

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



**Charakterisierung der Funktion des *extracellular matrix binding proteins* Embp bei der *Staphylococcus epidermidis*-Biofilmbildung**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

**Ulrike Wendt**  
aus Braunschweig

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 23.07.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am:

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

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

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

# Inhaltsverzeichnis

|       |                                                                                             |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | Einleitung .....                                                                            | 1  |
| 1.1   | Nosokomiale Infektionen .....                                                               | 1  |
| 1.2   | Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> .....                                              | 5  |
| 1.2.1 | Die primäre Bindung .....                                                                   | 6  |
| 1.2.2 | Die akkumulative Phase der Biofilmbildung .....                                             | 6  |
| 1.2.3 | Regulation der Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> .....                                | 9  |
| 1.3   | Voraussetzungen für diese Arbeit .....                                                      | 11 |
| 1.4   | Zielsetzung dieser Arbeit .....                                                             | 12 |
| 2     | Material und Methoden .....                                                                 | 14 |
| 2.1   | Material .....                                                                              | 14 |
| 2.1.1 | Chemikalien und Einwegartikel .....                                                         | 14 |
| 2.1.2 | Laborgeräte .....                                                                           | 16 |
| 2.1.3 | Medien .....                                                                                | 17 |
| 2.1.4 | Lösungen .....                                                                              | 18 |
| 2.1.5 | Bakterienstämme und Plasmide .....                                                          | 20 |
| 2.1.6 | Oligonukleotide und Sonden .....                                                            | 21 |
| 2.1.7 | Programme und Datenbanken .....                                                             | 23 |
| 2.2   | Methoden .....                                                                              | 24 |
| 2.2.1 | Allgemeine Mikrobiologische Methoden .....                                                  | 24 |
| 2.2.2 | Molekularbiologische Methoden .....                                                         | 29 |
| 2.2.3 | Proteinchemische Methoden .....                                                             | 33 |
| 3     | Ergebnisse .....                                                                            | 36 |
| 3.1   | Interaktion von PIA und Embp .....                                                          | 36 |
| 3.1.1 | Transduktion von pTXica in die Stämme <i>S. epidermidis</i> 1585,<br>1585-Ra und M135 ..... | 36 |

|       |                                                                                                                                                                    |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.2 | Phänotyp bei der Kultivierung der Bakterien unter PIA-induzierten und nicht-induzierten Bedingungen .....                                                          | 39 |
| 3.1.3 | Einfluss von <i>embp</i> - und <i>icaADBC</i> -Expression auf den Biofilmphe-<br>notyp von <i>S. epidermidis</i> 1585, 1585-Ra und M135 .....                      | 40 |
| 3.1.4 | Untersuchung der PIA-Expression an der Zelloberfläche und im Über-<br>stand von <i>S. epidermidis</i> mittels eines semiquantitativen Dot-Blots ....               | 43 |
| 3.1.5 | Untersuchung der PIA Expression an der Oberfläche und im Über-<br>stand von <i>S. epidermidis</i> mittels eines semiquantitativen Koagglu-<br>tinationstests ..... | 45 |
| 3.1.6 | Untersuchung der direkten Bindung von Embp an PIA anhand eines<br>Festphasen-Immunassays ( <i>Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay</i> ) ..                          | 47 |
| 3.1.7 | Untersuchung der Bindung von PIA an rEmbp17383 im Inhibitions-<br>ELISA .....                                                                                      | 50 |
| 3.1.8 | Bindung von Acetylglukosamin und Glukosamin an Embp im<br>Inhibitions-ELISA .....                                                                                  | 52 |
| 3.1.9 | Validierung der phänotypischen Untersuchungen von <i>S. epidermidis</i><br>1585(pTXica) unter Verwendung neuer Medium-Chargen .....                                | 53 |
| 3.2   | Einfluss von Proteasen auf die Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> .....                                                                                      | 54 |
| 3.2.1 | Nachweis von Proteasen der <i>S. epidermidis</i> -Stämme 1585 und<br>1585-Ra .....                                                                                 | 55 |
| 3.2.2 | Transduktion der M15-assoziierten Transposoninsertion in die<br>Stämme 1585 und 1585-Ra .....                                                                      | 55 |
| 3.2.3 | Biofilmtest der <i>S. epidermidis</i> -Stämme 1585, 1585-Ra sowie der<br>korrespondierenden Transduktanten .....                                                   | 56 |
| 3.2.4 | Embp-Nachweis in 1585, 1585-Ra und 1585-RaM15 .....                                                                                                                | 56 |
| 3.2.5 | Nachweis extrazellulärer Proteasen mittels <i>Skim-milk</i> -Hydrolyseagar.                                                                                        | 58 |
| 3.2.6 | Transkriptionsanalyse von <i>embp</i> in 1585, 1585-Ra und korrespon-<br>dierenden Transduktanten .....                                                            | 59 |
| 4     | Diskussion .....                                                                                                                                                   | 60 |
| 4.1   | Interaktion von PIA und Embp .....                                                                                                                                 | 63 |

|     |                                                                                         |    |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2 | Embp-unabhängige PIA-Bindung auf der Zelloberfläche .....                               | 66 |
| 4.3 | Regulation der Embp-abhängigen Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i><br>1585-Ra ..... | 69 |
| 5   | Zusammenfassung .....                                                                   | 72 |
| 6   | Literaturverzeichnis .....                                                              | 74 |
| 7   | Anhang .....                                                                            | 87 |
| 7.1 | Abkürzungsverzeichnis .....                                                             | 87 |
| 7.2 | Abbildungsverzeichnis .....                                                             | 89 |
| 7.3 | Tabellenverzeichnis .....                                                               | 91 |
| 7.4 | Danksagungen .....                                                                      | 92 |
| 7.5 | Curriculum vitae .....                                                                  | 93 |
| 7.6 | Erklärung .....                                                                         | 94 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Nosokomiale Infektionen

Unter nosokomialen Infektionen versteht man im Verlaufe eines Krankenhausaufenthaltes erworbene Infektionen. Diese stellen in der modernen Medizin ein zunehmend großes Problem im klinischen Alltag dar. So geht das Robert-Koch-Institut auf Basis von Daten des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS) und des Statistischen Bundesamtes von schätzungsweise 500.000-800.000 Fällen nosokomialer Infektionen pro Jahr in Deutschland aus (Geffers *et al.*, 2002), welche die Morbidität und Mortalität deutlich erhöhen (Martin *et al.*, 1989; Rupp and Archer, 1994).

Unter nosokomialen Infektionen haben einerseits die Patienten zu leiden, durch die längeren Liegezeiten und dementsprechend höheren Behandlungskosten werden jedoch auch das Gesundheitssystem und die Allgemeinheit belastet. So schätzt eine in Großbritannien durchgeführte Studie, dass nosokomiale Infektionen die Krankenhauskosten jährlich um etwa das 2,8 fache erhöhen (Geffers *et al.*, 2002).

In der CDC-Definition allgemeiner nosokomialer Infektionen wird davon ausgegangen, dass Infektionen als nosokomial anzusehen sind, wenn keine Hinweise dafür vorliegen, dass die Infektion bei Aufnahme in das Krankenhaus vorhanden oder in der Inkubationsphase war (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen, 2005). Die Unterscheidung zwischen ambulant und in der Klinik erworbenen Infektionen ist im klinischen Alltag jedoch oft schwierig. Da die Bewertungen, ob es sich um eine nosokomiale Infektion handelt oder nicht, teilweise sehr stark variieren, sind demzufolge auch sehr unterschiedliche Angaben der Inzidenz von nosokomialen Infektionen und deren Kosten zu finden. So geht aus einer Studie von Warren hervor, dass durch katheterassoziierte Infektionen eine Erhöhung der Gesamtbehandlungskosten von 11.971 Dollar resultiere und der Krankenhausaufenthalt im Schnitt um 7,54 Tage verlängert würde (Warren *et al.*, 2006). Pittet hingegen kommt zu dem Ergebnis, dass nosokomiale Infektionen 40.000 Dollar an zusätzlichen Kosten verursachten und den Aufenthalt im Krankenhaus um durchschnittlich vierzehn Tage verlängerten (Pittet *et al.*, 1994) und Digiovine wiederum beschreibt eine Kostenerhöhung von 34.508 Dollar und einen um zehn Tage verlängerten Krankenhausaufenthalt (Digiovine *et al.*, 1999).

Prinzipiell kann jeder Mikroorganismus, auch primär apathogene Kommensalen der Haut, eine nosokomiale Infektion auslösen. Im Rahmen der EPIC-Studie (Vincent *et al.*, 1995) konnten jedoch einige Erreger besonders häufig isoliert werden. Bei den fünf häufigsten Auslösern nosokomialer Infektionen handelt es sich um *S.aureus* (30 %), *Pseudomonas aeruginosa* (29 %), Koagulase-negative Staphylokokken (19 %), *E.coli* (13 %) und Enterokokken (12 %).

Eine häufige Ursache nosokomialer Infektionen sind in den Patienten eingebrachte Fremdkörper, die intermittierend oder dauerhaft Organfunktionen ersetzen. In Deutschland werden jährlich etwa 2,5 Millionen Fremdkörper implantiert. Bei Infektionsraten zwischen 1–20 % stellen sie einen entscheidenden Risikofaktor für eine nosokomiale Infektion dar (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Schätzung der jährlich in Deutschland auftretenden fremdkörperassoziierten Infektionen (Mack et al., 2005).

| Fremdkörper            | Anwendungen/ Jahr <sup>a</sup> | Infektionsrate <sup>b</sup> | Infektionen/ Jahr |
|------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| Zentrale Venenkatheter | ~ 1.750.000                    | 1- 5 %                      | 17.000- 87.000    |
| Hüftprothesen          | ≥200.000                       | ≤ 2 %                       | ~4.000            |
| Knieprothesen          | 60.000                         | ≤ 1- 6 %                    | ≤ 600- 3.600      |
| Herzklappen            | 18.000                         | 0,8-- 5,7 %                 | 150- 1.000        |
| Schrittmacher          | 70.000                         | ≤ 1-3 %                     | 700- 2.100        |
| künstliche Linsen      | ~ 300.000                      | ≤ 0,1- 0,3 %                | ≤ 300- 900        |
| CSF- Shunts            | 10.000                         | 2- 20 %                     | 200- 2.000        |

<sup>a</sup> Zahlen der Hersteller und von Fachleuten im Gebrauch der jeweiligen Katheter.

<sup>b</sup> Daten von Bisno und Waldvogel (Bisno and Waldvogel, 1994).

Betrachtet man die fremdkörperassoziierten Infektionen, so zeigt sich eine andere Verteilung in der Häufigkeit der nachgewiesenen Bakterienspezies als bei den allgemeinen nosokomialen Infektionen. So werden, trotz ihres geringen pathogenen Potentials für immunkompetente Menschen (Kloos, 1997; Noble, 1997), Koagulase-negative Staphylokokken am häufigsten als Erreger von fremdkörperassoziierten Infektionen an Venenkathetern, CAPD-Kathetern, Liquorshunts, künstlichen Herzklappen und Gelenken sowie Gefäßprothesen, intraokulären Linsen und Herzschrittmachern isoliert (Emori and Gaynes, 1993; Kloos and Bannerman, 1994; Pfaller and Herwaldt, 1988; Rupp and Archer, 1994).

*S. epidermidis* gehört zur Familie der Micrococcaceae. Da *S. epidermidis* die Fähigkeit fehlt Plasma zu koagglutinieren, wird er zur Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken gezählt. *S. epidermidis* ist mit der größten Populationsdichte unter den Koagulase-negativen Staphylokokken ein wesentlicher Bestandteil der normalen Haut- und Schleimhautflora (Mack, 1999b). Bei *S. epidermidis* handelt es sich um ein rundes bis ovales grampositives, fakultativ anaerobes, unbewegliches, nicht sporenbildendes Bakterium, welches in traubenartigen Haufen vorliegt. Die Pathogenität der Koagulase-negativen Staphylokokken, deren wichtigster Vertreter *S. epidermidis* ist, wurde lange nicht erkannt. Die isolierten *S. epidermidis*-Stämme wurden für eine Kontamination durch die normale Hautflora gehalten und man kann auch heute davon ausgehen, dass 75-90 % der aus Patientenmaterial isolierten Koagulase-negativen Staphylokokken weiterhin als eine solche Kontamination zu betrachten sind (Fidalgo *et al.*, 1990; Herwaldt *et al.*, 1996; Kirchhoff and Sheagren, 1985; Kleeman *et al.*, 1993; Ringberg *et al.*, 1991). Die Bedeutung der übrigen 10-25 % der Isolate wurde erst in den letzten Jahren erkannt. So zeigten Untersuchungen, dass Koagulase-negative Staphylokokken typische opportunistische Erreger sind, welche insbesondere im Rahmen einer Immunkompression und gleichzeitig implantierter Fremdkörper eine große Rolle spielen und zu den häufigsten Verursachern der fremdkörperassoziierten Infektionen zählen (Goldmann and Pier, 1993; Kotilainen *et al.*, 1990).

Die nach der Implantation von Fremdkörper entstehenden Infektionen sind besonders häufig auf Intensivstationen zu finden (Vincent *et al.*, 1995), da die beiden Hauptrisikofaktoren, Immunsuppression und implantierte Fremdkörper, auf diesen Stationen bei den meisten Patienten gefunden werden. So haben viele Patienten auf einer Intensivstation ein durch eine Grunderkrankung geschwächtes Immunsystem. Außerdem muss zur Überwachung und Therapie der Intensivpatienten eine Vielzahl von Kathetern implantiert werden. So sind zum Beispiel Blasen- und Zentralvenenkatheter, Liquorshunts und Ernährungs sonden bei der Behandlung von Intensivpatienten häufig unverzichtbar.

Durch *S. epidermidis* verursachte Infektionen sind sehr schwer zu behandeln, da eine eingeleitete Antibiotikatherapie oft fehlschlägt. Dies liegt zum einen an der Resistenz gegen multiple Antibiotika. So liegt zum Beispiel bei 80 % der Isolate eine Methicillinresistenz vor und in 50 % der Fälle ist eine  $\beta$ -Lactamase zu finden (Archer and Climo, 1994; Archer *et al.*, 2000).

Zum anderen liegt das schlechte Ansprechen einer Antibiotikatherapie an der Fähigkeit von *S. epidermidis*, auf der Oberfläche implantierter Fremdmaterialien in Form mehrlagiger, festhaftender Konsortien zu wachsen. Diese spezielle Organisationsform wird als Biofilm bezeichnet und ist direkt mitverantwortlich für die eingeschränkte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika (Knobloch *et al.*, 2002).

Die Biofilmbildung ist ein in der Natur weit verbreitetes Phänomen. Biofilme sind definiert als Gemeinschaft von Mikroorganismen, die an eine Oberfläche gebunden und von einer selbst synthetisierten polymeren Matrix umgeben sind (Costerton *et al.*, 1999; O'Toole *et al.*, 2000). In der Umwelt sind vielfach unterschiedliche Spezies gemeinsam in einem Biofilm organisiert, es gibt aber auch Monospeziesbiofilme. Diese stehen im medizinischen Bereich als Ursache klinisch relevanter biofilmassoziiierter Infektionen, zum Beispiel durch *S. epidermidis*, im Vordergrund (Costerton *et al.*, 1999). Ein Biofilm ist ein komplexes Gebilde, welches den Bakterien günstige Lebensbedingungen und Schutz vor Umwelteinflüssen bietet (Costerton *et al.*, 2003). Dies gilt insbesondere eben auch für die Empfindlichkeit gegenüber der Wirkung antibiotischer Substanzen (Sheth *et al.*, 1985; Evans and Holmes, 1987; Gristina *et al.*, 1989; Farber *et al.*, 1990; Widmer *et al.*, 1990; Chuard *et al.*, 1991; Duguid *et al.*, 1992; Gander, 1996). Zudem schützt der Biofilm *S. epidermidis* vor Effektormechanismen der frühen Immunantwort (Peters *et al.*, 1982; Heinzelmann *et al.*, 1997; Vuong *et al.*, 2004b; Kristian *et al.*, 2008; Begun *et al.*, 2007). Aufgrund dieser Phänomene ist regelhaft ein Therapieversagen zu beobachten, wenn fremdkörperassoziierte Infektionen allein mit Antibiotika behandelt werden (Davenport *et al.*, 1986; Diaz-Mitoma *et al.*, 1987; Younger *et al.*, 1987). In der Folge ist das Entfernen des implantierten Fremdkörpers oft die einzige Therapiemöglichkeit. Aus dieser Maßnahme resultiert wiederum eine Zunahme der Morbidität und Mortalität.

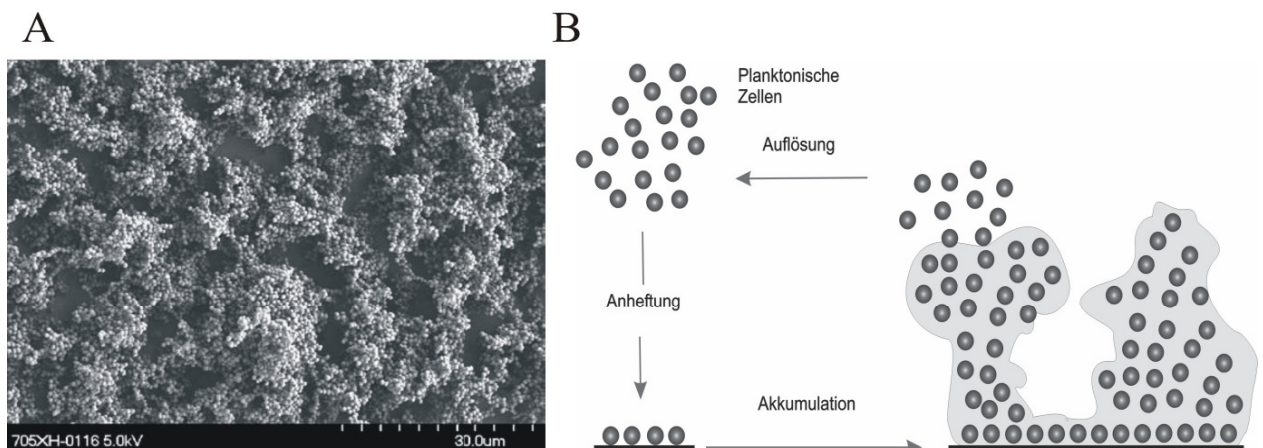
Um innovative Möglichkeiten zu finden, fremdkörperassoziierte Infektionen effektiver behandeln zu können bzw. einer Infektion vorzubeugen, ist es notwendig, sich mit der Pathogenese von durch *S. epidermidis* ausgelöster Infektionen näher zu beschäftigen. Hierbei stehen die Aufklärung der funktionell an der Entstehung eines Biofilms beteiligten Moleküle, deren Regulation sowie die molekulare Epidemiologie im Mittelpunkt des Interesses.

## 1.2 Biofilmbildung von *S. epidermidis*

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *ex vivo* Implantaten zeigten, dass *S. epidermidis*, eingebettet in eine amorphe Grundsubstanz, Fremdkörperoberflächen in Form mehrschichtiger Zellschichten kolonisiert (Peters *et al.*, 1981; Marrie *et al.*, 1982; Marrie *et al.*, 1983; Marrie and Costerton, 1984). Die Mehrzahl der Bakterien weist in dieser Organisationsform keinen direkten Kontakt zur Kunststoffoberfläche auf (Marrie and Costerton, 1984; Peters *et al.*, 1981). Dieses Phänomen wurde zunächst als Schleimbildung bezeichnet, um jedoch Missverständnisse zu vermeiden, wurde der Begriff der Biofilmbildung gebräuchlich (Götz, 2002; Mack, 1999a).

Die Entstehung eines Biofilms verläuft typischerweise in mehreren Phasen (Costerton *et al.*, 1999). Zunächst erfolgt die schnelle primäre Bindung einzelner Bakterienzellen an eine Polymeroberfläche. In der zweiten Phase folgt die Proliferation und Akkumulation der Zellen in vielen Zellschichten (Mack *et al.*, 2004).

Später findet eine Phase der Biofilmreifung statt, in der charakteristische morphologische Veränderungen auftreten können. Anschließend kann eine Loslösung planktonischer Zellen vom Biofilm stattfinden, welche in der Umgebung einen neuen Zyklus der Biofilmbildung initiieren können (Mack *et al.*, 2006).



**Abbildung 1:** Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457. **(A)** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *S. epidermidis* 1457 Biofilm gebildet auf Edelstahl nach 18 h Inkubation. Aufnahme von Harris und Richards (Harris and Richards, 2004). **(B)** Schematische Darstellung des Modells der Biofilmbildung in *S. epidermidis* nach Mack (Mack *et al.*, 2005).

### 1.2.1 Die primäre Bindung

Sobald ein Fremdkörper implantiert worden ist, wird die Oberfläche durch körpereigene Plasmaproteine, extrazelluläre Matrixproteine und Thrombozyten modifiziert (Gristina, 1987). Dieser Prozess wird als Konditionierung bezeichnet. Staphylokokken können sich sowohl direkt an die native als auch an die konditionierte Oberfläche binden. Die Wechselwirkung wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zum einen wird die Adhäsion über unspezifische hydrophobe Interaktionen und Van-der-Waals-Kräfte vermittelt (Fleer and Verhoef, 1989; Jansen *et al.*, 1989). Zum anderen gibt es neben den unspezifischen Faktoren spezifische Faktoren, wie Fibronektin und Fibrinogen (Herrmann *et al.*, 1988; Vaudaux *et al.*, 1989; Rupp *et al.*, 1999), welche die Oberfläche bedecken und an welche sich die Bakterienzellen binden können. Eine Übersicht über die verschiedenen spezifischen Faktoren ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2:** Übersicht spezifischer Adhäsionsfaktoren

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

### 1.2.2 Die akkumulative Phase der Biofilmbildung

In der zweiten Phase der Biofilmbildung kommt es durch Akkumulation zur Ausbildung einer komplexen Biofilmarchitektur. Die Zellen bilden einen mehrschichtigen Biofilm, in dem nur wenige Zellen direkten Kontakt zur Oberfläche besitzen. Da die Zellen jedoch auch ohne Kontakt zur Oberfläche fest in der Organisation gebunden sind, muss es Faktoren geben, die den Aufbau stabilisieren und eine interzelluläre Adhäsion der Bakterienzellen vermitteln (Mack *et al.*, 2006).

Hierbei spielt das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA), als einer der wichtigsten funktionellen Faktoren der Biofilmbildung, eine große Rolle. So konnte bei der Untersuchung von 197 *S. epidermidis*-Stämmen gezeigt werden, dass eine lineare Korrelation zwischen Biofilmbildung und PIA-Produktion besteht (Mack *et al.*, 1996b).

PIA ist ein lineares Homoglykan, welches aus durchschnittlich 130  $\beta$ -(1,6)-verknüpften N-Acetylglukosamineinheiten aufgebaut ist. Mittels Ionenaustauschchromatographie können zwei Polysaccharidfraktionen, Polysaccharid I ( $\geq 80\%$ ) und Polysaccharid II ( $\leq 20\%$ ) unterschieden werden. Die beiden Fraktionen unterscheiden sich in ihrem Anteil an nicht N-acetylierten Zuckerresten. So besitzt Polysaccharid I 15-20 % nicht N-acetylierte Glukosaminreste und ist positiv geladen. Polysaccharid II besitzt weniger nicht N-acetylierte Glukosaminreste und enthält Phosphat und Succinat, was zu einem leicht anionischen Charakter führt (Mack *et al.*, 1996a; Sadovskaya *et al.*, 2005). Diese unterschiedlichen Ladungen scheinen für die Funktion von PIA eine wichtige Rolle zu spielen, da gezeigt werden konnte, dass eine fehlende Deacetylierung von PIA zu einem negativen Biofilmphänotyp führen kann (Vuong *et al.*, 2004a).

Die für die PIA-Synthese kodierenden Gene sind im *icaADBC*-Lokus (Heilmann *et al.*, 1996b) organisiert. Dieser besteht aus vier in gleicher Transkriptionsrichtung organisierten Genen *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* (Gerke *et al.*, 1998; Heilmann *et al.*, 1996b). Ihnen ist das Gen *icaR* vorgelagert, welches als Repressor fungiert (Conlon *et al.*, 2002). Durch Transduktion des Plasmids pTXica in den biofilmb negativen Stamm *S. carnosus* TM300 konnte die Funktion der einzelnen Gene näher beschrieben werden. Im Plasmid pTXica kann das *icaADBC*-Operon unter der Kontrolle eines Xylose-anhängigen Promoters gezielt exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass IcaA die Funktion einer N-Acetylglukosaminyltransferase hat, welche die Anwesenheit von IcaD benötigt, um seine volle Aktivität entfalten zu können (Gerke *et al.*, 1998). IcaC ist als Transmembranprotein möglicherweise am Export von PIA beteiligt (Heilmann *et al.*, 1996b). IcaB hat die Funktion einer Deacetylase, welche sezerniert wird und sich im Kulturüberstand befindet (Vuong *et al.*, 2004a).

Neben PIA existieren jedoch noch andere wichtige Faktoren, die die Biofilmbildung beeinflussen können (Frank *et al.*, 2004; Rohde *et al.*, 2007). So stellte sich bei der Untersuchung von infizierten Hüft- und Knieprothesen heraus, dass etwa 27 % der isolierten biofilmbiositiven *S. epidermidis*-Stämme einen PIA-unabhängigen Biofilm

bilden konnten (Rohde *et al.*, 2007). Bei einem Teil dieser Stämme wird die Biofilmmakkumulation durch das *accumulation-associated protein* (Aap) vermittelt.

Aap ist ein von PIA vollkommen unabhängiger Faktor, welcher die Adhäsion der Bakterienzellen bei der Biofilmbildung beeinflussen kann. Es ist ein zellwandgebundenes 220 kDa großes Protein, welches aus zwei Domänen, Domäne A und B, aufgebaut ist. Die adhäsiven Eigenschaften von Aap sind in der Domäne B zu finden, welche durch die proteolytische Abspaltung von der Domäne A aktiviert wird (Hussain *et al.*, 1997; Rohde *et al.*, 2005). Die proteolytische Abspaltung kann sowohl durch Exoproteasen der Staphylokokken als auch durch wirtseigene Proteasen im Rahmen der frühen Immunantwort vermittelt werden. Somit kann *S. epidermidis* Effektormechanismen des wirtseigenen Immunsystems nutzen, um sich der Elimination durch Phagozytose zu entziehen (Foster, 2005).

