

Aus dem Institut
für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

**Analyse der kodierenden Nukleotidsequenz des 1 Megadalton
extracellular matrix binding proteins von *Staphylococcus
epidermidis***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.),
vorgelegt beim Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

von

Philip Andreas Pehle

aus Düsseldorf

Hamburg 2009

Meiner Familie gewidmet, vor allem meinem viel zu früh verstorbenen Vater,
Robert

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 16.07.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr.H. Rohde

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

Prüfungsausschuss, 3.Gutachter/in: Prof. Dr. I. Sobottka

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung	6
1.1 Das Genus <i>Staphylococcus</i>	6
1.2 Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken	7
1.3 Biofilmbildung	10
1.4 Die Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i>	11
1.5 Die primäre Bindung von <i>S. epidermidis</i>	13
1.6 Die akkumulative Phase der <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung	15
1.7 Prävalenz Virulenz-assoziiierter Genorte in kommensalen und invasiven <i>S. epidermidis</i> Populationen	16
1.8 Alternative, PIA-unabhängige Mechanismen der <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung	18
1.9 Voraussetzungen für diese Arbeit	20
1.10 Ziele der Arbeit und Fragestellung	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Geräte	23
2.1.2 Chemikalien, Plastik- und Einwegartikel	24
2.1.3 Nährmedien	24
2.1.4 Lösungen und Puffer	26
2.1.5 Antibiotika	27
2.1.6 Enzyme	27
2.1.7 Reagenztests für molekularbiologische Standardverfahren	28
2.1.8 Bakterienstämme und Plasmide	29
2.1.9 Oligonukleotide	30
2.1.10 Datenbanken und Programme	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden	32
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	32

0	5	
3	Ergebnisse	41
3.1	Sequenzierung von <i>embp</i> in <i>S. epidermidis</i> Stamm 1585 und Stamm 1585 Ra	43
3.2	Analyse des <i>Embp</i> -Transkripts in <i>S. epidermidis</i> 1585-Ra mittels RACE-PCR	44
3.3	Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>Embp</i>	48
3.3.1	Analyse der Aminosäuresequenz bezüglich des Vorhandenseins von definierten Domänen	49
4	Diskussion	51
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	61
7	Anhang	78
7.1	Oligonukleotide zur <i>embp</i> -Sequenzierung	78
7.2	Abkürzungsverzeichnis	81
7.3	Danksagung	83
7.4	Lebenslauf	84
7.5	Publikationen	86
7.6	Erklärung	87

1 Einleitung

1.1 Das Genus *Staphylococcus*

Bei Staphylokokken handelt es sich um runde bis ovale grampositive, fakultativ anaerobe Kokken von 0,5 bis 1,5 µm Durchmesser. Betrachtet man Staphylokokken unter einem Lichtmikroskop dann stellen sie sich angeordnet in Haufen oder Trauben (griechisch staphyle=Traube) (Hof und Dörries, 2000) dar. Staphylokokken bilden keine Sporen, sie sind unbeweglich und besitzen das Enzym Katalase, welches die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O+O_2 katalysiert (Pfaller und Herwaldt 1988). Typische Habitats von Staphylokokken sind die Haut, die Hautanhangsdrüsen sowie die Schleimhäute vieler Säugetiere (Nobel und Naidoo, 1986; Nobel *et al.*, 1997). Das Genus *Staphylococcus* gehört neben den Gattungen *Micrococcus*, *Planococcus* und *Stomatococcus* zur Familie der *Micrococcaceae* (Schleifer *et al.*, 1986). Innerhalb dieser Familie werden große Unterschiede zwischen den einzelnen Gattungen bezüglich des G/C-Gehalts der chromosomalen DNA beobachtet. Die Gattungen *Staphylococcus* und *Planococcus* fallen durch einen relativ niedrigen G/C-Gehalt von 30 bis 39 % auf, wohingegen die Gattungen *Micrococcus* und *Stomatococcus* einen G/C-Gehalt von 66 bis 77 % aufweisen (Kloos, 1997; Wilkinson, 1997).

Derzeit lässt sich das Genus *Staphylococcus* durch biochemische, molekularbiologische und physiologische Untersuchungen in 43 unterschiedliche Staphylokokkenspezies einteilen. Da einige Staphylokokkenspezies zusätzlich weiter untergliedert werden können, sind bis heute insgesamt 64 Taxa bekannt (Kloos *et al.*, 1997; Kloos *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1998; Probst *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1999; Vernozy-Rozand *et al.*, 2000; Trulzsch *et al.*, 2002; Devriese *et al.*, 2003; Place *et al.*, 2003; Spargser *et al.*, 2003).

Durch den Nachweis einer Prothrombin-aktivierenden Plasmakoagulase ist es möglich, die beim Menschen vorkommenden Staphylokokken in Koagulase-positive und Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) einzuteilen (Sperber und Tatini, 1975). Die einzig bekannte Koagulase-positive, humanpathogene Staphylokokkenspezies ist *S. aureus*. Alle anderen Staphylokokkenspezies sind Koagulase-negativ (Kloos und Bannerman, 1994; Waldvogel *et al.*, 2000). Insgesamt kommen 14 der bekannten KNS beim Menschen,

typischerweise, als residente oder temporär residente Besiedlungsflora der Haut vor (Kloos und Bannerman, 1994; Kloos *et al.*, 1997).

Die höchste Populationsdichte von Staphylokokken mit über 10^3 – 10^6 CFU/cm² befindet sich an den Ausführungsgängen von Talg- und Schweißdrüsen sowie auf den Schleimhäuten von natürlichen Körperöffnungen (Kloos und Bannerman, 1994; Noble *et al.*, 1997). Nicht alle Staphylokokkenspezies kommen gleichmäßig an allen Stellen des Körpers vor. Einige von ihnen weisen eine deutliche Prävalenz bezüglich der besiedelten Körperregion auf. So besiedelt zum Beispiel *S. auricularis* lediglich den äußeren Gehörgang, *S. capitis* wurde fast ausschließlich auf der behaarten Kopfhaut isoliert und *S. haemolyticus* und *S. hominis* siedeln sich vor allem im Bereich apokriner Schweißdrüsen an. Andere Spezies werden ubiquitär auf der Körperoberfläche isoliert, wobei *S. epidermidis* die dabei am häufigsten isolierte Staphylokokkenspezies darstellt (Kloos und Bannerman, 1994; Kloos *et al.*, 1997; Noble *et al.*, 1997).

1.2 Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken

Das humannpathogene Potential von *S. aureus* ist schon sehr lange bekannt gewesen. Es ist für eine Vielzahl von unterschiedlichen Erkrankungen wie zum Beispiel Furunkel der Haut, Wundinfektionen, nekrotisierende Pneumonien, Endokarditen sowie für die Entstehung der Sepsis verantwortlich. Seine Fähigkeit zur Toxinbildung führt zu spezifischen Krankheitsbildern wie dem *Toxic-Shock-Syndrom* (TSS), dem *Staphylococcal Scaled Skin Syndrome* (SSSS) oder zu Lebensmittelintoxikationen (Waldvogel *et al.*, 2000; Peters und Pulverer, 2001). Im Gegensatz dazu wurden KNS lange Zeit als nicht humanpathogene, kommensale Bakterien der Haut eingestuft. Daher wurde ihr Nachweis in klinischen Isolaten regelhaft als Kontamination gewertet (Archer, 2000). Einzige Ausnahme bildete *S. saprophyticus*, der bereits früh als Erreger von Harnwegsinfektionen bei jungen Frauen bekannt war (Marrie *et al.*, 1982). Epidemiologische Untersuchungen in den letzten 25 Jahren haben jedoch gezeigt, dass auch KNS bei nosokomialen Infektionen als fakultativ pathogene Erreger von großer Bedeutung sind. Mittlerweile gehören sie zu den wichtigsten Verursachern von so genannten nosokomialen, im Krankenhaus-erworbenen Infektionen (Rupp *et al.* 1995; Mack *et al.* 2005; Ziebuhr *et al.* 2006). Der am häufigsten isolierte Erreger bei nosokomialen Infektionen durch KNS ist mit bis zu 94 % *S. epidermidis*. Seltener werden

auch andere Staphylokokkenspezies wie zum Beispiel *S. lugdonensis*, *S. capitis*, *S. °haemolyticus*, oder *S. warneri* isoliert (Kloos und Bannerman, 1994; Peters und Pulverer, 2001).

Typischerweise werden KNS im Rahmen einer spezifischen oder unspezifischen Immunsuppression als nosokomiale Sepsiserreger gefunden, zum Beispiel im Rahmen einer Chemotherapie, eines Tumorleidens, einer Knochenmarkstransplantation, bei Traumata, bei schweren Verbrennungen oder bei einer HIV-Infektion (Archer *et al.*, 2000; Wisplinghoff *et al.*, 2003). Auch für Frühgeborene auf neonatologischen Intensivstationen sind Infektionen durch KNS von Bedeutung. Zum einem werden sie sehr häufig bei Sepsis isoliert, zum anderen können sie sehr häufig zu Septikämien führen, wodurch sie das Mortalitätsrisiko für frühgeborene Kleinkinder erhöhen (Noel und Edelson 1984; Simpson *et al.* 1986; Jarvis, 1987; da Silva *et al.*, 2002). Als Ursache der hohen Inzidenz von Infektionen in diesen Patientenkollektiven, die durch KNS verursacht werden, wird maßgeblich die transiente Suppression der Opsonierungs- und Phagozytoseaktivität der zellulären Abwehr verantwortlich gemacht (Peters und Pulverer, 2001).

In über 75 % der Fälle treten *S. epidermidis* Infektionen jedoch im Zusammenhang mit implantierten Fremdmaterialien auf (Fidalgo *et al.*, 1990). Ihr breiter Einsatz in der modernen Medizin führt zu einem dramatischen Anstieg der Inzidenz von nosokomialer Sepsis und Fremdkörper-assoziierten *S. epidermidis* Infektionen. Vor allem Materialien, die in den Blutkreislauf des Patienten eingebracht werden, sind Ausgangspunkt von Septikämien. Typische klinische Konstellationen stellen implantierte arterielle-, periphere-, zentralvenöse Zugänge, Peritonealdialysekatheter, subkutan implantierte Portsysteme, Silikon, Liquorshunts, künstliche Herzklappen, Herzschrittmacher, Intraokularlinsen oder Gelenk- und Gefäßprothesen dar (Emori und Gaynes, 1993; Rupp und Archer, 1994; Kloos und Bannerman, 1994; Boyce *et al.*, 1997; Kloos *et al.*, 1997 Archer *et al.*, 2000).

Der klinische Verlauf einer Fremdkörper-assoziierten Infektion kann in zwei Verlaufsformen unterteilt werden. Vor allem Infektionen, durch Endoprothesen - wie künstliche Hüft- oder Kniegelenke - dienen als Beispiel für den typischen Verlauf. Die so genannte „*early onset*“-Infektion beginnt einige Tage bis wenige Wochen nach Einbringen des Fremdmaterials in den Körper. Die Bakterienbesiedlung des Fremdmaterials geht von der Hautflora des Patienten oder von der Hautflora des Operators während der interventionellen Maßnahme aus. Bei der so genannten „*late onset*“-Infektion treten die Krankheitssymptome erst im Verlauf von Monaten oder Jahren nach der Implantation des

Fremdmaterials auf. Bei der „late onset“-Infektion kann die Besiedlung des Fremdmaterials *per continuitatem* oder hämatogen erfolgen (Kloos und Bannerman, 1994). Trotz der bei Fremdkörperimplantationen regelhaft durchgeführten peri- und postoperativen Wundinfektionsprophylaxe stieg von 1980 bis 1989 die Zahl der durch KNS induzierten, nosokomialen Infektionen um das 1,5–8,5 fache (Baddour *et al.* 1990; Fidalgo *et al.*, 1990; Banerjee *et al.*, 1991; Schaberg *et al.*, 1991; Rupp und Archer, 1994). In einer Surveillance Studie des NNIS (*National Nosocomial Infections Surveillance System*) in den USA über einen Zeitraum von 1992 bis 1998 auf Intensivstationen konnte gezeigt werden, dass KNS bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen die mit Abstand häufigsten (39 %) der isolierten Erreger darstellten (Richards *et al.*, 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass KNS nach *S. aureus* die zweithäufigsten Infektionserreger von postchirurgischen Wundinfektionen waren.

Die Diagnostik einer Fremdkörper-assoziierten Infektion stellt sowohl den behandelnden Arzt als auch den Mikrobiologen gleichermaßen vor große Probleme. Bei der Keimisolierung aus dem Untersuchungsmaterial gilt es, zwischen dem Infektionserreger und der einfachen Kontaminante zu unterscheiden. Bei der Materialgewinnung kann es durch unsteriles Arbeiten dazu kommen, dass die Probe mit der menschlichen Hautflora kontaminiert wird und es dadurch erheblich schwerer wird, die isolierten Keime der normalen Hautflora oder einer möglichen Keimbesiedlung im Blut zuzuordnen. Studien haben gezeigt, dass 75 bis 90 % der isolierten KNS als Kontamination, durch Bakterien der normalen Hautflora zu betrachten sind (Weinstein *et al.*, 1983; Kirchhoff und Sheagren, 1985; Fidalgo *et al.*, 1990; Ringberg *et al.*, 1991; Kleeman *et al.*, 1993; Herwaldt *et al.*, 1996). Diese Beobachtungen haben zur Folge, dass man mehrere Blutentnahmen oder Abstriche aus dem Infektionsgebiet auch an unterschiedlichen Stellen durchführen muss, um die Aussagekraft einer Keiminfection erhöhen zu können (Burkhardt und Schaal, 1992).

Fremdkörper-assoziierte Infektionen präsentieren sich klinisch häufig als schwer therapierbare Infektionen, die häufig einen chronischen Verlauf zeigen. Die aus den Studien resultierende Konsequenz ist, dass man das implantierte Fremdmaterial entfernen muß, um eine endültige Sanierung des Infektionsherdes zu erreichen (Younger *et al.*, 1987; Götz und Peters, 2000). Die Möglichkeiten einer antibiotischen Therapie sind auf Grund von Resistenzen bestimmter Stämme gegen Antibiotika oftmals stark eingeschränkt. So findet man in bis zu 80 % der Keimisolate eine Resistenz gegen Methicillin. Resistenzen

gegenüber β -Lactam-Antibiotika finden sich in über 50 % der Isolate (Archer und Climo, 1994; Archer *et al.*, 2000). Die Antibiotikaresistenz ist ein weiterer Grund für den Anstieg der Inzidenz von nosokomialen Infektionen durch KNS.

Außerdem besitzen KNS einen weiteren entscheidenden Vorteil, der für sie eine natürliche Resistenz gegenüber Antibiotika und körpereigener Abwehr darstellt. Hierbei handelt es sich um die spezielle Organisationsform der Bakterien, zum einem bei der Anlagerung der Bakterien an das implantierte Fremdmaterial, zum anderen um die Anlagerung der Bakterien untereinander und um die Ausbildung eines mehrschichtigen Biofilms. Die Ausbildung eines mehrschichtigen Biofilms bietet den Bakterien vor allem *S. epidermidis* Schutz vor Effektormechanismen der angeborenen Immunität (Vuong *et al.*, 2004; Kristian *et al.*, 2008; Mack *et al.*, 2008) vor der humoralen Immunantwort (Cochrane *et al.*, 1988; Heinzelmann *et al.*, 1997; Knobloch *et al.*, 2002b; Costerton *et al.*, 2003, Cerca *et al.*, 2007) und vor allem vor Antibiotika (Knobloch *et al.*, 2002a). Biofilme stellen also eine Barriere dar, durch die manche Antibiotikawirkstoffe nur sehr schlecht hindurch diffundieren können. Da zudem die Bakterien innerhalb eines Biofilms sehr langsam wachsen, ist dieses ein weiter Grund für die Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotikaklassen (Costerton *et al.*, 1999; Knobloch *et al.*, 2002a).

1.3 Biofilmbildung

Die Biofilmbildung ist ein in der Natur weit verbreitetes Phänomen. Es bezeichnet eine Gemeinschaft von Mikroorganismen, die an einer Oberfläche gebunden sind und Mikrokolonien bilden (Abbildung 1A). Diese Mikrokolonien akkumulieren durch Zellaggregation und Einbettung in eine Exopolysaccharid-Matrix zu einem Biofilm (Stoodley *et al.*, 2002) (Abbildung 1B). Die Exopolysaccharid-Matrix wird von den Mikroorganismen selbst synthetisiert (Costerton *et al.*, 1999; O'Toole *et al.*, 2000). Bei einem Biofilm handelt es sich um ein komplexes Gebilde, welches den Bakterien günstige Lebensbedingungen und Schutz vor Umwelteinflüssen bietet (Costerton *et al.*, 2003). Diese Art des Wachstumsverhalten mit anschließender Ausbildung eines Biofilms wurde erstmalig von Henrici beschrieben (Henrici *et al.*, 1933). Er machte die Beobachtung, dass Süßwasserbakterien nicht planktonisch, sondern an eine Oberfläche gebunden wuchsen. Auch unterschiedliche Spezies können sich gemeinsam in einem Biofilm organisieren. Beispiele für gemischte Biofilme finden sind auf Zähnen, wo Streptokokken und anaeroben, gramnegativen Bakterien gemeinsam Biofilmkonsortien ausbilden.

Pseudomonas aeruginosa und *Burkholderia cepacia* können gemeinsam in die Lunge von Patienten mit zystischer Fibrose persistieren, dort gemeinsam einen Biofilm ausbilden und so therapieresistente Pneumonien hervorrufen (Costerton *et al.*, 1999).

1.4 Die Biofilmbildung von *S. epidermidis*

Die enge Assoziation zwischen der Implantation von Fremdmaterialien und Infektionen durch *S. epidermidis* legten die Vermutung nahe, dass *S. epidermidis* über spezielle Fähigkeiten verfügen muß, die die Besiedlung an die Polymeroberflächen von Fremdmaterial begünstigen. Durch frühe elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *S. epidermidis* in Form von festhaftenden, mehrlagigen Bakterienkonsortien auf *ex vivo* gewonnen Venenkathetern organisiert sind. Hierbei zeigte sich, dass die Bakterienzellen in einer amorphen extrazellulären Matrix eingebettet sind. 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, ist heute der Begriff Biofilmbildung gebräuchlich (Hussain *et al.* 1993; Mack *et al.* 2000a). Die Fähigkeit von *S. epidermidis*, einen mehrlagigen Biofilm auf Polymeroberflächen von implantierten Fremdkörpern auszubilden, ist der entscheidende Pathogenitätsfaktor bei der Entstehung von Katheter-assoziierten Infektionen (Christensen *et al.*, 1983; Inman *et al.*, 1984; Dunne *et al.*, 1987).

Fast alle *S. epidermidis* Stämme können sich an Polymeroberflächen von Fremdmaterialien binden. Jedoch ist die Fähigkeit zur anschließenden Akkumulation und damit zur Biofilmbildung unterschiedlich ausgeprägt, so dass sich *S. epidermidis* Stämme bezüglich der Quantität des produzierten Biofilms unterscheiden (Pascual *et al.*, 1986; Hogg *et al.*, 1986; Esperson *et al.*, 1990; Muller *et al.*, 1993). Christensen und Mitarbeiter etablierten einen *in-vitro*-Test in Flüssigkulturröhrchen, mit dem es möglich war, die Biofilmbildung semi-quantitativ beurteilen zu können (Christensen *et al.*, 1982). Dieser so genannte Biofilm-Assay hat entscheidend zum Verständnis bei der Entstehung von *S. epidermidis* Biofilmen beigetragen.

Verschiedene epidemiologische Studien haben gezeigt, dass es enge Verbindungen zwischen der klinischen Relevanz eines *S. epidermidis*-Isolates und dessen Fähigkeit zur Biofilmbildung gibt. So finden sich signifikant häufiger biofilmpositive Stämme bei

Fremdkörper-assoziierten Infektionen, als biofilmbegative Stämme (Christensen *et al.*, 1983; Ishak *et al.*, 1985; Davenport *et al.*, 1986; Dunne *et al.*, 1987; Deighton und Balkau, 1990; Ziebuhr *et al.*, 1997). In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass es einen engen Zusammenhang zwischen der Virulenz der Erreger und ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung gibt (Rupp *et al.*, 1999a; Rupp *et al.*, 1999b; Rupp *et al.*, 2001). Weitere Arbeiten belegen, dass es bei Infektionen mit biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen signifikant häufiger zu einem antibiotischen Therapieversagen kommt als bei Infektionen, die durch biofilmbegative *S. epidermidis*-Stämme verursacht werden (Davenport *et al.*, 1986; Diaz-Mitoma *et al.*, 1987; Younger *et al.*, 1987). Durch all diese Arbeiten wird deutlich, dass die Fähigkeit von *S. epidermidis* zur Biofilmbildung der entscheidende Pathogenitätsfaktor bei der Entstehung von Fremdkörper-assoziierten Infektionen ist.

Die Biofilmbildung von *S. epidermidis* weist typischerweise eine Zweiphasenkinetik auf (**Abbildung 1B**). In der schnell verlaufenden primären Bindungsphase kommt es zur Adhäsion der Bakterien an die Polymeroberfläche von implantierten Fremdmaterialien. Die Adhäsion wird durch unspezifische und spezifische Faktoren beeinflusst (Mack *et al.*, 2006) (**Tabelle 1**). Es folgt die länger dauernde Phase der Akkumulation und Proliferation. In dieser sekundären Phase organisieren sich die Zellen zu einem mehrschichtigen Biofilm, wobei die Mehrzahl der Bakterienzellen keinen direkten Kontakt zu der Polymeroberfläche besitzen (Mack *et al.*, 2004). Eine schematische Darstellung der Biofilmbildung ist in **Abbildung 1** zu sehen.