In *S. epidermidis*-Stämmen konnte das *biofilm-associated protein* (Bap) (Cucarella *et al.*, 2001) als weiterer Faktor bestimmt werden. Da das Protein jedoch nur in einem kleinen Anteil der untersuchten Stämme zu finden war (Rohde *et al.*, 2004; Rohde *et al.*, 2007), scheint es für die Biofilmbildung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Es existiert zudem ein Bap-Homolog, das *Bap homologue protein* (Bhp), welches in einigen humanen Isolaten von *S. epidermidis* gefunden werden konnte. Da die Spaltung des *bhp*-Gens aus zwei klinischen Stämmen die Fähigkeit zur Biofilmbildung nicht beeinflusst hat, geht man jedoch davon aus, dass auch die Funktion von Bhp für die Biofilmbildung von anderen Determinanten ersetzt werden kann (Lasa and Penades, 2006).

Es gibt demnach viele klinisch signifikante *S. epidermidis* Isolate, welche offenbar die Fähigkeit haben, verschiedene Mechanismen zur interzellulären Adhäsion zu nutzen. (Vandecasteele *et al.*, 2003; Rohde *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2005). Die Biofilmbildung ist somit offensichtlich ein auf der Expression verschiedener, funktionell redundanter Faktoren basierender Prozess. Es stellt sich die Frage, welche Auswirkungen es auf die Biofilmbildung hat, wenn verschiedene Faktoren gemeinsam exprimiert werden. So ist es zum Beispiel denkbar, dass eine funktionelle Verbindung besteht, die synergistische oder antagonistische Phänomene auslösen kann. In diesem Zusammenhang ist die Regulation von großer Bedeutung, da hier entschieden wird, ob zwei Mechanismen tatsächlich parallel und nicht alternierend oder sukzessiv aktiv sind.

### 1.2.3 Regulation der Biofilmbildung in *S. epidermidis*

Die Regulation der *S. epidermidis*-Biofilmbildung ist ein komplexes System, welches noch nicht in allen Einzelheiten bekannt ist. Die Biofilmbildung kann durch Änderung der externen Bedingungen, wie die Entstehung anaerober Verhältnisse (Cramton *et al.*, 2001), höhere Temperaturen (Rachid *et al.*, 2000), hohe Osmolarität (Rachid *et al.*, 2000; Knobloch *et al.*, 2001) und Eisenmangel (Deighton and Borland, 1993) verstärkt werden.

Außerdem können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* spontane Phasenvariationen beobachtet werden (Baddour *et al.*, 1990; Ziebuhr *et al.*, 1997). Eine mögliche Ursache hierfür wird in der reversiblen Integration des Insertionselementes IS256 in das *ica*-Operon gesehen, welche zu einem biofilmnegativen Biofilmphänotyp führt (Ziebuhr *et al.*, 1999).

Der wichtigste an der Biofilmbildung beteiligte Faktor ist jedoch das durch die Geneprodukte des *icaADBC*-Genclusters synthetisierte PIA.

Durch Transposonmutagenese konnte gezeigt werden, dass mindestens vier ungebundene Loci auf die *icaADBC* Expression, und damit auf die PIA-Synthese, Einfluss nehmen (Conlon *et al.*, 2002; Mack *et al.*, 2000). Bei einem der inaktivierten Genorte handelt es sich um *rsbU*, welcher ein positiver Regulator der Expression des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^B$  ist (Knobloch *et al.*, 2001). Dieser reprimiert durch einen noch unbekannten Mechanismus den negativen Regulator der *icaADBC*-Expression, *icaR*, wodurch eine Verstärkung der Biofilmbildung stattfindet.

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

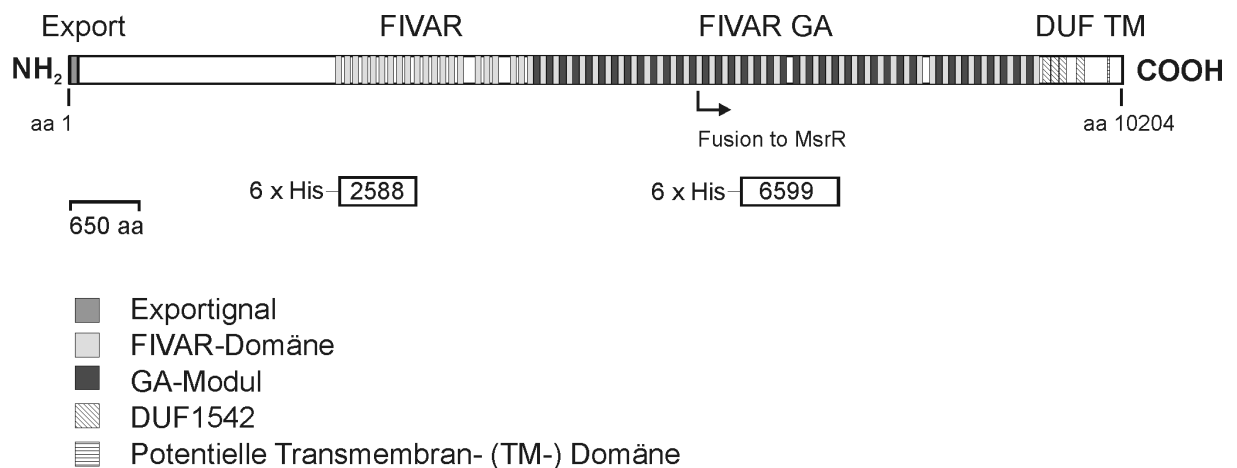
Vor kurzem ist ein neues globales Regulationssystem, das luxS quorum sensing System, identifiziert worden, welches die Biofilmbildung in *S. epidermidis* beeinflusst.



### 1.3 Voraussetzungen für diese Arbeit

Aus der Blutkultur eines Patienten mit einer Portinfektion konnte der *icaADBC*- und biofilmbegative *S. epidermidis*-Stamm 1585 isoliert werden (Rohde *et al.*, 2005). Durch Langzeitkultur konnte eine biofilmpositive Subpopulation dieses Stammes selektioniert werden. Diese biofilmpositive, *icaADBC*-negative Subpopulation wurde als 1585-Ra bezeichnet. Der von *S. epidermidis* 1585-Ra gebildete Biofilm kann durch Proteasen aufgelöst werden. Hieraus wurde abgeleitet, dass Proteine an der Stabilisierung der Biofilmstruktur beteiligt sein müssen.

Um genetische Determinanten des biofilmpositiven Phänotyps zu identifizieren, wurde eine Transposonmutagenese durchgeführt. Durch das Screening von 3500 Transposonmutanten wurden zwei biofilmbegative Mutanten M135 und M84 identifiziert. Mittels Sequenzanalyse der die Tn917-Insertion flankierenden Genomabschnitte konnte gezeigt werden, dass die Insertion in allen Mutanten in einem 30 kb großen *open reading frame* gelegen ist, welcher für das *extracellular matrix binding protein* (Embp) kodiert. Embp ist ein etwa 1 MDa großes Protein, welches im Wesentlichen aus 59 FIVAR- (*Found in various architectures*-) und 38 GA- (*protein G-related*) Domänen aufgebaut ist. Embp ist als wichtiger adhäsiver Faktor in der primären Phase der Biofilmbildung bekannt, da es über die FIVAR-Domänen an Fibronektin binden kann. Aus der Analyse der Mutanten M135 und M84 wurde geschlossen, dass Embp funktionell an der *S. epidermidis* 1585-Ra Biofilmbildung beteiligt ist. Diese Hypothese konnte durch weitere Untersuchungen unter Verwendung der rekombinant erzeugten Embp-Fragmente rEmbp2588 und rEmbp6599 sowie spezifischer, gegen die genannten rekombinanten Embp-Fragmente erzeugten Antiseren bestätigt werden.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Embp-Domänen-Struktur basierend auf bioinformatischen Untersuchungen (<http://smart.embl-heidelberg.de>) der Embp-Aminosäuresequenz von *S. epidermidis* 1585. In *S. epidermidis* 1585-Ra ist Embp bei aa6072 mit dem *S. epidermidis*-Oberflächenprotein MsrR fusioniert (durch einen Pfeil gekennzeichnet). Die Positionen der His<sub>6</sub>-Fusionsproteine rEmbp2588 (welches ausschließlich aus FIVAR-Domänen besteht) und rEmbp 6599 (welches ausschließlich aus GA-Domänen besteht) sind eingezeichnet.

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In den bisherigen Untersuchungen konnten verschiedene oberflächenassoziierte Faktoren von *S. epidermidis* identifiziert werden, welche für die *S. epidermidis*-Biofilmbildung von Bedeutung sind. Es konnte gezeigt werden, dass das Polysaccharid PIA sowie die Zelloberflächenproteine Aap und Embp unabhängig durch die Vermittlung interzellulärer Adhäsion die für die akkumulative Phase der Biofilmbildung von Bedeutung sind. Aufgrund des parallelen Nachweises von *icaADBC*, *aap* und *embp* in klinisch signifikanten *S. epidermidis* Stämmen erscheint es möglich, dass hier gleichzeitig verschiedene interzelluläre Adhäsine aktiv sind. Die hieraus abzuleitende Möglichkeit einer Interaktion der bereits bekannten Faktoren wurde jedoch bisher nahezu nicht in Betracht gezogen. Daher sollen innerhalb dieser Arbeit zunächst eine mögliche Interaktion von Embp und PIA und der Einfluss auf die Biofilmbildung untersucht werden. Um dieses Ziel zu erreichen soll (1.) das Plasmid pTXica in die Stämme 1585 (Embp-negativ), 1585-Ra (Embp-positiv) und die isogene Mutante M135 (Embp-negativ) eingebracht werden, um hierdurch phänotypische Konsequenzen der PIA-Synthese in Embp-positiven und –negativen genetischen Hintergründen zu analysieren. (2.) soll eine mögliche Interaktion zwischen aufgereinigtem PIA und rekombinant exprimierten Embp-Fragmenten geprüft werden.

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit der Einfluss von Proteasen auf die Embp-vermittelte Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1585-Ra untersucht werden. Hierzu sollte (1.) unter der Vorstellung, dass die Inaktivierung des globalen Regulators SigmaB zu einer Überexpression von Proteasen führt, die chromosomalen Tn917-Insertion der funktionellen SigmaB-Mutante M15 in die Stämme 1585 und 1585-Ra eingeführt werden. (2.) sollte der Einfluss der gesteigerten Proteasenexpression auf die Embp-vermittelte Biofilmbildung phänotypisch untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Einwegartikel

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

**Tabelle 3:** Übersicht über die verwendeten Chemikalien

| Chemikalie                | Hersteller       |
|---------------------------|------------------|
| Magermilchpulver          | Merck, Darmstadt |
| Methanol                  |                  |
| Natriumnitrit             |                  |
| $\text{NaN}_3$            |                  |
| $\text{NaCl}$             |                  |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ |                  |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ |                  |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$  |                  |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$  |                  |
| Borsäure                  |                  |
| Eisenchlorid              |                  |
| Ethanol abs               |                  |
| $\text{CaCl}_2$           |                  |
| $\text{NaOH}$             |                  |
| 25%ige $\text{HCl}$       |                  |

Fortsetzung Tabelle 3

| Chemikalie                              | Hersteller                          |
|-----------------------------------------|-------------------------------------|
| Nutrient Broth No.2                     | Oxoid, Ltd., Basingstoke, England   |
| Tryptone                                |                                     |
| Neutralized Soya Pepton                 |                                     |
| D(+)- Glucose                           |                                     |
| Hefeextrakt (Difco)                     | Becton Dickinson, Cockseyville, USA |
| Peptone (Difco)                         |                                     |
| BHI-Brühe (Difco)                       |                                     |
| TSB-BBL                                 |                                     |
| Bacto-Agar (Difco)                      | FMC Bioproduct, Rockland, NY, USA   |
| SeaKem- Agarose                         |                                     |
| Ficoll                                  |                                     |
| Ampicillin                              |                                     |
| Erythromycin                            | Serva, Heidelberg                   |
| Tetracyclin                             |                                     |
| Ethidiumbromid                          |                                     |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)              |                                     |
| Trihydroxyaminomethane (Tris)           | Invitrogen, Carlsbad, USA           |
| EDTA                                    |                                     |
| MgCl <sub>2</sub>                       | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe      |
| Magermilchpulver                        |                                     |
| Diethanolamin                           | Nestle, Vevey, Schweiz              |
| 3-Methyl-2-Benzo-Thiazolinone Hydrozone |                                     |
| Ammoniumsulfamat                        |                                     |
| Lysostaphin                             |                                     |

## 2.1.2 Laborgeräte

**Tabelle 4:** Übersicht über verwendete Laborgeräte

|                         | Gerätebezeichnung                                                                 | Hersteller                                       |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Digital pH-Meter        | Digital-pH-Meter 646                                                              | Knick (Berlin)                                   |
| Fluoreszenzobjektträger |                                                                                   | BioMérieux (Marcy l'Etoile, F)                   |
| Gelelektrophoresekammer | Horizontal                                                                        | Keutz (Reiskirchen)                              |
|                         | Vertikal X Cell Sure Lock™                                                        | BioRad (Hercules, USA)                           |
| Geldokumentationssystem | ChemiDoc™ XRS                                                                     | BioRad (Hercules, USA)                           |
|                         | UV- Transilluminator                                                              | Phase (Lübeck)                                   |
| Küvetten (100 µl)       | Quarz Spectrophoto-meter Cell                                                     | BioRad (Hercules, USA)                           |
| Photometer              | Smart Spec™ 3000                                                                  | BioRad (Hercules, USA)                           |
|                         | ELISA Processor II                                                                | Behring (Marburg)                                |
| Schüttelinkubator       |                                                                                   | New Brunswick Scientific Co (New Brunswick, USA) |
| Schüttler               | Unimax 1010                                                                       | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)   |
| Spannungsquelle         | Power Pac 1000                                                                    | BioRad (Hercules, USA)                           |
| Sterilfilter 0,22 µm    | Spritzenvorsatzfilter                                                             | Merck (Darmstadt)                                |
| Thermocycler            | Primus 96 plus                                                                    | MWG (Eberswalde)                                 |
|                         | Mastercycler gradient                                                             | Eppendorf (Hamburg)                              |
|                         | Icycler IQ™                                                                       | BioRad (Hercules, USA)                           |
| Thermoinkubator         | Thermomixer 5436                                                                  | Eppendorf (Hamburg)                              |
| Ultraschallzerkleinerer | Digital Sonifier®                                                                 | Branson (Danbury, USA)                           |
| Vortex                  | Vortex Genie 2                                                                    | Bender & Hobein AG (Zürich, CH)                  |
| Waagen                  | PC 4400                                                                           | Mettler (Giessen, Schweiz)                       |
|                         | Sartorius 4232                                                                    | Sartorius (Göttingen)                            |
| Westernblotkammer       | X Cell II™ Blot Module                                                            | Invitrogen (Carlsbad, USA)                       |
| Zellkulturschalen       | Deckglasboden (Ø10 cm; Ø5 cm),<br>96-Loch, 24-Loch, alle<br>NunclonΔ™-beschichtet | Nunc (Roskilde, Dänemark)                        |
| Zentrifugen             | Biofuge pico                                                                      | Heraeus (Osterode)                               |
|                         | Centrifuge 5417R                                                                  | Eppendorf (Hamburg)                              |
|                         | Megafuge 1.0 R                                                                    | Heraeus (Osterode)                               |

### 2.1.3 Medien

Alle Medien wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit entionisiertem Wasser angesetzt und durch 20-minütiges autoklavieren bei 121°C sterilisiert.

#### **Skim-Milk-Hydrolyseagar**

Lösung 1:

Hefeextrakt (Difco) 10 g/l

Peptone (Difco) 5 g/l

NaCl 5 g/l

Bacto<sup>®</sup>-Agar (Difco) 32,0 g/l

Lösung 2:

Magermilchpulver (Merck) 16 g/l

Lösung 1 wurde zwanzig Minuten bei 121°C autoklaviert. Lösung 2 wurde zehn Minuten bei 110°C autoklaviert (höhere Temperatur oder längere Zeit führen zur Proteolyse des Kaseins im Milchpulver). Anschließend wurden beide Lösungen zusammengegeben.

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

Columbia- Agar (Difco) 42 g/l

Bacto<sup>®</sup>-Agar (Difco) 1 g/l

Glucose 2,2 g/l

Schafsblut 72 ml/l

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

BHI-Brühe pH 7,4 ± 0,2 (Difco) 37 g/l

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

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

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

#### **NB2+ Brühe zur Phagentransduktion**

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

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

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

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

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

NaCl 5 g/l

Bacto<sup>®</sup>-Agar (Difco) 12 g/l

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

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

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

**TSB ohne Glukose; pH 7,3**

Tryptone (Oxoid) 17 g/l

Neutralized Soya Pepton (Oxoid) 3 g/l

NaCl 5 g/l

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

**2.1.4 Lösungen****DNA-Ladepuffer**

Bromphenolblau 0,25 %

Xylen Cyanol FF 0,25 %

Ficoll 15 %

Die Lösung wurde ohne Autoklavieren verwendet.

**Ethidiumbromid-Stammlösung**

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

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

NaCl 8 g/l

KCl 0,2 g/l

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

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

**PBST-Puffer**

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

Die Lösung wurde ohne vorherige Sterilisation verwendet.

**PBS-Puffer +0,05 % (wt/vol)  $\text{NaN}_3$** 

Die Lösung wurde ohne vorherige Sterilisation verwendet.

**SDS (Stammlösung Dodecylsulfat Natriumsalz)**

Es wurde eine 20 %ige Stammlösung Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS) in  $\text{dH}_2\text{O}$  angesetzt. Die Lösung wurde ohne vorherige Sterilisation verwendet.

**Substratpuffer für ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*); pH 9,8**

Diethanolamin 1 M

$\text{MgCl}_2$  0,5 M

$\text{NaN}_3$  0,02 %

**5x TBE**

Tris (Invitrogen) 54 g/l

Borsäure 27,5 g/l

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

TBE wurde ohne vorheriges Autoklavieren verwendet.

**TE; pH 8**

Tris (Invitrogen) 10 mM

EDTA 1 mM

**TTSB; pH 7,6**

Tris 2,42 g/l

$\text{NaCl}$  7,42 g/l

Tween<sup>®</sup>20 1 ml/l

### 2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide

**Tabelle 5:** Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und die aus ihnen abgeleiteten Transposoninsertionsmutanten

| <i>S. epidermidis</i> -Stamm | Charakteristika                                                 | Referenz                                                |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 1457                         | <i>icaADBC</i> -positiv, Embp-positiv, biofilmpositiv           | (Mack <i>et al.</i> , 1992; Mack <i>et al.</i> , 1996b) |
| 1457M10                      | <i>icaA</i> ::Tn917, biofilmnegativ                             | (Mack <i>et al.</i> , 1994; Mack <i>et al.</i> , 1999)  |
| 1457M135                     | <i>icaADBC</i> -positiv, Embp-negativ                           | (Christner, Rohde, unveröffentlichte Daten)             |
| 1457M13(pTXica)              | <i>icaA</i> ::Tn917, xyloseabhängige <i>icaADBC</i> -Expression | (Mack <i>et al.</i> , 2000)                             |
| 1457M15                      | <i>rsbU</i> ::Tn917, biofilmnegativ                             | (Knobloch <i>et al.</i> , 2001)                         |
| 1585                         | <i>icaADBC</i> -negativ, Embp- negativ, biofilmnegativ          | (Rohde <i>et al.</i> , 2005)                            |
| 1585-Ra                      | <i>icaADBC</i> -negativ, Embp-positiv, biofilmpositiv           | (Christner, Rohde, unveröffentlichte Daten)             |
| M135                         | <i>icaADBC</i> -negativ, <i>embp</i> ::Tn917, biofilmnegativ    | (Christner, Rohde, unveröffentlichte Daten)             |
| 1585(pTXica)                 | <i>icaADBC</i> -positiv, Embp-negativ, biofilmnegativ           | Diese Arbeit                                            |
| 1585-Ra(pTXica)              | <i>icaADBC</i> -positiv, Embp-positiv, biofilmpositiv           | Diese Arbeit                                            |
| M135(pTXica)                 | <i>icaADBC</i> -positiv, Embp-negativ, biofilmnegativ           | Diese Arbeit                                            |
| 1585M15                      | <i>rsbU</i> ::Tn917, Embp-negativ, biofilmnegativ               | Diese Arbeit                                            |
| 1585-RaM15                   | <i>rsbU</i> ::Tn917, Embp-positiv, biofilmnegativ               | Diese Arbeit                                            |

## 2.1.6 Oligonukleotide und Sonden

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

| Name             | Sequenz                           | Verwendung                                                                                      |
|------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IcaA for         | 5`-CAACTGCTCAACCGAGAACA-3`        | Nachweis N-Acetylglukosaminyl-Transferase (PIA- Synthese)                                       |
| IcaA rev         | 5`-TTTGTAGATGTTGTGCCCCA-3`        | Nachweis N-Acetylglukosaminyl-Transferase (PIA- Synthese)                                       |
| htrA1 for28      | 5`-CACTATCGTAATTCTTCACAG-3`       | Nachweis der extrazellulären Serinprotease htrA1                                                |
| htrA1 rev1140    | 5`-GTGTCTTACCATCTCTGATAACT-3`     | Nachweis der extrazellulären Serinprotease htrA1                                                |
| htrA2 for58      | 5`-GAATACTTTCATAACGTAGAGCGA-3`    | Nachweis der extrazellulären Serinprotease htrA2                                                |
| htrA2 rev874     | 5`-TATCAGACACAGTCGTGTCATTAGAC-3`  | Nachweis der extrazellulären Serinprotease htrA2                                                |
| ermB_1243 for    | 5`-GCCATACCACAGATGTTCCAG-3`       | Kontrolle der Transposoninsertion M15 in 1585M15 und 1585-RaM15                                 |
| Res_2166 Rev     | 5`-CAATAATAATATCCCGTTCCAGT-3`     | Kontrolle der Transposoninsertion M15 in 1585M15 und 1585-RaM15                                 |
| Orf1339 For      | 5`-GTAAATGATAGAGGTTGATAATGC-3`    | Kontrolle der Transposoninsertion M15 in 1585M15 und 1585-RaM15                                 |
| rsbU1022 rev     | 5`-ACTTGAAGCTTATTAGCGAGTC-3`      | Kontrolle der Transposoninsertion M15 in 1585M15 und 1585-RaM15                                 |
| SERP0611_45for   | 5`-GTGGTCTTCTAGTGGATAACAATA-3`    | Nachweis der Serinprotease der <i>accessionnumber</i> : SERP0611                                |
| SERP0611_Rev1788 | 5`-TTCTCCGCACCATTTTCGATAA-3`      | Nachweis der Serinprotease der <i>accessionnumber</i> : SERP0611                                |
| SERP1397_For16   | 5`-TTAATTACTGAATATTTATATCAGGTA-3` | Nachweis der Glutamyldopeptidase ( <i>precursor</i> SspA) der <i>accessionnumber</i> : SERP1397 |
| SERP1397_Rev853  | 5`-TTATCTATATGTACAATGACAATTGC-3`  | Nachweis der Glutamyldopeptidase ( <i>precursor</i> SspA) der <i>accessionnumber</i> : SERP1397 |
| SERP1661_For17   | 5`-GTTACTCTTAGATAGGCGCTTTGA-3`    | Nachweis der O-Sialoglycoprotein-endopeptidase der <i>accessionnumber</i> : SERP1661            |

Fortsetzung Tabelle 6

| Name                  | Sequenz                           | Verwendung                                                                                                 |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SERP1661_Rev1070      | 5`-TGACAAATAATAAATTAATCTTAGCA-3`  | Nachweis der O-Sialoglycoprotein-endopeptidase der <i>accessionnumber</i> : SERP1661                       |
| SERP2252_For          | 5`-ACGGTTCGCCTACACGCC-3`          | Nachweis der extrazellulären Elastase (sepA, <i>precursor</i> ) der <i>accessionnumber</i> : SERP2252      |
| SERP2252_Rev1516      | 5`-TCGCACTTACAAGTATTGCCG-3`       | Nachweis der extrazellulären Elastase (sepA, <i>precursor</i> ) der <i>accessionnumber</i> : SERP2252      |
| SERP2390_2391_For     | 5`-TATTCGATTTGAAAGAGTTGCA-3`      | Nachweis der Cysteinprotease ( <i>precursor</i> SspB/SspC) der <i>accessionnumber</i> : SERP2390           |
| SERP2390_2391_Rev1583 | 5`-TTTAGGCGAGGTACCTAAGC-3`        | Nachweis der Cysteinprotease ( <i>precursor</i> SspB/SspC) der <i>accessionnumber</i> : SERP2390           |
| SERP2401_For135       | 5`-GCATTGTAGAATTATCTTGAGTGGTAT-3` | Nachweis der Serinprotease der <i>accessionnumber</i> : SERP2401 (vor Aap)                                 |
| SERP2401_Rev891       | 5`-AAGATCATAATGCGAGTGCTG-3`       | Nachweis der Serinprotease der <i>accessionnumber</i> : SERP2401 (vor Aap)                                 |
| gyrBreal 1            | 5`-CTGACAATGGCCGTGGTATTC 3`       | Relative Transkriptionsanalyse der <i>DNA gyrase subunit B</i> (gyrB)                                      |
| gyrBreal 2            | 5`-GAAGATCCAACACCGTGAAGAC-3`      | Relative Transkriptionsanalyse der <i>DNA gyrase subunit B</i> (gyrB)                                      |
| SERP0611_Real for     | 5`-CTTCAAAACATAGCTATTCACAAC-3`    | Transkriptionsanalyse Serinprotease der <i>accessionnumber</i> : SERP0611                                  |
| SERP0611_Real rev     | 5`-TGTAGACGACACCTGATCCTAT-3`      | Transkriptionsanalyse Serinprotease der <i>accessionnumber</i> : SERP0611                                  |
| SERP1012_Real for     | 5`-GCACCTCCTGATGAACTTAT-3`        | Transkriptionsanalyse 5'-3'-Exonuklease der <i>accessionnumber</i> : SERP1012                              |
| SERP1012_Real rev     | 5`-CGATCAAGCGTGTAACGTT-3`         | Transkriptionsanalyse 5'-3'-Exonuklease der <i>accessionnumber</i> : SERP1012                              |
| SERP1397_Real for     | 5`-TTTACCTACACTTTCCACAT-3`        | Transkriptionsanalyse Glutamylendopeptidase ( <i>precursor</i> SspA) der <i>accessionnumber</i> : SERP1397 |

Fortsetzung Tabelle 6

| Name              | Sequenz                         | Verwendung                                                                                                             |
|-------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SERP1397_Real rev | 5`-GTGTTGTTGTAGGTGAAAATGA-3`    | Transkriptionsanalyse<br>Glutamyldoendopeptidase<br>( <i>precursor</i> SspA) der<br><i>accessionnumber</i> : SERP1397  |
| SERP1661_Real for | 5`-CTTTATTACTAGCAACACCACC-3`    | Transkriptionsanalyse O-<br>Sialoglycoprotein-endoendopeptidase<br>der <i>accessionnumber</i> :<br>SERP1661            |
| SERP1661_Real rev | 5`-CTTATGATAAAGTTGCTCGAAC-3`    | Transkriptionsanalyse O-<br>Sialoglycoprotein-endoendopeptidase<br>der <i>accessionnumber</i> :<br>SERP1661            |
| SERP2252_Real rev | 5`-AGAACGGTAAACAAGATTAGCA-3`    | Transkriptionsanalyse<br>extrazelluläre Elastase (sepA,<br><i>precursor</i> ) der<br><i>accessionnumber</i> : SERP2252 |
| SERP2252_Real rev | 5`-GGTCAAGCTTACTTAATGCA-3`      | Transkriptionsanalyse<br>extrazelluläre Elastase (sepA,<br><i>precursor</i> ) der<br><i>accessionnumber</i> : SERP2252 |
| SERP2390_Real for | 5`-GCTGAAGAACAATATTTATCTCGTG-3` | Transkriptionsanalyse<br>Cysteinprotease ( <i>precursor</i><br>SspB) der <i>accessionnumber</i> :<br>SERP2390          |
| SERP2390_Real rev | 5`-CAAAATATCCTTTTGTATTAGTCAA-3` | Transkriptionsanalyse<br>Cysteinprotease ( <i>precursor</i><br>SspB) der <i>accessionnumber</i> :<br>SERP2390          |

### 2.1.7 Programme und Datenbanken

Die durch PCR und Sequenzierreaktion gewonnenen DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI (InforMax, Oxford, UK) bearbeitet und analysiert. Oligonukleotidsequenzen für die relative Transkriptionsanalyse wurden mit dem Programm Beacon Designer 2 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) generiert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

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

#### 2.2.1.2 Resistenztestung

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

#### 2.2.1.3 Untersuchung Bakterienzellaggregatbildung

Um die Clusterbildung der Bakterien zu testen wurde eine Einzelkolonie in 2 ml Medium (TSB-BBL, TSB ohne Glukose, bzw. TSB ohne Glukose+1 % Xylose) suspendiert und für 6 Stunden bei 37° C und 200 *rpm* inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde eine 1:100 Verdünnung in 20 ml des gleichen Mediums hergestellt. Nach weiterer 18-stündiger Inkubation bei 200 *rpm* wurden 3 ml der Kultur entnommen, in eine 24-Loch-Schale (Nunc) überführt und die unterschiedlich starke Clusterbildung dokumentiert.

#### 2.2.1.4 Biofilmtest

Die Fähigkeit von *S. epidermidis*-Stämmen zur Bildung von Biofilmen wurde mittels eines semiquantitativen Biofilmtests beurteilt (Christensen *et al.*, 1985). Als Positivkontrolle diente *S. epidermidis* 1457 (biofilmpositiv), als Negativkontrolle *S. epidermidis* 1457M10 (biofilmnegativ). Standardmäßig wurde eine Einzelkolonie in 2 ml TSB-BBL suspendiert und für 6 Stunden bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde eine 1:100 Verdünnung im gleichen Medium hergestellt. Hiervon wurden je viermal 200 µl in die Näpfe einer 96-Loch Mikrotiterplatte (Nunc) gegeben. Für die Untersuchung von plasmidtragenden Stämmen wurde ein antibiotikahaltiges Medium verwendet. Nach etwa 20-stündigem Wachstum bei 37°C wurde das Medium abgegossen und die Platte dreimal mit 200 µl PBS pro Napf gewaschen. Die Platte wurde anschließend bei 37°C getrocknet und die anheftenden Bakterien mit 50 µl Kristallviolett pro Napf für 5 Minuten gefärbt. Die Färbelösung wurde unter fließendem Wasser vorsichtig ausgespült und nach erneutem Trocknen die Absorption im ELISA Processor II (Behring) bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm bestimmt. Der Biofilmphänotyp wurde durch Bildung des Mittelwertes von 2x4 Einzelwerten beurteilt. Hierbei galt ein *cut-off* von  $A_{570}$  0,1 als Trennpunkt zwischen biofilmpositivem und -negativem Phänotyp.

#### 2.2.1.5 Koagglutinationstest

##### *Staphylococcus aureus* Cowan I-Präparation

Zellen einer 800 ml TSB BBL-Übernachtskultur wurden durch 10 Minuten Zentrifugation bei 6000 rpm geerntet und zweimal in 100 µl PBS+0,05 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  gewaschen. Das Gewicht der Bakterien wurde bestimmt, die Zellen in einer Konzentration von 10 % (w/v) in PBS+0,05 % (w/v)  $\text{NaN}_3$ +1,5 % (w/v) Formaldehyd aufgenommen und 120 Minuten unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur fixiert. Die Lösung wurde zentrifugiert (6000 rpm, 10 Minuten) und das Pellet in PBS+0,05 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  resuspendiert. Nach Inkubation für 5 Minuten bei 80°C im Wasserbad unter ständigem Schwenken und anschließender Abkühlung auf Eis für einige Minuten wurden die Zellen erneut zweimal in PBS+0,05 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  gewaschen und final nach der Bestimmung des Gewichts der Zellen in einer Konzentration von 10 % (wt/vol) in PBS+0,05 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  aufgenommen. In 1,5 ml Aliquots verteilt wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

Bei der Herstellung des Koagglutinationsreagenz wurden anti-PIA-Antikörper über ihr Fc-Fragment an der Oberfläche von *S.aureus Cowan I* fixiert. Hierzu wurde die aufgetaute *Cowan-I*-Präparation dreimal in 1 ml PBS+0,05 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  gewaschen und das resultierende Pellet in 1 ml PBS+0,05 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  resuspendiert. Dann wurden 100  $\mu\text{l}$  eines polyklonalen PIA-Antiserums hinzugegeben und mit der Bakteriensuspension gründlich gemischt. Anschließend wurde der Ansatz bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden hiernach durch Zentrifugation (14000 *rpm*, 1 Minute) geerntet, in 1 ml PBS+0,05 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  aufgenommen und diese Bakteriensuspension in 9 ml PBS+0,05 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  überführt. Das fertige Koagglutinationsreagenz wurde bei 4°C gelagert.

Für die Durchführung der Koagglutination wurden die Rohextrakte bzw. Überstände der PIA-Präparationen verwandt. Diesen wurden 5  $\mu\text{l}$  entnommen und mit 15  $\mu\text{l}$  des Koagglutinationsreagenz auf einem Glasobjektträger zusammengebracht. Die Zellen wurden homogen mit dem Koagglutinationsreagenz vermischt. Als Negativkontrolle wurde parallel jeweils PBS mit dem Reagenz gemischt. Nach 2 Minuten, in denen die Suspensionen durch kreisende Bewegung weiter vermischt wurden, konnte das Koagglutinationsergebnis unter hellem Licht gegen dunklen Hintergrund abgelesen werden. Bei Koagglutination (Ausfällung stärkerer Agglutinate als bei der Negativkontrolle) wurde von einer relevanten PIA-Synthese des zu untersuchenden Stammes ausgegangen und er als PIA-positiv bezeichnet. Fehlte eine Koagglutination, so wurde dies als Zeichen einer fehlenden PIA-Synthese gewertet und der Stamm als PIA-negativ klassifiziert. Um eine semiquantitative Aussage über die PIA-Produktion eines Stammes machen zu können, wurde eine 1:16, 1:160 und 1:320 Verdünnung der Kultur hergestellt und hiermit der Koagglutinationstest in der oben beschriebenen Weise durchgeführt. Kam es bei einem Stamm auch bei einer höheren Verdünnung zu einer Koagglutination, bei einem anderen jedoch nicht, so wurde die synthetisierte PIA-Menge des ersten Stammes als größer gegenüber der des zweiten Stammes betrachtet.

#### 2.2.1.6 PIA-Präparation für einen Dot-Blot

Standardmäßig wurde eine Einzelkolonie in 2 ml des jeweiligen Mediums suspendiert und für sechs Stunden bei 37°C und 200 *rpm* inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 5 ml einer 1:100 Verdünnung in gleichem Medium hergestellt und in 5 cm Zellkulturschalen (Nunc) überführt. Zur Zellernte nach 18 Stunden wurden die Zellen mit

einem Zellschaber von den Zellkulturschalen geschabt, in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (10 Minuten, 4° C, 5000 *rpm*). Der Überstand wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS gewaschen und anschließend in 3 ml PBS aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde 4×30 Sekunden bei 70 % Leistung auf Eis geschallt, eine optische Dichte von 1 (OD<sub>600</sub>) eingestellt und abermals zentrifugiert (15 Minuten, 6000 *rpm*, 4° C). Der Rohextrakt wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und das Pellet verworfen. Aus dem Rohextrakt und dem Überstand wurden in einer Mikrotiterplatte (Greiner, Nürtingen) geometrische Verdünnungsreihen hergestellt. Die Membran (Immobilon™ Transfer Membranes, Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA) für den Dot-Blot wurde kurz in Methanol und dann in PBS geschwenkt. Anschließend wurden aus den Verdünnungsreihen jeweils 5 µl Probe aufgetragen und die Membran über Nacht in 3 % Magermilchpulver/PBS geblockt. Alle weiteren Schritte wurden auf einem Schüttelinkubator durchgeführt. Gewaschen wurde die Membran zwischen den Inkubationsschritten jeweils 15 Minuten und zweimal 5 Minuten in TTSB. Zum Nachweis von PIA wurde die Membran mit dem PIA-Antiserum 385-2-4 (1:1000 Verdünnung) für 1 Stunde inkubiert. Danach wurde dieser mit einem Anti-Kaninchen-Zweitantikörper (α-rabbit-IgG-PO; Dianova, 1:5000) gekoppelt. Vor Zugabe des Substrats wurde die Membran 2 Minuten in entionisiertes Wasser eingelegt. Die Chemilumineszenz-Detektion der PIA-spezifischen Antigen-Antikörperkomplexe erfolgte mit 7 ml ECL *Western blotting detection reagent* (Amersham Bioscience) für 1 Minute. Die Detektion der Punkte erfolgte unter dem Gel-Dokumentationssystem ChemiDoc™ XRS (BioRad).

#### 2.2.1.7 ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)

Mit dem ELISA sollte die Bindung von PIA an Embp untersucht werden. Hierzu wurde zunächst die Oberfläche der 96-Loch Platte mit 125µl / *well* nach Gelelektrophorese aufgereinigtem PIA in einer Glukosamin-Konzentration von 0,125µg / 100µl beschichtet (wobei jeweils ein Loch am Rand aller Seiten frei gelassen wurde), für 90 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37° C inkubiert und anschließend über Nacht bei 4° C gelagert. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden, soweit nicht anders angegeben, ebenfalls in einer feuchten Kammer bei 37° C durchgeführt. Die Platte wurde ausgeschlagen und vorsichtig 2× mit je 200 µl Waschpuffer

(PBS+0,5 % Tween 20) gewaschen. Um eine unspezifische Antikörperbindung an der Platte zu reduzieren, wurde die Platte anschließend für 2 Stunden mit 100 µl Blockpuffer (PBS + 0,5 % Tween +1 % BSA) inkubiert, danach wieder ausgeschlagen und 2× mit Waschpuffer gewaschen. Das Embp wurde in Waschpuffer zum Beispiel auf eine Konzentration von 100 µM / 100 µl verdünnt, auf die blockierte Platte gegeben, für 2 Stunden inkubiert und die Platte anschließend 2× mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die 90-minütige Inkubation mit 100 µl Embp-Antiserum (anti-17383), welches 1:5000 in Blockpuffer verdünnt wurde. Die Platte wurde 3× mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend der alkalische Phosphatase-konjugierte Zweitantikörper in einer 1:2500 Verdünnung für 1 Stunde hinzu gegeben. Die Platte wurde ein weiteres Mal gewaschen (3×), mit 100 µl / well Substrat (Substratpuffer + 1,45 mg/ml Phosphatase Substrat 104 (Sigma)) beschickt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Reaktion mit 50 µl / well 2 M NaOH gestoppt wurde, wurde die Absorption der Proben im ELISA-Processor II (Behring) bei 405 nm (Referenzwellenlänge: 492 nm) gemessen.

#### 2.2.1.8 Hexosamintest (Lane-Smith and Gilkerson, 1979)

Um die PIA-Konzentration zu bestimmen, wurde ein Hexosamintest durchgeführt. Dazu wurden 300 µl der zu untersuchenden Probe in ein Eppendorftube überführt und mit 300 µl HCl vermischt. Um eine Standardkurve zu erhalten, wurde der Versuch ebenfalls mit einer definierten Acetylglukosamin-Konzentration durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde HCl (0,5 M) verwendet. Die Eppendorftubes wurden anschließend für 2 Stunden in einem Steri-Back-Gerät bei 110° C inkubiert und die inkubierte Mischung auf drei neue Eppendorftubes (jeweils 200 µl) verteilt. Diese 200 µl wurden jeweils mit 400 µl 2,5 % (w/v) Natriumnitrit vermischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl 12,5 % (w/v) Ammoniumsulfamat tropfenweise hinzugegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann wurden 200 µl 0,25 % (w/v) 3-Methyl-2-Benzo-Thiazolinone Hydrozone (MBTH) hinzugegeben, gut gemischt und 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Nun wurden 200 µl 0,5 % (w/v) Eisenchlorid hinzugefügt und fünf Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde sofort die Extinktion bei 650 nm gemessen. Um die Konzentration zu bestimmen wurde der gemessene Wert mit der ermittelten Standardkurve verglichen.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation wurde mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das System beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen, gefolgt von einer Denaturierung und Präzipitation der Proteine und chromosomalen DNA, wobei die Plasmid-DNA in Lösung verbleibt (Birnboim und Doly, 1979). Zur Aufreinigung erfolgte eine Adsorption der Plasmid-DNA an eine Silicatmatrix in einer hoch konzentrierten Salzlösung. Die anschließende Elution der DNA fand in salzarmem Puffer statt. Das Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.2.2 DNA-Präparation

Die DNA-Präparation wurde mit dem *QIAamp DNA Mini Kit* durchgeführt. Hierzu wurde eine Einzelkolonie in 3 ml TSB-BBL für 18 Stunden bei 37° C und 200 *rpm* inkubiert. 1500 µl der Kultur wurden in ein Eppendorftube überführt und bei 13000 *rpm* und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen, die restlichen 1500 µl der Kultur auf das Pellet gegeben und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 180 µl ATL-Puffer resuspendiert, 10 µl Lysostaphin (1500 µl / ml) hinzugegeben und für 45 Minuten bei 37° C in einem Heizblock bei etwa 700 *rpm* inkubiert. Dann wurden 20 µl Proteinase K hinzugefügt und erneut für 30 Minuten bei 56° C in einem Heizblock bei etwa 700 *rpm* inkubiert. Das weitere Vorgehen erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### 2.2.2.3 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

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

aufgetragen. Er enthält 18 Fragmente der folgenden Größen: 23 kb, 9,4 kb, 6,5 kb, 4,3 kb, 2,3 kb, 3 kb, 1,3 kb, 1 kb, 872 bp, 564 bp, 310 bp, 281 bp, 271 bp, 234 bp, 194 bp, 125 bp, 118 bp, 72 bp.

#### 2.2.2.4 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Standardmäßig wurde die PCR mit Hilfe des *DNAzyme™ Polymerasekit* (Finnzyme) in einem *DNA-Thermal Cycler* (MWG) mit beheiztem Deckel durchgeführt. In 50 µl Ansatz wurden etwa 100 ng *template*-DNA, Primer in einer Konzentration von 10 pM/µl, dNTPs mit je 200 µM, 1 U Polymerase und der zugehörige Mg<sup>2+</sup>-haltige Puffer (1,5 mM) eingesetzt. Initial wurde die DNA 2 Minuten bei 94° C denaturiert, in den anschließenden Zyklen nur für 15 Sekunden. Für die Anlagerung der Primer wurde die Temperatur für 30 Sekunden auf die jeweils optimale *Annealing*temperatur abgesenkt. Der Zweitstrang wurde bei 72° C synthetisiert. Nach in der Regel 30-35 Zyklen schloss sich eine siebenminütige Synthesephase an, um eine vollständige Komplementierung aller Einzelstränge zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben auf 4° C heruntergekühlt. Die Kontrolle der PCR fand in einer Agarosegelelektrophorese statt.

Außerdem wurde das *Triple master PCR®* System (Eppendorf, Hamburg) für die PCR verwendet. Hierbei wurden für einen 50 µl Gesamtansatz 10 µl Master Mix 1 (ca. 100 ng *template*-DNA, Primer in einer Konzentration von 10 pM/µl) und 40 µl Master Mix 2 (dNTPs mit je 200 µM, 2,5 U Polymerase, magnesiumhaltiger *High Fidelity*-Puffer (2,5 mM)) auf Eis hergestellt. Nachdem Master Mix 1 zu Master Mix 2 gegeben wurde, sollte das PCR-Programm schnellstmöglich gestartet werden, um unspezifische Primerbindungen bei niedrigen Temperaturen zu vermeiden. Das PCR-Programm und die weitere Verarbeitung entsprechen der des Finnzyme-Polymerasekits.

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

Bei der Phagentransduktion handelt es sich um ein Verfahren, bei dem genetisches Material eines Donors im Rahmen des Vermehrungszyklus eines Bakteriophagen mobilisiert und bei der Infektion des Recipienten in diesen eingeführt (transduziert) wird.

### **Herstellung eines plasmidtragenden Phagenlysates**

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

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

### **Plaquetitration**

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

### **Transduktion**

Der über Nacht auf Blutagar kultivierte Empfängerstamm wurde in einer Konzentration von  $0,5$ - $1 \times 10^{10}$  CFU/ml entsprechend einer  $OD_{578}$  von 11 in NB2+ suspendiert. Hiervon wurde 1 ml mit dem gleichen Volumen des plasmidtragenden Phagenlysates in einem Phagen-Bakterien-Verhältnis von 0,1-1 für 30 Minuten in einem Schüttelinkubator bei 37° C infiziert. Die Adsorption der Phagenpartikel wurde durch Zugabe von 40 µl 1 M Natriumcitrat gestoppt. Das Medium wurde bei 1560xg abzentrifugiert, die Zellen zweimal in 2 ml BHI-Brühe mit 20 mM Natriumcitrat gewaschen und in 3 ml des gleichen Mediums resuspendiert. Um die Expression der plasmidkodierten Resistenzgene zu gewährleisten, inkubierte man die Bakterien in

diesem Medium für 3 Stunden in einem Schüttelinkubator bei 37°C. Die Suspension wurde mit 3 ml BHI-Softagar, der mit 20 mM Natriumcitrat und dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, gemischt, und auf BHI-Agarplatten (+Antibiotikum) verteilt. Die Transduktanten wurden in der Regel nach 24-48 Stunden isoliert.

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

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

Standardmäßig wurde eine Einzelkolonie in 2 ml TSB-BBL suspendiert und für 6 Stunden bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 10 ml einer 1:100 Verdünnung in gleichem Medium hergestellt. Zur Zellernte nach 6 bzw. 18 Stunden wurden die Kulturen in 50 ml Falcontubes auf Eis überführt, 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert und mit 2 ml eiskalten PBS überschichtet. Danach wurden die Zellen zehn Sekunden mit 70 % Leistung auf Eis geschallt. Nach Zugabe von 1,5 ml der Bakterienkultur zu 3 ml *RNA protect™ Bacteria Reagent* (Qiagen) wurde die Kultur fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Tubes wurden bei 5000×g und Raumtemperatur zehn Minuten zentrifugiert, das Pellet mit 10 ml eiskaltem PBS überschichtet und in zwei Durchgängen jeweils 3×30 Sekunden bei 70 % Leistung auf Eis geschallt und danach 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde jeweils wieder mit 10 ml eiskalten PBS überschichtet. Danach wurde das Pellet in 200 µl TE-Puffer resuspendiert und unter Schütteln für 10 Minuten bei 37°C mit 150 U/ml Lysostaphin verdaut. Nach Zugabe von 700 µl RLT-Puffer (*RNeasy® Mini Kit*, Qiagen) und 7 µl β-Mercaptoethanol wurde die Probe 15 Sekunden mit Hilfe eines Vortexgerätes gemischt und in ein 2 ml *Lysing Matrix Tube* (Bio101® Systems, Qbione, Morgan Irvine, CA, USA) mit Silikapartikeln überführt. Der Zellaufschluß erfolgte im *FastPrep™ cell disruptor* (FB 120, BIO 101, Savant instruments, Farmingdale, NY, USA) für dreimal 20 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit. Anschließend wurden die Zelltrümmer 1 Minute bei Maximalgeschwindigkeit abzentrifugiert. Die weitere Bearbeitung des Überstandes wurde unter Verwendung des *RNeasy® Mini Kits* nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch im GeneQuant-Spektral-

photometer bei 260 nm bestimmt. Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

#### 2.2.2.7 Transkriptionsanalyse durch *Real time*-PCR

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

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

### 2.2.3 Proteinchemische Methoden

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

Für die Extraktion von Proteinen wurde standardmäßig eine Einzelkolonie in 2 ml TSB ohne Glukose bzw. TSB ohne Glukose mit 1 % Xylose suspendiert und für 6 Stunden bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 20 ml einer

1:100 Verdünnung im gleichen Medium hergestellt und 6 bzw. 18 Stunden bei 37° C und 200 *rpm* inkubiert. Zur Zellernte wurden die Kulturen auf Eis entnommen, 15 Minuten bei 5242 $\times$ g und 4° C zentrifugiert und einmal in 5 ml PBS gewaschen.

Nach Zugabe von 250  $\mu$ l 4x Probenpuffer (1:4 verdünnt) wurde der Ansatz für 15 Minuten auf 95° C erhitzt, wobei alle 3 Minuten jede Probe für 15 Sekunden gevortext wurde. Anschließend wurden die Zelltrümmer 30 Minuten bei 13280 $\times$ g und 4° C abzentrifugiert. Der Überstand konnte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° C gelagert werden.

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

Die Konzentration einer Proteinpräparation wurde photometrisch bei 595 nm im *Smart Spec*<sup>TM</sup> 3000 unter Verwendung des Protein-Assay Farbstoffkonzentrates (BioRad) gemessen. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Der Vergleich mit einer zuvor erstellten Standardkurve einer Albuminverdünnungsreihe ließ die Bestimmung der Konzentration zu.

#### 2.2.3.3 **Lowry-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration**

Um die Konzentration einer Proteinpräparation photometrisch bei 750 nm im *Smart Spec*<sup>TM</sup> 3000 zu bestimmen, wurde neben dem Bradford-Test auch der Lowry-Test verwendet. Hierfür wurden die Proben der Proteinpräparation 1:3 verdünnt und nach den Angaben des Herstellers bearbeitet. Um die Proteinkonzentration bestimmen zu können, wurden die gemessenen Werte mit einer zuvor erstellten Standardkurve einer Albuminverdünnungsreihe verglichen.

#### 2.2.3.4 **SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) zur Auftrennung von Proteinen**

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

#### 2.2.3.5 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine Membran (Immobilon™ *Transfer Membranes*, Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA) übertragen.

Die Gele wurden im *X Cell II*™ Blot-Modul (Invitrogen) für 2 Stunden bei 30 V auf eine Invitrolon™ PVDF-Membran (Invitrogen) transferiert. Als Laufpuffer diente der NuPage® Transferpuffer. Es wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Danach wurde die Membran über Nacht in 3 % Magermilchpulver/PBST geblockt. Alle weiteren Schritte wurden auf einem Schüttelinkubator durchgeführt. Gewaschen wurde die Membran zwischen den Inkubationsschritten jeweils einmal 15 Minuten und zweimal 5 Minuten in PBST.

Für die Detektion des Embps wurde die alkalische Phosphatase verwendet. Hierzu wurde zunächst mit PBST der Blockpuffer vom Gel gewaschen. Als erstes Antiserum wurde das rEmbp  $\alpha$ 17383 (1:100) in einer 1:10000 Verdünnung eingesetzt und eine Stunde inkubiert. Spezifisch gebundenes rEmbp-Antiserum wurde mit Hilfe eines alkalische Phosphatase-konjugierten Anti-Kaninchen-Zweitantikörper dargestellt. Enzymatische Spaltung des zugegebenen Substrates (*Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase*) bewirkte das Sichtbarwerden der Antigen-Antikörperkomplexe in Form blauer Banden auf der Membran.

#### 2.2.3.6 Proteasescreening auf Skim-Milk-Hydrolyseagarplatten

Im Proteasetest können qualitative und grob quantitative Unterschiede in der Proteaseaktivität optisch nachgewiesen werden. Hierbei kann zwischen denaturierenden und lysierenden Proteasen unterschieden werden. Die denaturierenden Proteasen denaturieren das in den Agar eingegossene Kasein so, dass ein weißer Hof um die *S. epidermidis*-Kultur entsteht. Die lysierenden Proteasen sind in der Lage das Kasein vollständig umzusetzen, so dass bei ihnen ein heller kaseinfreier Hof um die Bakterienkultur herum entsteht. Der Agar wurde etwa 3 mm dick in 9 cm Petrischalen gegossen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Auf die Platten wurde mittig jeweils ein autoklaviertes Antibiotika-Testplättchen (Schleicher&Schuell) gelegt. Die zu untersuchenden Stämme wurden in einer TSB-BBL-Vorkultur kultiviert, bis eine Optische Dichte von 0,4 ( $OD_{600}$ ) erreicht war. Von der Kultur wurden 10  $\mu$ l auf die Testplättchen gegeben. Anschließend wurden die Platten umgedreht, damit die Suspension nicht aus den Testplättchen herauslaufen konnte. Die Platten wurden insgesamt für 3 Tage bei 37 C im Brutschrank inkubiert. Nach jeweils 48 und 72 Stunden wurden die Proteolysezonen vermessen und photographiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Interaktion von PIA und Embp

Grundsätzlich haben vorhergehende Arbeiten gezeigt, dass bei *S. epidermidis* Protein (Embp)- und Polysaccharid (PIA)-abhängige Biofilmbildung unterschieden werden können. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, in welcher Form PIA und das extrazelluläre Matrix-bindende Protein (Embp) bei gleichzeitiger Expression interagieren.