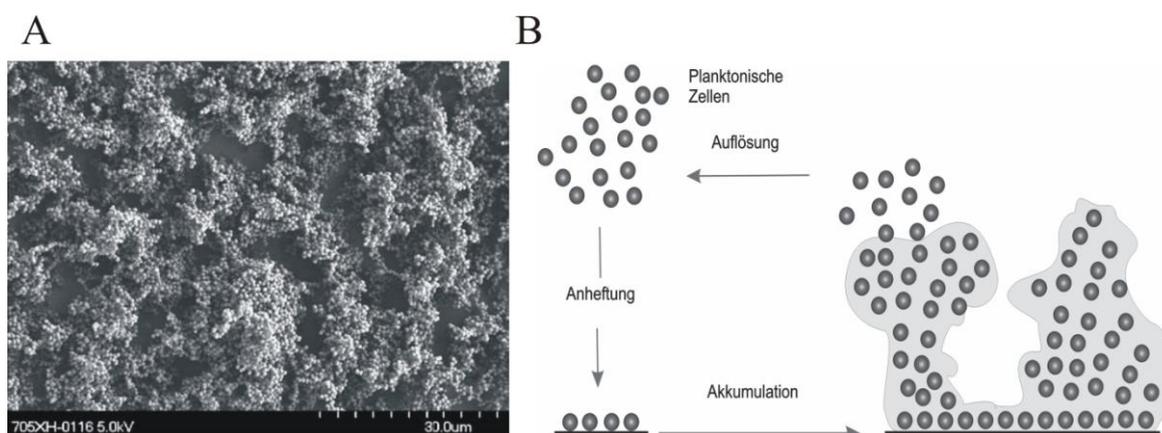


Abbildung 1: Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457. (A): Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines *S. epidermidis* 1457 Biofilms, der sich nach 18 h Inkubation auf Edelstahl gebildet hat. Aufnahme von Harris und Richards 2004. **(B): Schematische Darstellung des Modells der Biofilmbildung von *S. epidermidis*** (Mack *et al.* 2005). Es zeigt den zweiphasigen Verlauf. Während der primären Bindung kommt es zur Adhärenz an die Polymeroberfläche des Fremdmaterials. In der zweiten Phase kommt es durch Zellakkumulation zur Bildung eines mehrschichtigen Biofilms, in dem die meisten Bakterienzellen keinen direkten Kontakt mehr zur Polymeroberfläche besitzen.

1.5 Die primäre Bindung von *S. epidermidis*

In der primären Phase der Adhäsion lagert sich *S. epidermidis* an die Polymeroberflächen von implantierten Fremdmaterialien an. Die primäre Adhäsion ist abhängig von einer Reihe unspezifischer Faktoren wie die Beschaffenheit der Polymeroberflächen, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Interaktionen zwischen Polymer- und Bakterienoberfläche (Ludwicka *et al.*, 1984; Høgt *et al.* 1986; Pascual *et al.*, 1986; Jansen *et al.*, 1989; Flier and Verhoef, 1999; Mack *et al.*, 2001). Vor allem *in vivo* spielen zusätzlich Interaktionen mit wirtseigenen Proteinen, wie zum Beispiel Albumin, Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen und Vitronectin eine Rolle, denn diese werden bereits kurz nach Implantation in großen Mengen auf der artifiziellen Oberfläche abgelagert (Vandaux *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1993; Kloos and Bannermann, 1994; Esperson *et al.*, 1994).

In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl spezifischer Faktoren beschrieben werden, die durch Vermittlung der Bindung an diese Proteine an der primären Adhäsion von *S. epidermidis* beteiligt sind (**Tabelle 1**) So wurde das Kapselpolysaccharid/Adhäsion (*capsular polysaccharide/adhesin*, PS/A) als funktioneller Faktor für die Bindung von

S. epidermidis an Silikonkathetern beschrieben (Muller *et al.*, 1991; Tojo *et al.*, 1998; Higashi *et al.*, 1998).

Das *S. epidermidis* Autolysin E (AtlE) vermittelt die Bindung an das extrazelluläre Matrixprotein Vitronectin und an Polystyroloberflächen (Heilmann *et al.*, 1996; Heilmann *et al.*, 1997). Daneben vermittelt das Autolysin/Adhäsion (Aae) eine Bindung an Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin (Heilmann *et al.*, 2003).

Das *S. epidermidis* Oberflächenprotein 1 (*Staphylococcal surface protein*, Ssp 1) findet sich in einer Fimbrien-ähnlichen Struktur auf der Zelloberfläche und vermittelt die Bindung an Polystyrol (Timmerman *et al.*, 1991; Veenstra *et al.*, 1996). Auch konnte ein spezifisches, Fibrinogen-bindendes Protein (*fibrinogene binding proteine*, Fbe) identifiziert werden (Nilsson *et al.*, 1998; Pei *et al.*, 1999; Hartford *et al.*, 2001; Pei and Flock, 2001) Die Interaktion von *S. epidermidis* mit Fibronectin hingegen wird vermutlich durch das extrazellulär bindende Oberflächenprotein Embp (*extracellular matrix binding protein*, Embp) vermittelt (Williams *et al.*, 2002). Bei dieser Interaktion scheinen zusätzlich Teichonsäuren beteiligt zu sein (Hussain *et al.*, 2001). Für die extrazelluläre *S. epidermidis* Lipase (GehD) konnte gezeigt werden, dass diese zusätzlich als Zellwand-assoziiertes Kollagen-Adhäsion fungiert (Bowden *et al.*, 2002).

Die bekannten spezifischen Faktoren für die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* an Polymeroberflächen von Fremdmaterialien sind in der **Tabelle 1** zusammengefasst.

Tabelle 1: Spezifische Adhäsionsfaktoren von *S. epidermidis*

Adhäsionsfaktor	Oberfläche	Referenz
Fibrinogenbindendes Protein (Fbe)	Fibrinogen	(Nilsson <i>et al.</i> , 1998; Pei <i>et al.</i> , 1999 ; Hartford <i>et al.</i> , 2001)
Autolysin E (AtlE)	Polystyrol	(Heilmann <i>et al.</i> , 1996; Heilmann <i>et al.</i> , 1997)
<i>Staphylococcal surface protein</i> (Ssp-1)	Polystyrol	(Timmermann <i>et al.</i> , 1991; Veenstra <i>et al.</i> , 1996)
Kapsuläres Polysaccharid/Adhäsion (PS/A)	Silikonkatheter	(Muller <i>et al.</i> , 1991; Higashi <i>et al.</i> , 1998; Tojo <i>et al.</i> , 1998)
Embp	Fibronectin	(Williams <i>et al.</i> , 2002)

1.6 Die akkumulative Phase der *S. epidermidis* Biofilmbildung

Die akkumulative Phase der Biofilmbildung verläuft im Vergleich zur primären Adhäsionsphase langsamer. In der sekundären Phase formiert sich der mehrschichtige Biofilm, in dem nur die wenigsten Zellen im direkten Kontakt zu der Polymeroberfläche der implantierten Fremdmaterialien stehen (**Abbildung 1B**). Somit sind solche Faktoren, die die Adhäsion der Zellen in einem Biofilm untereinander vermitteln, eine wesentliche Voraussetzung für die Ausbildung der komplexen Biofilmstruktur.

Als ein wichtiger Faktor im Prozess der interzellulären Adhäsion wird das interzelluläre Polysaccharidadhäsion *polysaccharide intracellulare adhesin* (PIA) beschrieben (Mack *et al.* 1992; Mack *et al.* 1996b). PIA wird durch die Genprodukte des vier Gene umfassenden *icaADBC* Lokus (*intercellular adhesion ADBC*) synthetisiert. Das *icaADBC*-Operon besteht aus vier, in gleicher Transkriptionsrichtung organisierten Genen, dem *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* (Heilmann *et al.*, 1996; Gerke *et al.*, 1998), dessen Genprodukte PIA synthetisieren. Dem *ica*-Operon ist das Gen *icaR* vorgelagert, welches als Repressor fungiert (Conlon *et al.*, 2002). Die Funktion von *IcaA* entspricht der einer N-Acetylglucosaminyltransferase, welches die Anwesenheit von *IcaD* benötigt, um volle Aktivität entfalten zu können (Gerke *et al.*, 1998). *IcaB* hat die Funktion einer Deacetylase, es wird sekretiert und findet sich im Kulturüberstand (Vuong *et al.*, 2004a). *IcaC* ist ein Transmembranprotein, das am Export von PIA beteiligt ist (Heilmann *et al.*, 1996). 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).

Mittels Ionenaustauschchromatographie lässt sich PIA in die zwei unterschiedlichen Fraktionen, PIA I und PIA II auftrennen, wobei PIA I mehr als 80 % der Gesamtmenge ausmacht (Mack *et al.*, 1996a; Mack *et al.*, 1996b) Durch eine NMR-Spektroskopie und durch chemische Analysen konnte PIA I als ein lineares Homoglykan, das aus durchschnittlich 130 β -(1,6)-verknüpften 2-Desoxy-2-amino-D-glukopyranosyl-Einheiten besteht, charakterisiert werden. Im Durchschnitt sind 15 bis 20 % der Zuckereinheiten nicht-acetyliert und dadurch positiv geladen. Die positive Ladung ist ein wichtiger Aspekt für die Funktionalität von PIA I (Mack *et al.*, 1996a). PIA II ist strukturell sehr eng mit PIA I verwandt, wobei in PIA II durchschnittlich mehr Glukosamin-Reste acetyliert sind.

Zudem enthält PIA II noch Phosphat und Ester-gebundenes Succinat, wodurch es einen anionischen Charakter bekommt (Mack *et al.*, 1996a; Vuong *et al.*, 2004a).

Die Bedeutung von PIA für die akkumulative Phase der Biofilmbildung konnte auf Grund einer linearen Korrelation zwischen biofilmpositivem Phänotyp und PIA-Produktion in einer Population von 179 *S. epidermidis* Stämmen gezeigt werden (Mack *et al.*, 1996b).

In durchgeführten Experimenten in zwei Tiermodellen konnte die Bedeutung von PIA als Virulenzfaktor bei der Entstehung von Fremdkörper-assoziierten Infektionen gezeigt werden. Dafür wurden in einem Maus- und einem Rattenmodell der biofilmpositive, PIA-exprimierende Stamm *S. epidermidis* 1457 und die isogene biofilm- und PIA-negative Mutante 1457 M10 verwendet. In beiden Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass der Wildstamm *S. epidermidis* 1457 signifikant häufiger Infektionen induziert und seltener durch wirtseigene Abwehr eradiziert werden konnte als die isogene Mutante 1457 M10 (Rupp *et al.* 1999a; Rupp *et al.* 1999b). Vergleichbar konnte kürzlich demonstriert werden, dass eine PIA-negative Mutante des Stamms *S. epidermidis* 9142 im *C. elegans*-Modell Virulenz-attenuiert war (Begun *et al.*, 2007).

Das *icaADBC*-Operon konnte auch in anderen Staphylokokken-Spezies, wie zum Beispiel, *S. aureus* und *S. caprae* gefunden werden (Cramton *et al.* 1999; McKenney *et al.* 1998; Allignet *et al.* 2001). Gleichzeitig wurden homologe DNA-Sequenzen in zahlreichen anderen Koagulase-negativen Staphylokokken nachgewiesen (Moretro *et al.* 2003; Nielsdotter-Augustinsson *et al.*, 2007).

1.7 Prävalenz Virulenz-assoziiierter Genorte in kommensalen und invasiven *S. epidermidis* Populationen

Studien, die die Verbreitung von Virulenzfaktoren in verschiedenen *S. epidermidis* Populationen untersuchten, konnten belegen, dass bei schwerwiegenden Infektionen eine wesentlich höhere Prävalenz von *icaADBC*-positiven Stämmen vorliegt als bei kommensalen *S. epidermidis* Stämmen (Ziebuhr *et al.*, 1997; Frebourg *et al.* 2000; Galdbart *et al.* 2000). Dies führte zur Schlussfolgerung, dass *icaADBC*-negative Stämme als apathogen zu betrachten sind (Zhang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2005). Die Detektion von *icaADBC* sollte als Marker zur Unterscheidung von invasiven, also humanpathogen und Besiedlungs-Stämmen, die apathogen wären, genutzt werden (Ziebuhr *et al.*,

1996; Frebourg *et al.*, 2000; Galdbart *et al.* 2000; Montanaro *et al.*, 2007). Allerdings konnten in weiteren Untersuchungen an exakt definierten Bakterienpopulationen gezeigt werden, dass die Prävalenz von *icaADBC* bei kommensalen Stämmen hospitalisierter Patienten nach Knochenmarkstransplantation ähnlich hoch war wie in Blutkulturisolaten, die während einer Katheter-assoziierten Infektion isoliert wurden (Rohde *et al.* 2004). Die Ursache hierfür liegt vermutlich in einem erhöhten Selektionsdruck durch den Gebrauch von Antibiotika und Desinfektionsmittel, der letztlich zur Selektion resistenter kommensaler Staphylokokkenpopulationen führt (Hoiby *et al.*, 1997).

Von besonderer Bedeutung sind Studien, die bei Isolaten von infizierten Endoprothesen nur bei der Hälfte der isolierten *S. epidermidis* Stämme *icaADBC* nachweisen konnten (Frank *et al.*, 2004; Rohde *et al.*, 2007; Koskela *et al.*, 2008). Auch in anderen Bakterienpopulationen konnte eine ähnlich niedrige Prävalenz von invasiven *icaADBC*-positiven *S. epidermidis* Stämmen gefunden werden (da Silva *et al.*, 2002; Klug *et al.* 2003; Klingenberg *et al.*, 2007). Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass *icaADBC* keine unabdingbare Voraussetzung für die Etablierung einer persistierenden, Fremdkörper-assoziierten Infektion durch *S. epidermidis* ist.

Hinweise hierfür ergeben sich auch durch unabhängig von einander durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen. Diese zeigen, dass in definierten Tiermodellen unter *icaADBC*-negativen Mutanten keine Virulenzminderung im Vergleich zu den isogenen, *icaADBC*-positiven Stämmen aufweisen (Francois *et al.*, 2003; Kristian *et al.*, 2004). Diese Befunde weisen deutlich darauf hin, dass es PIA-unabhängige Faktoren geben muss, welche bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung und einer daraus resultierenden Fremdkörper-assoziierten Infektionen beteiligt sind. Neuere Studien zeigen, dass PIA als interzelluläres Adhäsion durch Proteine funktionell ersetzt werden kann (Rohde *et al.*, 2005; Rohde *et al.*, 2007). Darüber hinaus muss hervorgehoben werden, dass *icaADBC* und PIA möglicherweise für die Besiedlung der Haut gesunder Menschen entbehrlich ist (Rogers *et al.*, 2008).

1.8 Alternative, PIA-unabhängige Mechanismen der *S. epidermidis* Biofilmbildung

Neben PIA spielen weitere, Polysaccharid-unabhängige Faktoren eine Rolle bei der *S. epidermidis* Biofilmmakkumulation. Durch Behandlung von *S. epidermidis* Biofilmen mit DNase, Protease, sowie Perjodat-Oxidation konnte gezeigt werden, dass Zellwandproteine, Teichonsäuren und extrazelluläre DNA eine Rolle bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung spielen (Rohde *et al.*, 2005; Chaigon *et al.*, 2007; Rohde *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2007).

Das erste näher untersuchte Protein mit interzellulär adhäsiven Eigenschaften ist das Akkumulation assoziierte Protein (*accumulation associated protein*, Aap), welches durch eine Mitomycin Mutagenese des Stammes *S. epidermidis* RP62A identifiziert werden konnte (Schumacher-Perdreau *et al.*, 1994). Bei Aap handelt es sich um ein interzelluläres Adhäsion, das an der akkumulativen Phase der Biofilmbildung beteiligt ist (**Abbildung 1A**) und PIA in dieser Phase funktionell ersetzen kann. Aap ist ein 220 kDa großes Protein, welches aus zwei Domänen besteht und in Form von fibrillären Strukturen auf der *S. epidermidis* Oberfläche lokalisiert ist (Banner *et al.*, 2007). Die Aap Domäne-A zeigt Homologien zum Oberflächenprotein *SasG* von *S. aureus* (Roche *et al.*, 2003; Corrigan *et al.*, 2007). Die Aap Domäne-B ist 140 kDa groß und vermittelt interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung (Rohde *et al.*, 2005; Conrady *et al.*, 2008). Die Domäne-B besteht aus fünf repetitiven Sequenzen, die jeweils 128 Aminosäuren lang sind (Bateman *et al.*, 2005). Nur durch proteolytische Spaltung des nativen Aap erlangt die Domäne-B ihre Funktionsfähigkeit (Hussain *et al.*, 1997; Rohde *et al.*, 2005). Hierbei spielen zum einem Zink-abhängige, homotype Aap-Interaktionen eine Rolle (Conrady *et al.*, 2008), zum anderen scheinen jedoch auch heterotype Wechselwirkungen der Aap Domäne-B mit unabhängigen Zellwandstrukturen beteiligt zu sein (Rohde *et al.*, 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass Stämme, die *aap* exprimieren können, mehr Biofilm bilden als *aap*-negative Stämme (Hussain *et al.*, 1997; Stevens *et al.*, 2007). In einem Meerschweinchen-Tiermodell konnten Fremdkörper-assoziierte Infektionen mit einer *aap*-negativen Mutante erfolgreicher eradiziert werden als Infektionen mit dem *aap*-positiven Wildtypstamm (Schwank *et al.*, 1998). Neuere Studien belegen die funktionelle Bedeutung von *aap* für die Biofilmbildung durch *S. epidermidis* durch Verwendung von spezifischen Antisera (Sun *et al.*, 2005; Rohde *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2007). Als Pathogenitätsfaktor

für die Entstehung einer chronischen Mastitis bei Rindern, die durch *S. aureus* verursacht wurde, konnte das Biofilm assoziierte Protein (*biofilm associated protein*, Bap) isoliert werden. Bap ist ein 2276 Aminosäuren großes, Zellwand-assoziiertes Protein, welches an der primären Bindung, an der interzellulären Adhäsion und damit an der Biofilmbildung beteiligt ist (Cucarella *et al.*, 2001; Ubeda *et al.*, 2003). Bei humanen *S. aureus* Isolaten konnte das *bap* bis heute nicht gefunden werden. Durch Homologierecherche konnte ein *bap*-Homolog in *S. epidermidis* RP62A identifiziert werden. Dieses Molekül wird als Bap homologes Protein (*Bap homologue protein*, Bhp) bezeichnet. Das kodierende Gen *bhp* war im Kontext von Katheter-assoziierten Infektionen in weniger als 10 % der *S. epidermidis* Isolate nachweisbar (Rohde *et al.*, 2004). In Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *bhp* in zwei klinischen *S. epidermidis* Stämmen die Fähigkeit zur Biofilmbildung nicht beeinflusste. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Funktion von Bhp für die Biofilmbildung durch andere Determinanten ersetzt werden kann (Lasa und Penades, 2006).

Eine große Bedeutung für die Einschätzung der relativen klinischen Relevanz von einzelnen interzellulären Adhäsinen besitzt die Tatsache, dass viele klinisch signifikante *S. epidermidis* Isolate parallel die genetische Information für mehrere dieser Faktoren aufweisen (Vandecasteele *et al.*, 2003; Rohde *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2005). Zum einen ist es daher möglich, dass verschiedenen Mechanismen in unterschiedlichen Infektionssituationen relevant werden (Rohde *et al.*, 2007), oder es ist zum anderen möglich, dass die Mechanismen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der Infektion genutzt werden können (Vandecasteele *et al.*, 2003).

1.9 Voraussetzungen für diese Arbeit

Die Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeit beschäftigten sich mit dem *S. epidermidis* Stamm 1585. Dieser Stamm war aus Blutkulturen eines Patienten mit einer Portkatheter-assoziierten Sepsis isoliert worden. Durch Verwendung spezifischer Primer konnte bewiesen werden, dass der *S. epidermidis* Stamm 1585 *icaADBC* und *aap*-negativ ist. Durch weitere Experimente stellte sich heraus, dass *S. epidermidis* 1585 keinen Biofilm bilden konnte (Rohde *et al.*, 2004; Rohde *et al.*, 2005).