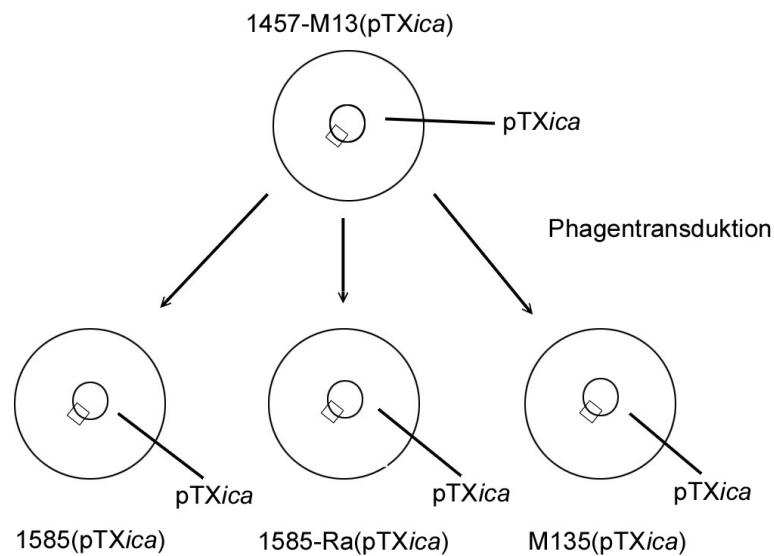
Hierzu wurde das Plasmid pTXica, über welches die PIA-Synthesegene *icaADBC* Xylose-abhängig exprimiert werden können, in den Stamm 1585 (*icaADBC*-negativ, biofilmnegativ, Embp-negativ), den Stamm 1585-Ra (*icaADBC*-negativ, biofilmpositiv, Embp-positiv) und die durch Transposonmutagenese hervorgegangene Mutante M135 (*icaADBC*-negativ, biofilmnegativ, *embp*::Tn917-positiv) eingebracht.

Diese drei Stämme wurden ausgewählt, da sie sich in der *embp*-Expression unterscheiden. Der biofilmpositive Stamm 1585-Ra konnte durch Passage und Selektion adhärenter Zellen aus dem biofilmnegativen Stamm *S. epidermidis* 1585 selektioniert werden. *S. epidermidis* 1585-Ra unterscheidet sich von 1585 durch eine verstärkte Expression von *embp*. Die molekularen Mechanismen, die der Heraufregulierung der *embp*-Expression und der damit verbundenen phänotypischen Änderung zugrunde liegen, sind nicht bekannt. Deshalb wird als dritter Stamm M135, eine Mutante des Stammes 1585-Ra, untersucht. Bei diesem Stamm ist durch Transposonmutagenese die *embp*-Expression singulär ausgeschaltet. Beim Vergleich der Stämme 1585-Ra und M135 kann also davon ausgegangen werden, dass alle beobachteten Unterschiede auf die unterschiedliche Expression von *embp* zurückzuführen sind.

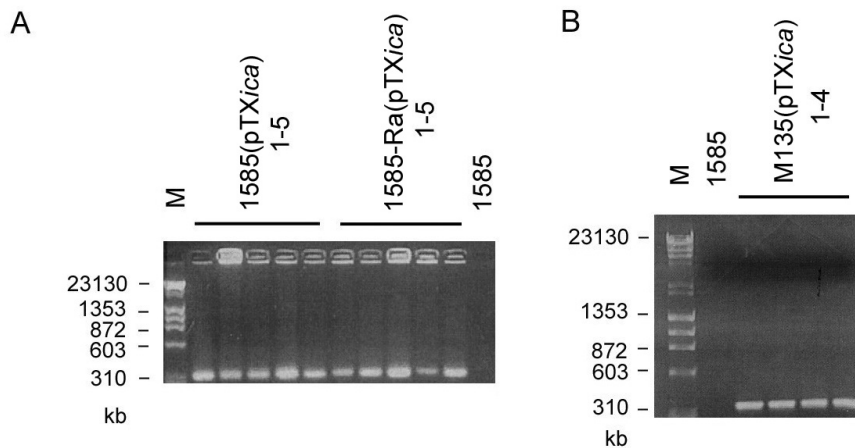
#### 3.1.1 Transduktion von pTXica in die Stämme *S. epidermidis* 1585, 1585-Ra und M135

Unter Verwendung des Phagen A6C wurde ein hochtitriges Phagenlysate aus dem Stamm *S. epidermidis* 1457-M13(pTXica) (Mack *et al.*, 2000) erzeugt. Unter Verwendung dieses Phagenlysates wurde pTXica in die Stämme *S. epidermidis* 1585, 1585-Ra und M135 transduziert (Abbildung 4). Positive Transduktanten wurden vorläufig durch den erwarteten Resistenzphänotyp (Tetracyclin-resistent) erkannt. Die

erfolgreiche Transduktion wurde schließlich mittels PCR unter Verwendung *icaA*-spezifischer Primer nachgewiesen (Abbildung 5). Die resultierenden Transduktanten erhielten die Bezeichnung 1585(pTXica), 1585-Ra(pTXica) und M135(pTXica). In diesen Stämmen kann durch Xylose-Induktion *icaADBC* exprimiert werden, so dass es konsekutiv zur PIA-Synthese kommt.



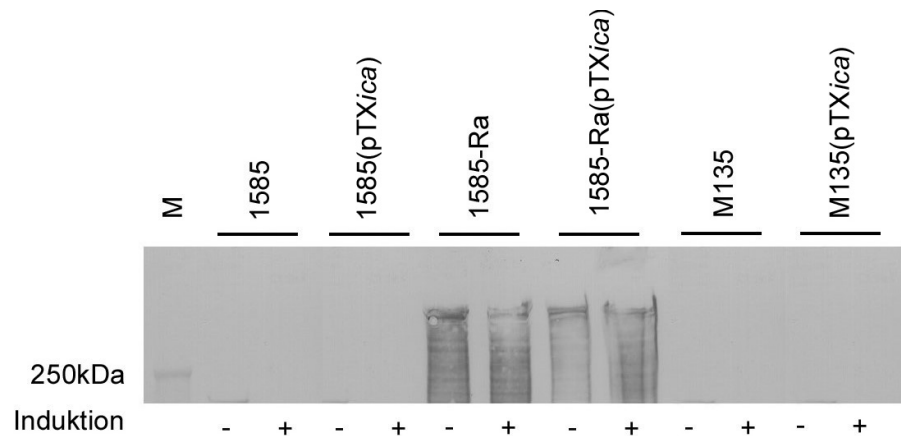
**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Phagentransduktion von pTXica aus dem Stamm 1457-M13(pTXica) in die *S. epidermidis*-Stämme 1585, 1585-Ra und M135 unter Verwendung des Phagen A6C. Die erfolgreiche Transduktion wurde mittels PCR unter Verwendung *icaA*-spezifischer Primer nachgewiesen.



**Abbildung 5:** (A) Nachweis von *icaA* in fünf unabhängigen pTXica-Transduktanten der Stämme *S. epidermidis* 1585 (1585(pTXica) 1-5) und 1585-Ra (1585-Ra(pTXica) 1-5) mittels PCR unter Verwendung *icaA*-spezifischer Primer. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung dargestellt. Der *icaADBC*-negative Wildtypstamm 1585 wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Als Marker (M) diente *Hind*III gesplante DNA des Phagen  $\lambda$  und *Hae*III gesplante DNA des Phagen X174. (B) Nachweis von *icaA* in vier unabhängigen pTXica-Transduktanten des Stammes *S. epidermidis* M135 (M135(pTXica) 1 – 4) mittels PCR unter Verwendung *icaA*-spezifischer Primer. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung dargestellt. Der *icaADBC*-negative Wildtypstamm 1585 wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Als Marker (M) diente *Hind*III gesplante DNA des Phagen  $\lambda$  und *Hae*III gesplante DNA des Phagen X174.

Da in dieser Arbeit untersucht werden sollte, ob eine Interaktion zwischen PIA und Embp besteht, sollte sichergestellt werden, dass durch die Phagentransduktion die Stämme in ihrer Eigenschaft *embp* zu exprimieren nicht verändert worden sind. Dazu wurde ein Western Blot der Wildtypstämme und korrespondierenden Transduktanten durchgeführt, in welchem Embp mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen wurde.

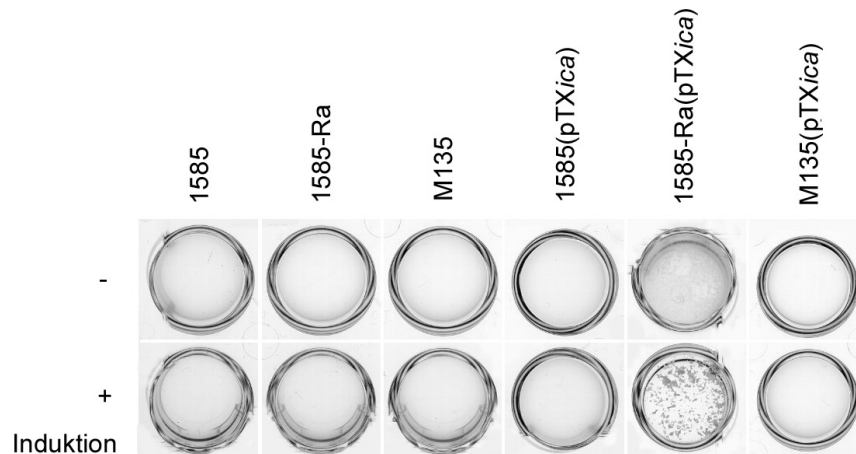
Wie in Abbildung 6 dargestellt, konnten die Stämme 1585, M135 sowie ihre Transduktanten kein Embp exprimieren, während 1585-Ra und Transduktante weiterhin Embp-positiv waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Phagentransduktion und Expression von *icaADBC* nicht zu einer Veränderung der *embp*-Expression in den Zielstämmen geführt hat. Das bedeutet, dass die Stämme geeignet sind ein Interagieren von Embp und PIA bei der *S. epidermidis*-Biofilmbildung zu untersuchen.



**Abbildung 6:** Nachweis der Embp-Expression von *S. epidermidis* 1585, 1585(pTXica), 1585-Ra, 1585-Ra(pTXica), M135 und M135(pTXica) nach Anzucht unter *icaADBC*-induzierten (+) und nicht induzierten (-) Bedingungen. Präparationen von oberflächenassoziierten Proteinen der jeweiligen Stämme wurde in einem NuPageTM 4-12 % Bis-Tris-Gradientengel (Invitrogen) aufgetrennt und anschließend mittels Elektrottransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Als Marker diente der *Precision Plus Protein Dual Color*-Standard (Invitrogen). Die Membran wurde mit einem Embp-spezifischen Kaninchenantiserum (anti-rEmbp17383, prä-absorbiert an *S. epidermidis* 1585) inkubiert und gebundene Antikörper mit einem alkalischer Phosphatase-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper nachgewiesen. Während in den Stämmen *S. epidermidis* 1585 und M135 sowie den korrespondierenden Transduktanten kein Embp nachgewiesen werden konnte, kam es bei *S. epidermidis* 1585-Ra sowie der korrespondierenden Transduktante sowohl unter nicht induzierten als auch unter induzierten Bedingungen zur Darstellung von Embp mit einem erwarteten Molekulargewicht von etwa 500 kDa. Der Schmier unterhalb der 500 kDa Bande muss am ehesten als Ausdruck einer unspezifischen Embp-Degradation gewertet werden.

### 3.1.2 Phänotyp bei der Kultivierung der Bakterien unter PIA-induzierten und nicht-induzierten Bedingungen

Bereits bei der Kultivierung der untersuchten Stämme fielen deutlich unterschiedliche Phänotypen der Bakterienstämme unter *icaADBC*-induzierten Bedingungen auf. So ließ sich bereits makroskopisch beobachten, dass sich der Stamm 1585-Ra(pTXica), sobald er in xylosehaltigem Medium wuchs, deutlich von den anderen Stämmen unterschied. Er bildete Zellaggregate und war im Vergleich zu den anderen Stämmen sehr schwer in Suspension zu bringen.

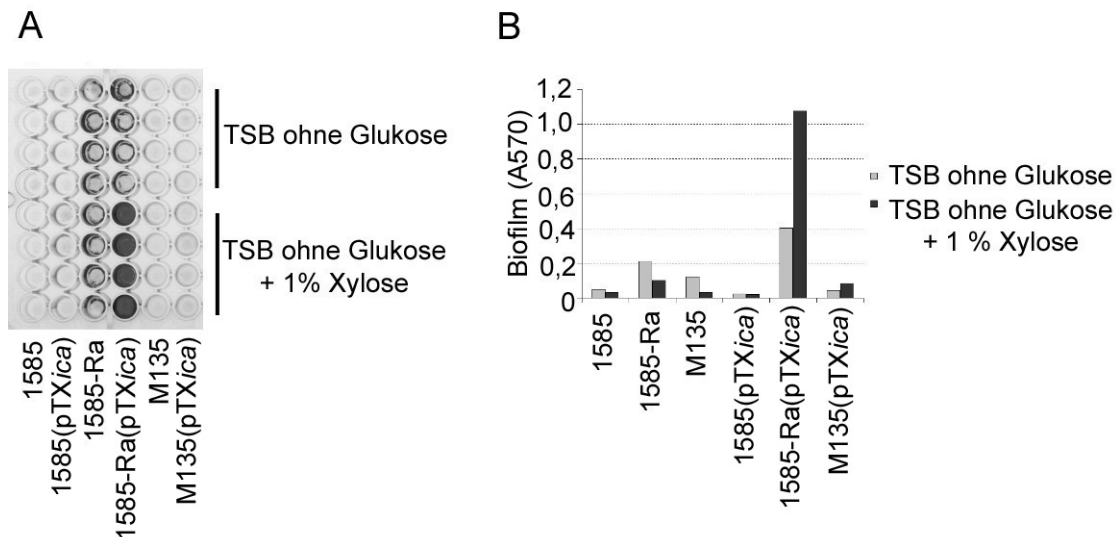


**Abbildung 7:** Dokumentation makroskopisch sichtbarer Unterschiede während des Wachstums der verschiedenen Bakterienstämme unter *icaADBC*-induzierten Bedingungen. Zur Bakterienkultivierung wurde eine Vorkultur der Stämme 1585, 1585-Ra, M135, 1585(pTXica), 1585-Ra(pTXica) und M135(pTXica) 1:100 in TSB ohne Glukose bzw. TSB ohne Glukose + 1 % Xylose verdünnt und 18 Stunden bei 37°C inkubiert. 3 ml der Bakteriensuspension wurden entnommen und die Zellaggregate in einer 24-well-Platte (Nunc) dokumentiert.

Es ist bekannt, dass PIA eine entscheidende Rolle bei der Zelladhäsion spielt (Mack *et al.*, 1996b). Embp scheint diese zelladhäsiven Eigenschaften von PIA zu beeinflussen, denn nur bei dem Stamm 1585-Ra(pTXica), der sowohl PIA als auch Embp bildet, können Zellaggregate beobachtet werden. Ohne die Expression von *embp* hat PIA scheinbar nicht so starke interzellulär wirksame adhäsive Eigenschaften. Da bei der Biofilmbildung die Adhäsion von Bakterienzellen eine entscheidende Rolle spielt, wurde postuliert, dass die beobachteten Unterschiede der Adhäsionsfähigkeit der *S. epidermidis*-Stämme Auswirkungen auf die Biofilmbildung haben. Daher wurde die Fähigkeit der Stämme 1585, 1585-Ra, M135 und ihrer Transduktanten zur Biofilmbildung untersucht.

### 3.1.3 Einfluss von *embp*- und *icaADBC*-Expression auf den Biofilmpheänotyp von *S. epidermidis* 1585, 1585-Ra und M135

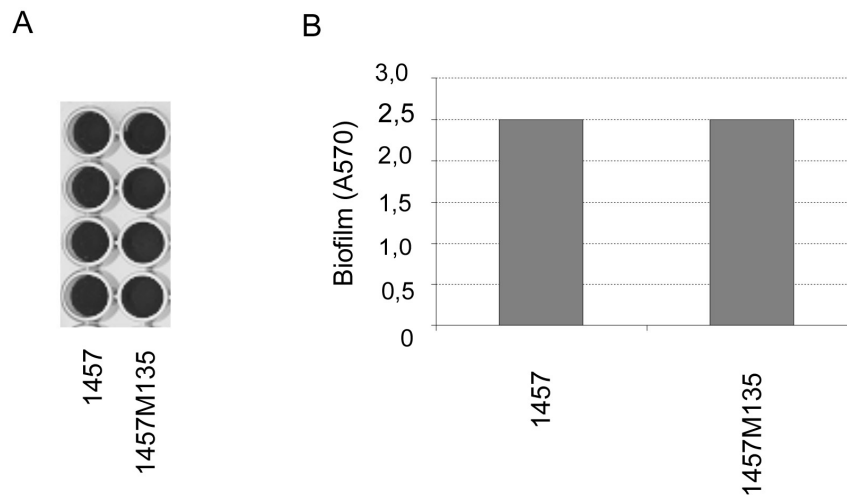
In einem Biofilmtest wurde der Biofilmpheänotyp der Stämme *S. epidermidis* 1585, 1585-Ra, M135 und ihrer Transduktanten 1585(pTXica), 1585-Ra(pTXica) und M135(pTXica) jeweils in TSB ohne Glukose und in TSB ohne Glukose + 1 % Xylose geprüft. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden parallel der biofilmbildende Wildtypstamm *S. epidermidis* 1457 und seine biofilmbildende Mutante 1457M10 mitgeführt.



**Abbildung 8: (A)** Semiquantitativer Biofilmtest der Stämme 1585, 1585-Ra, M135 und ihrer korrespondierenden Transduktanten unter induzierten und nicht induzierten Bedingungen. Der Biofilm wurde mit Kristallviolett angefärbt und die Absorption bei 570 nm gemessen. **(B)** Graphische Darstellung der semiquantitativen Biofilmmessung von *S. epidermidis* 1585, 1585-Ra, M135 und ihrer Transduktanten unter induzierten und nicht induzierten Bedingungen. Es wurde der Mittelwert aus jeweils vier Messwerten aus zwei Versuchen gebildet. Im Gegensatz zu *S. epidermidis* 1585-Ra(pTXica), bei welchem eine Verstärkung des Biofilms unter induzierten Bedingungen beobachtet werden konnte, führte die Expression von PIA in den Stämmen *S. epidermidis* 1585(pTXica) und M135(pTXica) nicht zu einer Induktion eines biofilmpositiven Phänotyps. In der Positivkontrolle 1457 konnte sowohl unter induzierten als auch unter nicht induzierten Bedingungen eine Biofilmbildung nachgewiesen werden. In der Negativkontrolle 1457M10 konnte sowohl unter induzierten als auch unter nicht induzierten Bedingungen keine Biofilmbildung nachgewiesen werden. Aus Übersichtsgründen werden die Kontrollen nicht in den Abbildungen gezeigt.

Im Biofilmtest zeigte sich, dass bei dem Stamm 1585-Ra(pTXica) die Expression von *icaADBC* in xylosehaltigem Medium zu einer signifikanten Verstärkung der Biofilmbildung führte. Zudem war zu beobachten, dass in *S. epidermidis* 1585, 1585(pTXica), M135 und M135(pTXica) die Expression von *icaADBC* zu keiner Biofilmbildung führt. Das bedeutet, dass die PIA-vermittelte Biofilmbildung in 1585-Ra(pTXica) von der *embp*-Expression abhängig ist.

In einem weiteren Biofilmtest wurde die Transduktante 1457M135 (*icaADBC*-positiv) untersucht, in welcher die *embp*-Expression des Wildtypstamms 1457 ausgeschaltet wurde. Damit sollte vor einem unabhängigen genetischen Hintergrund geprüft werden, ob die Ausschaltung von *embp* in jedem Falle Auswirkungen auf die PIA-vermittelte Biofilmbildung in *S. epidermidis* hat.



**Abbildung 9:** (A) Semiquantitativer Biofilmtest der *S. epidermidis*-Stämme 1457 und 1457M135. Der Biofilm wurde mit Kristallviolett angefärbt und die Absorption bei 570 nm gemessen. (B) Graphische Darstellung der semiquantitativen Biofilmmessung von *S. epidermidis* 1457 und 1457M135. Es wurde der Mittelwert aus jeweils vier Messwerten aus zwei Versuchen gebildet.

Hierbei zeigte sich, dass die Transduktante 1457M135 und der Wildtypstamm 1457 weiterhin gleichermaßen einen Biofilm bildeten. Das bedeutet, dass die Ausschaltung von *embp* nicht in jedem Falle zu einer Veränderung des Biofilmphänotyps führt.

Anhand der Ergebnisse aus dem Biofilmtest wird deutlich, dass PIA grundsätzlich einen biofilmpositiven Phänotyp unterstützt, jedoch nicht in jedem Falle ausreichend ist um einen biofilmpositiven Phänotyp zu erzeugen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Embp* in *S. epidermidis* 1585-Ra Einfluss auf die PIA-vermittelte Biofilmbildung zu haben scheint, da die gleichzeitige Expression von PIA und *Embp* zu einer signifikanten Biofilmverstärkung führte.

Der Einfluss von *Embp* auf die PIA-vermittelte Biofilmbildung lässt sich jedoch nicht grundsätzlich auf die gesamte Gruppe der *S. epidermidis*-Stämme verallgemeinern, da anhand des Biofilmtests von 1457 und 1457M135 auch gezeigt werden konnte, dass *Embp* nicht in jedem Falle essentiell für die Biofilmbildung in *S. epidermidis* ist. Es müssen demnach neben *Embp* weitere Faktoren existieren, welche die Biofilmbildung beeinflussen.

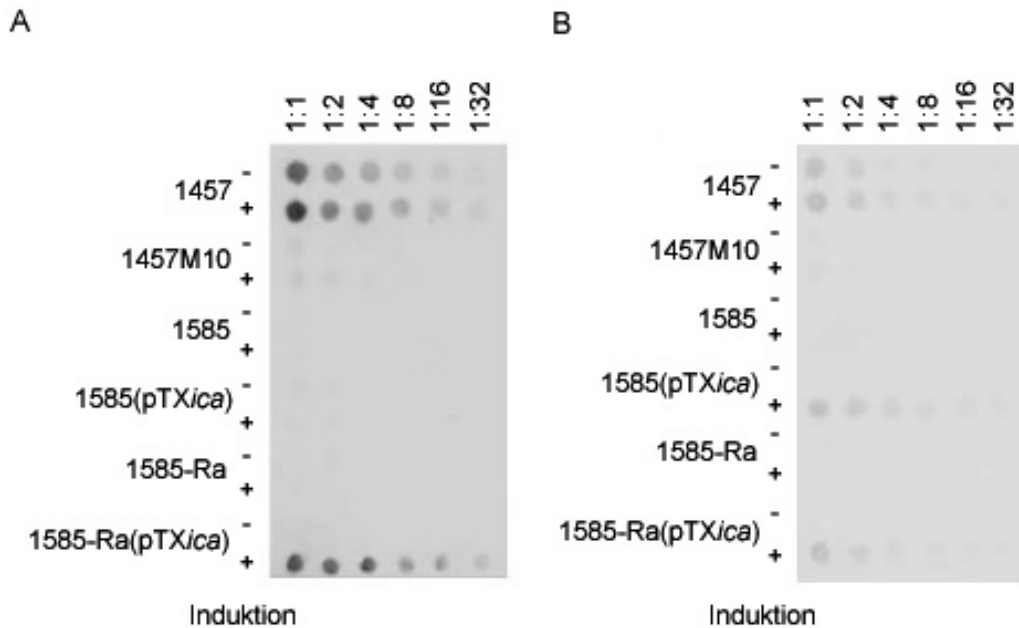
Um die PIA-vermittelten Prozesse innerhalb der Biofilmbildung in 1585, 1585-Ra, M135, 1585(pTXica), 1585-Ra(pTXica) und M135(pTXica) näher zu analysieren sollte die PIA-Verteilung auf der Zelloberfläche der *S. epidermidis*-Stämme und im Kulturüberstand mittels eines Dot-Blots näher untersucht werden.

### 3.1.4 Untersuchung der PIA-Expression an der Zelloberfläche und im Überstand von *S. epidermidis* mittels eines semiquantitativen Dot-Blots

Dazu wurde eine PIA-Präparation der Stämme 1585, 1585-Ra, M135, 1585(pTXica), 1585-Ra(pTXica) und M135(pTXica) in xylosefreien und xylosehaltigen TSB ohne Glukose hergestellt. Von der PIA-Präparation wurde eine Verdünnungsreihe (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32) auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und mittels eines PIA-spezifischen Antiserums (Serum 385-2-4) PIA an der *S. epidermidis*-Zelloberfläche und im Überstand nachgewiesen. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden der biofilmbildende, PIA-positive Wildtypstamm 1457 und seine biofilmm-negative, PIA-negative Mutante 1457M10 mitgeführt.

Von den Stämmen 1585, 1585-Ra und M135 wurde erwartungsgemäß weder unter nicht induzierten noch unter induzierten Bedingungen PIA gebildet. Ebenso wurde von den Transduktanten 1585(pTXica), 1585-Ra(pTXica) und M135(pTXica) in TSB ohne Glukose kein PIA gebildet.

Wurde jedoch ein induzierendes Medium verwendet, bildeten sowohl 1585(pTXica) als auch M135(pTXica) PIA, welches ausschließlich im Überstand (1585(pTXica): 1:8 Verdünnung; M135(pTXica): 1:8- 1:16 Verdünnung) nachweisbar war. Im Gegensatz dazu war das von 1585-Ra(pTXica) gebildete PIA sowohl an der Oberfläche der Bakterien (Verdünnungsstufe 1:16) als auch im Überstand (Verdünnungsstufe 1:4) nachweisbar.



**Abbildung 10: (A)** Nachweis von PIA unter induzierten und nicht induzierten Bedingungen an der Zelloberfläche der Stämme 1585, 1585-Ra und ihrer Transduktanten mittels Dot-Blot. Eine PIA-Präparation der Bakterienzellen wurde auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und PIA mittels eines PIA-spezifischen Antiserums (385-2-4) nachgewiesen. An das PIA-spezifische Antiserum wurde ein Anti-Kaninchen-Zweitantikörper gekoppelt und dieser mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion unter einem Geldokumentationssystem nachgewiesen. **(B)** Nachweis von PIA unter induzierten und nicht induzierten Bedingungen im Überstand der Stämme 1585, 1585-Ra und ihrer Transduktanten mittels Dot-Blot. Eine PIA-Präparation des Überstands der Stämme wurde auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und PIA mittels eines PIA-spezifischen Antiserums (385-2-4) nachgewiesen. An das PIA-spezifische Antiserum wurde ein Anti-Kaninchen-Zweitantikörper gekoppelt und dieser mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion unter einem Geldokumentationssystem nachgewiesen.

Es konnte somit gezeigt werden, dass PIA zwar von 1585(pTXica) und M135(pTXica) gebildet werden kann, jedoch nicht an der Zelloberfläche gebunden wird. Im Gegensatz dazu bildet 1585-Ra(pTXica) PIA, welches eine Zelladhäsion und Biofilmbildung vermittelt und an der Oberfläche der Bakterien fixiert werden kann.