Durch eine Langzeitbiofilmkultur konnte eine biofilmpositive Subpopulation dieses *S. epidermidis* Stammes angereichert werden, welcher als *S. epidermidis* 1585-Ra bezeichnet wurde. Hierdurch konnte die grundsätzliche Fähigkeit von *S. epidermidis* 1585 zur Biofilmbildung gezeigt werden. Im Vergleich zum biofilmmnegativen Stamm *S. epidermidis* 1585 wies 1585-Ra keinen Unterschied hinsichtlich der Fähigkeit zur primären Adhäsion an unbeschichtete Polymeroberflächen auf (Christner *et al.*, 2009). Dies deutet darauf hin, dass die Fähigkeit von *S. epidermidis* 1585-Ra zur Biofilmbildung auf der Expression interzellulär-adhäsiver Mechanismen beruhen muss. Vorläufige Untersuchungen zeigten, dass diese Protein-abhängig sind. Um nun die an der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1585-Ra funktionell beteiligten Strukturen identifizieren zu können, wurde eine Transposonmutagenese durchgeführt. Unter Verwendung des Transposons pTV1ts (Yougmann *et al.*, 1983; Shaw und Clewell, 1985) wurden über 3500 Tn917-Mutanten isoliert und bezüglich ihres Biofilmphänotyps untersucht. Es konnten zwei biofilmmnegative Mutanten, M84 und M135, identifiziert werden (**Abbildung 2**). Bei diesen beiden Mutanten konnte eine Insertion des Transposons in einem 30612 bp großen, offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) gefunden werden. Dieser kodiert für das putative 1 MDa Embp (*extracellular matrix binding protein*, Embp) (Williams *et al.*, 2002). Embp wurde bislang Fibronectin-bindende Aktivität zugesprochen.

In einer quantitativen *real-time* PCR konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *embp* im biofilmpositiven Stamm *S. epidermidis* 1585-Ra um das 123-fache höher war als im Wildtypstamm *S. epidermidis* 1585. Gemeinsam mit den Daten der Transposonmutagenese macht dies deutlich, dass der biofilmpositive Phänotyp von *S. epidermidis* 1585-Ra auf der Expression von *embp* beruhen muss. Erstaunlicherweise konnte diese Hochregulation nur unter Verwendung von Primern im Bereich jenseits des Nukleotids

18000 der kodierenden Sequenz gefunden werden (**Abbildung 2**), während die Verwendung eines 5' gelegenen Primerpaars *embpreal1* (**Abbildung 2**) keine Veränderung der *embp*-Transkription zeigte.

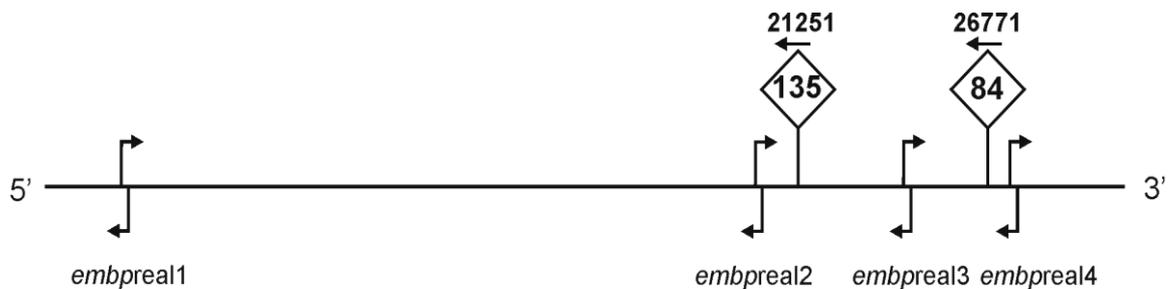


Abbildung 2: Schematische Übersicht über *embp* und die Lokalisation von Transposoninsertionen in den Mutanten M84 und M135. Die Insertionen sind jeweils im hinteren Drittel von *embp* lokalisiert. Zahlen geben die jeweilige Nukleotidposition an, der Pfeil zeigt die Transkriptionsrichtung des auf Tn917 lokalisierten *ermB*-Gens an. In *S. epidermidis* 1585-Ra konnte in quantitativen *real time* PCR-Experimenten, unter Verwendung der Primerpaare *embpreal2*, 3 und 4 eine Hochregulation von *embp* im Vergleich zu *S. epidermidis* 1585 gefunden werden. Die quantitative Analyse der *embp*-Transkription von *S. epidermidis* 1585 und -Ra mit Primerpaar *embpreal1* zeigte keine Unterschiede. Die schematische Übersicht ist nicht maßstabsgetreu.

1.10 Ziele der Arbeit und Fragestellung

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist der entscheidende Pathogenitätsfaktor von *S. epidermidis*. Epidemiologische Daten haben gezeigt, dass an der Biofilmbildung nicht nur, wie bislang angenommen, ausschließlich Polysaccharide - wie PIA - beteiligt sind, sondern, dass auch Proteinfaktoren eine interzelluläre Adhäsion und Biofilmmakkumulation vermitteln können. Die Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass *embp* ein wichtiger Faktor für die Entstehung von *S. epidermidis* Biofilmen sein könnte.

Die Befunde der oben beschriebenen Transkriptionsanalyse von *embp* lassen die Vermutung zu, dass *embp* im Stamm *S. epidermidis* 1585-Ra nicht in einem, sondern in mindestens zwei getrennten offenen Leserahmen (*open reading frames*, ORF), mit jeweils unabhängiger Regulationskontrolle organisiert ist. Hierzu passt auch die Beobachtung, dass alle zu einem biofilmnegativen Phänotyp führenden Transposoninsertionen im distalen Drittel des Gens *Emb p* gefunden wurden.

Durch die Sequenzanalyse der *embp*-Allele in dem biofilm- und *embp*-negativen Stamm *S. epidermidis*°1585 und dem biofilmpositiven, *embp*-exprimierenden Stamm *S.°epidermidis* 1585-Ra sollte daher geklärt werden, ob es durch größere strukturelle Alterationen zu einer Hochregulation des Gens in *S. epidermidis* 1585-Ra gekommen ist. Zudem sollte durch eine *in silico*-Analyse, der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Proteinsequenz geklärt werden, ob es einen strukturellen Anhalt für die Funktion von *Emb p* als ein interzelluläres Adhäsion gibt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Laborgerät	Hersteller
Biofuge pico Tischzentrifuge	Heraeus-Christ, Osterode, Deutschland
Brutschrank 5050E	
Cryofuge 6-6 Kühlzentrifuge	
Certoat BS-1	Sartorius, Hanau, Deutschland
CEQ™ 8000 Sequenzer	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Eppendorfszentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektroporator Gene-Pulser® II,	BioRad, Hercules, USA
Feinwaage	Leitz, Wetzlar, Deutschland
GelCam Photodokumentationssystem	Phase, Lübeck, Deutschland
	BioRad, Hercules, USA
Gelelektrophoresekammern, horizontal	Kreutz Laborgeräte, Hamburg, Deutschland
	Invitrogen, Carlsbad, USA
	BioRad, Hercules, USA
Gelkammern	BioRad, München, Deutschland
Heizbad 1083,GFL	AD Krauth, Hamburg, Deutschland
J2-21 Kühlzentrifuge	Beckmann, München, Deutschland
Küvetten Quarz Spectrophotometer	BioRad, Hercules, USA
Cell	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Lab-Shaker Schüttelinkubator	MWG, Biotech, München, Deutschland
MWG-Biotech Primus 96 plus	Heraeus-Christ, Osterode, Deutschland
Multifuge 1.0 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mastercycler gradient	BioRad, München, Deutschland

PowerPac 3000 Power Supply	BioRad, Hercules, USA
Photometer Smart Spec™3000	BioRad, Hercules, USA
Photometer GeneQuant	New Brunswick Scientific Co., USA
Schüttelinkubator	Beckmann, München, Deutschland
Spectrophotometer 34	Behring, Marburg, Deutschland
Spectrophotometer ELISA Processor II	BioRad, München, Deutschland
SmartSpec Plus Spectrophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer 5436	Kleinfeld, Mannheim, Deutschland
Thermostat BT 100	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Tischzentrifuge Rotana	Branson, Danbury, USA
Ultraschallzerkleinerer Digital Sonifier	Mettler, Giessen, Schweiz
Waagen PC 4400	

2.1.2 Chemikalien, Plastik- und Einwegartikel

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma (Taufkirchen, Deutschland) in *pro analysi* Qualität bezogen. Die Plastikartikel und Einwegmaterialien stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Becton Dickinson (Cockeysville, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) Greiner (Nürtingen, Deutschland) und Nunc (Roskilde, Dänemark).

2.1.3 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden in vollentionisiertem Wasser (VE) angesetzt und durch Erhitzen (15 min, 121 °C, 3,0 bar) in einem Dampfautoklaven sterilisiert. Zur Herstellung von Festmedien wurde den Flüssigmedien, soweit nicht anders erwähnt, 15 g/l Bacto®-Agar (Difco, Detroit, USA) hinzu gegeben. Die verwendeten Grundsubstanzen und die fertigen Trockenmedien wurden, sofern nicht gesondert angegeben von den Firmen Becton Dickinson (Cockeysville, USA) Difco (Detroit, USA) oder Oxoid (Basingstoke, England) bezogen.

BHI-Agar:

30 g/l Brain Heart Infusion Broth

2 g/l Bacto-Agar

Blut-Agar:

42 g/l Columbia-Agar

1 g/l Bacto-Agar

2,2 g/l Glukose

72 ml/l Schafsblut

Einfriermedium:

100 ml 1,5 % (wt/vol) Bacto-Pepton

60 ml Glycerin 87%

Die Bestandteile wurden getrennt autoklaviert und anschließend zusammengefügt.

Luria-Bertani-Medium (LB):

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

Gegebenenfalls wurden dem Medium 15g/l Bacto-Agar zugefügt.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):

8 g/l NaCl

0,20 g/l KCl

1,44 g/l Na_2HPO_4

0,24 g/l KH_2PO_4

pH 7,4

SOC-Medium:

20 g/l Trypton

5 g/l Hefeextract

0,6 g/l NaCl

0,5 g/l KCl

20 mM Glucose

20 mM Mg²⁺

pH 7,0

Trypton Soja Brühe (TSB):

30 g/l TSB (Becton Dickinson)

ph 7,3

2.1.4 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden, sofern nicht anders angegeben, in vollentionisiertem (VE) Wasser angesetzt und in einem Dampfautoklaven (15 min, 121 °C, 3,0 bar) sterilisiert.

DNA-Gelladepuffer:

0,25 % [wt/vol] Bromphenolblau

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

15 % [wt/vol] Ficoll

Die Lösung wurde ohne Sterilisation verwendet.

Ethidiumbromid-Stammlösung:

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

Na-Acetat Lösung:

3M Na-Acetat

pH 7,0

5x TBE-Puffer:

54 g/l Tris

27,5 g/l Borsäure

20 ml/l (0,5 mM) EDTA

pH 8,0

TBE wurde ohne Sterilisation verwendet.

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

pH 8,0

X-Gal-Lösung40 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid in Dimethylformamid**2.1.5 Antibiotika**

Zur Selektion wurden die Medien mit unterschiedlichen Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen supplementiert (**Tabelle 3**). Sämtliche Antibiotika wurden bei Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Tabelle 3: Verwendete Antibiotika-Stammlösungen

Antibiotika	Stammlösung
Ampicillin	100 μ g/ml in 80% [v/v] Ethanol, Aliquots gelagert bei -20 °C
Kanamycin	50 μ g/ml in 95% [v/v] Ethanol, Aliquots gelagert bei -20 °C

2.1.6 Enzyme**Tabelle 4: Verwendete Enzyme**

Enzym	Hersteller
RNase (DNase frei)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim, Deutschland
<i>EcoRI</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.7 Reagenztests für molekularbiologische Standardverfahren

Die angegebenen Reagenziensets sind in der (Tabelle 5) zusammengefasst. Sie wurden von den Firmen Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Finnzymes (Espoo, Finnland), Invitrogen (Carlsbad, USA), Qiagen (Hilden, Deutschland) und Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen.

Tabelle 5: Verwendete Reagenztests und die Hersteller

Standardverfahren	Hersteller
DNA-Extraktion aus Zellen	QIAamp [®] DNA Mini Kit (Qiagen)
DNA-Extraktion aus Agarosegelen	QIAquick [®] Gel Extraction Kit (Qiagen)
Klonierung	TOPO TA [®] Cloning Kit (pCR4-TOPO Vektor) mit TOP10 chemisch kompetenten <i>E.coli</i> (Invitrogen)
Plasmidpräparation	QIAprep [®] Spin Miniprep Kit (Qiagen) TripleMaster [®] PCR System (Eppendorf)
Polymerasekettenreaktion (PCR)	Expand long proofreading [®] PCR (Roche) Phusion High-Fidelity [®] PCR Kit (Finnzymes)
RNA-Extraktion	RNeasy [®] Mini-Kit (Qiagen)
Sequenzierung	CEQ [™] 8000 DTCS-Quick Start Kit (Beckmann Coulter)

2.1.8 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> Wirt zur Klonierung von Plasmiden. Genotype F <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 deoR araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG.E</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>S. epidermidis</i> 1585	Klinisches Isolat aus einer Portkatheter- infektion; <i>aap</i> -, <i>icaADBC</i> -, und biofilmmnegativ	Rohde <i>et al.</i> , 2005
<i>S. epidermidis</i> 1585-Ra	Biofilmpositive und <i>embp</i> -exprimierende Mutante von <i>S. epidermidis</i> 1585	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> RP62A	ATCC 35984, biofilmpositiv, <i>ica</i> -positiv	Schumacher- Perdreau <i>et al.</i> , 1994

2.1.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die verwendeten Oligonukleotide zum Vergleich der Promotorregion sind in **Tabelle 7**, die für die RACE sind in **Tabelle 8** und die Oligonukleotide zur *embp*-Sequenzierung sind im Anhang in der **Tabelle 9** dargestellt.

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide zum Vergleich der Promotorregionen

Name ^a	Sequenz (in 5`-3` Richtung)	Referenz
<i>embp_410for</i>	CATCAACTAGTCAAAATCAAGC	Diese Arbeit
<i>embp_1325rev</i>	GTGAAAGTTACTGGACCAGTT	Diese Arbeit
<i>embp_1287for</i>	TCCAAGTGATCAAACACCAACT	Diese Arbeit
<i>embp_2591rev</i>	GAATTTCCACGTAATTCATTAG	Diese Arbeit

^a Die angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf den *open reading frame* des *embp* Allels von *S. epidermidis* RP62A (GeneBank accession number SERP1011).

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide für die RACE

Name ^a	Sequenz (in 5`-3` Richtung)	Anwendung
<i>embprevRT18040</i>	CATGAAGATTAGATTTAGCTTGAGTTAC	cDNA-Synthese
<i>embprevRT19043</i>	GCAGAATCTTCATTTGTATAATCAC	cDNA-Synthese
<i>embprev18881</i>	CTGAGTTTTACGTTGCATCTGTTATCTG	Amplifikation der cDNA-Enden
GeneRacer 5`	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	Amplifikation der cDNA-Enden
<i>fntC_for1</i>	AGCACCTATTGGAGTAATGAGAGA	Diese Arbeit
<i>fntC_for</i>	TGCGACTATATATACTTATGCGTCA	Diese Arbeit

^a Die angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf den *open reading frame* des *embp* Allels von *S. epidermidis* RP62A (GeneBank accession number SERP1011).

2.1.10 Datenbanken und Programme

Die durch PCR und Sequenzierungsreaktionen gewonnenen DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI (InforMax, Oxford, UK), und mittels der SMART-Software (<http://smart.embl-heidelberg.de>) bearbeitet und analysiert. Hierbei wurde auf das vollständig sequenzierte Genom des *S. epidermidis* Stamms RP62A zurückgegriffen (Lokus Nummer CP000029; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Anzuchtbedingungen

Bakterien wurden zur Stammhaltung auf Agarplatten kultiviert, welche - falls nötig - mit einem Antibiotikum supplementiert wurden. Staphylokokkenstämme wurden auf Blutagar und *E. coli* Stämme wurden auf LB-Agar kultiviert. Alle verwendeten Bakterienstämme wurden in der Regel für 24 h bei 37°C, sofern nicht gesondert angegeben, in einem Brutschrank (Agarkulturen) oder als Flüssigkultur in einem Schüttelinkubator bei 150 rpm kultiviert und anschließend bei -4°C gelagert. Bei Bedarf wurden den Agarmedien zur Selektion Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) zugesetzt. Vorkulturen wurden entweder für 6 h oder über Nacht inkubiert und anschließend für die Hauptkulturen 1:100 im gewünschten Medium verdünnt. Für die längerfristige Aufbewahrung wurden die Bakterien in 500 µl Einfriermedium suspendiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Präparation chromosomaler DNA aus *S. epidermidis*

Zur Präparation chromosomaler DNA aus *S. epidermidis* wurde das QIAamp[®]-DNA-Mini Kit (Qiagen, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben angewendet. Zur Vorkultur wurden 2 ml BHI mit einer Kolonie des zu untersuchenden Stammes beimpft und über Nacht bei 37 °C und 120 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Gegebenenfalls wurden zur Selektion Antibiotika hinzugegeben. 500 µl der Vorkultur wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und zur Bakterienernte bei Raumtemperatur für 1 min. bei 16.100 x g zentrifgiert und der Überstand dekantiert. Das entstandene Bakterien-Pellet wurde anschließend in 180 µl TE-Puffer (pH 7,0) resuspendiert, 5 µl Lysostaphin (1.500 U/ml) dazugegeben und in einem Heizblock für 1 h bei 37°C inkubiert, um die Bakterienzellwand zu lysieren. Im Anschluss daran wurden 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinkinase K (Kit) hinzugefügt, durch kräftiges Mischen auf dem Vortexer vermischt und für 2 h bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer, erneutem Mischen auf

dem Vortexer und Inkubation für 10 min bei 75°C in einem Heizblock wurde der Ansatz abermals zentrifugiert. Daran schloss sich eine Fällung mit Ethanol an, wofür dem Ansatz 200 µl *Ethanol abs.* zugegeben, erneut gemischt und zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde auf eine Säule gegeben und in ein Eppendorf-Röhrchen gesetzt, 500 µl AW 1-Puffer zugegeben und erneut für 1 min bei 16.100 x g zentrifugiert, wieder in ein neues Eppendorf-Röhrchen gesetzt und nach Zugabe von 500 µl AW 2-Puffer nochmals für 1 min bei 16.100 x g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gesetzt und zur Trocknung der Säule bei 16.100 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl AE-Puffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wiederholte sich, die Säule wurde verworfen und die gereinigte DNA in ein sauberes Eppendorf-Röhrchen überführt und im Kühlschrank bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Polymeraskettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Standardmethode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten (Saiki *et al.*, 1985). Üblicherweise wurde die PCR mit Hilfe der TripleMaster®PCR (Eppendorf, Deutschland) in einem DNA Thermal Cycler (MWG Biotech, Deutschland) mit beheiztem Deckel nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das TripleMaster®PCR System enthält eine *proofreading* DNA-Polymerase mit inhärenter Exonukleaseaktivität, die gegebenenfalls auftretende Synthesefehler reparieren kann, so dass eine höhere Genauigkeit gewährleistet werden kann.

Bei der PCR dient die doppelsträngige DNA als Vorlage (*template*). Gegenläufige (*forward* und *reverse*) Oligonukleotide, die so genannten Primer, dienen der DNA-Polymerase als Start. Durch abwechselnde Zyklen von Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer (*annealing*) und Synthese des komplementären Stranges kommt es zur exponentiellen Amplifikation des vorliegenden Fragments. In ein 50 µl Ansatz wurde *circa* 100 bis 200 ng *template* DNA, *forward*- und *reverse* 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 dann für 2 min bei 94°C denaturiert, in den anschließenden Zyklen nur für 30 s. Für die Anlagerung der Primer wurde, in die *annealing*--Temperatur, in Abhängigkeit der verwendeten Primer, für 30 s auf Temperaturen zwischen 55°C und 65°C abgesenkt. Der Zweitstrang wurde bei 72°C

synthetisiert, wobei sich die Dauer nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments richtete und mit etwa 40 s/kb angesetzt wurde. Nach in der Regel 30 bis 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 Kontrollen der PCR fanden durch Gelelektrophorese statt. Sollte die amplifizierte DNA kloniert werden oder war die PCR mit dem TripleMaster[®] PCR System negativ, so wurde als Alternative das Phusion High-Fidelity[®] PCR-Kit (Finnymes, Finnland), welche eine 3'-5' exonuklease *proofreading* Aktivität besitzt, gemäß Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.3 Klonierung von PCR-Produkten

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 so genannte 3'-Desoxyadenosin-Überhänge. Mittels der Topoisomerase I wurden Vektor und Amplifikate ligiert und danach in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Da die *multiple cloning site* des Vektors in einem *lacZ* Gen liegt, konnten Klone mit erfolgreicher Insertion anhand eines *blue/white screenings* identifiziert werden (Sambrook *et al.*, 1989). Es wurden 1 bis 4 µl eines PCR-Amplifikats und 1 µl Salzlösung (Kit) mit sterilem dH₂O auf 5 µl aufgefüllt und mit 1 µl pCR4-TOPO Vektor gemischt. Die Ligation fand für 30 min bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt.

2.2.2.4 Chemische Transformation

Die chemischkompetenten *E. coli* TOP10 Zellen (Kit) wurden auf Eis aufgetaut und mit *circa* 2 bis 4 µl des Ligationsansatzes, durch vorsichtiges Schwenken vermennt und für insgesamt 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 s in ein 42°C heißes Wasserbad gehalten und erneut auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit 250 µl SOC-Medium (Kit) versetzt und für eine 1 h bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Für die Transformation des linearisierten Shuttlevektor pCR4 wurde zunächst 40 µl X-Gal auf LB-Agarplatten, mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und die Agarplatten bei 37°C vorgewärmt. Jeweils 80 µl der Bakteriensuspension wurden unverdünnt auf 3 LB-Agarplatten ausplattiert und dann für 24 h bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Eine mögliche Blaufärbung der Kolonien kam durch die β-Galaktosidaseaktivität zustande, die

nur im Falle einer erfolgreichen Integration der Bakterienzellen in den linearisierten Shuttlevektor pCR4 aufgehoben wird. Deshalb wurden nur weiße oder leicht bläuliche Klone identifiziert und nach einer Subkultivierung genauer analysiert.