Da die Bindung von PIA an der Oberfläche von *S. epidermidis*-Zellen für die Zelladhäsion und Biofilmbildung ein essentieller Faktor ist, ist die fehlende Fixierung von PIA an der Zelloberfläche als Grund für den negativen Biofilmphänotyp von 1585(pTXica) und 1585-Ra(pTXica) zu diskutieren.

Um die unterschiedliche Verteilung von PIA an der Oberfläche und im Überstand unter induzierten Bedingungen in einem weiteren Experiment nachzuweisen, wurde ein Koagglutinationstest der *S. epidermidis*-Stämme durchgeführt.

### 3.1.5 Untersuchung der PIA Expression an der Oberfläche und im Überstand von *S. epidermidis* mittels eines semiquantitativen Koagglutinationstests

Anhand dieses Tests wurden ausschließlich die Transduktanten 1585(pTXica), 1585-Ra(pTXica) und M135(pTXica) untersucht, da von den Stämmen 1585, 1585-Ra und M135 in den vorherigen Versuchen erwartungsgemäß kein PIA gebildet wurde. Die Transduktanten wurden in xylosehaltigem Medium angezüchtet, zentrifugiert und eine PIA-Präparation der Bakterienzellen und des Überstandes durchgeführt. Von den PIA-Präparationen wurde eine Verdünnungsreihe (1:1, 1:16, 1:160 und 1:320) hergestellt und mit der Positivkontrolle, dem Wildtypstamm 1457, verglichen. Als Negativkontrollen wurden stets auch die PIA-negative Transmutante 1457M10 und ein steriles Medium mitgeführt.

**Tabelle 7:** Übersicht über die Ergebnisse des PIA-Nachweises auf der Zelloberfläche sowie im Kulturüberstand mittels Koagglutinationstest

**A**

| Zelloberfläche  | Verdünnung |      |       |       |
|-----------------|------------|------|-------|-------|
|                 | 1:1        | 1:16 | 1:160 | 1:320 |
| 1585(pTXica)    | +          | +    | -     | -     |
| 1585-Ra(pTXica) | +          | +    | +     | -     |
| M135(pTXica)    | +          | +    | -     | -     |

**B**

| Zellüberstand   | Verdünnung |      |       |       |
|-----------------|------------|------|-------|-------|
|                 | 1:1        | 1:16 | 1:160 | 1:320 |
| 1585(pTXica)    | +          | +    | +     | -     |
| 1585-Ra(pTXica) | +          | +    | -     | -     |
| M135(pTXica)    | +          | +    | +     | -     |

Sowohl bei 1585(pTXica), 1585-Ra(pTXica) und M135(pTXica) konnte an der Bakterienzelloberfläche PIA nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass 1585-Ra(pTXica) (1:160) im Vergleich zu den *embp*-negativen Transduktanten (1:16)

auch in höheren Verdünnungsstufen eine Koagglutination zeigte, was für eine höhere PIA-Konzentration an der Bakterienzelloberfläche von 1585-Ra(pTXica) spricht.

Bei der Untersuchung des Überstandes zeigte sich ein umgekehrtes Bild bei der Verteilung von PIA. So war bei allen Transduktanten PIA im Überstand nachzuweisen. Es zeigte sich jedoch, dass bei 1585(pTXica) (1:160) und M135(pTXica) (1:160) im Vergleich zu 1585-Ra(pTXica) (1:16) größere Mengen an nicht zellwandgebundenem PIA im Überstand nachzuweisen waren.

Damit konnten die Ergebnisse aus dem Dot-Blot bestätigt werden, dass das gebildete PIA durch Embp eindeutig stärker an die Oberfläche gebunden werden kann und dies möglicherweise als Ursache für die verstärkte interzelluläre Adhäsion und stärkere Biofilmbildung durch 1585-Ra(pTXica) anzusehen ist.

Im Biofilmtest der Transduktante 1457M135 hatte sich gezeigt, dass *embp* in diesem *S. epidermidis*-Stamm nicht der entscheidende Faktor ist, welcher zu einem biofilm-positiven Phänotyp führt. Das bedeutet, dass in diesem Falle andere Faktoren existieren müssen, welche die für die Biofilmbildung essentielle interzelluläre Adhäsion vermitteln können. Um zu prüfen, ob diese Embp-unabhängigen Faktoren ebenfalls die Bindung von PIA an der Bakterienzelloberfläche beeinflussen, wurden *S. epidermidis* 1457 und 1457M135 in einem Koagglutinationstest untersucht.

**Tabelle 8:** Übersicht über die Ergebnisse des Koagglutinationstests von 1457 und 1457M135

**A**

| Zelloberfläche | Verdünnung |       |       |       |
|----------------|------------|-------|-------|-------|
|                | 1:100      | 1:150 | 1:200 | 1:250 |
| 1457           | ++         | ++    | ++    | ++    |
| 1457M135       | ++         | ++    | +     | -     |
| 1457M10        | -          | -     | -     | -     |

**B**

| Zellüberstand | Verdünnung |       |       |       |
|---------------|------------|-------|-------|-------|
|               | 1:100      | 1:150 | 1:200 | 1:250 |
| 1457          | (+)        | -     | -     | -     |
| 1457M135      | ++         | -     | -     | -     |
| 1457M10       | -          | -     | -     | -     |

Es zeigte sich, dass bei der PIA-Präparation von 1457 bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:250 PIA an der Bakterienzelloberfläche nachzuweisen war. Bei der Transduktante 1457M135 war PIA bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:200 eindeutig am Pellet nachzuweisen. Weiterhin zeigte sich, dass bei 1457 etwas weniger PIA im Überstand nachzuweisen war als bei der Transduktante 1457M135.

Das bedeutet, dass die Ausschaltung von *embp* in 1457M135 zu einer leicht veränderten PIA-Verteilung an Oberfläche und Überstand führt. Da die beobachteten Unterschiede jedoch allenfalls minimal sind, scheint die Fixierung von PIA an der Oberfläche und die dadurch vermittelte Biofilmbildung in 1457 und 1457M135 *Embp*-unabhängig zu sein.

Dies bestätigt die bereits im Biofilmtest erhobenen Ergebnisse, dass in *S. epidermidis* 1585-Ra(pTXica) *Embp* der entscheidende Faktor zu sein scheint, der zur Bindung von PIA an die Zelloberfläche und zur Biofilmbildung führt, dies jedoch keine allgemeingültige Aussage für alle *S. epidermidis*-Stämme ist.

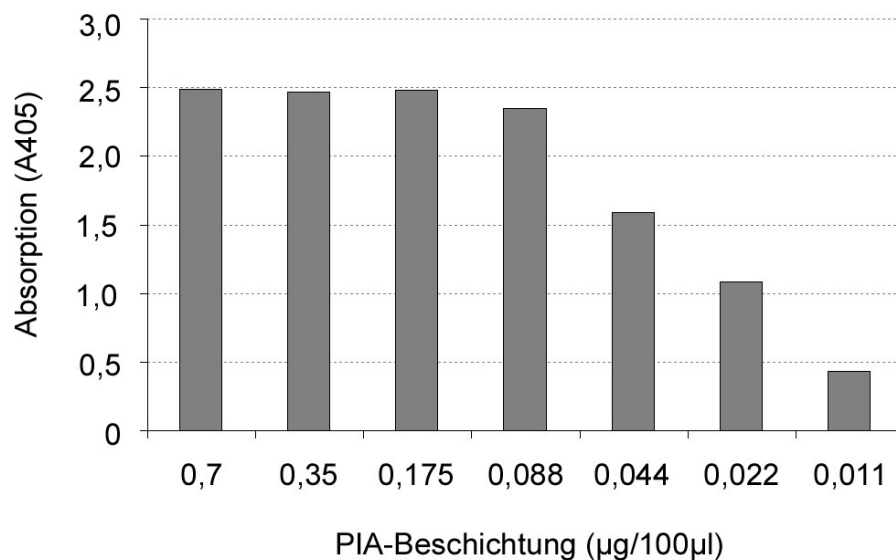
### 3.1.6 Untersuchung der direkten Bindung von *Embp* an PIA anhand eines Festphasen-Immunassays (*Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay*)

Es ist bekannt, dass *Embp* FIVAR-Domänen besitzt, denen eine N-Acetylglukosaminbindende Aktivität zugesprochen wird (Christner, Rohde, unveröffentlichte Daten). Da PIA aus N-Acetylglukosamineinheiten aufgebaut ist und somit eine direkte Bindung zwischen *Embp* und PIA gut vorstellbar ist, sollte eine direkte Interaktion der beiden Faktoren anhand eines Festphasen-Immunassays (ELISA) geprüft werden. Hierzu sollte eine Maxi-Sorp-Mikrotiterplatte (Nunc) mit aufgereinigtem PIA beschichtet und anschließend mit einem rekombinant erzeugten *Embp*-Fragment r*Embp*17383, welches aus FIVAR- und GA-Domänen besteht, inkubiert werden. Um gebundenes r*Embp*17383 nachzuweisen stand ein *Embp*-spezifisches Antiserum zur Verfügung.

Für den ELISA wurde eine Maxi-Sorp-Mikrotiterplatte (Nunc) verwendet, welche effizient PIA an die Oberfläche binden kann (Mack *et al.*, 1995). Da diese Platte jedoch ebenfalls eine hohe Bindungskapazität für Proteine besitzt, musste eine Möglichkeit gefunden werden, um unspezifische Bindungen der eingesetzten rekombinanten *Embp*-Fragmente sowie Antiseren an die Platte zu minimieren. Um dies zu

erreichen, wurde nach der Behandlung mit PIA die Platte in einem weiteren Schritt mittels BSA geblockt. Des Weiteren wurde in einem Vorversuch die für die Beschichtung optimale PIA-Konzentration bestimmt, bei welcher eine Sättigung der Plattenoberfläche mit PIA erreicht wird.

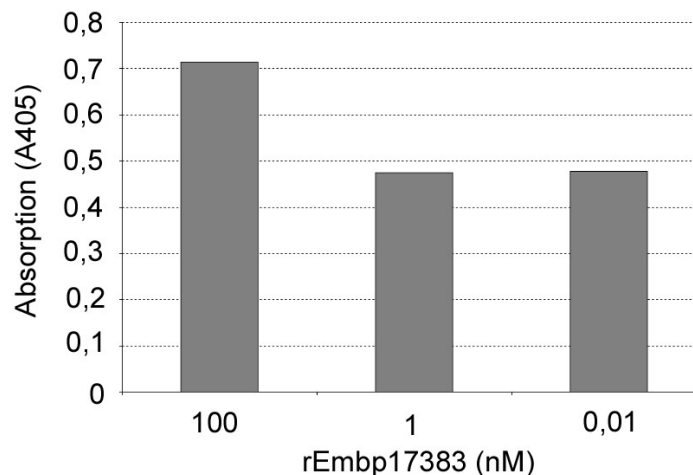
Hierzu wurde eine Maxi-Sorp-Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen PIA-Mengen wie in „Material und Methoden“ beschrieben beschichtet und gebundenes PIA mittels eines spezifischen PIA-Antiserums sowie einem alkalische Phosphatase konjugiertem anti-Kaninchenantiserum nachgewiesen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass es ab einer PIA-Menge von 0,175  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  auch bei größeren PIA-Mengen zu keiner Zunahme der nachgewiesenen Absorption kam.



**Abbildung 11:** Graphische Darstellung der gemessenen Absorption in einem ELISA, in dem die optimale Konzentration für die Beschichtung einer Maxi-Sorp-Platte (Nunc) mit interzellulären Polysaccharid-Adhäsın (PIA) ermittelt wurde. Die Maxi-Sorp-Platte wurde mit unterschiedlichen PIA-Konzentrationen (0,7  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , 0,35  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , 0,175  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , 0,088  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , 0,044  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , 0,022  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , 0,011  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ) beschichtet und anschließend mit BSA geblockt. Zum Nachweis des plattengebundenen PIA wurde als Erstantikörper das PIA-spezifische Antiserum 385-2-4 in einer Verdünnung von 1:2500 verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein alkalischer Phosphatase konjugierter anti-Kaninchen-Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt. Die Absorption des umgesetzten Substrates wurde im ELISA-Processor II (Behring) bei 405 nm (Referenzwellenlänge: 492 nm) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 4 Messwerten.

Hieraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass bei einer PIA Konzentration von 0,175  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  PIA die Plattenoberfläche vollständig mit PIA gesättigt ist. In den weiteren ELISA-Untersuchungen wurde eine PIA-Konzentration von 0,5  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  PIA verwendet, um die Mikrotiterplatte zu beschichten.

Um zu prüfen, ob PIA und rEmbp17383 eine direkte Bindung miteinander eingehen können, wurde eine Maxi-Sorp-Platte mit 0,5 µg/100 µl PIA beschichtet, mit BSA geblockt und mit verschiedenen Konzentrationen an rEmbp-Fragmenten (100 nM rEmbp17383, 1 nM rEmbp17383 und 0,01 nM rEmbp17383) inkubiert. Das gebundene rEmbp17383 wurde mittels eines spezifischen Antiserums nachgewiesen.



**Abbildung 12:** Graphische Darstellung der gemessenen Absorption in einem ELISA, in dem eine Bindung von PIA und rEmbp17383 untersucht wurde. Die Maxi-Sorp-Platte wurde mit 0,5 µg/100 µl PIA beschichtet, mit BSA geblockt und mit verschiedenen Konzentrationen rEmbp-Fragmenten (100 nM rEmbp17383, 1 nM rEmbp17383 und 0,01 nM rEmbp17383) inkubiert. Um gebundenes rEmbp17383 nachzuweisen wurde das anti-17383 Kaninchenantiserum verwendet. Als Zweitantikörper diente ein alkalische Phosphatase konjugierter anti-Kaninchenantikörper (1:2500 Verdünnung). Die Absorption des umgesetzten Substrates wurde im ELISA-Processor II (Behring) bei 405 nm (Referenzwellenlänge: 492 nm) gemessen und der Mittelwert aus jeweils 4 Messwerten gebildet. Als Negativkontrollen wurde in einigen Näpfen die Untersuchung ohne eine vorherige PIA-Beschichtung durchgeführt. Um die Bedingungen der Negativkontrollen der eigentlichen Untersuchung anzupassen, wurden auch hier unterschiedliche Konzentrationen an rEmbp17383 (Negativkontrolle 1: 100 nM rEmbp17383, Negativkontrolle 2: 1 nM rEmbp17383, Negativkontrolle 3: 0,01 nM rEmbp17383) eingesetzt. Die Ergebnisse sind aus Übersichtsgründen nicht dargestellt. Negativkontrolle 1: 0,57 (A405); Negativkontrolle 2: 0,11 (A405); Negativkontrolle 3: 0,11 (A405).

Dabei zeigte sich, dass die Höhe der gemessenen Absorption direkt abhängig von der eingesetzten rEmbp17383-Konzentration war. Je höher die eingesetzte rEmbp17383-Konzentration war, desto höher war das gemessene Signal. Bei einer Konzentration von 100 nM Embp wurde jedoch ein deutlich positives Signal in der Negativkontrolle 1 gemessen. Diese Beobachtung könnte zum Beispiel auf die Eigenschaften der Maxi-Sorp-Platte zurückzuführen sein.

Da diese eine extrem große Bindungskapazität für vielerlei Substanzen besitzt erschien es möglich, dass rEmbp17383 trotz der Beschichtung mit PIA unspezifisch an der Plastikoberfläche gebunden wird.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob unspezifische Bindungen durch Einsatz alternativer Blocklösungen umgangen werden könnten. Hierzu wurde die Mikrotiterplatte mit einer PIA-Konzentration von 0,5 µg/100 µl beschichtet und jeweils mit BSA, Magermilch oder Gelatine geblockt. Anschließend wurde die Platte mit rEmbp17383-Fragmenten inkubiert und diese mittels eines spezifischen Anti-Embp-Antiserums nachgewiesen. Um den Erfolg der Blockierung beurteilen zu können, wurde in den Negativkontrollen auf eine Beschichtung der Platte mit PIA verzichtet. Dabei zeigte sich, dass unabhängig von der verwendeten Blocklösung in den Negativkontrollen ein positives Signal gemessen werden konnte, sobald hohe Konzentrationen an rEmbp17383 verwendet wurden. Das bedeutet, dass die verwendeten Blocklösungen nur bedingt geeignet sind, unspezifische Bindungen von rEmbp17383 an die Mikrotiterplatte zu verhindern.

Da das im ELISA gemessene Signal demnach nicht eindeutig auf eine Bindung von rEmbp17383 an PIA zurückzuführen ist, musste nach einer anderen Möglichkeit gesucht werden, die Bindung von rEmbp17383 an PIA zu überprüfen. Hierzu wurde ein Inhibitions-ELISA gewählt.

### 3.1.7 Untersuchung der Bindung von PIA an rEmbp17383 im Inhibitions-ELISA

Das Prinzip des Inhibitions-ELISA beruht auf einer kompetitiven Inhibition der Bindung eines Liganden an den plattengebundenen Interaktionspartner durch Präinkubation des potentiellen Bindungspartners (rEmbp17383) mit dem zur Beschichtung eingesetzten Faktor (PIA).

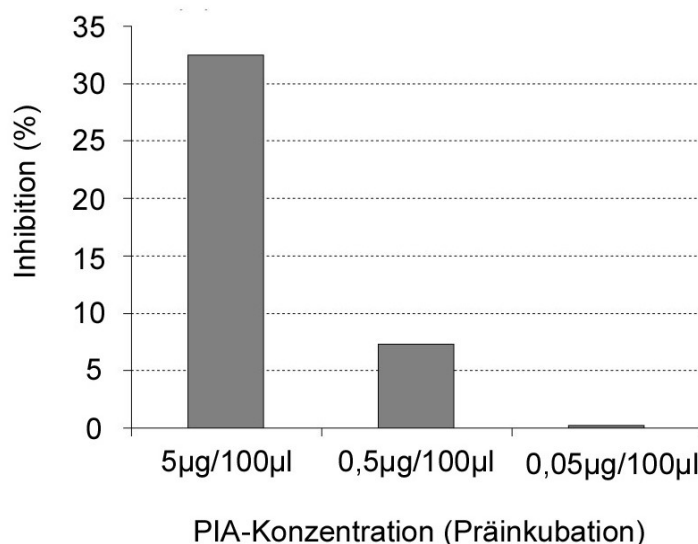
Hierzu wurde eine Mikrotiterplatte mit 0,5 µg/100µl PIA beschichtet und anschließend mit BSA geblockt. Die rekombinanten Embp-Fragmente rEmbp17383 (0,125 nM rEmbp17383) wurden mit unterschiedlichen PIA-Konzentrationen (5 µg/100µl PIA; 0,5 µg/100µl PIA und 0,0005 µg/100µl PIA) präinkubiert. Anschließend wurde die geblockte Mikrotiterplatte mit dem Präinkubationsgemisch beschickt. Als Positivkontrolle wurde parallel die Bindung von rEmbp17383 ohne vorherige Präinkubation

untersucht. Das Ausmaß der Inhibition der Bindung wurde durch die Formel

$$1 - \left( \frac{A_{405 \text{Präinkubation}}}{A_{405 \text{keine Präinkubation}}} \right) \text{ berechnet.}$$

Bei diesem Versuchsaufbau ist zwar ebenfalls eine Bindung von rEmbp17383 an die Maxi-Sorp-Platte möglich, jedoch können trotzdem Rückschlüsse auf die Bindung von rEmbp17383 und PIA gezogen werden, da die Inhibition der Bindung von rEmbp17383 und PIA anhand der gemessenen Signale berechnet wird und somit unabhängig von möglichen unspezifischen Bindungen ist. Damit ist es möglich, die im ELISA beobachtete Bindung von PIA und rEmbp17383 näher zu spezifizieren.

Es konnte gezeigt werden, dass in den Näpfen, die mit dem unbehandelten rEmbp17383 inkubiert wurden, höhere Messwerte gemessen wurden als in den Näpfen, die mit dem präinkubierten rEmbp17383-PIA-Gemisch inkubiert wurden. Die Inhibition wurde berechnet und in Abbildung 13 dargestellt.



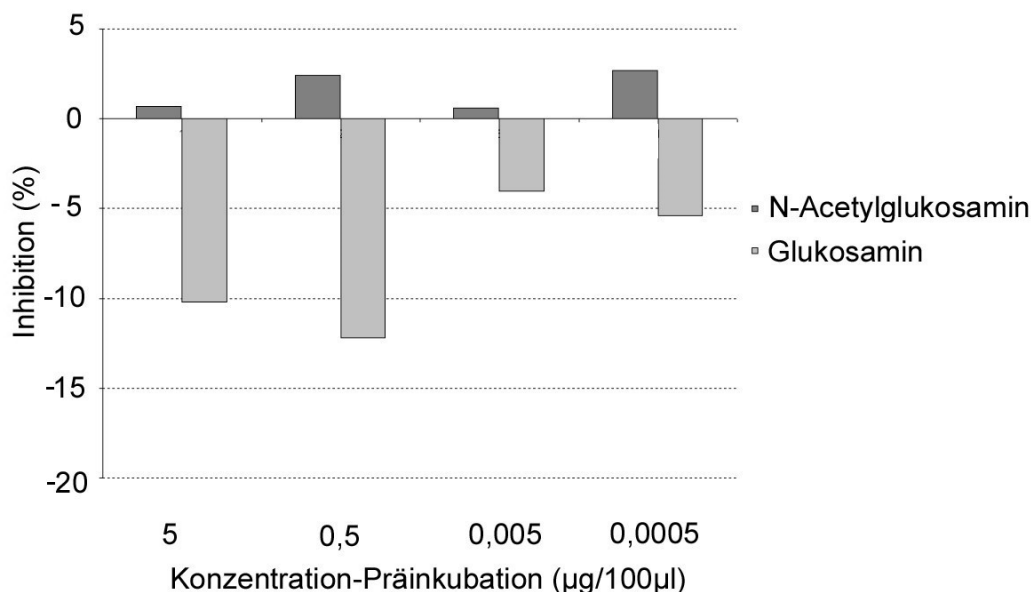
**Abbildung 13:** Graphische Darstellung der Inhibition in einem ELISA-Test zur Untersuchung der Bindung von PIA an rEmbp17383. Die Maxi-Sorp-Platte wurde mit 0,5 µg/100 µl PIA beschichtet und mit BSA blockiert. Zur Inkubation wurden mit PIA präinkubierte bzw. nicht präinkubierte rekombinante rEmbp17383-Fragmente (0,125 nM rEmbp17383) eingesetzt. Zum Nachweis des rEmbp17383 wurde das Antiserum anti-rEmbp17383 verwendet. Als Zweitantikörper diente der alkalische Phosphatase konjugierte Kaninchen-Zweitantikörper (1:2500 Verdünnung). Die Absorption des umgesetzten Substrates (Substratpuffer + 1,45 mg/ml Phosphatase Substrat 104 (Sigma)) wurde im ELISA-Processor II (Behring) bei 405 nm (Referenzwellenlänge: 492 nm) gemessen. Anschließend wurde die relative Inhibition nach der im Text angegebenen Formel berechnet und der Mittelwert aus jeweils 4 Werten gebildet.

Es konnte nachgewiesen werden, dass durch die Präinkubation von rEmbp17383 mit 5 µg/100 µl PIA die Bindung von rEmbp17383 an das plattengebundene PIA um 32 % gesenkt werden konnte. Bei einer Präinkubation 0,5 µg/100 µl PIA ließ sich eine Inhibition der Bindung von etwa 7,5 % erzielen. Dieser Befund kann als Hinweis auf eine direkte Interaktion von PIA mit rEmbp17383 interpretiert werden.

### 3.1.8 Bindung von Acetylglukosamin und Glukosamin an Embp im Inhibitions-ELISA

Das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA) ist ein Homoglykan, welches aus durchschnittlich 130β-(1,6)-verknüpften N-Acetylglukosamineinheiten aufgebaut ist. Es lässt sich in zwei Polysaccharidfraktionen aufteilen, die als Polysaccharid I und Polysaccharid II bezeichnet werden. Diese beiden Fraktionen unterscheiden sich durch den unterschiedlichen Gehalt an acetylierten Glukosaminresten (Mack *et al.*, 1996a).

Da die vorherigen Untersuchungen für eine Bindung von Embp an PIA sprechen, stellt sich die Frage, ob für die Bindung an Embp das gesamte Polysaccharid benötigt wird, oder ob einzelne Komponenten des Polysaccharid ausreichen, um eine Bindung zu vermitteln. Um dies zu untersuchen, wurde ein Inhibitions-ELISA mit N-Acetylglukosamin und Glukosamin durchgeführt. Hierzu wurde die Platte mit 0,5 µg/100µl PIA beschichtet und das bei der Präinkubation zuvor verwendete PIA durch N-Acetylglukosamin beziehungsweise Glukosamin ersetzt.

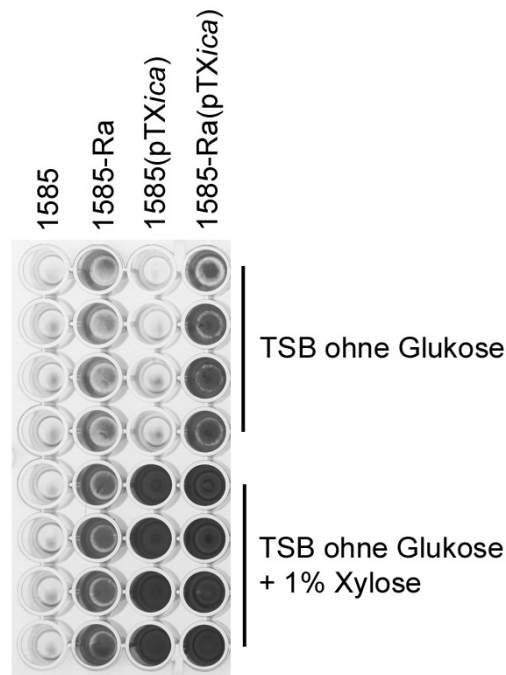


**Abbildung 14:** Graphische Darstellung der Inhibition von rEmbp17383 an PIA durch Präinkubation mit N-Acetylglukosamin oder Glukosamin. Die Maxi-Sorp-Platte wurde mit 0,5 µg/100µl PIA beschichtet und mit BSA blockiert. Zur Inkubation wurden mit Acetylglukosamin oder Glukosamin präinkubiertes oder nicht-präinkubiertes rEmbp17383 (0,125 nM) eingesetzt. Zum Nachweis des an PIA gebundenen rEmbp17383 wurde das rEmbp17383-spezifische Antiserum verwendet. Als Zweitantikörper diente ein alkalische Phosphatase konjugierter Kaninchen-Zweitantikörper (1:2500 Verdünnung). Die Absorption des umgesetzten Substrates (Substratpuffer+1,45 mg/ml Phosphatase Substrat 104 (Sigma)) wurde im ELISA-Processor II (Behring) bei 405 nm (Referenzwellenlänge: 492 nm) gemessen, die Inhibition berechnet und der Mittelwert aus jeweils 4 Werten gebildet.

Es konnte gezeigt werden, dass weder durch Acetylglukosamin noch durch Glukosamin eine deutliche Inhibition der Bindung von rEmbp17383 an PIA erreicht werden konnte. Demzufolge scheinen mindestens Di- oder Oligo-N-Acetylglukosaminmoleküle für die Bindung von rEmbp17383 an PIA notwendig zu sein.

### 3.1.9 Validierung der phänotypischen Untersuchungen von *S. epidermidis* 1585(pTXica) unter Verwendung neuer Medium-Chargen

Die oben beschriebenen Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen des Biofilmtests und Dot-Blots gehen von der Grundvoraussetzung aus, dass der Stamm 1585(pTXica) unter induzierten Bedingungen biofilmnegativ ist. Nachdem jedoch eine andere Charge Tryptone, welches für die Herstellung des Mediums TSB ohne Glukose benötigt wird, verwendet wurde, bildete auch der Stamm 1585(pTXica) in Anwesenheit von 1 % Xylose einen Biofilm. Auch die Ergebnisse des semiquantitativen Dot-Blots konnten nach dem Wechsel des Mediums nicht reproduziert werden, da PIA in 1585(pTXica) in gleichem Maße an die Oberfläche gebunden werden konnte wie in 1585-Ra(pTXica).



**Abbildung 15:** Semiquantitativer Biofilmtest der Stämme 1585, 1585-Ra, M135 und ihrer korrespondierenden Transduktanten unter induzierten und nicht induzierten Bedingungen. Der Biofilm wurde mit Kristallviolett angefärbt und die Absorption bei 570 nm gemessen.

Dies bestätigt die Hypothese, dass *Embp* nicht der einzige Faktor ist, der an der Bindung von PIA an der Bakterienoberfläche beteiligt ist. Es scheint *Embp*-unabhängige Faktoren zu geben, die PIA, die interzelluläre Adhäsion und somit auch die Biofilmbildung beeinflussen können.

### 3.2 Einfluss von Proteasen auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis*

Die Biofilmbildung von *S. epidermidis* wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Neben dem Polysaccharid PIA spielen bei der Biofilmbildung Proteine eine wichtige Rolle. So konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von *embp* in *S. epidermidis* 1585-Ra zu einem positiven Biofilmtyp führt. Die Modulation der interzellulär adhäsiven Oberflächeneigenschaften ist für die Pathogenese von *S. epidermidis* von großer Bedeutung. Diese Flexibilität kann bei Proteinadhäsinen durch (1.) Änderung der Genexpression oder (2.) eine Modifikation des Turn-overs durch vermehrte oder verminderte proteolytische Degradation erfolgen. Die dynamische Modifikation der *Embp*-vermittelten Biofilmbildung durch Proteasen sollte daher im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht werden.

### 3.2.1 Nachweis von Proteasen der *S. epidermidis*-Stämme 1585 und 1585-Ra

Um zu klären, welche Proteasen grundsätzlich im Genom der untersuchten *S. epidermidis*-Stämme 1585 und 1585-Ra vorhanden sind und somit auf die Degradation von Embp Einfluss nehmen können, wurde das Genom der beiden *S. epidermidis*-Stämme mit Hilfe spezifischer Primer auf das Vorkommen der bekannten *S. epidermidis*-Proteasen untersucht. Es zeigte sich, dass die Gene aller untersuchten Proteasen (Serinprotease htrA1, Serinprotease htrA2, Serinprotease der *accession number*: SERP0611, Glutamyldopeptidase (*precursor* SspA) der *accession number*: SERP1397, O-Sialoglycoprotein-Endopeptidase der *accession number*: SERP1661, Elastase (SepA, *precursor*) der *accession number*: SERP2252, Cysteinprotease (*precursor* SspB/SspC) der *accession number*: SERP2390, Serinprotease der *accession number*: SERP2401) im Genom von *S. epidermidis* 1585 und 1585-Ra nachzuweisen waren.

Um den Einfluss von Proteasen auf die Modifikation der Embp-vermittelten Biofilmbildung untersuchen zu können, musste eine Möglichkeit gefunden werden, die Expression von endogenen, Staphylokokken-eigenen Proteasen zu kontrollieren. Es ist bekannt, dass durch eine Tn917-Insertion im *sigB*-Operon die Aktivität des Transkriptionsfaktors SigmaB herunterreguliert und dadurch die Expression von Proteasen gesteigert wird (Kneschke, J., Knobloch, K.-M., persönliche Mitteilung). Mit dem Ziel, das globale Expressionsniveau von Proteasen zu steigern, wurde mittels Phagentransduktion die zur funktionellen SigmaB-Mutante M15 führende, chromosomale Tn917-Insertion (Knobloch *et al.*, 2001; Mack *et al.*, 2000) in die Stämme 1585 (*icaADBC*-negativ, biofilmnegativ, Embp-negativ) und 1585-Ra (*icaADBC*-negativ, biofilmpositiv, Embp-positiv) transduziert.

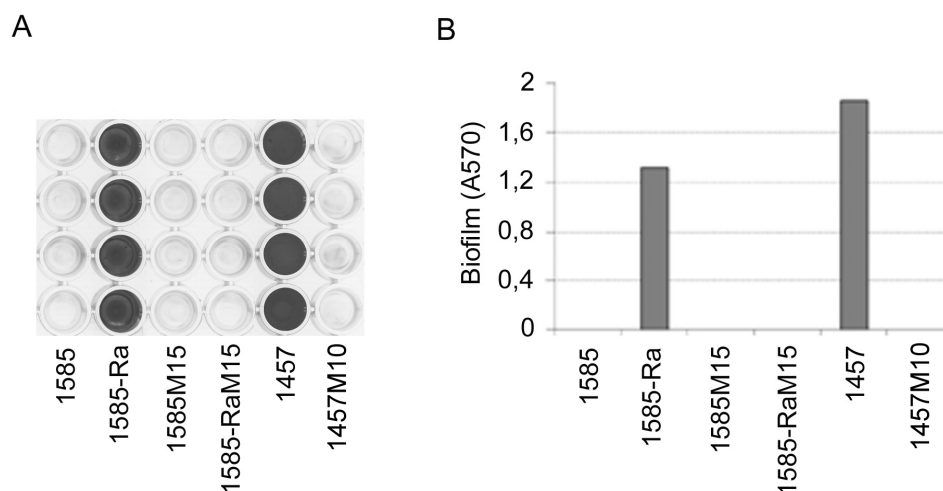
### 3.2.2 Transduktion der M15-assoziierten Transposoninsertion in die Stämme 1585 und 1585-Ra

Um die Tn917-Insertion in die Stämme *S. epidermidis* 1585 und 1585-Ra zu transduzieren, wurde zunächst unter Verwendung des Phagen A6C ein hochtitriges Phagenlysat aus dem Stamm *S. epidermidis* 1457M15 erzeugt. Dieses wurde verwendet, um die chromosomale Insertion in die oben genannten Stämme zu transduzieren. Positive Transduktanten wurden vorläufig durch den erwarteten Resistenzphänotyp (Erythromycin-resistent) erkannt. Die erfolgreiche Transduktion wurde schließlich

mittels Sequenzanalyse nachgewiesen. Die resultierenden Transduktanten erhielten die Bezeichnung 1585M15 und 1585-RaM15.

### 3.2.3 Biofilmtest der *S. epidermidis*-Stämme 1585, 1585-Ra sowie der korrespondierenden Transduktanten

Um den generellen Einfluss von SigmaB auf die Embp-vermittelte Biofilmbildung zu beschreiben, wurde der Biofilmtyp der *S. epidermidis*-Stämme 1585, 1585-Ra, 1585M15 und 1585-RaM15 in einem Biofilmtest geprüft.



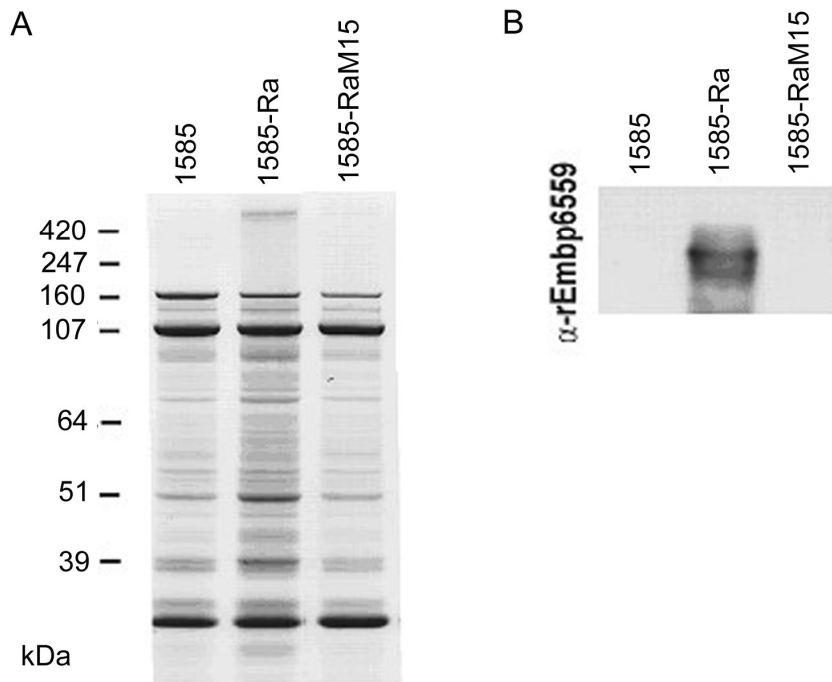
**Abbildung 16: (A)** Semiquantitativer Biofilmtest der Stämme 1585, 1585-Ra und ihrer Transduktanten 1585M15 und 1585-RaM15. Der Biofilm wurde mit Kristallviolett angefärbt und die Absorption bei 570 nm gemessen. **(B)** Graphische Darstellung der semiquantitativen Biofilmmessung von *S. epidermidis* 1585, 1585-Ra und ihrer Transduktanten 1585M15 und 1585-RaM15. Es wurde der Mittelwert aus jeweils vier Messwerten aus zwei Versuchen gebildet. Die Tn917-Insertion führt zu einem biofilmnegativen Phänotyp des Stammes 1585-RaM15. Die Transduktante des *S. epidermidis*-Stamm 1585 bleibt durch die Tn917-Insertion unverändert biofilmnegativ. Als Positivkontrolle bzw. Negativkontrolle wurden *S. epidermidis* 1457 und 1457M10 mitgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Tn917-Insertion im Stamm 1585-RaM15 zu einem biofilmnegativen Phänotyp führt. Der *S. epidermidis*-Stamm 1585M15 blieb unverändert biofilmnegativ.

### 3.2.4 Embp-Nachweis in 1585, 1585-Ra und 1585-RaM15

Um zu prüfen, ob der beobachtete biofilmnegative Phänotyp des Stamms 1585-RaM15 auf einer Veränderung im Bereich von Embp beruht, wurden zellwandassoziierte Proteine der Stämme *S. epidermidis* 1585, 1585-Ra und 1585-RaM15 präpariert und in einem Proteingradientengel (Abbildung 17A) sowie im Western-Blot (Ab-

bildung 17B) unter Verwendung eines Embp-spezifischen Antiserums dargestellt. Dabei konnte ausschließlich in dem *S. epidermidis*-Stamm 1585-Ra Embp nachgewiesen werden. In der Transduktante 1585-RaM15 ließ sich weder im SDS-PAGE noch im Immunoblot Embp nachweisen. Dieser Befund stellt eine hinreichende Erklärung für den biofilmbegativen Phänotyp der Mutante dar.



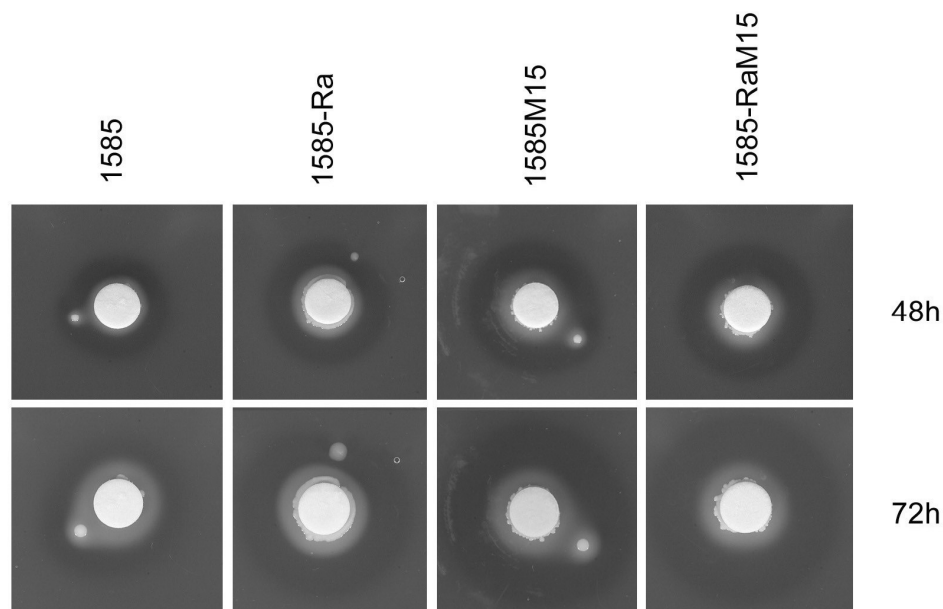
**Abbildung 17:** Nachweis von Embp in *S. epidermidis* 1585, 1585-Ra und 1585-RaM15 mittels SDS-PAGE und Western Blot. **(A)** Proteinpräparationen der angegebenen Stämme wurden in einem NuPage™ 4-12 % Bis-Tris Gradientengel aufgetrennt und anschließend nach Coomassie gefärbt. Die hochmolekulare Bande, welche bei 1585-Ra oberhalb der 429 kDa Markerbande nachweisbar ist, entspricht Embp (Christner, Rohde, unveröffentlichte Daten). **(B)** Ein weiteres Gradientengel wurde nach der Auftrennung für den Western Blot mittels Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit einem Embp-spezifischen Kaninchenantiserum (anti-rEmbp6559) (Christner, Rohde, unveröffentlichte Daten) inkubiert und gebundene Antikörper mit einem Peroxidase-gekoppelten, anti-Kaninchen-Antikörper nachgewiesen. Während in den Stämmen *S. epidermidis* 1585 und 1585-RaM15 kein Embp nachgewiesen werden konnte, kommt es bei *S. epidermidis* 1585-Ra zur Darstellung von Embp mit einem erwarteten Molekulargewicht von etwa 500 kDa.

Für den fehlenden Embp-Nachweis in der Transduktante 1585-RaM15 kommen verschiedene Erklärungsmodelle in Betracht. Zum einen ist es möglich, dass Embp durch von SigmaB negativ-kontrollierte, und somit in der Transduktante heraufregulierte Proteasen degradiert wird. Zum anderen ist denkbar, dass durch die Herunterregulation von SigmaB die *embp*-Expression vermindert wird. Dies wäre als Hinweis auf eine Beteiligung von SigmaB an der *embp*-Expressionskontrolle zu bewerten.

Um zunächst die Frage zu klären, ob es durch funktionelle Inaktivierung von SigmaB zu einer Heraufregulierung von Proteasen in den Transduktanten kommt, erfolgte eine orientierende Quantifikation der extrazellulären Proteasen.

### 3.2.5 Nachweis extrazellulärer Proteasen mittels *Skim-milk*-Hydrolyseagar

Extrazelluläre Proteasen können unter Verwendung eines *Skim-milk*-Hydrolyseagars orientierend quantifiziert werden. Hierbei ist der Durchmesser der um ein mit Bakterien beschicktes Filterplättchen gebildeten Hydrolysezone proportional zu der Menge der produzierten extrazellulären Proteasen.



**Abbildung 18:** Nachweis extrazellulärer Proteasen von *S. epidermidis* 1585, 1585-Ra, 1585M15 und 1585-RaM15 mittels *Skim-milk* Hydrolyseagar. Hierbei ist der Durchmesser der um ein mit Bakterien beschicktes Filterplättchen gebildeten Hydrolysezone (dunkel) proportional zu der Menge der produzierten extrazellulären Proteasen. Die hellen Ringe um die beschickten Filterplättchen entsprechen Präzipitationen. Die Agarplatten wurden jeweils nach 48 und 72 Stunden photographiert.

Es konnte gezeigt werden, dass in der Transduktante 1585M15 (Durchmesser 48 h: 26 mm; Durchmesser 72 h: 34 mm), wie erwartet, deutlich mehr extrazelluläre Proteasen produziert werden, als in *S. epidermidis* 1585 (Durchmesser 48 h: 22 mm; Durchmesser 72 h: 25 mm). Im Gegensatz dazu führt die Tn917-Insertion in 1585-RaM15 (Durchmesser 48 h: 26 mm; Durchmesser 72 h: 34 mm) zu keiner deutlich vermehrten Proteaseproduktion im Vergleich zum Ausgangsstamm 1585-Ra (Durchmesser 48 h: 25 mm; Durchmesser 72 h: 31 mm). Vergleicht man jedoch die Hydrolysezonen von 1585 und 1585-Ra, so ist diese in 1585Ra eindeutig größer als

in 1585. Das bedeutet, dass in 1585-Ra bereits vor der Transduktion eine im Vergleich zum Ausgangsstamm 1585 erhöhte Proteaseaktivität vorliegt. Da trotzdem Embp von *S. epidermidis* 1585-Ra gebildet werden kann, scheinen die Proteasen keinen wesentlichen Einfluss auf extrazelluläres Embp zu haben. Das bedeutet, dass die Tn917-Insertion die Embp-Expression auf Transkriptionsebene zu beeinflussen scheint.

Ob die Herunterregulation von SigmaB tatsächlich zu einer veränderten *embp*-Expression führt, wurde in einer *Real time*-Polymerasekettenreaktion untersucht.

### 3.2.6 Transkriptionsanalyse von *embp* in 1585, 1585-Ra und korrespondierenden Transduktanten

In der *Real time*-PCR konnte nachgewiesen werden, dass in *S. epidermidis* 1585M15 und 1585-RaM15 *sigB* im Vergleich zu den Ursprungstämmen sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase durch die Tn917-Insertion in *rsbU* herunterreguliert wird. Dieser Befund zeigt, dass es sich bei beiden Stämmen um funktionelle SigmaB Mutanten handelt.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die *embp*-Transkription der Mutante 1585-RaM15 in der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zum Wildtypstamm 1585-Ra um etwa das 280-fache erniedrigt war. Hieraus wurde geschlossen, dass SigmaB direkt oder indirekt an der Expressionskontrolle von *embp* beteiligt ist. Tatsächlich ließ sich im biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stamm 1585-Ra im Vergleich zu 1585 eine leichte, jedoch signifikante Erhöhung der *sigB*-Expression während der exponentiellen (+3) und stationären (+8) Wachstumsphase beobachten. Die gesteigerte *embp*-Expression des biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stamms 1585-Ra scheint demzufolge mit einer Heraufregulierung von *sigB* assoziiert zu sein.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der biofilmnegative Phänotyp von 1585-RaM15 nicht durch eine Heraufregulation der Protease-Expression zustande kommt, sondern auf den direkten oder indirekten Einfluss von SigmaB auf die *embp*-Transkription zurückzuführen ist.

Bei der ungerichteten Entstehung von 1585-Ra aus 1585 scheint es demnach zu erheblichen Veränderungen in den übergeordneten Regulationszentren gekommen zu sein, die eine Embp-Expression positiv beeinflussen.

Damit konnte das eigentliche Ziel, den Einfluss von Proteasen auf die Biofilmbildung nachzuweisen, nicht erreicht werden. Es konnten jedoch weitere wichtige Einblicke in die übergeordneten regulierenden Kontrollsysteme gefunden werden.

## 4 Diskussion

Fremdkörperassoziierte *S. epidermidis*-Infektionen gehören heute zu den häufigsten im Krankenhaus erworbenen Infektionen. Sie sind daher eine wesentliche Ursache für die stetige Zunahme von Morbidität und Mortalität im Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen (Rupp and Archer, 1994; Mack *et al.*, 2006; Rohde *et al.*, 2007). Das klinische Management von *Staphylococcus epidermidis*-Infektionen stellt aus verschiedenen Gründen eine Herausforderung für den behandelnden Arzt dar. Hierbei erwachsen Probleme insbesondere aus dem regelhaften Versagen einer antibiotischen Therapie. Dieses lässt sich zum einen darauf zurückführen, dass fremdkörperassoziierte Infektionen in der Mehrzahl der Fälle durch multiresistente *S. epidermidis*-Stämme verursacht werden. So weisen heute etwa 80 % der isolierten *S. epidermidis*-Stämme eine Methicillinresistenz auf und sind somit gegenüber allen Beta-Laktam-Antibiotika unempfindlich (Archer and Climo, 1994; Archer *et al.*, 2000; Frebourg *et al.*, 2000; Grosserode and Wenzel, 1991; Bailey *et al.*, 1990). Zum anderen zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen von *ex vivo* gewonnenen Implantaten, dass *S. epidermidis* auf künstlichen Oberflächen in Form so genannter Biofilme organisiert ist (Read *et al.*, 1989; Marrie *et al.*, 1982; Peters *et al.*, 1982). Biofilmständige *S. epidermidis*-Zellen sind vor Effektormechanismen der frühen Immunantwort geschützt und weisen gleichzeitig eine herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika auf (Sheth *et al.*, 1985; Evans and Holmes, 1987; Gristina *et al.*, 1989; Farber *et al.*, 1990; Widmer *et al.*, 1990; Chuard *et al.*, 1991; Duguid *et al.*, 1992; Gander, 1996; Peters *et al.*, 1982; Heinzelmann *et al.*, 1997; Vuong *et al.*, 2004a; Kristian *et al.*, 2008). Gemeinsam mit klassischen Resistenzmechanismen muss damit die Fähigkeit zur Biofilmbildung als eine entscheidende Ursache für den chronisch persistierenden Verlauf von *S. epidermidis*-Infektionen und das regelhafte Versagen einer antibiotischen Therapie angesehen werden. Ein zentrales Ziel der Analyse der molekularen Mechanismen, die zur *S. epidermidis*-Biofilmbildung führen, ist es, neue Angriffspunkte für die Entwicklung diagnostischer, therapeutischer sowie präventiver Verfahren zu identifizieren.

Ein wesentlicher Bestandteil von *S. epidermidis*-Biofilmen ist das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin (PIA), welches durch im *icaADBC*-Lokus kodierte Enzyme synthetisiert wird (Mack *et al.*, 1996a; Heilmann *et al.*, 1996b; Gerke *et al.*, 1998). Die funktionelle Beteiligung von PIA an der Entstehung fremdmaterialassoziiierter *S. epi-*

*dermidis*-Infektionen konnte in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen werden. So zeigten PIA-negative Mutanten im Tiermodell eine deutlich verminderte Virulenz als ein PIA-positiver Wildtypstamm (Rupp *et al.*, 1999). Diese Befunde konnten kürzlich in einem *C. elegans*-Modell nachvollzogen werden (Begun *et al.*, 2007). Hierbei scheint PIA die Persistenz von *S. epidermidis* durch eine Herabsetzung der Empfindlichkeit gegenüber Effektormolekülen der angeborenen Immunität zu begünstigen (Foster, 2005; Vuong *et al.*, 2004a). *icaADBC* homologe Gene wurden auch bei *S. aureus* (Cramton *et al.*, 1999; Rohde *et al.*, 2001; Kropec *et al.*, 2005) und einer Vielzahl weiterer KNS (Nilsdotter-Augustinsson *et al.*, 2007; Moretro *et al.*, 2003) gefunden. Darüber hinaus wurden selbst bei gramnegativen Bakterien wie *E.coli*, *Y.pestis* und *A.actinomycescomitans* *icaADBC*-homologe Geneorte beschrieben, welche bei *E.coli* den Apparat für die Synthese eines strukturell mit PIA praktisch identischen Polysaccharids kodieren (Wang *et al.*, 2004; Kaplan *et al.*, 2004; Itoh *et al.*, 2005). Als Konsequenz aus diesen Befunden wurde angenommen, dass die PIA-vermittelte interzelluläre Adhäsion als ein generelles Prinzip bakterieller Biofilmbildung gilt. Im Hinblick auf die Pathogenese von *S. epidermidis*-assoziierten Fremdmaterialinfektionen wurde diese Sicht durch epidemiologische Studien gestützt. So konnte gezeigt werden, dass *icaADBC* in klinischen *S. epidermidis*-Isolaten weit verbreitet ist und zudem die Prävalenz dieses Genorts bei klinisch relevanten *S. epidermidis*-Stämmen signifikant höher ist als bei kommensalen Hautisolaten (Ziebuhr *et al.*, 1997; Frebourg *et al.*, 2000; Galdart *et al.*, 2000; Mack *et al.*, 1996b; Arciola *et al.*, 2002; Arciola *et al.*, 2001).

Diese Erkenntnisse motivierten Bemühungen, PIA als Basis eines Impfstoffes zur Prävention von *S. epidermidis*-Infektionen zu verwenden (Maira-Litran *et al.*, 2004; Götz, 2004). Neuere Untersuchungen stellen jedoch die ausschließliche Relevanz von PIA für die Pathogenese von *S. epidermidis*-Infektionen in Frage. So zeigte in verschiedenen Studien die Analyse von gut definierten *S. epidermidis*-Stämmen aus Gelenkprotheseninfektionen, dass hier *icaADBC* in maximal 50 % der Isolate nachgewiesen werden konnte (Rohde *et al.*, 2007; Frank *et al.*, 2004; Nilsdotter-Augustinsson *et al.*, 2007). Eine ähnlich niedrige Prävalenz konnte auch bei *S. epidermidis*-Blutkulturisolaten dargestellt werden (Cafiso *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass PIA offensichtlich keine generelle Voraussetzung für die Etablierung einer persistierenden fremdmaterialassoziierten *S. epidermidis*-Infektion ist. Unter der Annahme, dass die Fähigkeit zur Biofilmbildung als entscheidender Patho-

genitätsmechanismus aufzufassen ist, lässt sich zudem ableiten, dass unabhängige Mechanismen der *S. epidermidis*-Biofilmbildung existieren müssen (Rohde *et al.*, 2007; Hennig *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2007b).