2.2.2.5 Restriktionsverdau

Die Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* oder Staphylokokken extrahiert und einer Spaltung mit Restriktionsenzymen unterzogen. Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen in einem DNA-Doppelstrang und schneiden dann beide Stränge an definierten Stellen (Sambrook *et al.*, 1989). Die Restriktionsansätze enthielten 5 bis 15 µl DNA, 1 bis 2 µl Restriktionsenzym sowie den geeigneten Puffer und wurden mit sterilen dH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation für 2 bis 24 h bei 37°C. Bei einem Doppelverdau, bei dem die Puffer nicht kompatibel waren, wurde ein fragmentierter Verdau durchgeführt. Für diesen Verdau wurden 30 µl DNA, 2 bis 3 µl Restriktionsenzym und bis zu 4 µl Puffer mit sterilem dH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die DNA wurde anschließend in einer horizontalen Gelelektrophorese in 0,5 bis 2,5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Ergebnisse der Restriktionsverdaue wurden durch Betrachtung unter dem UV-Transilluminator dokumentiert.

2.2.2.6 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die horizontale Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Grund ihrer Ladung, Größe und Konformation in einem elektrischen Feld. Sie 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 0,5 bis 2,5 %ige Agarosegele verwendet. Hochreine Agarose (SeaKem[®]ME-Agarose, Cambrex-Bioscience, Rockland Inc., USA) wurde in 100 ml 0,5-fach TBE-Puffer aufgekocht, abgekühlt, mit 1,5 µl 1%igem Ethidiumbromidkonzentrat versetzt und in einen Gelträger mit Kamm unter Vermeidung von Blasen gegossen. Die Proben wurden mit 2 µl DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des ausgehärteten Gels eingefüllt, das mit 0,5-fach TBE-Puffer überschichtet war. Eine Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 15 bis 120 Volt/Stunde. Als Größenstandard wurde ein Mix aus *Hind*III-gespaltener DNA des λ-Phagens und *Hae*III-gespaltener DNA des Phagens φX174 (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, 563 bp, 310 bp, 281 bp, 271 bp, 234 bp, 194 bp, 125 bp, 118 bp, 72 bp. Für alle Gele dieser vorliegenden Arbeit, die durch eine Gelelektrophorese entstanden sind, wurden diese Marker verwendet. In der folgenden **Abbildung 3** werden die Größen der einzelnen Banden definiert und gelten für die folgenden Gelelektrophorese-Abbildungen. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator mit einer angeschlossenen digitalen CCD-Kamera (GelCam Photodokumentationssystem) dokumentiert.



Abbildung 3: Größenstandard für DNA Gelelektrophorese 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.

2.2.2.7 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden mit Hilfe des QIAprep[®]Spin Miniprep Kit (Qiagen, Deutschland) 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 Silikatmatrix in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. Anschließend wurde die DNA in einem salzarmen Puffer eluiert. Für Plasmidpräparationen aus *E. coli* wurden die Bakterien in der Regel über Nacht in LB-Medium unter Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin angezchtet. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Eluate wurden zur Klonierung, Sequenzierung oder zu Restriktionsanalysen eingesetzt.

2.2.2.8 Bestimmung der DNA-Konzentration in den Plasmiden

Zur Vorbereitung der Proben für die Sequenzanalyse wurde die DNA-Konzentration (dsDNA) in den aufgereinigten PCR-Proben mit dem BioRad Smart Spec-TM[®]3000 (BioRad, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 280 nm und einem *conversion factor* von 50.000 gemessen. Hierfür wurden 2 µl der PCR-Proben und 98 µl *aqua ad iniectabiliae* vermischt. Diese 100 µl Verdünnung wurde in eine Quartz Spectrometer Küvette pipettiert. Zu Beginn der DNA-Konzentrationsbestimmung wurden 100 µl *aqua ad iniectabiliae* in die Küvette pipettiert und der Leerwert bestimmt. Die Küvette wurde vor jeder Messung mit *aqua ad iniectabiliae* gewaschen und nach Beendigung des Messvorgangs zusätzlich mit 100 µl 1 M HCL und 100 µl 1M NaOH gewaschen, um DNA-Probereste zu entfernen. Die DNA-Konzentration wurde in µg/ml angegeben.

2.2.2.9 DNA-Sequenzierung

Die durchgeführten DNA-Sequenzierungen basieren auf einer modifizierten Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977; Sanger *et al.*, 1978). Zur DNA-Sequenzierung wurden, aus dem QIA-quick[®]PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland) gereinigte PCR-Amplifikate, unter Verwendung der Primer M13for und M13rev und des CEQTM DTCS-Quick[®]Start Kit (Beckman Coulter, USA) nach Angaben des Herstellers

durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte die Denaturierung der DNA für 2 min in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (MWG-Biotech, Deutschland). Daran schlossen sich 30 Zyklen mit jeweils 20 s Denaturierung bei 96°C, Anlagerung der Primer für 20 s bei 50°C und 4 min Synthesezeit bei 60°C an. Die Proben wurden am Ende auf 4°C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze gemäß den Herstellerangaben mittels einer Ethanol/NaAcetat-Präzipitation von den überschüssigen Nukleotiden gereinigt.

Das resultierende Pellet wurde in 40 µl SLS aufgenommen und bei –20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Sequenzierung erfolgte dann unter Verwendung eines CEQ™ 8000 Sequenzierers (Beckman Coulter, Deutschland).

Zum Teil wurden die Sequenzanalysen als Auftragsarbeit durch MWG-Biotech (Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde 100 ng/µl DNA-Probe in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen abgefüllt, zusätzlich wurde separat 1 µl Primer ebenfalls in ein 1,5 ml Röhrchen abgefüllt. Diese Proben wurden dann per Post versandt.

2.2.2.10 Extraktion von Ribonukleinsäuren (RNA) aus *S. epidermidis*

Für die Extraktion von Ribonukleinsäuren aus *S. epidermidis* 1585-Ra wurde nach der von Dobinsky beschriebenen Methode verfahren (Dobinsky und Mack, 2001).

Es wurden Schüttelkulturen in TSB während der stationären Wachstumsphase verwendet. Nach einer Inkubation über 24 h bei 37°C wurden die Zellen geerntet. Den Zellen wurden 3 ml RNA protect™ Bacteria Reagent (Qiagen, Deutschland) hinzugefügt und einmal für 10 s mit 70 % Leistung und in zwei weiteren Durchgängen für jeweils 3 x 30 s bei 70 % Leistung auf Eis mit Ultraschall behandelt und danach für 5 min mit maximaler Geschwindigkeit bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das dabei entstehende Pellet wurde jeweils mit 10 ml eiskaltem PBS überschichtet. Danach wurde das Pellet in 200 µl TE-Puffer (Kit) resuspendiert und auf einem Schüttelinkubator für 10 min bei 37°C mit 150 U/ml Lysostaphin verdaut. Dieser Suspension wurden im Anschluss 700 µl RLT-Puffer (RNeasy® Mini Kit, Qiagen, Deutschland) und 7 µl β-Mercaptoethanol (Kit) zugegeben und für 15 s gevortextet. Nach dem Vortexten wurde die Probe in eine 2 ml Lysing Matrix Tube (Bio 101® Systems, Qbione, Morgan Irvine, USA) mit Silikonpartikel überführt. Der Zellaufschluss von *S. epidermidis* 1585-Ra erfolgte im FastPrep™ Celldisruptor (FB 120, BIO 101, Savant instruments, Farmingdale, USA) in dem er 3 x für 20 s bei maximaler Geschwindigkeit gevortextet wurde. Dieser Ansatz wurde sofort danach auf Eis gestellt

und die Zelltrümmer für 1 min bei Maximalgeschwindigkeit abzentrifugiert. Die weitere Bearbeitung des Überstandes wurde unter Verwendung des RNeasy[®]Mini Kits (Qiagen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch im GeneQuant[™]Spektralphotometer (BioRad, USA) bei 260 nm bestimmt. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Aliquots bei -20°C gelagert.

2.2.2.11 Anreicherung von mRNA mittels MicrobeExpress[®]

Ein Problem bei der Präparation bakterieller RNA und sich daran anschließender Analysen ist, dass ribosomale rRNA insgesamt über 95 % der zellulären Gesamt-RNA ausmachen. Hierdurch werden spezifische Modifikationen gerade seltener mRNA Spezies erschwert. Um die rRNA aus der Gesamtzell-RNA zu entfernen, wurde das MicrobeExpress[®]System (Ambion, Applied Biosystems, USA) verwendet. Dieses System basiert darauf, dass bakterielle rRNA hochkonservierte Sequenzabschnitte aufweist. Dies wird genutzt, um die rRNA an magnetische Mikrosphären zu binden, welche mit komplementären DNA-Oligonukleotiden beschichtet sind. Wird ein starkes Magnetfeld angelegt, so kann die an die Mikrosphären gebundene rRNA entfernt werden. Im Wesentlichen wurde die Durchführung entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 10 µg Gesamtzell-RNA in 100 µl Waschlösung (Ambion, Applied Biosystems, USA) aufgenommen und anschließend Ethanol-präzipitiert. Das hieraus resultierende Pellet wurde in 25 µl TE-Puffer aufgenommen und die mRNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer bestimmt. Typischerweise betrug die Ausbeute etwa 1 bis 1,5 µg mRNA.

2.2.2.12 Bestimmung des Transkriptionsstarts mittels *Rapid amplification of cDNA ends* (RACE)

Um die Sequenz der 5` Enden des *embp*-Transkripts von *S. epidermidis* 1585-Ra zu bestimmen, wurde eine *rapid amplification of cDNA ends* (RACE) durchgeführt. Hierbei wurde auf das Gene[®]Racer Kit (Invitrogen, Deutschland) zurückgegriffen. Im wesentlichen entsprach die Durchführung den Angaben des Herstellers. 250 ng der angereicherten mRNA wurden mit Oligo-RNA Fragmenten ligiert. Nach Präzipitation erfolgte die cDNA Synthese unter Verwendung der Superscript III *reverse-transcriptase* (Invitrogen, Deutschland) und den *embp*-spezifischen Primer *embprevRT18040* oder *embprevRT19043*. Die so gewonnene cDNA wurde als *template* in einer PCR eingesetzt,

bei welcher die Primer *embprev18881* und Gene[®]Racer 5` (Invitrogen, Deutschland) eingesetzt wurden. Nach Kontrolle der Amplifikate, aufgereinigt, in den Vektor pCR4 eingebracht und anschließend sequenziert.

3 Ergebnisse

Die beiden Stämme *S. epidermidis* 1585 und 1585-Ra unterscheiden sich hinsichtlich des Expressionsniveaus des *Embp*-kodierenden Gens *embp*. Die *embp*-Expression in *S. epidermidis* 1585-Ra ist im Vergleich zu *S. epidermidis* 1585 um den Faktor 123 heraufreguliert (Christner *et al.*, 2009). Mögliche Ursachen für die *embp*-Überexpression könnten daran liegen, dass es im Rahmen der zur Entstehung des Stamms *S. epidermidis* 1585-Ra durchgeführten Langzeitkultur-Passage zu chromosomalen Veränderungen wie Deletionen oder Insertionen innerhalb der *Embp*-kodierenden Sequenz von *S. epidermidis* 1585-Ra, zum Beispiel mit der Entstehung von alternativen Promotoren, gekommen ist. Um nun größere strukturelle Veränderungen von *embp* nachzuweisen zu können, wurden mittels *long-range* PCR unter Verwendung spezifischer Primer (**Tabelle 9**) größere *embp*-Fragmente amplifiziert (**Abbildung 5**) und mittels Gelelektrophorese analysiert. Einen schematischen Überblick über die Position der verwendeten Primerpaare liefert die **Abbildung 4**. Die PCR wurde nach Optimierung der *annealing*-Temperaturen unter Verwendung chromosomaler DNA der zu vergleichenden Stämme durchgeführt. Bei der Analyse der so erzeugten Amplifikate zeigte sich, dass diese im wesentlichen die gleiche Größe aufwiesen (**Abbildung 5**). Eine Ausnahme hiervon stellte das Primerpaar *embp_12847for* und *embp_19104rev* dar. Trotz mehrfacher Versuche unter unterschiedlichen PCR-Bedingungen konnte mit diesen beiden Primern nur bei *S. epidermidis* 1585 ein Amplifikat dargestellt werden, während dies bei *S. epidermidis* 1585-Ra nicht gelang (**Abbildung 4**). Dies kann als Hinweis auf Veränderungen des *embp*-Allels von *S. epidermidis* 1585-Ra im Vergleich zu *S. epidermidis* 1585 gewertet werden. Zur Darstellung dieser möglichen Sequenzunterschiede sollten daher beide *embp*-Allele vollständig sequenziert werden.

3.1 Sequenzierung von *ebp* in den beiden *S. epidermidis* Stämmen 1585 und 1585 Ra

Um die *ebp*-Allele in den beiden Stämmen *S. epidermidis* 1585 und *S. epidermidis* 1585-Ra sequenzieren und im Anschluss daran analysieren zu können, wurden unter Verwendung spezifischer Primer etwa 1000 bp große, sich jeweils überlappende Fragmente aus der chromosomalen DNA der beiden *S. epidermidis* Stämme amplifiziert und anschließend in den linearisierten Vektor pCR4 kloniert. Die Sequenzierung erfolgte dann unter Verwendung der beiden Primer M13for(-20) und M13rev(-29). Die resultierenden Sequenzdaten wurden dann unter Verwendung des Programms VektorNTI (Invitrogen, Deutschland) editiert und durch den Assembly-Algorithmus zu einer fortlaufenden Sequenz zusammengeführt.

Zuerst wurden die Sequenzen des *ebp*-Allels von *S. epidermidis* 1585 mit dem ebenfalls *ebp*-positiven *S. epidermidis* Stamm RP62A (SERP1011) verglichen. Das *ebp*-Allel dieses Stammes wurde bereits sequenziert (Gill *et al.*, 2005) und diente daher in dieser Arbeit als Referenzstrang. Es zeigte sich, dass die *ebp*-Allele in den *S. epidermidis* Stämmen 1585 und RP62A eine Länge von insgesamt 30612 bp aufwiesen. Auf Ebene der Nukleotide fand sich in der weiteren Analyse der beiden *S. epidermidis* Stämme eine Übereinstimmung von über 99 %. Die Bestimmung der stromaufwärts und stromabwärts von *ebp* gelegenen Sequenzabschnitte zeigte, dass das *ebp* in *S. epidermidis* 1585 und in *S. epidermidis* RP62A die identische chromosomale Lokalisation zwischen den Genen SERP1010 und SERP1012 aufweist.

Zur Sequenzierung des *ebp*-Allels in *S. epidermidis* 1585-Ra wurde eine parallele Strategie angewendet. Hierbei konnten die Nukleotide 1 – 17743 sowie 18213 – 30612 problemlos analysiert werden. Diese *ebp*-Abschnitte wiesen im Vergleich zu *ebp* des Stammes *S. epidermidis* 1585 keine signifikanten Sequenzunterschiede auf. Durch die Sequenzierung konnte zudem gezeigt werden, dass es keinen Unterschied in der Nukleotidsequenz in den Promotorregion der *S. epidermidis* Stämme 1585 und 1585-Ra gab. Hieraus konnte geschlossen werden, dass offensichtlich die Ursache der *ebp*-Überexpression unabhängig von Veränderungen des natürlichen *ebp*-Promoters erfolgt ist. Trotz mehrfacher Versuche, unter Verwendung verschiedener Primer gelang es nicht, bei *S. epidermidis* 1585-Ra den Übergang zwischen Nukleotid 17743 und 18213 zu

amplifizieren und die Sequenz bestimmen zu können (**Abbildung 5**). Dieser Befund gemeinsam mit den Ergebnissen der *long-range* PCR-Untersuchungen führten zu der Hypothese, dass der *S. epidermidis* Stamm 1585-Ra in diesem Bereich von *ebp* in veränderter Form vorliegen muss. Mit dem Ziel, einen alternativen Transkriptionsstart vor Nukleotid 18213 zu bestimmen, sollte das 5'-Ende des *ebp*-Transkript bei dem Stamm *S. epidermidis* 1585-Ra näher charakterisiert werden.

3.2 Analyse des *Emb*p-Transkripts in *S. epidermidis* 1585-Ra mittels RACE-PCR

Durch die Sequenzierung des 5' Endes des *ebp*-Transkripts sollte analysiert werden, ob ein alternativer Transkriptionsstart in *S. epidermidis* 1585-Ra vorliegt. Hierfür sollte eine RACE-PCR-Strategie angewendet werden. Zunächst wurde Gesamtzell-RNA aus den Stämmen *S. epidermidis* 1585-Ra und der Mutante M84 gewonnen. Um eine optimierte Ligation des 5' *linkers* zu ermöglichen, wurde aus dieser Präparation die mRNA durch Verwendung des MicrobeExpress® Systems angereichert. Nach Ligation des 5' *linkers* an die mRNA erfolgte die cDNA-Synthese durch *reverse* Transkription, unter Verwendung der Primer *embprevRT18040* und *embprevRT19043* (**Abbildung 7**). Diese wurde als *template* in einer PCR unter Verwendung der Primer RACE5' und *embprev18881* eingesetzt. Hierbei konnte mit der cDNA, die nach *reverser* Transkription mit dem Primer *embprevRT19043* erzeugt worden war, ein Amplifikat gefunden werden (**Abbildung 6**). Die PCR mit den beiden Primern RACE5' und *embprev18881* und Einsatz der cDNA, welche unter Verwendung des Primers *embprevRT18040* generiert worden war, erbrachte kein Amplifikat. (**Abbildung 6**).

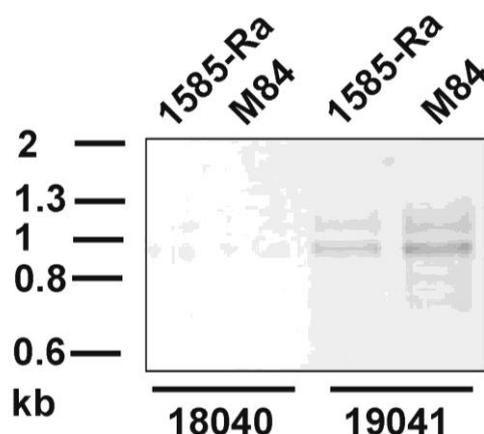


Abbildung 6: Analyse der PCR-Amplifikate unter Verwendung von Primer RACE5' und *embprev18881*. Die PCR unter Verwendung von cDNA der beiden Stämme *S. epidermidis* 1585-Ra und M84, die durch *reverse* Transkription mit dem Primer *embprevRT18040* generiert worden war, erbrachte keine Amplifikate. Unter Einsatz von cDNA, die mit dem Primer *embprevRT19041* generiert worden war, konnte sowohl bei *S. epidermidis* 1585-Ra als auch bei M84 ein etwa 900 bp großes DNA-Amplifikat nachgewiesen werden.

In der Sequenzanalyse der generierten Amplifikate zeigte sich, dass *embp* an Position des Nukleotids 18213 mit den Nukleotiden 1 – 461 des Gens *msrR in frame* fusioniert vorliegt. Diese Fusion konnte auch durch direkte Sequenzierung der chromosomalen DNA von *S. epidermidis* 1585-Ra und M84 nachgewiesen werden. Eine schematische Darstellung der Fusion von *msrR* und *embp* in *S. epidermidis* 1585-Ra zeigt die **Abbildung 7**.

▶ Start *msrR*

TTATAGTATATAGATATGTAATTTTGAAGGTATAAGGTAGGTAAATATGACTGAACAGAAGGATATTAAGAAACAGA
 GTATCGACGACAGAAAGGAACAACCTTCGACACCTTCTAGGCGAAGAAATAAAAAAGAATGCGGAAGTTACCTTTTAT
 CATTTTAGTCATCCTTATTATTTAATTTCTATCATTGTGTATATTACCCATCAGTATAACAGTGGTATGAAGTATGC
 TAAAGAACATGCTAAGGATGTTAAGGTGCATAAAATTTAATGGGAATATGAAAAATGATGGGAAGATTTTCAGTTCTTGT
 CCTTGGCGCGGATAAGGCTCAAGGTGGTAAATCACGTACTGACTCGATTATGATTGTTCAATATGATTACGTACATAA
 AAAAAATGAAAATGATGTCTGTTCATGAGAGATATTTATGCTGATATTCCTGGTTATGATAAATATAAAATTAATGCCGC
msrR nt 461 *embp* nt 18213
 ATATTCACCTTGGAGGCCCGGAATTGTTAAGAAAAACACTAGCTCAAGCTTTAGATGGTTAATGGGTGCCTTAAAAGA
AAGTATTAAGATTATACTAATATTGTTTCAAACGGTAATTACATCAATGCGGAACCATCTAAGAAACAAGCATATGA
TGCAGCTGTACAAAATGCTCAAAATATAATAAATGGAACGAATCAACCAACAATTAATAAGGTAATGTCACTACAGC
AACACAAACCGTGAAAAATACTAAAGATGCCTTAGACGGTGATCATAGATTAGAGGAAGCTAAAAATAATGCCAATCA
AACAATCAGAAATCTATCTAAT

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Fusion von *msrR* und *embp* in *S. epidermidis* 1585-Ra auf Nukleotidebene. Durch Sequenzierung der genomischen DNA von *S. epidermidis* 1585-Ra konnte eine *in frame*-Fusion von *msrR* (Nukleotid 1 – 461, fette Buchstaben) mit *embp* (Nukleotid 18213 – 30612, unterstrichene Buchstaben) gefunden werden. Vor dem Startkodon von *msrR* (fett und unterstrichen) konnte die natürliche Promotorstruktur von *msrR* gefunden werden (einfache Buchstaben).