Tatsächlich konnten verschiedene interzelluläre Adhäsine beschrieben werden, die PIA funktionell ersetzen. So gibt es beispielsweise Hinweise darauf, dass freigesetzte bakterielle DNA (sogenannte eDNA) *S. epidermidis*-Biofilme stabilisieren kann (Qin *et al.*, 2007a; Izano *et al.*, 2008). Zudem können Oberflächenproteine die *S. epidermidis* Zell-Zell-Interaktion vermitteln (Rohde *et al.*, 2007; Hussain *et al.*, 1993; Rohde *et al.*, 2005; Chaignon *et al.*, 2007). Neben dem *accumulation associated protein* (Aap) konnte kürzlich auch für das 1 MDa *Extracellular matrix binding protein* (Embp) eine Funktion bei der *S. epidermidis*-Biofilmbildung dargestellt werden. Hierbei ist Embp zum einen durch seine fibronektin- und fibrinogenbindende Aktivität an der primären Bindung von *S. epidermidis* an konditionierte Oberflächen beteiligt (Williams *et al.*, 2002). Zudem fungiert es als interzelluläres Adhäsion und ist damit auch in die Phase der Biofilmmakkumulation involviert (Christner, Rohde, unveröffentlichte Daten).

Die bisher zur Identifikation von funktionell an der *S. epidermidis*-Biofilmbildung beteiligten Faktoren durchgeführten Studien hatten im Wesentlichen das Ziel, unabhängige interzelluläre Adhäsine zu identifizieren. Die Möglichkeit, dass unterschiedliche Faktoren auch kooperativ in den Prozess der Biofilmbildung involviert sein könnten, wurde bisher praktisch nicht betrachtet. Epidemiologische Studien zeigen aber, dass viele invasive *S. epidermidis*-Isolate grundsätzlich nicht nur zur Bildung eines Faktors befähigt sind (Frebourg *et al.*, 2000; Galdart *et al.*, 2000; Rohde *et al.*, 2007; Rohde *et al.*, 2004), sondern parallel zum Beispiel mit *aap*, *embp* und *icaADBC* ausgestattet sind (Rohde *et al.*, 2007). Somit erscheint eine Interaktion dieser Faktoren möglich. Aus theoretischen Überlegungen heraus rückte in dieser Untersuchung die Analyse der Interaktion von Embp und PIA in den Mittelpunkt, da Embp über so genannte FIVAR-Domänen verfügt (Christner, Rohde, unveröffentlichte Daten). FIVAR-Domänen wird eine N-Acetylglukosaminbindende Aktivität zugesprochen (Tanaka *et al.*, 2008). Da PIA aus N-Acetylglukosamineinheiten aufgebaut ist (Mack *et al.*, 1996a), sollte im ersten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob PIA und das extrazelluläre Matrix-bindende Protein (Embp) bei gleichzeitiger Expression interagieren.

## 4.1 Interaktion von PIA und Embp

Um diese Frage zu beleuchten wurden die Transduktanten 1585(pTXica) (Embp-negativ), 1585-Ra(pTXica) (Embp-positiv) und M135(pTXica) (Embp-negativ) generiert, in denen die PIA-Synthesegene *icaADBC* Xylose-abhängig exprimiert werden können. Hierbei hatte die Expression von PIA keinen Einfluss auf die Embp-Expression bei *S. epidermidis* 1585-Ra.

Es zeigte sich, dass die Expression von *icaADBC* und die daraus folgende PIA-Synthese nur im Embp-positiven Stamm 1585-Ra(pTXica) zur Bildung von großen Zellclustern führt. Zudem führte die PIA-Synthese in 1585-Ra(pTXica) zu einer Verstärkung des bei *S. epidermidis* 1585-Ra in TSB ohne Glukose nur schwach ausgeprägten Biofilms. Im Gegensatz dazu führte die Expression von *icaADBC* und die daraus folgende PIA-Synthese in den Embp-negativen Stämmen 1585(pTXica) und M135(pTXica) zu keinem makroskopisch nachweisbaren Effekt auf die Zellaggregation und Biofilmbildung. Neben den Änderungen des Phänotyps konnte in weiteren Untersuchungen mittels Dot-Blot und Koagglutinationstest nachgewiesen werden, dass von 1585-Ra(pTXica) gebildetes PIA im Wesentlichen an der Oberfläche der Bakterien gebunden vorliegt. Im Gegensatz dazu wurde bei den Embp-negativen Stämmen 1585(pTXica) und M135(pTXica) PIA vor allem im Überstand der Kulturen, also zellunabhängig, nachgewiesen. Auf der Zelloberfläche konnten bei diesen Stämmen nur geringe PIA-Mengen gefunden werden. Diese Befunde können als Hinweis auf eine schwächere PIA-Bindung an die Zelloberfläche der Embp-negativen Stämme gewertet werden. Zudem ist offensichtlich, dass unter den gewählten Kulturbedingungen die Synthese von PIA allein nicht ausreicht, um in allen getesteten Stämmen eine Biofilmbildung zu induzieren. Vielmehr ergeben sich Hinweise dafür, dass die parallele Expression von Embp notwendig ist, um PIA an die Bakterienoberfläche zu binden und die nachfolgende interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung zu vermitteln.

Grundsätzlich kann die Expression von Embp direkt oder indirekt zur PIA-Bindung auf der Bakterienzelloberfläche beitragen. Zum einen ist es möglich, dass Embp direkt als PIA-bindendes Protein fungiert und dadurch PIA an der Bakterienoberfläche fixiert. Daneben ist es auch denkbar, dass Embp indirekt über die Bindung eines weiteren, bislang nicht bekannten Faktors die PIA-Bindung und somit die interzelluläre Adhäsion beeinflusst. Als drittes Erklärungsmodell ist es zudem vorstellbar,

dass durch den biofilmpositiven Phänotyp des Stamms 1585-Ra die Änderung der globalen Genexpression im Vergleich zum biofilmnegativen *S. epidermidis* 1585 zur Expression eines oder mehrerer Gene führt, die für PIA-bindende Faktoren kodieren.

Für die Hypothese einer direkten PIA-bindenden Aktivität von Embp sprechen die bereits erwähnten bioinformatischen Erkenntnisse, welche zeigen, dass die wesentlichen Strukturelemente von Embp so genannte FIVAR- und GA-Domänen sind (Christner, Rohde, unveröffentlichte Daten). FIVAR-Domänen wurden bereits in dem zellwandassoziierten Protein FmtB in *S. aureus* (Komatsuzawa *et al.*, 2000) und in der Gellanlyase in *Bacillus sp.* GL1 beschrieben (Hashimoto *et al.*, 1998). Sie haben die Fähigkeit an N-Acetylglukosamin zu binden und erfüllen somit eine Grundvoraussetzung für eine Bindung an PIA, welches aus durchschnittlich 130  $\beta$ -(1,6)-verknüpften N-Acetylglukosamineinheiten aufgebaut ist. Um die Wechselwirkung von Embp und PIA direkt nachzuweisen, wurde ein Festphasen-Immunassay entwickelt. Hierbei wurde eine Maxi-Sorp-Mikrotiterplatte mit PIA beschichtet. Die mit PIA gesättigte Oberfläche wurde anschließend mit dem rekombinanten Embp-Fragment rEmbp17383, welches FIVAR-Domänen aufweist, inkubiert. Gebundenes Protein wurde dann mittels eines Embp-spezifischen Antiserums nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass das gemessene Signal direkt abhängig von der eingesetzten rEmbp-Konzentration war: Je mehr rEmbp17383 eingesetzt wurde, desto höher war auch das gemessene Signal. Diese Beziehung spricht für eine direkte Interaktion von PIA und rEmbp17383. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass in diesem Versuchsaufbau rEmbp17383 sehr viel stärker an die unbehandelte, also nicht mit PIA beschichtete, jedoch mit BSA geblockte Oberfläche band. In dem eingesetzten ELISA-System kommt es demnach zu unspezifischen Bindungen. Zum einen ist vorstellbar, dass es zu einer unspezifischen Bindung von rEmbp17383 an die Maxi-Sorp-Platte kommt, da bekannt ist, dass diese Oberfläche vor allem für Proteine eine sehr hohe Bindungskapazität besitzt. Des Weiteren ist es möglich, dass Embp an das zur Blockierung verwendete BSA bindet, da nachgewiesen werden konnte, dass die in rEmbp17383 neben FIVAR-Domänen vorhandenen GA-Module Albumin-Bindungskapazitäten besitzen (de Chateau *et al.*, 1996; Lejon *et al.*, 2004). Allerdings wurde die PIA-unabhängige Bindung von rEmbp17383 auch unter Verwendung BSA-freier Blockierungsmethoden beobachtet. Somit muss als Ursache für die beobachtete unspezifische Bindung am ehesten eine hoch affine Bindung von rEmbp17383 an die Maxi-Sorp-Oberfläche angenommen werden. Daher wurde, um die Spezifität

der im ELISA beobachteten Bindung von rEmbp17383 an die PIA-beschichtete Oberfläche weiter zu charakterisieren, ein Inhibitions-ELISA durchgeführt.

Das Prinzip des Inhibitions-ELISA beruht auf einer kompetitiven Inhibition der Bindung an den plattengebundenen Interaktionspartner durch Präinkubation des putativen Liganden mit dem zur Beschichtung eingesetzten Faktor. Bei den hier beschriebenen Experimenten wurde daher der putative PIA-Interaktionspartner in Form von rEmbp17383 mit unterschiedlichen Konzentrationen aufgereinigten PIAs inkubiert.

Dabei konnte nachgewiesen werden, dass durch die Präinkubation mit 5 µg/100µl PIA die Bindung von rEmbp17383 an das plattengebundene PIA (0,5 µg/100µl) um 32 % gesenkt werden konnte. Dieser Befund spricht für eine direkte Wechselwirkung zwischen rEmbp17383 und PIA. Erstaunlich ist hierbei, dass lediglich eine Inhibition von 32 % erreicht werden konnte, da bei einem Einsatz von PIA im 10-fachen Überschuss mindestens eine Inhibition von 90 % zu erwarten gewesen wäre. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass PIA in freiem Zustand eine andere Konformation besitzt als in plattengebundener Form. Es ist bekannt, dass PIA in unterschiedlichen Isoformen vorkommt (Mack *et al.*, 2004; Sadovskaya *et al.*, 2005). So konnte durch Ionenaustauschromatographie nachgewiesen werden, dass PIA aus zwei Polysaccharidfraktionen besteht, die sich in ihrem Anteil an nicht N-acetylierten Zuckerresten unterscheiden (Mack *et al.*, 1994). Das Polysaccharid I besitzt 15-20 % nicht N-acetylierte Glukosaminreste und ist positiv geladen. Das Polysaccharid II besitzt weniger nicht N-acetylierte Glukosaminreste und enthält Phosphat und Succinat, was zu einem leicht anionischen Charakter führt (Mack *et al.*, 1996a; Sadovskaya *et al.*, 2005). Diese unterschiedlichen Ladungen spielen bei der Biofilmbildung eine wichtige Rolle, da anzunehmen ist, dass die positive Ladung von PIA durch Deacetylierung eine Grundvoraussetzung für eine Bindung an die negativ geladene Bakterienzelloberfläche darstellt (Vuong *et al.*, 2004a). Da bei den hier beschriebenen Experimenten gelchromatographisch aufgereinigtes PIA, welches beide genannten Isoformen umfasst, eingesetzt wurde, wäre es vorstellbar, dass eine unterschiedliche Anzahl an nicht N-acetylierten Zuckerresten in freiem und plattengebundenem PIA besteht, die zu einer unterschiedlichen Ladung der beiden Formen führt. Dies könnte letztendlich in einer vermehrten Embp-Bindungskapazität des plattengebundenen PIA im Vergleich zum freien PIA resultieren, was die relativ geringe Inhibition im ELISA erklären würde.



schließlich in einem Biofilmtest und Koagglutinationstest untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sowohl *S. epidermidis* 1457 als auch die Transduktante 1457M135 einen gleichermaßen starken Biofilm bildeten. Im Koagglutinationstest konnte zudem gezeigt werden, dass die Ausschaltung von *embp* in 1457M135 zu keinem signifikanten Unterschied der PIA-Bindung an die Bakterienoberfläche führt. Somit scheint in diesem Stamm *Embp* keine notwendige Voraussetzung für die PIA-vermittelte Biofilmbildung darzustellen. Die hier erhobenen Befunde weisen zudem darauf hin, dass selbst im Stamm *S. epidermidis* 1585 *Embp*-unabhängige, PIA-bindende Strukturen existieren. Diese Annahme resultiert aus der Beobachtung, dass der Stamm *S. epidermidis* 1585(pTXica) nach Wechsel der zur Herstellung der TSB verwendeten Trypton-Charge unter PIA-induzierten Bedingungen PIA auf der Zelloberfläche band und, im Gegensatz zu den initialen Beobachtungen, einen Biofilm bildete. Es ist gut bekannt, dass exogene Faktoren wie Temperatur, pH, CO<sub>2</sub> sowie Salz- und Zuckergehalt auf den Biofilmphänotyp durch Beeinflussung der Genexpression Einfluss nehmen können (Rohde *et al.*, 2001; Knobloch *et al.*, 2001; Cramton *et al.*, 2001; Rachid, 2000; Deighton and Borland, 1993). Hierbei kann selbst der Wechsel von Medium-Chargen zum Beispiel zu einer Änderung der PIA-Synthese führen und hierüber den Biofilmphänotyp beeinflussen (Mack *et al.*, 2001; Rohde *et al.*, 2001). Es muss daher angenommen werden, dass in dieser Untersuchung nach subtiler Änderung der Medium-Zusammensetzung beim untersuchten Stamm *S. epidermidis* 1585(pTXica) zunächst nicht vorhandene, *Embp*-unabhängige, PIA-bindende Strukturen auf der Oberfläche exprimiert werden. Daraus folgt, dass für die *Embp*-abhängige, PIA-vermittelte Biofilmbildung bislang nicht näher bekannte Wachstumsbedingungen vorliegen müssen, unter denen *Embp* tatsächlich die wesentliche PIA-bindende Oberflächenstruktur darstellt. Unter anderen Wachstumsbedingungen wiederum scheinen *Embp*-unabhängige Faktoren die PIA-vermittelnde Biofilmbildung zu unterstützen.

Frühere Untersuchungen legten den Verdacht nahe, dass es sich bei dem *accumulation associated protein* Aap um ein PIA-bindendes Protein handeln könnte (Mack, 1999a). Aap ist ein 220 kDa großes, kovalent zellwandgebundenes Oberflächenprotein von *S. epidermidis*. Das Protein ist im Wesentlichen aus zwei Domänen A und B aufgebaut (Rohde *et al.*, 2005). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die aus repetitiv angeordneten 128 Aminosäuren langen *repeats* aufgebaute Domäne B (Jager *et al.*, 2005; Monk and Archer, 2007) selbst interzelluläre Adhäsion

und Biofilmbildung vermitteln kann (Rohde *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 1997; Conrady *et al.*, 2008). Bioinformatische Untersuchungen führten zu der Annahme, dass diese als G5-Domänen bezeichneten *repeats* N-Acetylglukosamin- und damit PIA-bindende Aktivität aufweisen könnten (Bateman *et al.*, 2005). Experimentelle Evidenz für diese Annahme wurde durch Untersuchung der durch ungerichtete chemische Mutagenese aus *S. epidermidis* RP62A generierten, Aap- und biofilm-negativen Mutante M7 gewonnen (Hussain *et al.*, 1997). Diese Mutante produziert große Mengen PIA, gibt diese jedoch im Wesentlichen in den Kulturüberstand ab (Mack, de Grahl, nicht publizierte Daten). Der endgültige Beweis, dass Aap tatsächlich als PIA-bindender Faktor zu betrachten ist, konnte bisher jedoch nicht geliefert werden. So konnte zum einen unter Verwendung von rekombinanten Aap und aufgereinigtem PIA in einem ELISA keine Bindung zwischen rekombinantem Aap und PIA nachgewiesen werden (Frankenberger, Rohde, nicht publizierte Daten). Zum anderen konnte eine gezielt generierte, *aap*-negative Mutante des Stamms RP62A weiterhin PIA auf der Oberfläche binden und einen Biofilm bilden. (Rohde, nicht publizierte Daten). Für die Existenz Aap-unabhängiger Faktoren der PIA-Bindung spricht zudem der Befund, dass der Aap-negative Stamm *S. carnosus* TM300(pCN27) stark biofilmpositiv ist (Heilmann *et al.*, 1996b).

Bei der Suche nach weiteren PIA-bindenden Faktoren sind unter anderem auch die Teichonsäuren näher zu betrachten. Teichonsäuren sind ein essentieller Bestandteil der Zellwand grampositiver Bakterien. Grundsätzlich lassen sich die Teichonsäuren in zellwandassoziierte Teichonsäuren (WTA) und Lipoteichonsäuren (LTA) unterteilen, wobei die zellwandassoziierten Teichonsäuren kovalent am Peptidoglykan gebunden sind, während die Lipoteichonsäuren in der Zellmembran verankert werden (Weidenmaier and Peschel, 2008). Teichonsäuren von *S. epidermidis* sind aus Glycerol- oder Ribitolphosphateinheiten aufgebaut und stellen offensichtlich in Form so genannter extrazellulärer Teichonsäuren (EC-TA) auch einen Bestandteil der extrazellulären Matrix in *S. epidermidis*-Biofilmen dar. (Frankenberger, Rohde, nicht publizierte Daten). Teichonsäuren sind grundsätzlich stark negativ geladen. Durch eine Veresterung mit D-Alanin oder die Einführung von glykosidisch gebundenem N-Acetylglukosamin werden die Teichonsäuren jedoch strukturell modifiziert, was letztendlich in einer positiven Nettoladung resultiert (Peschel *et al.*, 1999; Endl *et al.*, 1983; Sadovskaya *et al.*, 2004).

Es ist bereits bekannt, dass die Struktur der Teichonsäuren und die daraus resultierenden Ladungen entscheidend für die Fähigkeit von *S.aureus* sind, an Kunststoffoberflächen zu binden und einen Biofilm zu bilden. So konnte nachgewiesen werden, dass *S.aureus-dtl*-Mutanten, denen die Fähigkeit der Teichonsäureveresterung mit D-Alanin fehlt, keinen Biofilm auf polymeren Oberflächen bilden können. Dies scheint jedoch in erster Linie durch eine gestörte primäre Adhäsion erklärt zu sein, da die Phase der Akkumulation unbeeinträchtigt bleibt. (Gross *et al.*, 2001; Peschel *et al.*, 1999). Für *S. epidermidis* konnte eine Beteiligung der Teichonsäuren an der Fibronectinbindung und damit der primären Adhäsion dargestellt werden (Hussain *et al.*, 2001). EC-TA lassen sich in großem Umfang in der extrazellulären Matrix von *S. epidermidis*-Biofilmen darstellen (Sadovskaya *et al.*, 2005). Daher kann sehr wohl auch über eine Beteiligung von Teichonsäuren an der akkumulativen Phase spekuliert werden. Da PIA sowohl positive als auch negative Ladungen aufweist wäre es durchaus denkbar, dass durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen WTA beziehungsweise LTA und PIA die *S. epidermidis*-Zellen in die extrazelluläre PIA-Matrix integriert werden und hieraus ein biofilmpositiver Phänotyp resultiert. Um dies zu klären, müssen zukünftig in Analogie zu *S.aureus* gezielte Mutanten zum Beispiel des *dltABCD* oder *tagO* Lokus generiert werden, die ihre Fähigkeit zur Synthese korrekt geladener Teichonsäuren verloren haben. Diese Mutanten können dann hinsichtlich Ihrer Fähigkeit zur PIA-Bindung, interzellulären Aggregation und Biofilmakkumulation getestet werden.

### **4.3 Regulation der Embp-abhängigen Biofilmbildung in *S. epidermidis* 1585-Ra**

Die Biofilmbildung von *S. epidermidis* wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Dabei spielen, wie im ersten Teil dieser Arbeit bereits dargelegt wurde, neben dem interzellulären Polysaccharid Adhäsine (PIA) Proteine eine wichtige Rolle. Die Bedeutung der Proteine liegt hierbei sowohl im Bereich der primären Adhäsion als auch in der Akkumulationsphase der Biofilmbildung.

So konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von *embp* in *S. epidermidis* 1585-Ra zu einem biofilmpositiven Phänotyp führt. Die Bildung eines Biofilms, die unter anderem von den interzellulär adhäsiven Oberflächeneigenschaften abhängig ist, steht in direktem Zusammenhang mit der Virulenz von *S. epidermidis*. Die Modulation der interzellulär adhäsiven Oberflächeneigenschaften ist daher für die Pathogenese von *S. epidermidis*-Infektionen von großer Bedeutung. Diese Flexibilität kann bei Proteinadhäsinen durch (1.) Änderung der Genexpression oder (2.) eine

Modifikation des Turn-overs durch vermehrte oder verminderte proteolytische Degradation erfolgen. Daher sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die dynamische Modifikation der Embp-vermittelten Biofilmbildung in 1585 und 1585-Ra durch Proteasen untersucht werden.

Proteasen sind insbesondere für den hydrolytischen Proteinabbau von Bedeutung. Die Proteolyse dient jedoch nicht nur dem alleinigen Abbau von Proteinen, sondern spielt auch bei der Aktivierung von Proteinen eine wichtige Rolle (Gottesman, 2003; Gottesman, 1999). Die wichtige regulatorische Funktion, die diese Enzyme übernehmen, wird zum Beispiel bei der Blutgerinnung im menschlichen Organismus deutlich, bei der durch limitierte proteolytische Spaltung die verschiedenen Gerinnungsfaktoren aktiviert werden können (Löffler, 2008).

Es ist bekannt, dass bei der Entstehung von Infektionen durch Staphylokokken Proteasen eine wichtige Rolle spielen (Abdelnour *et al.*, 1993). In *S. epidermidis* 1585 und 1585-Ra konnten mittels PCR Gene dargestellt werden, die für Metallo-, Serin- oder Cysteinproteasen kodieren. Die Funktion dieser im Genom von *S. epidermidis* nachweisbaren Proteasen ist bisher unklar. Da jedoch starke Homologien zu den in *S. aureus* nachgewiesenen Proteasen bestehen, wird vermutet, dass die Proteasen in *S. epidermidis* eine ähnliche oder gleiche Funktion haben. In *S. aureus* liegen diese unter anderem im Bereich der Gewebszerstörung (Potempa *et al.*, 1988; Travis *et al.*, 1995), der Inaktivierung von Wirtsenzymen (Potempa *et al.*, 1986; Potempa *et al.*, 1991) und der Regulation der Bakterienadhäsion (McGavin *et al.*, 1997; McAleese *et al.*, 2001).

Da die Biofilmbildung in 1585-Ra direkt von Embp abhängig ist und durch exogen zugeführte Proteasen wie Trypsin zerstört werden kann (Christner, Rohde, unveröffentlichte Daten), sollte der Einfluss von endogenen, also staphylokokken-eigenen Proteasen auf die Biofilmbildung des Stamms 1585-Ra untersucht werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die chromosomalen Tn917-Insertionen der Mutante 1457M15(*rsbU*::Tn917) (Mack *et al.*, 2000) mittels Phagentransduktion in die Stämme 1585 und 1585-Ra eingebracht. In diesen kommt es zu einer funktionellen Inaktivierung des alternativen Sigmafaktors SigB. Da SigB ein negativer Regulator von Proteasen ist (Kneschke, J., Knobloch, K.-M., persönliche Mitteilung), wurde erwartet, dass hierdurch die Expression der in *S. epidermidis* 1585 und 1585-Ra kodierten Proteasen heraufreguliert werden würde.

Die chromosomale Transposoninsertion führte in *S. epidermidis* 1585-RaM15 zu einem negativen Biofilmphänotyp. Der Biofilmphänotyp von 1585M15 blieb weiterhin negativ. Weitere Untersuchungen zeigten, dass bei *S. epidermidis* 1585-RaM15 im

Westernblot kein Embp mehr nachgewiesen werden konnte. Dies erklärt hinlänglich den biofilmnegativen Phänotyp dieses Stamms. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass dieser Befund sowohl auf eine verstärkte proteolytische Degradation von Embp, als auch auf einer veränderten *embp*-Expression beruhen kann.

Mittels eines Skim-milk-Hydrolyseagars konnte gezeigt werden, dass durch die verminderte Aktivität des Transkriptionsfaktors SigmaB die Proteasenexpression nur in der Transduktante 1585M15 im Vergleich zum Wildtyp *S. epidermidis* 1585 deutlich gesteigert wurde. In dem Stamm 1585-Ra ist die Proteasenexpression bereits vor der Transduktion im Vergleich zu *S. epidermidis* 1585 deutlich gesteigert. Bei der ungerichteten Entstehung von 1585-Ra aus 1585 scheint es zu erheblichen Veränderungen in den übergeordneten Regulationszentren gekommen zu sein, die zum einen die Embp-Expression positiv beeinflussen und zum zweiten zu einer vermehrten Proteasenexpression führen. Diese Steigerung der Proteasenexpression scheint in 1585-Ra jedoch nicht zu einer proteolytischen Spaltung von Embp zu führen. Damit scheinen extrazelluläre Proteasen keinen wesentlichen Einfluss auf Embp und die Embp-abhängige Biofilmbildung zu haben.

Das bedeutet, dass die Ursache des negativen Biofilmphänotyps am ehesten auf der Transkriptionsebene zu suchen ist. Die daraufhin durchgeführte Transkriptionsuntersuchung mittels *Real-time*-PCR konnte diese Vermutung bestätigen, da die *embp*-Transkription in der Transduktante 1585-RaM15 im Vergleich zu *S. epidermidis* 1585-Ra deutlich erniedrigt war. Das bedeutet, dass die Biofilmbildung in den untersuchten *S. epidermidis*-Stämmen nicht durch Proteasen beeinflusst wird, sondern durch eine Veränderung auf Ebene der Genexpression von *embp*. Ob die Transkription von SigmaB direkt beeinflusst wird, oder ob komplexere Regulationsmechanismen dabei eine Rolle spielen, bleibt unklar.

Um den Einfluss von staphylokokkeneigenen Proteasen auf die Embp-vermittelte Biofilmbildung untersuchen zu können, muss nach alternativen experimentellen Ansätzen gesucht werden. In diesem Zusammenhang wäre es beispielsweise vorstellbar, definierte Proteasegene in einen Expressionsvektor wie pALC2073 (Bateman *et al.*, 2001) zu klonieren. Der genannte Expressionsvektor würde eine regulierte Expression von Proteasen erlauben, dass zum einen die dynamische Wirkung steigender Proteasekonzentrationen auf die Embp-vermittelte Biofilmbildung untersucht werden könnte, zusätzlich jedoch auch eine Beurteilung des Effekts unterschiedlicher Proteasen möglich wäre.