Durch die beschriebene Fusion von *embp* mit *msrR* entstand ein 12858 bp großer offener Leserahmen. Dieser offene Leserahmen kodiert für ein aus 4132 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 463 kDa. Dieses Molekulargewicht entspricht exakt dem, in der *S. epidermidis* 1585-Ra gefundenen Embp-Isoform (Christner *et al.*, 2009). Auf Grund dessen ist davon auszugehen, dass es offensichtlich im Stamm *S. epidermidis* 1585-Ra durch Rekombinationsereignisse zu einer strukturellen Umlagerung mit daraus resultierender Teilung des Wildtyp-*embp* in zwei offene Leserahmen gekommen ist. Diese beiden offenen Leserahmen, werden dann unabhängig von einander exprimiert. Die beiden offenen Leserahmen werden als *embpB* und *embpA* bezeichnet. Eine schematische Darstellung der Organisation des *msrR-embp*-Hybridgens in *S. epidermidis* 1585-Ra wird in **Abbildung 8** gezeigt.

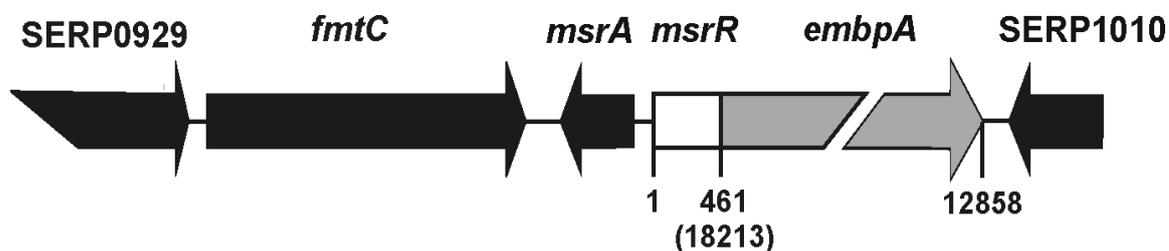


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Organisation des *msrR-embp*-Hybridgens in *S. epidermidis* 1585-Ra. Durch Sequenzierung konnte eine Fusion der *msrR*-kodierenden Nukleotide 1 – 416 mit den Nukleotiden 18213 – 30612 gefunden werden. Hierdurch entsteht ein aus 12858 Nukleotiden aufgebauter offener Leserahmen. Vor dem *msrR-embp*-Hybridgen finden sich die Gene *msrA*, *fmtC* und SERP0929 (kodierend für ein hypothetisches Protein). Hinter dem *msrR-embp*-Hybridgen liegt der Genort SERP1010. Die schematische Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

Die weitere Sequenzanalyse von *S. epidermidis* 1585-Ra zeigte, dass vor dem *msrR-embp*-Hybridgen die Gene *msrA*, *fmtC* und SERP0929 lokalisiert sind (**Abbildung 8**). Hinter dem Stopkodon von *Embpa* ist das Gen SERP1010 lokalisiert. Der Übergang zwischen SERP0929 und *Embpa* (Nukleotid 17743) konnte trotz mehrfacher Versuche nicht amplifiziert werden. Daher kann angenommen werden, dass die in *S. epidermidis* 1585-Ra vorliegende Insertion deutlich größer als 2500 bp sein muss. Eine schematische Darstellung wird in **Abbildung 9** gezeigt.

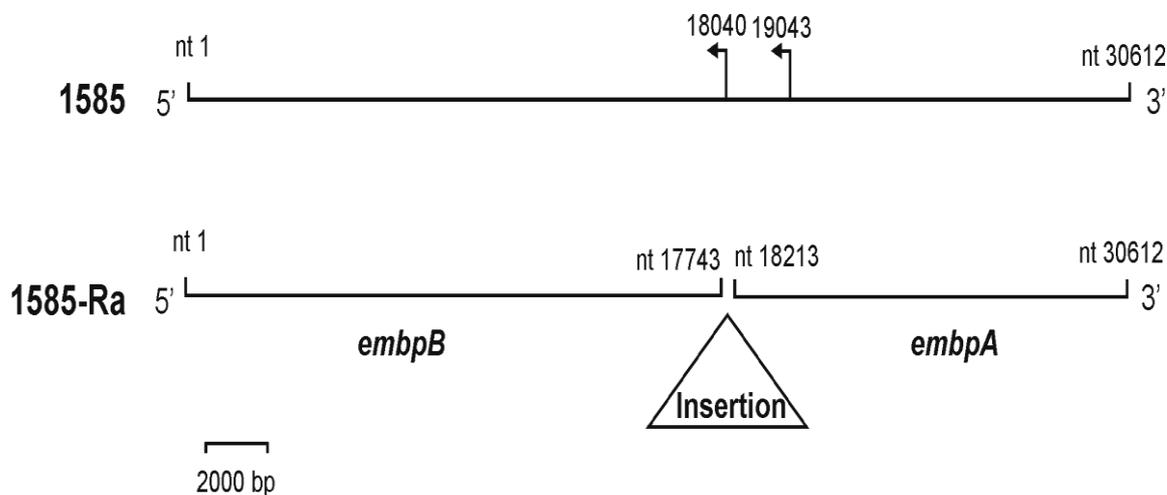


Abbildung 9: Schematische Darstellung von *embp* des Stamms *S. epidermidis* 1585 im Vergleich zu *S. epidermidis* 1585-Ra. In *S. epidermidis* 1585 konnte ein 30612 bp großer offener Leserahmen von *embp* nachgewiesen werden. In *S. epidermidis* 1585-Ra wird dieser durch eine über 2500 bp große Insertion in zwei offene Leserahmen, *embpB* (nt 1 – 17743) und *embpA* (nt 18213 – 30612) getrennt. Die cDNA-Synthese für die nachfolgende RACE-PCR wurde unter Verwendung der beiden Primer *embprevRT18040* und *embprevRT19043* durchgeführt. Es wird deutlich, dass auf Grund der Insertion nur bei Verwendung des Primer *embprevRT19043* eine erfolgreiche cDNA-Synthese durchgeführt werden konnte. Die schematische Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

3.3 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Embp

Die genetischen Daten (Christner *et al.*, 2009) legen die Vermutung nahe, dass es sich bei Embp um ein interzelluläres Adhäsion handelt. Um die strukturellen Determinanten dieser Funktion zu verstehen, sollten die, von den Nucleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen hinsichtlich des Vorkommens von distinkten Domänen analysiert werden. Die Analyse wurden mittels der SMART-Software (<http://smart.embl-heidelberg.de>) durchgeführt.

3.3.1 Analyse der Aminosäuresequenz bezüglich des Vorhandenseins von definierten Domänen

Die Analyse der Nukleotidsequenz mittels der SMART-Software (<http://smart.embl-heidelberg.de>) ergab, dass Embp aus insgesamt 10204 Aminosäuren besteht. Diese sind durch eine hochgradig modulare Struktur charakterisiert.

Am N-terminalen Ende von Embp ist ein charakteristisches, bakterielles Exportsignal lokalisiert. Dieses Exportsignal wird durch ein so genanntes YSIRK-Motiv (AS 58 – 84) gekennzeichnet und findet sich typischerweise bei extrazellulären Proteinen grampositiver Bakterien. An das Exportsignal schließt sich eine Region an, die mehrere *coiled-coil*-Domänen aufweist. Hierauf folgt zwischen AS 2579 - 4497 eine Reihe von 21 repetitiv angeordneten, so genannten FIVAR- (*found in various architectures*, PFO7554) Domänen. Die AS 4504 - 9407 bestehen aus insgesamt 38 FIVAR-Domänen, welche alternierend mit so genannten GA-Domänen (PFO1468) kombiniert sind. Am C-terminalen Ende von Embp befinden sich insgesamt vier Domänen (DUF1542), deren Funktion zum jetzigen Zeitpunkt noch unbekannt ist. Hinter den DUF1542-Domänen befindet sich eine putative Transmembrandomäne, welche vermutlich eine nicht-kovalente Verbindung zwischen Embp und der Zellmembran realisiert. Eine schematische Darstellung dieser Domänstruktur liefert die **Abbildung 10A**.

Als Resultat durch die Fusion mit *msrR* kann in EmbpA ein N-terminal lokalisiertes Exportsignal gefunden werden. Hieran schließt sich eine LytR_cpsA_psr-Domäne (PFO3816) an. Diese Domäne wie auch das Exportsignal werden durch Sequenzen von *msrR* kodiert. Der LytR-Domäne folgt die Wildtyp-Embp-Organisation (AS-Sequenz 6072 – 10203), welche aus weiteren 27 FIVAR und 26 GA-Domänen besteht. Eine schematische Darstellung der von der Nukleotidsequenz abgeleiteten Domänenstrukturen von Embp liefert die **Abbildung 10B**.

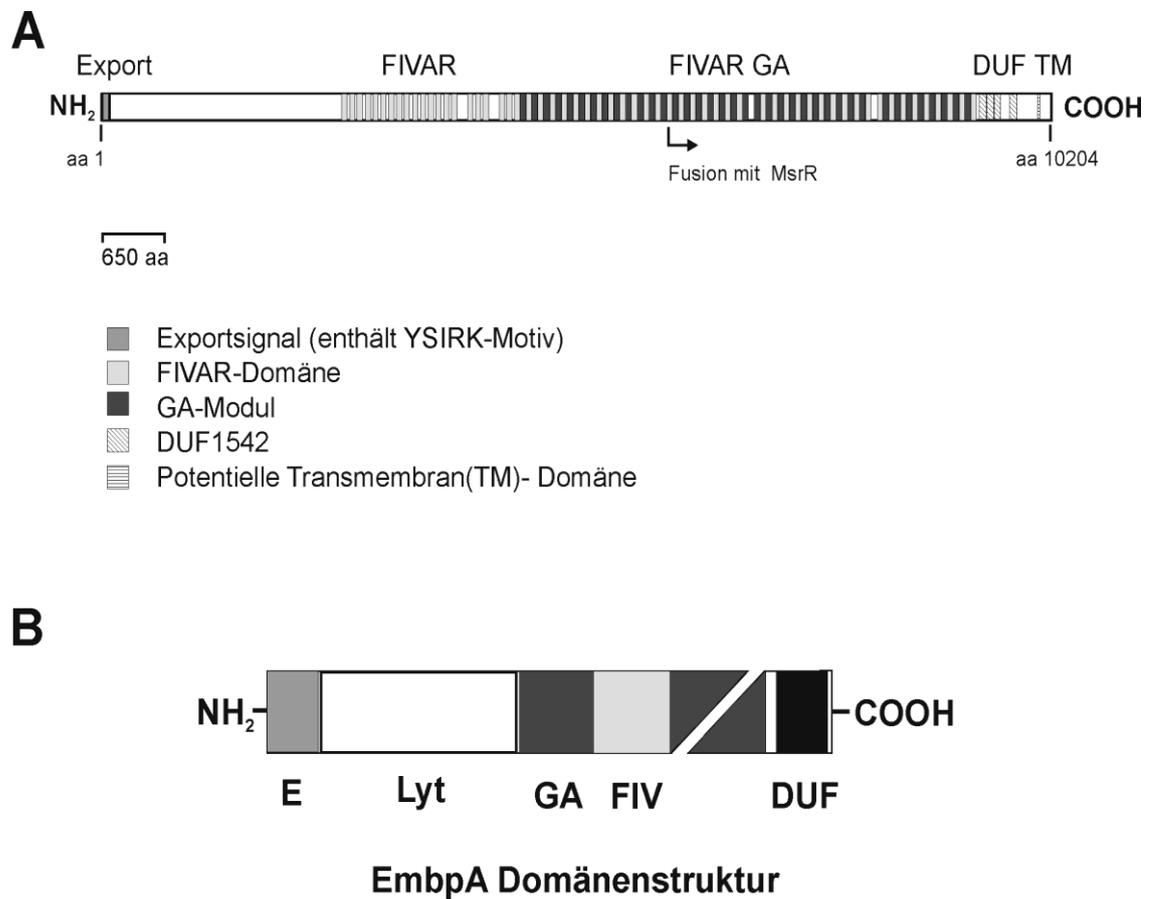


Abbildung 10: (A): Schematische Darstellung der von der Nukleotidsequenz abgeleiteten Domänenstruktur von Embp. Die Position der Fusion mit MsrR, die bei *S. epidermidis* 1585-Ra gefunden werden konnte, ist gekennzeichnet. **(B) Schematische Darstellung der N-terminalen Domänenstruktur von EmbpA.** Bei dieser Embp-Isoform findet sich ein N-terminales Exportmotiv (E), welche von einer LytR_cpsA_psr-Domäne (Lyt) gefolgt wird. Beide Domänen werden durch *msrR*-Sequenzen kodiert. An die LytR_cpsA_psr-Domäne schliesst sich die Embp-Organisation an, die auch bei *S. epidermidis* 1585 gefunden werden kann. Die beiden schematischen Darstellungen sind nicht maßstabsgetreu.

4 Diskussion

Das humanpathogene Potential von Staphylokokken, vor allem von *S. epidermidis*, wurde in der Medizin sehr lange Zeit unterschätzt. Der entscheidende Pathogenitätsfaktor von *S. epidermidis* ist seine Fähigkeit zur Anlagerung an Polymeroberflächen von implantierten Fremdmaterialien mit anschließender Ausbildung eines mehrschichtigen Biofilms (Rupp *et al.*, 1999a; Rupp *et al.*, 1999b; Rupp *et al.*, 2001). Durch diese Voraussetzungen ist *S. epidermidis* mehr und mehr in den Focus der modernen Medizin gerückt. Da er sowohl als Erreger von nosokomialen, als auch von Fremdkörper-assoziierten Infektionen sehr häufig isoliert wird und dadurch einen erheblichen Anteil am Anstieg der Morbidität und Mortalität nosokomialer Infektionen besitzt (Banerjee *et al.*, 1991; National Nosocomial Infections Surveillance (NNSI) System report, 1999; Wisplinghof *et al.*, 2003; Karlowsky *et al.*, 2004; Mack *et al.*, 2006a). Bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen ist *S. epidermidis* der am häufigsten isolierte Erreger. Allein in Deutschland muss jährlich mit bis zu 100.000 Infektionen gerechnet werden (Mack *et al.*, 2004).

Die Ausbildung des mehrschichtigen Biofilms bietet *S. epidermidis* Schutz vor Effektormechanismen der angeborenen Immunität (Vuong *et al.*, 2004; Kristian *et al.*, 2008; Mack *et al.*, 2008), der humoralen Immunantwort (Cerca *et al.*, 2007) und vor allem vor Antibiotika (Knobloch *et al.*, 2002; Knobloch *et al.*, 2008), so dass als einzige Therapieoption nur noch die Entfernung des implantierten Materials in Frage kommt (Yuonger *et al.*, 1987; Götz und Peters, 2000; Darouiche, 2005). In den letzten Jahren konnten erhebliche Fortschritte im Hinblick auf das Verständnis der zur Biofilmbildung führenden, molekularen Prozesse gemacht werden. Hierbei wurde vor allem dem intrazellulären Polysaccharid-Adhäsin PIA große Aufmerksamkeit geschenkt. Frühe epidemiologische Untersuchungen konnten eine weite Verbreitung von PIA bei klinischen *S. epidermidis* Isolaten nachweisen. Dieser Befund war wesentliche Motivation, PIA als Basis eines *S. epidermidis*-Impfstoffes zu evaluieren (Maira-Litran *et al.*, 2004; Kelley und Quintos, 2006; Cerca *et al.*, 2007). Durch neuere epidemiologische Studien kann jedoch die große Bedeutung von PIA und seinem Transkriptionsort *icaADBC* für die Biofilmbildung und die Entstehung von Fremdkörper-assoziierten Infektionen in Frage

getellt werden. Insbesondere ist bemerkenswert, dass in neueren Studien zur Prävalenz von *icaADBC* bei klinisch signifikanten *S. epidermidis* Stämmen, die im Zusammenhang mit implantierten Fremdmaterialien isoliert wurden, *icaADBC* nur in bis zu 50 % der isolierten Stämme nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine relevante Zahl von *icaADBC*-negativen Stämmen in der Lage sind einen Biofilm auszubilden (Klug *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2004; Petrelli *et al.*, 2006; Bradford *et al.*, 2006; Rohde *et al.*, 2007; Henning *et al.*, 2007). Diese Studien weisen darauf hin, dass *icaADBC* und PIA keine notwendige Voraussetzung für die Invasivität von *S. epidermidis* im Zusammenhang mit Fremdkörper-assoziierten Infektionen darstellen (Klingenberg *et al.*, 2007). Diese Sichtweise wird dadurch unterstrichen, dass einem *tissue-cage* Modell definierte *icaADBC*-Mutanten keine reduzierte Virulenz im Vergleich mit den Wildtypstämmen aufwiesen (Francois *et al.*, 2003; Fluckiger *et al.*, 2005; Chokr *et al.*, 2006).

Daher erscheinen PIA-basierte, mono-valente Impfstoffe als zu kurz gegriffen. Mit dem Ziel, weitere Zielstrukturen für die Entwicklung effektiver Prophylaxestrategien zur Vermeidung von *S. epidermidis* Infektionen zu entwickeln, ist daher die Untersuchung alternativer Mechanismen der *S. epidermidis* Biofilmbildung von erheblicher Bedeutung.

Zur Entstehung PIA-unabhängiger Biofilme können verschiedene Faktoren funktionell beitragen (Rohde *et al.*, 2006). Hierbei scheint auch extrazelluläre DNA von Bedeutung zu sein (Izano *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2007; Chaignon *et al.*, 2007). Weitere wichtige Hinweise auf die biochemische Natur der PIA-unabhängigen, interzellulären Adhäsine konnten durch Untersuchungen gewonnen werden, bei welchen etablierte *S. epidermidis* Biofilme mit einer hochspezifischen, PIA-spaltenden, b-1,6-Hexosaminidase, dem Dispersin B (DspB) (Kaplan *et al.*, 2004; Donelli *et al.*, 2007; Chaignon *et al.*, 2007), oder mit Trypsin behandelt wurden. Hierbei zeigte sich, dass PIA-abhängig gebildete Biofilme des Referenzstamms 1457 durch DspB vollständig zerstört wurden, jedoch stabil gegenüber der Wirkung von Trypsin waren (Qin *et al.*, 2007; Molin *et al.*, 2007; Hennig *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu wurden Biofilme von PIA-negativen Stämmen durch Trypsin zerstört, während DspB keine Desintegration der Biofilme bewirkte (Rohde *et al.*, 2007; Chaignon *et al.*, 2007). Aus diesen einfachen Experimenten kann geschlossen werden, dass PIA-unabhängige Mechanismen bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung unter anderem auf Proteinstrukturen basieren muss. Hierbei konnte die funktionelle Beteiligung

des Aap (*accumulation associated proteine*, Aap) bereits gut dokumentiert werden (Hussain *et al.*, 1997; Vandecasteele *et al.*, 2003; Rohde *et al.*, 2004; Rohde *et al.*, 2005; Petrelli *et al.*, 2006; de Araujo *et al.*, 2006; Stevens *et al.*, 2007; Rohde *et al.*, 2007; Conrady *et al.*, 2008).

Da jedoch auch *aap*-negative *S. epidermidis* Stämme, biofilmassoziierte Infektionen hervorrufen können, müssen weitere Mechanismen bei der durch *S. epidermidis* vermittelten Biofilmmakulation existieren. Die funktionelle Beteiligung von Embp (*extracellular matrix binding proteins*, Embp) an der Biofilmbildung konnte durch Isolierung von zwei unabhängigen, biofilmbildungsnegativen Tn917-Mutanten des *S. epidermidis* Stamms 1585-Ra, bei welchen *embp* als Folge der Transposoninsertion inaktiviert wurde, erstmalig erkannt werden. Durch Sequenzierung der transposonflankierenden Sequenzen konnte gezeigt werden, dass in der Mutante M135 das Transposon an der Position des Nukleotids 21251 und in der Mutante M84 an der Position des Nukleotids 26771 in der Embp-kodierenden Sequenz lokalisiert ist (Christner *et al.*, 2009). Die Lokalisierung ergab sich durch Abgleich mit dem bereits publizierten Genom von *S. epidermidis* RP62A (Gill *et al.*, 2005). Unklar war jedoch, ob in *S. epidermidis* 1585 das *embp* in Bezug auf die Position im Chromosom und auf die Größe des offenen Leserahmens mit dem korrespondierenden Allel in *S. epidermidis* RP62A (SERP1011) vergleichbar ist. Daher war es ein wichtiges Ziel der hier beschriebenen Experimente, das *embp*-Allel in *S. epidermidis* zu charakterisieren.

Um *embp* dieses Stamms zu sequenzieren, wurden anhand der *embp*-Sequenz des Stamms *S. epidermidis* RP62A spezifische Primer generiert, die die Amplifikation von etwa 1000 bp langen, sich überlappenden Fragmenten von *embp* sowie den flankierenden, chromosomalen Abschnitten erlaubten. Bei der Analyse der Sequenzdaten zeigte sich, dass *embp* in *S. epidermidis* 1585 - wie auch bei *S. epidermidis* RP62A - zwischen zwei putativen offenen Leserahmen, SERP1010 und SERP1012 lokalisiert ist. SERP1010 weist Homologien zu einem für ein Zellwandenzym EbpS kodierenden Gen *ebpS* auf, während SERP1012 Homologien zu einem für eine Exonuklease ExoS kodierenden Gen *exoS* aufweist. Wie auch in *S. epidermidis* RP62A ist die Transkriptionsrichtung von *embp* parallel zu der des Gens SERP1012, jedoch entgegengesetzt zu der des offenen Leserahmens SERP1010. Der offene Leserahmen von *embp* umfasst in *S. epidermidis* 1585 insgesamt 30612 Nukleotide. Somit kodiert *embp* auch in *S. epidermidis* 1585 für ein

aus 10204 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von über 1MDa. Embp ist damit das größte bekannte Protein von *S. epidermidis*.

Die durchschnittliche Größe bakterieller Gene liegt bei etwa 1000 bp (Skovgaard *et al.*, 2001). Dies legt nahe, dass Gene, die für große Proteine mit einem Molekulargewicht von über 250 kDa kodieren, selten sind. Tatsächlich konnte im Rahmen einer Suche in 580 vollständig sequenzierten, prokaryotischen Chromosomen (zusammen etwa 2071329 offene Leserahmen) insgesamt nur 3732 offene Leserahmen mit einer Größe von mehr als 5000 bp gefunden werden. Dies entspricht einem Anteil von 0,2 % aller offener Leserahmen (Reva und Tümmler, 2007). Nur 41 Gene konnten gefunden werden, die größer als 25 kb sind. Neben Embp in *S. epidermidis* finden sich diese besonders großen Gene in den humanpathogenen Spezies *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, *Nocardia farcinica*, *Pseudomonas putida*, *S. aureus* und *Streptococcus pyogenes*. Zusätzlich besitzen typische Bodenbakterien Gene mit mehr als 5000 bp (Reva und Tümmler, 2007). Funktionell handelt es sich bei der Mehrzahl der durch Riesengene kodierten Proteine um Exportproteine mit adhäsiver und / oder hämolytischer Aktivität (Reva und Tümmler, 2007). So vermittelt das Protein Rtx von *Legionella pneumophila* die Bindung des Erregers an epitheliale Zellen (Cirillo *et al.*, 2001). Das 900 kDa große Protein LapA von *Pseudomonas putida* ist an der Bindung an Polystyren und Quarzsand beteiligt (Shannon *et al.*, 2003).

Für das Embp-Homolog Ebh in *S. aureus* wurde eine Fibronectin-bindende Aktivität beschrieben (Clark *et al.*, 2002), auch dem Embp konnte eine Fibronectin-bindende Aktivität nachgewiesen werden (Williams *et al.*, 2002). Zusätzlich ist Embp als interzelluläres Adhäsion funktionell an der akkumulativen Phase der *S. epidermidis* Biofilmbildung beteiligt. Hierbei ist es denkbar, dass Embp eine extrazelluläre Matrix bildet, in diese dann die Bakterienzellen integriert werden. Erst kürzlich konnte die Struktur eines Fragments des Embp-Homologs Ebh aufgeklärt werden (Tanaka *et al.*, 2008). Es zeigte sich, dass Ebh aus repetitiven Helices besteht, die mutmaßlich als Bündel entlang der Längsachse von Ebh angeordnet sind. Die Länge eines Moleküls beträgt hierbei etwa 320 nm (Tanaka, *et al.*, 2008). Unter der Annahme, dass sich diese strukturellen Eigenschaften auch bei Embp wieder finden könnten, ist es somit denkbar, dass Embp, vergleichbar mit eukaryoten, extrazellulären Strukturproteinen, wie Fibronectin, eine von den Bakterien gebildete Biofilmmatrix bildet. Eine solche

extrazelluläre Matrix hat im Zusammenhang mit bakterieller Biofilmbildung insbesondere die Aufgabe, ein für die bakterielle Physiologie günstiges Mikromilieu zu bilden. Aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergeben sich Hinweise, dass Embp hierfür von Bedeutung sein könnte. So ist Embp nämlich reich an polaren, aliphatischen Aminosäuren wie Glutamat, Threonin, Serin und Asparagin und arm an Lysin und Arginin. Hieraus resultiert, dass es sich bei Embp um ein saures, hydrophiles Molekül handelt, welches in der Lage sein sollte, Kationen und Wasser zu binden. Gerade die Regulation der Homöostase von Wasser und Ionenmilieu ist eine wichtige Aufgabe der extrazellulären Biofilmmatrix (Costerton *et al.*, 1999; O'Toole *et al.*, 2000; Götz *et al.*, 2005).

Eine wichtige Frage ist, welche strukturellen Determinanten die interzelluläre, adhäsive Funktion von Embp bestimmen. Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigt, dass es sich bei Embp um ein hochgradig, modular aufgebautes Protein handelt. Neben einem N-terminal lokalisierten Exportsignal wird die Domänenstruktur vor allem durch so genannte FIVAR- und GA-Domänen bestimmt. Der Nachweis von diesen Domänen ist der erste Anhalt dafür, dass diese neben einer Fibronectin-bindenden Aktivität auch an der Interaktion von Oberflächen-assoziierten Proteinen mit der Bakterienoberfläche beteiligt sein könnten. Bisher wurden FIVAR-Domänen im Zellwand-assoziierten FmtB Protein von *S. aureus* (Komatsuzawa *et al.*, 2000) und in der Gellan-Lyase von *Bacillus sp.* (Hashimoto *et al.*, 1998) beschrieben. Hier sollen sie an der Bindung an N-Acetylglucosamin beteiligt sein. GA-Domänen konnten in den Oberflächenproteinen PAB von *Finegoldia magna* und im G Protein von G-Streptokokken nachgewiesen werden (Lejon *et al.*, 2004). Im Oberflächenprotein A (SpA) von *S. aureus* vermitteln GA-Domänen die Bindung an das Immunglobulin G (Graille *et al.*, 2000). Hinweise auf die funktionelle Bedeutung der FIVAR- und GA-Domänen für die Embp-vermittelte Biofilmbildung wurden durch Untersuchungen belegt, bei welchen Antiseren in Biofilminhibitionsexperimenten eingesetzt wurden. Hierbei zeigte sich, dass spezifische anti-Embp-Kaninchenantiseren die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1585-Ra spezifisch hemmen können (Christner *et al.*, 2009). Zudem konnte durch Zugabe eines rekombinant exprimierten Embp-Fragments, welches aus FIVAR- und GA-Domänen besteht, bei biofilmmnegativen *S. epidermidis* Wildtypstämmen ein biofilmpositiver Phänotyp induziert werden (Christner *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu konnte unter Verwendung eines rekombinanten Embp-Fragments, welches nur aus FIVAR-Domänen besteht, keine

Biofilmbildung induziert werden (Christner *et al.*, 2009). Somit wird deutlich, dass für die interzellulär adhäsive Funktion von Embp offensichtlich die Kombination von FIVAR- und GA-Domänen notwendig ist. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die am C-terminalen Ende von Embp lokalisierten DUF1542-Domänen sowie die Transmembrandomäne eine funktionelle Bedeutung für die interzellulär adhäsive Funktion von Embp aufweisen (Christner *et al.*, 2009).

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass bakterielle Ribosomen maximal 40 Peptidbindungen pro Sekunde synthetisieren können (Watson *et al.*, 1987), kann daraus abgeleitet werden, dass *S. epidermidis* zur Synthese von Vollängen-Embp etwa 4 min benötigt. Da die Generationszeit von *S. epidermidis* unter *in vitro* Kulturbedingungen etwa 15 min. beträgt, ist es auf Grund des sehr hohen Energieaufwandes unwahrscheinlich, dass Embp unter solchen Bedingungen synthetisiert wird. Vielmehr ist zu erwarten, dass die Synthese vor allem unter Bedingungen verlängerter Generationszeiten stattfindet. Diese Situation ist gerade *in vivo*, zum einen im Rahmen der *S. epidermidis* Kolonisation von Haut und Schleimhäuten, aber auch gerade im Rahmen einer Fremdkörper-assoziierten Infektion zu erwarten. Gerade hier ist die Aufrechterhaltung eines optimalen Mikromilieus zum Beispiel durch Biofilmbildung bei ansonsten suboptimalen Umgebungsbedingungen, von großem Wert für den Erreger (Reva und Tümmler, 2007). Riesenproteine wie Embp scheinen trotz ihrer kostspieligen Synthese hierbei von großem Nutzen zu sein. Dies wird unter anderem auch dadurch unterstrichen, dass Embp in Populationen, kommensaler wie auch invasiver *S. epidermidis* Stämme in über 90 % aller Fälle nachgewiesen werden konnte (Rohde *et al.*, 2004; Rohde *et al.*, 2007).

Hieraus ergibt sich, dass der Befund einer fehlenden Embp-Bildung von *S. epidermidis* 1585 unter *in vitro* Kulturbedingungen nicht als sehr ungewöhnlich erscheint. Ein ähnlich niedriges *embp*-Expressionsniveau konnte bei *S. epidermidis* 1457 und bei 20 weiteren, genetisch unabhängigen *S. epidermidis* Stämmen festgestellt worden (Rohde, nicht publizierte Daten). Die geringe *embp*-Transkriptionsrate könnte ein Grund dafür sein, dass *embp* bis heute nicht als interzelluläres Adhäsins identifiziert werden konnte. Weitere Untersuchungen zeigten, dass *embp* in *S. epidermidis* 0-47 nur in Anwesenheit von Kaninchenserum exprimiert werden kann, was bedeuten könnte, dass die Expression vor allem *in vivo* stattfindet (Sellmann *et al.*, 2005). Tatsächlich konnte die *embp*-Expression weder durch Wachstum in TSB-Brühe supplementiert mit NaCl, Ethanol noch

subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen, jedoch durch Wachstum in Kaninchen- und Ziegenserum induziert werden (Christner, Rohde, nicht publizierte Daten). Im Gegensatz zu dem Wildtypstamm produziert *S. epidermidis* 1585-Ra spontan Embp in großen Mengen (Christner *et al.*, 2009). Der *S. epidermidis* Stamm 1585-Ra war durch Passage und Selektion Oberflächen-adhärenter Zellen isoliert worden (Christner *et al.*, 2009). In letzter Konsequenz beruht die Erzeugung von *S. epidermidis* 1585-Ra also auf der *S. epidermidis* inhärenten genetischen Flexibilität, die letztlich zur Entstehung einer adhären, biofilmpositiven Subpopulation des biofilmbnegativen Ausgangsstammes führte. Bei *S. epidermidis* 1585-Ra ist *embp* im Vergleich zum Wildtypstamm 1585 um den Faktor 123 heraufreguliert (Christner *et al.*, 2009). Somit muss es im Rahmen der kulturellen Passage von *S. epidermidis* 1585 zu genetischen Ereignissen gekommen sein, die letztlich zu einer stärkeren Expression von *embp* geführt haben.

Die genetische Flexibilität von Bakterien beruht auf unterschiedlichen Mechanismen (Hallet *et al.*, 2001). Zum einen kann die Genexpression durch Punktmutationen, zum Beispiel in Promoterstrukturen oder Transkriptionsfaktoren, modifiziert werden. Des Weiteren ist es bekannt, dass bei Staphylokokken durch Insertion oder Exzision von beweglichen genetischen Elementen die Genexpression moduliert werden kann (Ziebuhr *et al.*, 1999; Conlon *et al.*, 2004; Handke *et al.*, 2004; Ziebuhr *et al.*, 2006). Auch kann es zu größeren chromosomalen Deletionen kommen (Cho *et al.*, 2002; Nuryastuti *et al.*, 2008). Um die strukturelle Ursache für die *embp*-Überexpression in *S. epidermidis* 1585-Ra zu identifizieren, wurde das *embp*-Allel dieses Stammes sowie der flankierenden chromosomalen Abschnitte inklusive der putativen Promoterstrukturen durch Sequenzierung näher untersucht. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die kodierenden Sequenzen von *embp* vorgelagerten Sequenzen keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass mögliche Punktmutationen eine verstärkte Aktivität des *embp*-Promoters verursacht haben könnten. Das Vorkommen größerer struktureller Veränderungen von *embp* wurde orientierend durch *long range* PCR unter Verwendung von sich überlappenden Primerpaaren untersucht. Es zeigte sich, dass unter Verwendung der Primer *embp*_12847for und *embp*_19104rev bei *S. epidermidis* 1585 ein Fragment mit der erwarteten Größe amplifiziert werden konnte, während dies bei *S. epidermidis* 1585-Ra nicht der Fall war. Hieraus ergibt sich ein erster Hinweis darauf, dass es in der *embp*-kodierenden Sequenz zu einer größeren Modifikation

gekommen sein könnte. Unterstützt wird diese Annahme durch Ergebnisse von Transkriptionsuntersuchungen mittels quantitativer *real time* PCR, die eine Heraufregulation von *embp* nur unter Verwendung von im distalen Drittel von *embp* lokalisierten Primern zeigten (Christner *et al.*, 2009). Zusätzlich war bei der Analyse von Zelloberflächen-assoziierten Proteinen des Stamms *S. epidermidis* 1585-Ra aufgefallen, dass Embp in der Höhe der 420 kDa Markerbande wanderte, also erheblich kleiner war, als das eigentlich zu erwartende Protein (Christner *et al.*, 2009). Diese Befunde führten zu der Hypothese, dass *embp* in *S. epidermidis* 1585-Ra in zwei unabhängigen offenen Leserahmen transkribiert wird. Um diese Hypothese zu prüfen, sollte durch 5'RACE der Start des *embp*-Transkripts in *S. epidermidis* 1585-Ra dargestellt werden.

Diese Analyse ergab, dass in *S. epidermidis* 1585-Ra *embp* an Position des Nukleotids nt 18213 *in frame* mit den ersten 461 bp der *MsrR*-kodierenden Sequenz fusioniert vorliegt. Vor dem *msrR-embp*-Hybridgen fand sich der putative *msrR*-Promotor sowie die Gene *msrA* und *fntC*. Offensichtlich ist es also im Rahmen der Passage von *S. epidermidis* 1585 zu einer Insertion chromosomaler DNA in die *EmbP*-kodierende Sequenz gekommen. Dies führt wie angenommen zu einer Teilung des 30612 bp großen offenen Leserahmens von *embp* in zwei unabhängig zu transkribierende, offene Leserahmen, die mit *embpB* (*embp* nt 1 - 17743) und *embpA* (*embp* nt 18213 – 30612) benannt wurden. Diese Nomenklatur geht auf die Beschreibung des in *S. aureus* gefundenen *embp*-Homologs *ebh* zurück. *Ebh* liegt bei manchen *S. aureus* Stämmen natürlicher Weise in zwei getrennten offenen Leserahmen vor, die als *ebhB* und *ebhA* gekennzeichnet werden (Foster *et al.*, 2002). Die genauen molekularen Mechanismen, die letztlich zu der Insertion in *embp* des Stamms 1585 geführt haben, sowie die genaue Größe und Aufbau dieser Insertion konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, da es nicht gelungen ist, den Übergang zwischen *embp*-Nukleotid 17743 und der *embp*-Insertion zu amplifizieren und einer Sequenzanalyse zuzuführen. Wesentlich ist jedoch, dass die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass in *S. epidermidis* 1585-Ra ein *msrR-embp*-Hybridgen vorliegt, welches sich unter der Kontrolle des natürlichen *msrR*-Promoters befindet. In *S. aureus* kodiert *msrR* für einen Zelloberflächen-assoziierten Transkriptionsregulator, der die phänotypische Ausprägung der Resistenz von *S. aureus* gegenüber Teicoplanin und Meticillin beeinflusst (Rossi *et al.*, 2003). *MsrR* wird vor allem in der exponentiellen Phase exprimiert (Rossi *et al.*, 2003). Da bei *S. epidermidis* 1585-Ra die *embp*-Expression in der mittleren exponentiellen Phase

besonders stark ist, jedoch kaum eine Transkription in der späteren Wachstumsphasen nachgewiesen werden kann (Christner *et al.*, 2009), ist es naheliegend, dass das *msrR-embp*-Hybridgen tatsächlich unter der Kontrolle des *msrR*-Promoters exprimiert wird. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass die abgeleitete Größe der *msrR-embp*-Hybridgenprodukts mit 463 kDa der beobachteten Größe von Embp im SDS-PAGE entspricht (Christner *et al.*, 2009).

Im Hinblick auf den biofilmpositiven Phänotyp von *S. epidermidis* 1585-Ra bleibt offen, welche Bedeutung die Verkürzung von *msrR* für die Embp-vermittelte *S. epidermidis* Biofilmbildung besitzt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der stark biofilmpositive Phänotyp dieses Stamms auch im Zusammenhang mit dieser genetischen Veränderung im funktionellen Zusammenhang steht. Kürzlich konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Mutante 1585 $P_{xy1/tet}embp$, bei welcher *embp* unter der Kontrolle durch einen durch Tetracyclin steuerbaren Promoter vorliegt, unter *embp*-induzierenden Kulturbedingungen einen Biofilm ausbildet (Christner *et al.*, 2009). Dies beweist, dass Embp auch unabhängig von der in *S. epidermidis* 1585-Ra vorliegenden *msrR*-Verkürzung als interzelluläres Adhäsion Biofilmbildung vermittelt. Vor diesem Hintergrund kann der *S. epidermidis* Stamm 1585-Ra durchaus weiterhin als ein stabiler Embp-überexprimierender Modellorganismus betrachtet werden, der geeignet ist, prototypisch die Funktion von Embp bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung zu studieren.

Es kann also festgestellt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen eine plausible molekulare Erklärung für die *embp*-Überexpression des biofilmpositiven *S. epidermidis* Stamms 1585-Ra liefern. Durch die *embp*-Sequenzanalysen ergeben sich erstmalig direkte Hinweise auf mögliche strukturelle Determinanten der interzellulären, adhäsiven Funktion von Embp. Die weitere Analyse der Funktion und Bedeutung von Embp bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung wird eine wichtige Aufgabe in der Zukunft sein. Es ist zu erwarten, dass hierdurch ein vertieftes molekulares Verständnis der Fähigkeit von *S. epidermidis*, natürliche wie auch künstliche Oberflächen zu besiedeln, resultieren wird. Dies ist die unabdingbare Voraussetzung für verbesserte präventive, therapeutische und auch diagnostische Möglichkeiten im Kontext von Fremdkörper-assoziierten *S. epidermidis* Infektionen.

5 Zusammenfassung

Staphylococcus epidermidis ist einer der häufigsten Erreger bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen. Vor dem Hintergrund der unbefriedigenden präventiven, therapeutischen und diagnostischen Möglichkeiten besteht ein hohes Interesse an der Aufklärung der molekularen Pathogenese, um hierdurch neue Wege zur Bekämpfung von *S. epidermidis* Infektionen zu erkennen. Wichtigster Pathogenitätsfaktor von *S. epidermidis* ist seine Fähigkeit zur Ausbildung mehrlageriger Biofilme auf artefiziellen Oberflächen. Unabhängig vom interzellulären Polysaccharidadhäsion PIA ist bei dem hier untersuchten *S. epidermidis* Stamm 1585-Ra das Embp (*extracellular matrix binding protein*, Embp) am Prozess der Biofilmbildung beteiligt. *S. epidermidis* 1585-Ra produziert im Vergleich zum korrespondierenden Wildtypstamm 1585 Embp in großen Mengen. Durch Analyse des *embp*-Allels von *S. epidermidis* 1585-Ra, durch Sequenzierung und Bestimmung des Transkriptionsstart mittels 5'RACE konnte gezeigt werden, dass die Ursache für diese Überexpression in einer Insertion der Gene *fntC*, *msrA* und *msrR* in *embp* liegt. Die Insertion hat zur Folge, dass bei *S. epidermidis* 1585-Ra der offene Leserahmen von *embp* geteilt wird, wobei die Basenpaare 18213 - 30612 *in frame* mit den *msrR* Nukleotiden 1 – 461 fusioniert vorliegen. Hierdurch kann das *msrR-embp*-Hybridgen unter Kontrolle des natürlichen *msrR*-Promoters exprimiert werden. Bei Analyse der von der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigte sich, dass Embp eine hochgradig modulare Struktur aufweist, die insbesondere durch FIVAR- und GA-Domänen bestimmt ist. Da Embp als interzelluläres Adhäsion fungiert, gibt es somit erstmalig Hinweis auf die konkrete Funktionalität dieser Domänen. Da Embp bei praktisch allen *S. epidermidis* Stämmen gefunden werden kann, stellt dieses Protein eine interessante Zielstruktur für die zukünftige Entwicklung innovativer präventiver oder therapeutischer Strategien zur Bekämpfung von *S. epidermidis* Infektionen dar.

6 Literaturverzeichnis

- Allignet, J., S. Aubert, K.G. Dyke, and 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.
- Archer, G.L., and M.W. Climo.** 1994. Antimicrobial susceptibility of coagulase- negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**: 2231-2237.
- Archer, G.L.** 2000. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R. (eds). Philadelphia: Churchill Livingstone, **pp**: 2092-2100.
- Arber, N., E. Pras, Y. Copperman, J.M. Schapiro, V. Meiner, I.S. Lossos, A. Militianu, D. Hassin, E. Pras, and A. Shai.** 1994. Pacemaker endocarditis. Report of 44 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **73**: 299- 305.
- 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.
- Banerjee, S.N., T.G. Emori, D.H. Culver, R.P. Gaynes, W.R. Jarvis, T. Horan, J.R. Edwards, J. Tolson, T. Henderson, and W. J. Martone.** 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am. J. Med.* **91**: 86-89.
- Banner, M.A., J.G. Cunniffe, R.L Macintosh, T.J. Foster, H. Rohde, and D. Mack.** 2007. Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J Bacteriol.* **189**: 2793-2804.
- Bateman, A., M.T. Holden, and C. Yeats.** 2005. The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics.* **21**: 1301-1303.
- Bayston, R., and S.R. Penny.** 1972. Excessive production of mucoid substance in *Staphylococcus SHA*: Possible factor of colonisation of Holter shunts. *Dev. Med. Child. Neurol.* **14 (Suppl. 27)**: 25-28
- Begum, M.D, M. Umemura, S. Kon, A. Yahagi, S. Hamada, K. Oshiro, K. Gotoh, A. Nishizono, T. Uede, and G. Matsuzaki.** 2007. Suppression of the bacterial antigen-specific T cell response and the dendritic cell migration to the lymph nodes by osteopontin. *Microbiol Immunol.* **1**: 135-147.
- Birnboim, H.C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.

- Bowden, M.G., L. Visai, C.M. Longshaw, K.T. Holland, P. Speziale, and M. Hook.** 2002. Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen-binding adhesin? *J. Biol. Chem.* **277**: 43017-43023.
- Boyce, J.M.** 1997. Epidemiology and Prevention of Nosocomial Infections. In *Staphylococci in Human Disease*. Crossley, K.B. and Archer, G.L. (eds). New York: Curchill Livingstone, pp. 309-332.
- Boyce, J.M.** 2004. Coagulase-Negative *Staphylococci*. In *Hospital Epidemiology and Infection Control*. C.G. Mayhall (ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp. 495-516.
- Bradford, R., R. Abdul Manan, A.J. Daley, C. Pearce, A. Ramalingam, D. D'Mello, Y. Mueller, W.Uahwatanasakul, Y. Qu, D. Grando, S. Garland, and M. Deighton.** 2007. Coagulase-negative staphylococci in very-low-birth-weight infants: inability of genetic markers to distinguish invasive strains from blood culture contaminants. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **5**: 283-290.
- Burkhardt, F., and K.P. Schaal.** 1992. Gewinnung und Verarbeitung von Untersuchungsmaterial - Bewertung von Befunden. In *Mikrobiologische Diagnostik*. Burkhardt, F. (ed). Stuttgart: Thieme, pp. 15-49.
- Chaignon, P., I. Sadovskaya, C. Rangunah, N. Ramasubbu, J.B. Kaplan, and S. Jabbouri.** 2007. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol.* **1**: 125-132.
- Chokr, A., D. Watier, H. Eleaume, B. Pangon, J.C. Ghnassia, D. Mack, and S. Jabbouri.** 2006. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Int J Med Microbiol.* **6**: 381-388.
- Cho, S.H., K. Naber, J. Hacker, and W. Ziebuhr.** 2002. Detection of the icaADBC gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents.* **6**: 570-575.
- Christner, M., G. Franke, B. Zobiak, U. Wendt, K. Wegert, P. Pehle, G.Kroll, M. Busch, C. Schulze, F. Buck, D. Mack, M. Aepfelbacher, and H. Rohde.** 2009. The giant extracellular matrix binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to host endothelial matrix. Eingereicht zur Publikation.
- Christensen, G.D., W.A. Simpson, A.L. Bisno, and E.H. Beachey.** 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* **37**: 318-326.
- Christensen, G.D., J.T. Parisi, A.L. Bisno, W.A. Simpson, and E.H. Beachey.** 1983. Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 258-269.

- Cerca, N., K.K. Jefferson, T. Maira-Litrán, D.B. Pier, C. Kelly-Quintos, D.A. Goldmann, J. Azeredo, and G.B. Pier.** 2007. Molecular basis for preferential protective efficacy of antibodies directed to the poorly acetylated form of staphylococcal poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. *Infect Immun.* **7**: 3406-3413.
- Cirillo, S.L., L.E Bermudez, S.H. El-Etr, G.E. Duhamel, and J.D. Cirillo.** 2001. *Legionella pneumophila* entry gene rtxA is involved in virulence. *Infect Immun.* **1**: 508-51
- Clark, N.C., L.M. Weigel, J.B. Patel, and F.C Tenover.** 2002. Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* **1**: 470-472.
- Cramton, S.E., C. Gerke, N.F. Schnell, W.W. Nichols, and F. Götz.** 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* **67**: 5427-5433.
- Conlon, K.M., H. Humphreys, and 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.
- Conrady, D.G., C.C. Brescia, K. Horii, A.A. Weiss, D.J. Hassett, and A.B. Herr.** 2008. A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci, USA* **49**: 19456-19457.
- Corrigan, R.M., D. Rigby, P. Handley, and T. J. Foster.** 2007. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology* **153**: 2435- 2446.
- Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Costerton, J.W., R. Veeh, M. Shirtliff, M. Pasmore, C. Post, and G. Ehrlich.** 2003. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest.* **112**: 1466-1477.
- Cucarella, C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I.I. Lasa, and J.R. Penades.** 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *J Bacteriol.* **183**: 2888- 2896.
- Darouiche, R.O.** 2004. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J. Med.* **350**: 1422-1429.
- Davenport, D.S., R.M. Massanari, M.A. Pfaller, M.J. Bale, S.A. Streed, and W.J. Hierholzer, Jr.** 1986. Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci. *J. Infect. Dis.* **153**: 332-339.

- de Araujo, G.L., L.R. Coelho, C.B. de Carvalho, R.M. Maciel, A.Z. Coronado, and R. Rozenbaum.** 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, and 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.
- Deighton, M.A. and B. Balkau.** 1990. Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 2442-2447.
- Devriese, L.A., M. Vancanneyt, M. Baele, M. Vanechoutte, G.E. De, C. Snauwaert, I. Cleenwerck, P. Dawyndt, J. Swings, A. Decostere, and F. Haesebrouck.** 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase- positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1569-1573.
- Diaz-Mitoma, F., G.K. Harding, D.J. Hoban, R.S. Roberts, and D.E. Low.** 1987. Clinical significance of a test for slime production in ventriculoperitoneal shunt infections caused by coagulase-negative staphylococci. *J. Infect. Dis.* **156**: 555-560.
- Dobinsky, S., H. Rohde, J.K.M. Knobloch, M.A. Horstkotte, and D. Mack.** 2004. Transcriptional activity of *icaADBC* is not correlated to the degree of biofilm formation in clinical *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* strains. *Biofilms* **1**: 101-106.
- Dobinsky, S., and D. Mack.** 2001. Efficient RNA isolation method for analysis of transcription in sessile *Staphylococcus epidermidis* biofilm cultures. *Methods Enzymol.* **336**: 255-262.
- Cochrane, D.M., M.R. Brown, H. Anwar, P.H. Weller, K. Lam, and J.W. Costerton.** 1988. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection. *J Med Microbiol.* **27**: 255-261.
- Donelli, G., I. Francolini, D. Romoli, E. Guaglianone, A. Piozzi, C. Raganath, and J.B. Kaplan.** 2007. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. *Antimicrob Agents Chemother.* **8**: 2733-2740.
- Foster, S.J., S.R. Clarke, J. Ilions, and R.G. Richards.** 2002. Analysis of Ebh, a 1.1-Megadalton cell wall-Associated Fibronectin-Binding Protein of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity.* pp. 6680-6687.
- Dunne, W.M., Jr., D.B. Nelson, and M.J. Chusid.** 1987. Epidemiologic markers of pediatric infections caused by coagulase-negative staphylococci. *Pediatr. J. Infect. Dis.* **6**: 1031-1035.

- Emori, T.G., and R.P. Gaynes.** 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev.* **6**: 428-442.
- Espersen, F., B.J. Wilkinson, B. Gahrn-Hansen, R. Thamdrup, and I. Clemmensen.** 1990. Attachment of staphylococci to silicone catheters in vitro. *APMIS* **98**: 471-478.
- Espersen, F., M. Wurr, L. Corneliussen, A.L. Hog, V.T. Rosdahl, N. Frimodt-Møller, and P. Skinhoj.** 1994. Attachment of staphylococci to different plastic tubes in vitro. *J. Med. Microbiol.* **40**: 37-42.
- Fidalgo, S., F. Vazquez, M.C. Mendoza, F. Perez, and F.J. Mendez.** 1990. Bacteremia due to *Staphylococcus epidermidis*: microbiologic, epidemiologic, clinical, and prognostic features. *Rev. Infect. Dis.* **12**: 520-528.
- Fleer, A., and J. Verhoef.** 1989. An evaluation of the role of surface hydrophobicity and extracellular slime in the pathogenesis of foreign-body-related infections due to coagulase-negative staphylococci. *J. Invest Surg.* **2**: 391-396.
- Fluckiger, U., M. Ulrich, A. Steinhuber, G. Doring, D. Mack, and R. Landmann.** 2005. Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect Immun* **73**: 1811-1819.
- Francois, P., P.H. Tu Quoc, C. Bisognano, W.L. Kelley, D.P. Lew, J. Schrenzel, et al.** 2003. Lack of biofilm contribution to bacterial colonisation in an experimental model of foreign body infection by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **35**: 135-140.
- Frank, K.L., A.D. Hanssen, and R. Patel.** 2004. *icaA* is not a useful diagnostic marker for prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* **42**: 4846-4849.
- Frebourg, N.B., S. Lefebvre, S. Baert, and 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, and 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, and 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, and J. Ravel.** 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., and G. Peters.** 2000. Colonization of Medical Devices by Coagulase- Negative Staphylococci. In: F. A. Waldvogel and A. L. Bisno (eds.), *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*. ASM Press, Washington DC. **pp:** 55-88
- Graille, M., E.A. Stura, A.L. Corper, B.J. Sutton, M.J. Taussig, J.B. Charbonnier, and G.J. Silverman.** 2000. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **10:** 5399-404.
- 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.
- Harris, L.G., and R.J. Richards.** 2004. Staphylococcus aureus adhesion to different treated titanium surfaces.. *J Mater Sci Mater Med.* **4:** 311-314.
- 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., 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., 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.
- Heinzelmann, M., D.O. Herzig, B. Swain, M.A. Mercer-Jones, T.M. Bergamini, and H. C. Polk, Jr.** 1997. Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime- producing variant in human neutrophils. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* **4:** 705-710.
- Henrici, A.T.** 1933. Studies of freshwater bacteria. I. A Direct microscopic technique. *J. Bacteriol.* **5:** 277-287.
- Hennig, S., W.S. Nyunt, 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.
- Herwaldt, L.A., M. Geiss, C. Kao, and M.A. Pfaller.** 1996. The positive predictive value of isolating coagulase-negative staphylococci from blood cultures. *Clin. Infect. Dis.* **22:** 14-20.
- 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.

- Hogt, A.H., J. Dankert, C.E. Hulstaert, and J. Feijen.** 1986. Cell surface characteristics of coagulase-negative staphylococci and their adherence to fluorinated poly(ethylene-propylene). *Infect. Immun.* **51**: 294-301.
- Hof, H. and R.L. Dörries.** 2000. Spezielle Bakteriologie. In *Duale Reihe, Mikrobiologie*. Hof, H. and R.L. Dörries (eds). Thieme-Verlag, p. 275.
- Høiby, N., J.O. Jarløy, M. Kemp, M. Tvede, J.M. Bangsborg, A. Kjerulf, C. Pers, and H. Hansen.** 1997. Excretion of ciprofloxacin in sweat and multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. *Lancet.* **9046**: 167-169.
- Hussain, M., M.H. Wilcox, and P.J. White.** 1993. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev.* **4**: 191-207.
- 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., C. Heilmann, G. Peters, and M. Herrmann.** 2001. Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb. Pathog.* **31**: 261-270.
- Inman, R.D., K.V. Gallegos, B.D. Brause, P.B. Redecha, and C.L. Christian.** 1984. Clinical and microbial features of prosthetic joint infection. *Am. J. Med.* **77**: 47-53.
- Ishak, M.A., D.H. Groschel, G.L. Mandell, and R.P. Wenzel.** 1985. Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. *J. Clin. Microbiol.* **22**: 1025-1029.
- Izano, E.A., M.A. Amarante, W.B. Kher, and J.B. Kaplan.** 2007. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* **2**: 470-766.
- Jansen, B., F. Schumacher-Perdreau, G. Peters, and G. Pulverer.** 1989. New aspects in the pathogenesis and prevention of polymer-associated foreign-body infections caused by coagulase-negative staphylococci. *J. Invest Surg.* **2**: 361- 380.
- Jarvis, W.R.** 1987. Epidemiology of nosocomial infections in pediatric patients. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **6**: 344-351.
- Jelsbak, L., H.K. Johansen, A.L. Frost, R. Thøgersen, L.E. Thomsen, O. Ciofu, L. Yang, J.A. Haagensen, N. Høiby, and S. Molin.** 2007. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun.* **5**: 2214-2224.

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.*

Kaplan, J.B., C. Raganath, K. Velliyagounder, D.H. Fine, and N. Ramasubbu. 2004. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2633-2636.

Kelly-Quintos, C., L.A. Cavacini, M.R. Posner, D. Goldmann, and G.B. Pier. 2007. Characterization of the opsonic and protective activity against *Staphylococcus aureus* of fully human monoclonal antibodies specific for the bacterial surface polysaccharide poly-N-acetylglucosamine. *Infect Immun.* **5**: 2742-2750.

Kirchhoff, L.V., and J.N. Sheagren. 1985. Epidemiology and clinical significance of blood cultures positive for coagulase-negative staphylococcus. **6**: 479-486.

Kleeman, K.T., T.L. Bannerman, and W.E. Kloos. 1993. Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of *Microbiol.* **31**: 1318-1321.

Klingenberg, C., A. Rønnestad, S.S. Anderson, T.G. Abrahamsen, J. Zorman, A. Villaruz, T. Flaegstad, M. Otto, and J.E. Sollid. 2007. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. *Clin Microbiol Infect.* **11**: 1100-1111.

Kloos, W.E. 1997. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In *The staphylococci in human disease*. Crossley, K.B., and Archer, G.L. (eds). New York: Churchill Livingstone. **pp**: 113-137.

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, 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 staphylytic enzyme genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 313-323.

Kloss, W.E., C.G. George, J.S. Oligate, P.L. Van, M.L. McKinnon, and B.L. Zimmer. 1998. *Staphylococcus hominis* subsp. novobiosepticus subsp. Nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int J Syst Bacteriol.* **3**: 799-812.

Kloss, W.E., and T.L. Bannermann. 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 117-140.

- Klug, D., F. Wallet, S. Kacet, and 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., M.A. Horstkotte, H. Rohde, P.M. Kaulfers, and D. Mack.** 2002a. Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**: 683-687.
- Knobloch, J.K.M., M.A. Horstkotte, H. Rohde, and D. Mack.** 2002b. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* **191**: 101-106.
- Knobloch, J.K.M., H. Von Osten, M.A. Horstkotte, H. Rohde, and 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.M., H. Von Osten, M.A. Horstkotte, H. Rohde, and D. Mack.** 2008. Biofilm formation is not necessary for development of quinolone-resistant "persister" cells in an attached *Staphylococcus epidermidis* population. *Int J Artif Organs.* **9**: 752-760.
- Koskela, A., A. Nilsdotter-Augustinsson, L. Persson, and B. Söderquist.** 2008. Prevalence of the *ica-operon* and insertion sequence IS256 among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **8**: 123-127.
- Komatsuzawa, H., G.H. Choi, T. Fujiwara, Y. Huang, K. Ohta, M. Sugai, and H. Suginaka.** 2000. Identification of a *fmtA*-like gene that has similarity to other PBPs and beta-lactamases in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* **1**: 35-39.
- Kristian, S.A., T. Golda, F. Ferracin, S.E. Cramton, B. Neumeister, A. Peschel, F. Götz, and R. Landmann.** 2004. The ability of biofilm formation does not influence virulence of *Staphylococcus aureus* and host response in a mouse tissue cage infection model. *Microb Pathog.* **5**: 237-245.
- Lambert, L.H., T. Cox, K. Mitchell, R.A. Rossello-Mora, C. Del Cueto, E. Dodge, P. Orkand, and R.J. Cano.** 1998. *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48 Pt 2**: 511-518.
- Lasa, I., and J.R. Penades.** 2006. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol.* **157**: 99-107.
- Lejon, S., I.M. Frick, L. Björck, M. Wikström, and S. Svensson.** 2004. Crystal structure and biological implications of a bacterial albumin binding module in complex with human serum albumin.. *J Biol Chem.* **41**: 42924-42928.

- Li, H., L. Xu, J. Wang, Y. Wen, C. Vuong, M. Otto, and Q. Gao.** 2005. Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the ica locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infect Immun.* **5:** 3188-3191.
- Ludwicka, A., B. Jansen, T. Wadstrom, and G. Pulverer.** 1984. Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. *Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hyg. [A]* **256:** 479-489.
- Marrie, T.J., C. Kwan, M.A. Noble, A. West, and L. Duffield.** 1982. *Staphylococcus saprophyticus* as a cause of urinary tract infections. *J Clin Microbiol.* **16:** 427- 431.
- Mack, D., N. Siemssen, and 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.
- Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, and R. Laufs.** 1996a. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* **178:** 175-183.
- Mack, D., M. Haeder, N. Siemssen, and 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., H. Rohde, S. Dobinsky, J. Riedewald, M. Nedelmann, J.K.M. Knobloch, H.A. Elsner, and H.H. Feucht.** 2000. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect. Immun.* **68:** 3799-3807.
- Mack, D., K. Bartscht, C. Fischer, H. Rohde, C. de Grahl, S. Dobinsky, M.A. Horstkotte, K. Kiel, and J.K.M. Knobloch.** 2001. Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Methods Enzymol.* **336:** 215-239.
- Mack, D., P. Becker, I. Chatterjee, S. Dobinsky, J.K.M. Knobloch, G. Peters, H. Rohde, and M. Herrmann.** 2004. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int J Med Microbiol.* **294:** 203-212.
- Mack, D., M.A. Horstkotte, H. Rohde, and J.K.M. Knobloch.** 2005. Coagulase-negative staphylococci. In *Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy*. Pace, J.L., Rupp, M.E. and Finch, G. (eds). London UK: CRC Press, pp. 109-153.
- Mack, D., H. Rohde, L.G. Harris, A.P. Davies, M.A. Horstkotte, and J.K.M. Knobloch.** 2006. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* **29:** 343-359.

- McKenney, D., J. Hübner, E. Muller, Y. Wang, D.A. Goldmann, and G.B. Pier.** 1998. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect. Immun.* **66**: 4711-4720.
- Molin, M., M. Pilon, and A. Blomberg.** 2007. Dihydroxyacetone-induced death is accompanied by advanced glycation endproduct formation in selected proteins of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics.* **20**: 3764-3774.
- Moretto, T., L. Hermansen, A.L. Holck, M.S. Sidhu, K. Rudi, and S. Langsrud.** 2003. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Appl Environ Microbio.* **69**: 5648-5655.
- Montanaro, L., D. Campoccia, and C.R. Arciola.** 2007. Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives. *Biomaterials.* **34**: 5155-5168.
- Muller, E., S. Takeda, D.A. Goldmann, and G.B. Pier.** 1991. Blood proteins do not promote adherence of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *Infect. Immun.* **59**: 3323-3326.
- Muller, E., J. Hübner, N. Gutierrez, S. Takeda, D.A. Goldmann, and 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.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report.** 1999. Data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *Am J Infect Control* **27**: 520-532.
- Nilsdotter-Augustinsson, A., A. Koskela, L. Ohman, and B. Soderquist.** 2007. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from patients with infected hip prostheses: use of phenotypic and genotypic analyses, including tests for the presence of the *ica* operon. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **26**: 255-265.
- Nilsson, M., L. Frykberg, J.I. Flock, L. Pei, M. Lindberg, and B. Guss.** 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **66**: 2666-2673.
- Nobel, W.C.** 1997. Staphylococcal Carriage and Skin and Soft Tissue Infection in Staphylococci. In *Human Disease*. Crossley, K.B. and Archer, G.L. (eds). New York: Churchill Livingstone: pp. 401-412.
- Nobel, W.C., and J. Naidoo.** 1986. Coagulase-negative staphylococci as skin commensals. *J Med Microbiol.* **22**: 287-291.
- Noel, G.J., and P.J. Edelson.** 1984. *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in neonates: further observations and the occurrence of focal infection. *Pediatrics* **74**: 832-837.

- Nuryastuti, T., C. Henny, J.B. Henk, K. Roel, T.A. Abu, and P.K. Bastiaan. 2008. RecA mediated spontaneous deletions of the *icaADBC* operon of clinical *Staphylococcus epidermidis* isolates: a new mechanism of phenotypic variations. *Med. J. Malaysia*. **63**: 97-105.
- O'Toole, G., J.B. Kaplan, and R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 49-79.
- 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.
- Pei, L., and J.I. Flock. 2001. Lack of *fbe*, the gene for a fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*, reduces its adherence to fibrinogen coated surfaces. *Microb. Pathog.* **31**: 185-193.
- 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.
- Pascual, A., A. Fleer, N.A. Westerdal, and J. Verhoef. 1986. Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to Teflon catheters in vitro. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **5**: 518-522.
- Perdreau-Remington, F., M.A. Sande, G. Peters, and H. Chambers. 1998. The abilities of a *Staphylococcus epidermidis* wild-type strain and its slime-negative mutant to induce endocarditis in rabbits are comparable. *Infect. Immun.* **66**: 2778-2781.
- 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.
- Peters, G., and G. Pulverer. 2001. Die Familie der Micrococcaceae. In *Medizinische Mikrobiologie*. Köhler, W., Eggers, H.J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H. und G. Pulverer. (eds). München: Urban und Fischer, pp. 250-260.
- 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.
- 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.
- Pfaller, M.A., and L.A. Herwaldt. 1988. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**: 281-299.

- Qin, Z., Y. Ou, L. Yang, Y. Zhu, T. Tolker-Nielsen, S. Molin, and D. Qu.** 2007. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*. Pt 7: 2083-2092.
- Richards, M.J., J.R. Edwards, D.H. Culver, and R.P. Gaynes.** 2000. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 21: 510-515.
- Reva, O., and B. Tümmler.** 2008. Think big--giant genes in bacteria. *Environ Microbiol.* 3: 768-777.
- Ringberg, H., A. Thoren, and A. Bredberg.** 1991. Evaluation of coagulase- negative staphylococci in blood cultures. A prospective clinical and microbiological study. *Scand. J. Infect. Dis.* 23: 315-323.
- Roche, F.M., R. Massey, S.J. Peacock, N.P. Day, L. Visai, P. Speziale, L. Lam, M. Pellam, and T.J. Foster.** 2003a. Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology* 149: 643-654.
- Roche, F.M., M. Meehan, and T.J. Foster, T.J.** 2003b. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology* 149: 2759-2767.
- Rohde, H., M. Kalitzky, N. Kroger, S. Scherpe, M.A. Horstkotte, J.K.M. Knobloch, A.R. Zander, and 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.
- Rohde, H., C. Burdelski, K. Bartscht, M. Hussain, F. Buck, M.A. Horstkotte, J.K.M. Knobloch, C. Heilmann, M. Herrmann, and 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., D. Mack, L.G. Harris, A.P. Davies, M.A. Horstkotte, and J.K.M. Knobloch.** 2006. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs.* 4: 343-359.
- Rohde, H., E.C. 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. Ragunath, J.B. Kaplan, and 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.
- Rogers, K.L., M.E. Rupp, and P.D. Fey.** 2008. The presence of icaA/BC is detrimental to the colonization of human skin by *Staphylococcus epidermidis*. *Appl Environ Microbiol.* 19: 6155-6157.

- Rossi, J., M. Bischoff, A. Wada, and B. Berger-Bächi.** 2003. MsrR, a putative cell envelope-associated element involved in *Staphylococcus aureus* sarA attenuation. *Antimicrob Agents Chemother.* **8**: 2558-2564.
- Rupp, M.E., and G.L. Archer.** 1994. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin. Infect. Dis.* **19**: 231-243.
- Rupp, M.E., T. Fitzgerald, N. Marion, V. Helget, S. Puumala, J.R. Anderson, and P.D. Fey.** 1995. Effect of silver-coated urinary catheters: efficacy, cost-effectiveness, and antimicrobial resistance. *Am J Infect Control.* **8**: 445-450.
- Rupp, M.E., J.S. Ulphani, P.D. Fey, K. Bartscht, and 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, and 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.
- Rupp, M.E., P.D. Fey, C. Heilmann, and 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.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sambrook, J., and D.W. Russell.** 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., A.R. Coulson, T. Friedmann, G.M. Air, B.G. Barrell, N.L. Brown, J.C. Fiddes, C.A. Hutchison, III, P.M. Slocombe, and M. Smith.** 1978. The nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174. *J. Mol. Biol.* **125**: 225- 246.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schaberg, D.R., D.H. Culver, and R.P. Gaynes.** 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med.* **91**: 72-75.
- Schleifer, K.H.** 1986. *Micrococcaceae*. In Sneath *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins (eds), Baltimore. p. 1003.

- Schumacher-Perdreau, F., C. Heilmann, G. Peters, F. Götz, and G. Pulverer.** 1994. Comparative analysis of a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain and its adhesion-positive, accumulation-negative mutant M7. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**: 71-78.
- Schwank, S., Z. Rajacic, W. Zimmerli, and J. Blaser.** 1998. Impact of bacterial biofilm formation on *in vitro* and *in vivo* activities of antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 895-898.
- Shaw, J.H., and D.B. Clewell.** 1985. Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **164**: 782-796.
- Simpson, R.A., A F. Spencer, D.C. Speller, and R.R. Marples.** 1986. Colonization by gentamicin-resistant *Staphylococcus* baby unit. *J. Hosp. Infect.* **7**: 108-120.
- Skovgaard, M., L.J. Jensen, S. Brunak, D. Ussery, and A. Krogh.** 2001. On the total number of genes and their length distribution in complete microbial genomes. *Trends Genet.* **8**: 425-428.
- Sperber, W.H., and 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, R. Rosengarten, and H.J. Busse.** 2003. *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 2007-2011.
- Stoodley, P., K. Sauer, D.G. Davies, and J.W. Costerton.** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* **56**: 187-209.
- Sun, D., M.A. Accavitti, and 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, and 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.
- Thylefors, J.D., S. Harbarth, and D. Pittet.** 1998. Increasing bacteremia due to coagulase-negative *staphylococci*: Fiction or reality? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **19**: 581-589.
- Timmerman, C.P., A. Flier, J.M. Besnier, L. De Graaf, F. Cremers, and J. Verhoef.** 1991. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect. Immun.* **59**: 4187- 4192.
- Tojo, M., N. Yamashita, D.A. Goldmann, and G.B. Pier.** 1988. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **157**: 713-722.

- Trulzsch, K., H. Rinder, J. Trcek, L. Bader, U. Wilhelm, and J. Heesemann.** 2002. "*Staphylococcus pettenkoferi*," a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **43**: 175-182.
- Ubeda, C., M.A. Tormo, C. Cucarella, P. Trotonda, T.J. Foster, I. Lasa and J.R. Penadés.** 2003. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol.* **1**: 193-210.
- Vaudaux, P., D. Pittet, A. Haeberli, E. Huggler, U.E. Nydegger, D.P. Lew, and F.A. Waldvogel.** 1989. Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J. Infect. Dis.* **160**: 865-875.
- Vandecasteele, S.J., W.E. Peetermans, R. Merckx, and J. Van Eldere.** 2003. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during *in vitro* and *in vivo* foreign body infections. *J Infect Dis.* **188**: 730-737.
- Veenstra, G.J., F.F. Cremers, H. van Dijk, and A. Fleer.** 1996. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* **178**: 537-541.
- Vernozy-Rozand, C., C. Mazuy, H. Meugnier, M. Bes, Y. Lasne, F. Fiedler, J. Etienne, and J. Freney.** 2000. *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50 Pt 4**: 1521-1527.
- 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.
- Waldvogel, F.A.** 2000. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Vol. 2. Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R. (eds). Philadelphia Churchill Livingstone, **pp.** 2069-2092.
- Wang, I.W., J.M. Anderson, and R.E. Marchant.** 1993. Platelet-mediated adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to hydrophobic NHLBI reference polyethylene. *J. Biomed. Mater. Res.* **27**: 1119-1128.
- 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.

- Weinstein, M.P., L.B. Reller, J.R. Murphy, and K.A. Lichtenstein.** 1983. The clinical significance of positive blood cultures: A comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Rev. Infect. Dis.* **5**: 35-53.
- Wilkinson, B.J.** 1997. Biology. In: Crossley, K.B., and G.L. Archer (eds.): *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone. pp. 1-38.
- 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.
- 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.
- Youngman, P.J., J.B. Perkins, and R. Losick.** 1983. Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn917. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 2305-2309.
- Zhang, Y.Q., S.X. Ren, H.L. Li, Y.X. Wang, G. Fu, and J. Yang.** 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.

7 Anhang

7.1 Oligonukleotide zur *embp*-Sequenzierung

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide zur *embp*-Sequenzierung

Name ^a	Sequenz (in 5`-3` Richtung)	Referenz
M13for (-20)	GTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung von pCR 4- Inserts
M13rev(-29)	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung von pCR 4- Inserts
embp_for 256	GAAATTAGATCAAACCAACTCCAC	Diese Arbeit
embp_rev984	TGATCTCTAGATAATCCGACTGGAT	Diese Arbeit
embp_for957	AAATCCAGTCGGATTATCTAGAGAT	Diese Arbeit
embp_rev1747	CCCTTATATTAACCCACCGTAAGAA	Diese Arbeit
embp_for1723	TTCTTACGTTGGGTTAATATAAG	Diese Arbeit
embp_rev2484	AATTGCACTATCTGTAGAAGCTC	Diese Arbeit
embp_for2460	AGCTTCTACAAGTGATGCAATTC	Diese Arbeit
embp_rev3127	TTTCACCATCAAAGAATATTTTCAG	Diese Arbeit
embp_for3098	TACACGCTGAAATATTCTTTGATGG	Diese Arbeit
embp_rev3820	TTATGAAACTATTGAAGTCA	Diese Arbeit
embp_for3811	AGTTTCATAAGTAATATAACCAG	Diese Arbeit
embp_rev4610	TTATCTGCAGATGCTTGGAT	Diese Arbeit
embp_for4592	TCCAAGCATCTGCAGATAAGA	Diese Arbeit
embp_rev5393	TCTTCAGAACTTCCATCACT	Diese Arbeit
embp_for5383	AGTTCTGAAGAAGCTACTGAGACTG	Diese Arbeit
embp_rev6179	TGAAGTAAAGCAATTGCTTG	Diese Arbeit
embp_for6160	CAAGCAATTGCTTTACTTCAACCA	Diese Arbeit
embp_6972rev	ATTCTCTTTTATCAGCTCTTAAGT	Diese Arbeit

embp_6919for	GCATTACAAAATGCTAAGAATGAC	Diese Arbeit
embp_7708rev	GGTTGTAATAAGTTAATTGTATCTG	Diese Arbeit
embp_7663for	GTAACCAATTGAACCAACGC	Diese Arbeit
embp_8403rev	CACTTGTTGTACACTAGGTTGAGC	Diese Arbeit
embp_8380for	GCTCAACCTAGTGTACAACAAGTG	Diese Arbeit
embp_9212rev	TTATCTAATTCAGGTTGAACAGC	Diese Arbeit
embp_9195for	TCAACCTGAATTAGATAAAGCGATAGC	Diese Arbeit
embp_10047rev	TCTTCTGTTTAATTGTTGAACTGCTG	Diese Arbeit
embp_9981for	TGCTAAACAGCAATTAAGTGCAG	Diese Arbeit
embp_10742rev	GCTTGTGTTAAATCGTTACTGATTTCG	Diese Arbeit
embp_10687for	GCAATCAAACGAATAAAGCAG	Diese Arbeit
embp_11350rev	GTGCTGAGTTAACTTGAGCTTTAAA	Diese Arbeit
embp_11354for	ATCATAATACTTTAGAAACGA	Diese Arbeit
embp_12053rev	CCATCAATGGTTGTATTA	Diese Arbeit
embp_12041for	CAACCATTGATGGTTAACTTATCT	Diese Arbeit
embp_12869rev	TGAGCAGTGTTAATAGCTCTTTTAA	Diese Arbeit
embp_12847for	AAAACAGCTATTAACACTGCTC	Diese Arbeit
embp_13552rev	AAGCAACAGCATCTTCTT	Diese Arbeit
embp_13370for	TGATAATGCAATTGATAATGGCTCG	Diese Arbeit
embp_14144rev	CCACGTTGATGTTTCAAGTTGAATCAT	Diese Arbeit
embp_14711for	ACACAGCTCAAATCAACGC	Diese Arbeit
embp_15104rev	CGCTTTTGACCGTCATTTAAG	Diese Arbeit
embp_15630for	TAATGAGGATCATGACCAACAACA	Diese Arbeit
embp_15873rev	TAAAGAATCTTCCATATG	Diese Arbeit
embp_16509for	AAATGCAGAAGCTTTACATGG	Diese Arbeit
embp_19104rev	AGATCATCTGTAGTGCCGTTTAAAT	Diese Arbeit
embp_17389for	AATAATGCTGATACTCGAGATGAGG	Diese Arbeit
embp_17683rev	CCTGTTTAAATCTGGATTCTCCATT	Diese Arbeit
embp_17903for	TAGCTCAACAAAATGCCTAT	Diese Arbeit
embp_19064rev	TTTTGAACTTGCGGATCTTC	Diese Arbeit
embp_18809for	CACAAAATCAAGCAGATTCA	Diese Arbeit

embp_20132rev	GTATTGTCATTGTTAACAAT	Diese Arbeit
embp_19941for	AGCAGAGGCTAAGTCAGACG	Diese Arbeit
embp_21343rev	GTTTTACACGATCAACGGCA	Diese Arbeit
embp_21175for	CGTTCTGAAGTACATCAAGT	Diese Arbeit
embp_22540rev	CTTCGTTGATAGCATGCTCT	Diese Arbeit
embp_22431for	TGATGTTCAAGAAAGATACGATA	Diese Arbeit
embp_23663rev	GCTTGTCGTA CTGATCTAAACTTACAT	Diese Arbeit
embp_23531for	ATACTACTTTGCCTAATTACTG	Diese Arbeit
embp_24744rev	AAGAACTTTTCGAGCATTAC	Diese Arbeit
embp_24652for	TTTCCTGTCCAAGCAAGC	Diese Arbeit
embp_25711rev	TGTCTTTAGACGCTCTAATCTG	Diese Arbeit
embp_25598for	GACGTCTAAAAGAACATCAACA	Diese Arbeit
embp_26671rev	GAGCTAAAGTATTAAATGCATGCTC	Diese Arbeit
embp_26509for	CGAGATGCAATAAATAACAACACTG	Diese Arbeit
embp_27551rev	GCCCATTTGTTTTATAAAGTAAGAAGCAG	Diese Arbeit
ebsB_303for	TGATTTGATGTTTGTGAGATGG	Diese Arbeit
embp_28317rev	ATGAGTGGAACGCTTCATAACACTGTA	Diese Arbeit
embp_2591rev	GAATTTCCACGTAATTCATTAG	Diese Arbeit

^a Die angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf den *open reading frame* des *embp* Allels von *S. epidermidis* RP62A (GeneBank accession number SERP1011).

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Für die im Text verwendeten Gewichts-, Volumen- und Zeiteinheiten wurden die Bezeichnungen nach dem internationalen SI System verwendet und werden im Abkürzungsverzeichnis nicht gesondert angegeben.

A ₅₇₀	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 570 nm
AS	Aminosäure
<i>aap</i>	Gen des Akkumulation-assoziierten Proteins (englisch: <i>accumulation associated protein</i>)
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
<i>bap</i>	Gen des Biofilm-assoziierten Proteins (englisch: <i>biofilm-associated protein</i>)
BHI	Hirn-Herz-Glucose-Bouillon (englisch: <i>brain-heart-infusion</i>)
CFU	koloniebildende Einheiten (englisch: <i>colony forming units</i>)
cm	Zentimeter
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>desoxyribonuclein acid</i>)
dNT	Desoxy-Nukleotidyl-Triphosphat
<i>embp</i>	Gen des Fibronectin-bindenden Proteins (englisch: <i>extra matix binding protein</i>)
<i>fbe</i>	Gen des Fibrinogen-bindenden Proteins (englisch: <i>fibrinogen binding protein</i>)
h	Stunde
<i>ica</i>	Gen des interzellulären Adhäsins (englisch: <i>intercellular adhesin</i>)
IS256	Insertionselement 256
kDa	Kilodalton
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
kV	Kilovolt
M	Mol
MDa	Megadalton
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

ms	Millisekunden
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Ω	Ohm
ORF	offener Leserahmen (englisch: <i>open reading frame</i>)
OD ₅₆₀	optische Dichte bestimmt bei einer Wellenlänge von 560 nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: <i>polymerase chain reaction</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: <i>phosphate buffered saline</i>)
PIA	interzelluläres Polysaccharid Adhäsion (englisch: <i>polysaccharide intercellular adhesin</i>)
PS/A	Gen des kapsulären Polysaccharid Adhäsion (englisch: <i>capsular polysaccharide adhesin</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: <i>ribonucleic acid</i>)
Tn917	Transposon 917
TSB	Trypton-Soja Brühe (englisch: <i>trypticase soy broth</i>)
U	enzymatische Einheit (englisch: <i>unit</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: <i>rounds per minute</i>)
s	Sekunde
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
xg	xfache Erdbeschleunigung

7.3 Danksagung

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

Herrn PD Dr. Ingo Sobottka danke ich dafür, dass er das Thema und die Betreuung meiner Doktorarbeit Herrn PD Dr. med. Holger Rohde überlassen hat.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, und Leiter der Arbeitsgruppe Herrn PD Dr. med. Holger Rohde. Er stand mir während der gesamten Doktorarbeit mit Rat und Tat zur Seite und war eine sehr große Hilfe bei der Beantwortung meiner ständigen Fragen, bei der Ausarbeitung neuer Ideen, beim Durchführen der Experimente und beim Verfassen der Dissertationsschrift. Vielen, vielen Dank dafür. Seine Freude an der wissenschaftlicher Arbeit, an der Forschung und an der Betreuung seiner Doktoranden kann nur als vorbildlich bezeichnet werden.

Herrn Prof. Dr. med. H.-H. Feucht danke ich für die Hilfe bei den Sequenzanalysen.

Großer Dank auch an Dr. med. Gefion Franke, Gesche Kroll und Martin Christner aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, die mir mit wissenschaftlichem Rat, mit Antworten auf meine Fragen und mit steter Hilfestellung bei der praktischen Durchführung meiner Versuche zur Seite standen.

Abschließend danke ich noch allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und vor allem den Doktoranden Chia-Jung, Julia, Thea, Sandra, Ulrike, Christoph, Jan, Kim und Manuel für die schöne Zeit im und vor allem außerhalb des Labors. Durch Euch war es mir immer eine Freude, ins Labor zu gehen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da war und mich großzügig in allen Dingen unterstützt und immer an mich geglaubt hat. Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die gerade in meinen jungen Jahren stets an mich glaubten und mich so förderten, dass es mir später unter anderem möglich war, das Medizinstudium zu absolvieren. Ohne die Hilfe, Aufmunterung und Motivation meiner Freundin Sandra Schewe wäre diese Arbeit nicht so geworden, wie sie ist.

Für die intensive Korrektur dieser Arbeit bedanke ich mich herzlich bei meinen beiden Onkeln, Herrn Walter H. Pehle und Herrn Ulrich Koch.

7.4 Lebenslauf

Name: Philip Andreas Pehle
Geburtsdatum: 02.11.1977
Geburtsort: Düsseldorf
Anschrift: Rilkehof 4
 38440 Wolfsburg
Email-Adresse: Philippehle@web.de
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
08/1984-06/1988 **Grundschule** Düsseldorf
08/1988-06/1998 **Gymnasium** Düsseldorf
06/1998 **Abitur**
08/1998-10/1999 **Zivildienst:**
 Mobiler Sozialer Hilfsdienst der Caritas, Düsseldorf
10/1999-02/2000 **Ausbildung:**
 Rettungsassistentenschule am Klinikum Niederberg
02/2000-08/2001 **Beruf:**
 Rettungsanitäter beim Malteser Hilfsdienst Düsseldorf
10/2001 **Studium der Humanmedizin**
 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
04/2004 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum)
08/2004 **Famulatur:** Allgemeinchirurgie, Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster
11/2004 **Famulatur:** Orthopädische Praxis, Drs. Lütten, Holz
08/2005 **Famulatur:** Anästhesie, Södersjukhuset, Stockholm
08/2006 **Famulatur:** Innere Medizin, Dominikus-Krankenhaus, Düsseldorf

02/2007	1. PJ-Tertial: Orthopädie, Rheinfelden (Uni Basel)
06/2007	2. PJ-Tertial: Innere, Marienkrankenhaus, Hamburg
08/2007	3. PJ-Tertial: Chirurgie, AK Altona, Hamburg
06/2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 08/2008	Assistenzarzt in der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Handchirurgie, Klinikum der Stadt Wolfsburg
Stipendien:	Hochschulstipendium des Hartmann-Bundes
Sprache:	Englisch (fortgeschritten) Latein und Schwedisch (Grundlagen)
Computer:	Word und Excel

Wolfsburg, im Mai 2009

7.5 Publikationen

Originalarbeiten

M. Christner, B. Zobiak, G. Franke, U. Wendt, K. Wegert, **P. Pehle**, G. Kroll, M. Busch, C. Schulze, F. Buck, M. Aepfelbacher, D. Mack, and H. Rohde. 2009. The giant extracellular matrix binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to host extracellular matrix. Eingereicht zur Publikation

7.6 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Dissertation ``Analyse der kodierenden Nukleotidsequenz des 1 Megadalton extracellular matrix binding proteins von *Staphylococcus epidermidis*`` selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Bei der Sequenzanalyse der PCR-Produkte wurde die Hilfe von Mitarbeitern des Instituts für Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und von der Firma MWG-Biotech in Ebersberg in Anspruch genommen.

Zudem versichere ich, dass ich andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich kenntlich gemacht habe. Außerdem versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Prüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.