## 5 Zusammenfassung

Aufgrund seiner Fähigkeit zur Biofilmbildung gehört *Staphylococcus epidermidis* zu den häufigsten Erregern nosokomialer, fremdmaterialassoziiierter Infektionen. In einem Biofilm werden die *S. epidermidis*-Zellen in eine extrazelluläre Matrix eingebettet, welche im Wesentlichen durch das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin PIA gebildet wird. Neben PIA ist auch das oberflächenassoziierte *extracellular matrix binding protein* Embp an der *S. epidermidis*-Biofilmbildung beteiligt. Somit erscheint es möglich, dass Embp an der Integration von *S. epidermidis* in die Biofilmmatrix involviert ist. Ziel der Untersuchung war es, eine mögliche Interaktion zwischen PIA und Embp darzustellen, sowie deren Bedeutung für die Biofilmentstehung zu untersuchen.

Unter Verwendung von spezifischen Mutanten des *S. epidermidis*-Stamms 1585 konnte mittels molekulargenetischer und proteinchemischer Methoden nachgewiesen werden, dass die Expression von Embp notwendige Voraussetzung für die Rekrutierung von PIA an die bakterielle Oberfläche und die Ausbildung eines biofilmpositiven Phänotyps darstellt. Das weist darauf hin, dass Embp und PIA kooperativ in den Prozess der Biofilmbildung involviert sind. Die direkte Interaktion von Embp und PIA wurde unter Verwendung rekombinanter Proteine sowie gereinigtem PIA in einem Festphasen-Immunassay untersucht. Hier konnten Hinweise für eine spezifische Wechselwirkung zwischen Embp und PIA nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen zeigten aber auch, dass für die Bindung von PIA auf der Zelloberfläche weitere Faktoren notwendig sind. Diese werden jedoch offenbar in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen differentiell exprimiert.

Außerdem sollte in dieser Arbeit die dynamische Modifikation der Embp-vermittelten Biofilmbildung in 1585 und 1585-Ra durch Proteasen untersucht werden. Hierzu wurden mittels Phagentransduktion die Transduktanten 1585M15 und 1585-RaM15 geschaffen, in denen die funktionelle Inaktivierung des alternativen Sigmafaktors SigB zu einer Heraufregulierung der Proteasenexpression führen sollte. Die Mutante 1585-RaM15 wies einen biofilmnegativen Phänotyp auf. Untersuchungen mittels Skim-milk-Hydrolyseagars widerlegten jedoch die Hypothese, dass der Grund hierfür eine proteolytische Degradation von Embp durch heraufregulierte Proteasen sei. Vielmehr konnte in Transkriptionsuntersuchungen gezeigt werden, dass die Inaktivierung von SigmaB in 1585-Ra zu einer Herabregulation der *embp*-Expression führt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Rahmen dieser Arbeit erstmalig Hinweise für eine spezifische Interaktion zwischen Komponenten der Biofilmmatrix und spezifischen *S. epidermidis*-Oberflächenstrukturen gefunden werden konnten. Die Integration von *S. epidermidis* in die komplexe Biofilmarchitektur ist jedoch ein multifaktorielles Geschehen. Durch die Darstellung weiterer hieran beteiligter Strukturen ist zu erwarten, dass zukünftig neue Ansätze für die Therapie und Prophylaxe von *S. epidermidis*-Infektionen gefunden werden können.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abdelnour,A., Arvidson,S., Bremell,T., Ryden,C., and Tarkowski,A. (1993) The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun* **61**: 3879-3885.
- Archer,G.L., and Climo,M.W. (1994) Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 2231-2237.
- Archer,G.L., Mandell,G.L., Bennett,J.E., and Dolin,R. (2000) *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In *Principles and practice of infectious disease*. Churchill Livingstone, Philadelphia, USA.
- Arciola,C.R., Baldassarri,L., and Montanaro,L. (2001) Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* **39**: 2151-2156.
- Arciola,C.R., Baldassarri,L., and Montanaro,L. (2002) In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (*ica*) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. *J Biomed Mater Res* **59**: 557-562.
- Baddour,L.M., Barker,L.P., Christensen,G.D., Parisi,J.T., and Simpson,W.A. (1990) Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* in infection of transvenous endocardial pacemaker electrodes. *J Clin Microbiol* **28**: 676-679.
- Bailey,E.M., Constance,T.D., Albrecht,L.M., and Rybak,M.J. (1990) Coagulase-negative staphylococci: incidence, pathogenicity, and treatment in the 1990s. *DICP* **24**: 714-720.
- Bateman,A., Holden,M.T., and Yeats,C. (2005) The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics* **21**: 1301-1303.
- Bateman,B.T., Donegan,N.P., Jarry,T.M., Palma,M., and Cheung,A.L. (2001) Evaluation of a tetracycline-inducible promoter in *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo and its application in demonstrating the role of sigB in microcolony formation. *Infect Immun* **69**: 7851-7857.
- Begun,J., Gaiani,J.M., Rohde,H., Mack,D., Calderwood,S.B., Ausubel,F.M., and Sifri,C.D. (2007) Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog* **3**: e57.
- Bisno,A.L., and Waldvogel,F.A. (1994) *Infections associated with indwelling medical devices* Washington DC: American Society of Microbiology.
- Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

- Cafiso, V., Bertuccio, T., Santagati, M., Campanile, F., Amicosante, G., Perilli, M.G. *et al.* (2004) Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect* **10**: 1081-1088.
- Chaignon, P., Sadovskaya, I., Ragunah, C., Ramasubbu, N., Kaplan, J.B., and Jabbouri, S. (2007) Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**: 125-132.
- Chuard, C., Lucet, J.C., Rohner, P., Herrmann, M., Auckenthaler, R., Waldvogel, F.A., and Lew, D.P. (1991) Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body in vivo to killing by antimicrobials. *J Infect Dis* **163**: 1369-1373.
- Conlon, K.M., Humphreys, H., and O'Gara, J.P. (2002) *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **184**: 4400-4408.
- Conlon, K.M., Humphreys, H., and O'Gara, J.P. (2004) Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **186**: 6208-6219.
- Conrady, D.G., Brescia, C.C., Horii, K., Weiss, A.A., Hassett, D.J., and Herr, A.B. (2008) A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 19456-19461.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., and Ehrlich, G. (2003) The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* **112**: 1466-1477.
- Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W., and Gotz, F. (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* **67**: 5427-5433.
- Cramton, S.E., Ulrich, M., Gotz, F., and Doring, G. (2001) Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **69**: 4079-4085.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., I, and Penades, J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *J Bacteriol* **183**: 2888-2896.
- Davenport, D.S., Massanari, R.M., Pfaller, M.A., Bale, M.J., Streed, S.A., and Hierholzer, W.J., Jr. (1986) Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* **153**: 332-339.
- de Chateau, M., Holst, E., and Bjorck, L. (1996) Protein PAB, an albumin-binding bacterial surface protein promoting growth and virulence. *J Biol Chem* **271**: 26609-26615.

- Deighton,M., and Borland,R. (1993) Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun* **61**: 4473-4479.
- Diaz-Mitoma,F., Harding,G.K., Hoban,D.J., Roberts,R.S., and Low,D.E. (1987) Clinical significance of a test for slime production in ventriculoperitoneal shunt infections caused by coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* **156**: 555-560.
- Digiovine,B., Chenoweth,C., Watts,C., and Higgins,M. (1999) The attributable mortality and costs of primary nosocomial bloodstream infections in the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med* **160**: 976-981.
- Dobinsky,S., Kiel,K., Rohde,H., Bartscht,K., Knobloch,J.K., Horstkotte,M.A., and Mack,D. (2003) Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J Bacteriol* **185**: 2879-2886.
- Duguid,I.G., Evans,E., Brown,M.R., and Gilbert,P. (1992) Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*: evidence for cell-cycle dependency. *J Antimicrob Chemother* **30**: 791-802.
- Emori,T.G., and Gaynes,R.P. (1993) An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* **6**: 428-442.
- Endl,J., Seidl,H.P., Fiedler,F., and Schleifer,K.H. (1983) Chemical composition and structure of cell wall teichoic acids of staphylococci. *Arch Microbiol* **135**: 215-223.
- Evans,R.C., and Holmes,C.J. (1987) Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrob Agents Chemother* **31**: 889-894.
- Farber,B.F., Kaplan,M.H., and Clogston,A.G. (1990) *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J Infect Dis* **161**: 37-40.
- Fidalgo,S., Vazquez,F., Mendoza,M.C., Perez,F., and Mendez,F.J. (1990) Bacteremia due to *Staphylococcus epidermidis*: microbiologic, epidemiologic, clinical, and prognostic features. *Rev Infect Dis* **12**: 520-528.
- Fleer,A., and Verhoef,J. (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.
- Foster,T.J. (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* **3**: 948-958.
- Frank,K.L., Hanssen,A.D., and Patel,R. (2004) *icaA* is not a useful diagnostic marker for prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol* **42**: 4846-4849.
- Frebourg,N.B., Lefebvre,S., Baert,S., and Lemeland,J.F. (2000) PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol* **38**: 877-880.

- Galdbart, J.O., Allignet, J., Tung, H.S., Ryden, C., and El Solh, N. (2000) Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J Infect Dis* **182**: 351-355.
- Gander, S. (1996) Bacterial biofilms: resistance to antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* **37**: 1047-1050.
- Geffers, C., Gastmeier, P., and Rüden, H. (2002) Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 8, Nosokomiale Infektionen, Robert- Koch- Institut.
- Gerke, C., Kraft, A., Süssmuth, R., Schweitzer, O., and Götz, F. (1998) Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* **273**: 18586-18593.
- Goldmann, D.A., and Pier, G.B. (1993) Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin Microbiol Rev* **6**: 176-192.
- Gottesman, S. (1999) Regulation by proteolysis: developmental switches. *Curr Opin Microbiol* **2**: 142-147.
- Gottesman, S. (2003) Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 565-587.
- Götz, F. (2002) Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol* **43**: 1367-1378.
- Götz, F. (2004) Staphylococci in colonization and disease: prospective targets for drugs and vaccines. *Curr Opin Microbiol* 2004 Oct;7(5):477-87 Review.
- Gristina, A.G. (1987) Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* **237**: 1588-1595.
- Gristina, A.G., Jennings, R.A., Naylor, P.T., Myrvik, Q.N., and Webb, L.X. (1989) Comparative in vitro antibiotic resistance of surface-colonizing coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 813-816.
- Gross, M., Cramton, S.E., Gotz, F., and Peschel, A. (2001) Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. *Infect Immun* **69**: 3423-3426.
- Grosserode, M.H., and Wenzel, R.P. (1991) The continuing importance of staphylococci as major hospital pathogens. *J Hosp Infect* **19 Suppl B**: 3-17.
- Harris, L.G., and Richards, R.G. (2004) *Staphylococcus aureus* adhesion to different treated titanium surfaces. *J Mater Sci Mater Med* **15**: 311-314.
- Hashimoto, W., Miki, H., Nankai, H., Sato, N., Kawai, S., and Murata, K. (1998) Molecular cloning of two genes for beta-D-glucosidase in *Bacillus sp.* GL1 and identification of one as a gellan-degrading enzyme. *Arch Biochem Biophys* **360**: 1-9.
- Heilmann, C., Gerke, C., Perdreau-Remington, F., and Götz, F. (1996a) Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect Immun* **64**: 277-282.

- Heilmann,C., Hussain,M., Peters,G., and Götz,F. (1997) Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* **24**: 1013-1024.
- Heilmann,C., Schweitzer,O., Gerke,C., Vanittanakom,N., Mack,D., and Götz,F. (1996b) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* **20**: 1083-1091.
- Heinzelmann,M., Herzig,D.O., Swain,B., Mercer-Jones,M.A., Bergamini,T.M., and Polk,H.C., Jr. (1997) Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. *Clin Diagn Lab Immunol* **4**: 705-710.
- Hennig,S., Nyunt,W.S., and Ziebuhr,W. (2007) Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate. *Int J Med Microbiol* **297**: 117-122.
- Herrmann,M., Vaudaux,P.E., Pittet,D., Auckenthaler,R., Lew,P.D., Schumacher-Perdreau,F. *et al.* (1988) Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* **158**: 693-701.
- Herwaldt,L.A., Geiss,M., Kao,C., and Pfaller,M.A. (1996) The positive predictive value of isolating coagulase-negative staphylococci from blood cultures. *Clin Infect Dis* **22**: 14-20.
- Higashi,J.M., Wang,I.W., Shlaes,D.M., Anderson,J.M., and Marchant,R.E. (1998) Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and transposon mutant strains to hydrophobic polyethylene. *J Biomed Mater Res* **39**: 341-350.
- Hussain,M., Heilmann,C., Peters,G., and Herrmann,M. (2001) Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb Pathog* **31**: 261-270.
- Hussain,M., Herrmann,M., von Eiff,C., Perdreau-Remington,F., and Peters,G. (1997) A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* **65**: 519-524.
- Hussain,M., Wilcox,M.H., and White,P.J. (1993) The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev* **10**: 191-207.
- Itoh,Y., Wang,X., Hinnebusch,B.J., Preston,J.F., III, and Romeo,T. (2005) Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J Bacteriol* **187**: 382-387.
- Izano,E.A., Sadovskaya,I., Wang,H., Vinogradov,E., Ragunath,C., Ramasubbu,N. *et al.* (2008) Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and detergent resistance in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog* **44**: 52-60.

- Jager, S., Mack, D., Rohde, H., Horstkotte, M.A., and Knobloch, J.K. (2005) Disintegration of *Staphylococcus epidermidis* biofilms under glucose-limiting conditions depends on the activity of the alternative sigma factor sigmaB. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5577-5581.
- Jansen, B., Schumacher-Perdreau, F., Peters, G., and Pulverer, G. (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.
- Kaplan, J.B., Velliyagounder, K., Ragunath, C., Rohde, H., Mack, D., Knobloch, J.K., and Ramasubbu, N. (2004) Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* **186**: 8213-8220.
- Kirchhoff, L.V., and Sheagren, J.N. (1985) Epidemiology and clinical significance of blood cultures positive for coagulase-negative staphylococcus. *Infect Control* **6**: 479-486.
- Kleeman, K.T., Bannerman, T.L., and Kloos, W.E. (1993) Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. *J Clin Microbiol* **31**: 1318-1321.
- Kloos, W.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., and Bannerman, T.L. (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **7**: 117-140.
- Knobloch, J.K., Von Osten, H., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Mack, D. (2002) Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative *Staphylococcus epidermidis*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **191**: 107-114.
- Knobloch, J.K.M., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.H., and Mack, D. (2001) Biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* depends on RsbU, a functional activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J Bacteriol* **183**: 2624-2633.
- Komatsuzawa, H., Ohta, K., Sugai, M., Fujiwara, T., Glanzmann, P., Berger, B., and Suginaka, H. (2000) Tn551-mediated insertional inactivation of the *fmtB* gene encoding a cell wall-associated protein abolishes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **45**: 421-431.
- Kotilainen P., Nikoskelainen J., and Huovinen P. (1990) Emergence of ciprofloxacin-resistant coagulase-negative staphylococcal skin flora in immunocompromised patients receiving ciprofloxacin. *J Infect Dis* ;161(1):41-4.
- Kristian, S.A., Birkenstock, T.A., Sauder, U., Mack, D., Gotz, F., and Landmann, R. (2008) Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *J Infect Dis* **197**: 1028-1035.

- Kropec,A., Maira-Litran,T., Jefferson,K.K., Grout,M., Cramton,S.E., Gotz,F. *et al.* (2005) Poly-N-acetylglucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. *Infect Immun* **73**: 6868-6876.
- Lane-Smith,R., and Gilkerson,E. (1979) Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2- benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Anal Biochem* **98**: 478-480.
- Lasa,I., and Penades,J.R. (2006) Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* **157**: 99-107.
- Lejon,S., Frick,I.M., Bjorck,L., Wikstrom,M., and Svensson,S. (2004) Crystal Structure and Biological Implications of a Bacterial Albumin Binding Module in Complex with Human Serum Albumin. *J Biol Chem* **279**: 42924-42928.
- Löffler,G. (2008) Thrombocyten und Blutgerinnung. Basiswissen Biochemie. Springer, Berlin Heidelberg (ed)., pp. 365-380.
- Mack,D. (1999a) Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J Hosp Infect* **43 (Suppl)**: S113-S125.
- Mack,D. (1999b) Molekulare Mechanismen der Biofilm-Entstehung von *Staphylococcus epidermidis*: Bedeutung für die Pathogenese Fremdkörper-assoziiierter Infektionen. *Chemother J* **8**: 166-175.
- Mack,D., Bartscht,K., Fischer,C., Rohde,H., de Grahl,C., Dobinsky,S. *et al.* (2001) Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Meth Enzymol* **336**: 215-239.
- Mack,D., Becker,P., Chatterjee,I., Knobloch,J.K.M., Peters,G., Rohde,H., and Herrmann,M. (2004) Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *International Journal of Medical Microbiology* **294**: 203-212.
- Mack,D., Fischer,W., Krokotsch,A., Leopold,K., Hartmann,R., Egge,H., and Laufs,R. (1996a) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* **178**: 175-183.
- Mack,D., Haeder,M., Siemssen,N., and Laufs,R. (1996b) Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J Infect Dis* **174**: 881-884.
- Mack,D., Horstkotte,M.A., Rohde,H., and Knobloch,J.K.M. (2005) Coagulase-Negative Staphylococci. In *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. Pace,J.L., Rupp,M.E., and Finch,R.G. (eds). London: CRC Press, pp. 109-153.
- Mack,D., Nedelmann,M., Elsner,H.A., Magnus,T., and Laufs,R. (1995) Tn917-Insertionen an verschiedenen Insertionsorten führen zu einem biofilmbnegativen Phänotyp von *Staphylococcus epidermidis*. *Immun Infekt Suppl* **1** **23**: 144.

- Mack,D., Nedelmann,M., Krokotsch,A., Schwarzkopf,A., Heesemann,J., and Laufs,R. (1994) Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* **62**: 3244-3253.
- Mack,D., Riedewald,J., Rohde,H., Magnus,T., Feucht,H.H., Elsner,H.A. *et al.* (1999) Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect Immun* **67**: 1004-1008.
- Mack,D., Rohde,H., Dobinsky,S., Riedewald,J., Nedelmann,M., Knobloch,J.K.M. *et al.* (2000) Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun* **68**: 3799-3807.
- Mack,D., Rohde,H., Harris,L.G., Davies,A.P., Horstkotte,M.A., and Knobloch,J.K. (2006) Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* **29**: 343-359.
- Mack,D., Siemssen,N., and Laufs,R. (1992) Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun* **60**: 2048-2057.
- Maira-Litran,T., Kropec,A., Goldmann,D., and Pier,G.B. (2004) Biologic properties and vaccine potential of the staphylococcal poly-N-acetyl glucosamine surface polysaccharide. *Vaccine* **22**: 872-879.
- Marrie,T.J., and Costerton,J.W. (1984) Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *J Clin Microbiol* **19**: 687-693.
- Marrie,T.J., Nelligan,J., and Costerton,J.W. (1982) A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* **66**: 1339-1341.
- Marrie,T.J., Noble,M.A., and Costerton,J.W. (1983) Examination of the morphology of bacteria adhering to peritoneal dialysis catheters by scanning and transmission electron microscopy. *J Clin Microbiol* **18**: 1388-1398.
- Martin,M.A., Pfaller,M.A., and Wenzel,R.P. (1989) Coagulase-negative staphylococcal bacteremia. Mortality and hospital stay. *Ann Intern Med* **110**: 9-16.
- McAleese,F.M., Walsh,E.J., Sieprawska,M., Potempa,J., and Foster,T.J. (2001) Loss of clumping factor B fibrinogen binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease. *J Biol Chem* **276**: 29969-29978.
- McGavin,M.J., Zahradka,C., Rice,K., and Scott,J.E. (1997) Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infect Immun* **65**: 2621-2628.

- Monk,A.B., and Archer,G.L. (2007) Use of Outer Surface Protein Repeat Regions for Improved Genotyping of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* **45**: 730-735.
- Moretro,T., Hermansen,L., Holck,A.L., Sidhu,M.S., Rudi,K., and Langsrud,S. (2003) Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5648-5655.
- Muller,E., Hübner,J., Gutierrez,N., Takeda,S., Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (1993) Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. *Infect Immun* **61**: 551-558.
- Nilsdotter-Augustinsson,A., Koskela,A., Ohman,L., and Soderquist,B. (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., Frykberg,L., Flock,J.I., Pei,L., Lindberg,M., and Guss,B. (1998) A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **66**: 2666-2673.
- Noble,W.C. (1997) Staphylococcal carriage and skin and soft tissue infection. The staphylococci in human disease. Crossley,K.B., and Archer,G.L. (eds). New York: Churchill Livingstone, pp. 401-412.
- O'Toole,G., Kaplan,H.B., and Kolter,R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**: 49-79.
- Pei,L., Palma,M., Nilsson,M., Guss,B., and Flock,J.I. (1999) Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **67**: 4525-4530.
- Peschel,A., Otto,M., Jack,R.W., Kalbacher,H., Jung,G., and Götz,F. (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**: 8405-8410.
- Peters,G., Locci,R., and Pulverer,G. (1981) Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* **173**: 293-299.
- Peters,G., Locci,R., and Pulverer,G. (1982) Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* **146**: 479-482.
- Pfaller,M.A., and Herwaldt,L.A. (1988) Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **1**: 281-299.
- Pittet,D., Tarara,D., and Wenzel,R.P. (1994) Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA* **271**: 1598-1601.
- Potempa,J., Dubin,A., Korzus,G., and Travis,J. (1988) Degradation of elastin by a cysteine proteinase from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **263**: 2664-2667.

- Potempa,J., Fedak,D., Dubin,A., Mast,A., and Travis,J. (1991) Proteolytic inactivation of alpha-1-anti-chymotrypsin. Sites of cleavage and generation of chemotactic activity. *J Biol Chem* **266**: 21482-21487.
- Potempa,J., Watorek,W., and Travis,J. (1986) The inactivation of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor by proteinases from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **261**: 14330-14334.
- Qin,Z., Ou,Y., Yang,L., Zhu,Y., Tolker-Nielsen,T., Molin,S., and Qu,D. (2007a) Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **153**: 2083-2092.
- Qin,Z., Yang,X., Yang,L., Jiang,J., Ou,Y., Molin,S., and Qu,D. (2007b) Formation and properties of in vitro biofilms of *ica*-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J Med Microbiol* **56**: 83-93.
- Rachid,S., Cho,S., Ohlsen,K., Hacker,J., and Ziebuhr,W. (2000) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: the possible involvement of the alternative transcription factor sigB. *Adv Exp Med Biol* **485**: 159-166.
- Read,R.R., Eberwein,P., Dasgupta,M.K., Grant,S.K., Lam,K., Nickel,J.C., and Costerton,J.W. (1989) Peritonitis in peritoneal dialysis: bacterial colonization by biofilm spread along the catheter surface. *Kidney Int* **35**: 614-621.
- Ringberg,H., Thoren,A., and Bredberg,A. (1991) Evaluation of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. A prospective clinical and microbiological study. *Scand J Infect Dis* **23**: 315-323.
- Rohde,H., Burandt,E., Siemssen,N., Frommelt,L., Burdelski,C., Wurster,S. *et al.* (2007) Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**: 1711-1720.
- Rohde,H., Burdelski,C., Bartscht,K., Hussain,M., Buck,F., Horstkotte,M.A. *et al.* (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* **55**: 1883-1895.
- Rohde,H., Kalitzky,M., Kroger,N., Scherpe,S., Horstkotte,M.A., Knobloch,J.K. *et al.* (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., Knobloch,J.K., Horstkotte,M.A., and Mack,D. (2001) Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **190**: 105-112.
- Rupp,M.E., and Archer,G.L. (1994) Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* **19**: 231-243.

- Rupp, M.E., Ulphani, J.S., Fey, P.D., Bartscht, K., and Mack, D. (1999) 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.
- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G., and Jabbouri, S. (2005) Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun* **73**: 3007-3017.
- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Li, J., and Jabbouri, S. (2004) Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus epidermidis* RP62A, a reference biofilm-positive strain. *Carbohydr Res* **339**: 1467-1473.
- Sheth, N.K., Franson, T.R., and Sohnle, P.G. (1985) Influence of bacterial adherence to intravascular catheters on in-vitro antibiotic susceptibility. *Lancet* **2**: 1266-1268.
- Sun, D., Accavitti, M.A., and Bryers, J.D. (2005) Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**: 93-100.
- Tanaka, Y., Sakamoto, S., Kuroda, M., Goda, S., Gao, Y.G., Tsumoto, K. *et al.* (2008) A helical string of alternately connected three-helix bundles for the cell wall-associated adhesion protein Ebh from *Staphylococcus aureus*. *Structure* **16**: 488-496.
- Timmerman, C.P., Fleer, A., Besnier, J.M., De Graaf, L., Cremers, F., and Verhoef, J. (1991) Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun* **59**: 4187-4192.
- Tojo, M., Yamashita, N., Goldmann, D.A., and Pier, G.B. (1988) Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis* [published erratum appears in J Infect Dis 1988 Jul;158(1):268]. *J Infect Dis* **157**: 713-722.
- Tormo, M.A., Marti, M., Valle, J., Manna, A.C., Cheung, A.L., Lasa, I., and Penades, J.R. (2005) SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J Bacteriol* **187**: 2348-2356.
- Travis, J., Potempa, J., and Maeda, H. (1995) Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiol* **3**: 405-407.
- Vandecasteele, S.J., Peetermans, W.E., Merckx, R., Rijnders, B.J., and Van Eldere, J. (2003) Reliability of the *ica*, *aap* and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. *Clin Microbiol Infect* **9**: 114-119.
- Vaudaux, P., Pittet, D., Haeberli, A., Huggler, E., Nydegger, U.E., Lew, D.P., and Waldvogel, F.A. (1989) Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J Infect Dis* **160**: 865-875.
- Veenstra, G.J., Cremers, F.F., van Dijk, H., and Fleer, A. (1996) Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **178**: 537-541.

- Vincent, J.L., Bihari, D.J., Suter, P.M., Bruining, H.A., White, J., Nicolas-Chanoine, M.H. *et al.* (1995) The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee [see comments]. *JAMA* **274**: 639-644.
- Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G.A., Fischer, E.R., and Otto, M. (2003) Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **188**: 706-718.
- Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J.M., Yao, Y., Fischer, E.R., DeLeo, F.R., and Otto, M. (2004a) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* **279**: 54881-54886.
- Vuong, C., Saenz, H.L., Gotz, F., and Otto, M. (2000) Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **182**: 1688-1693.
- Vuong, C., Voyich, J.M., Fischer, E.R., Braughton, K.R., Whitney, A.R., DeLeo, F.R., and Otto, M. (2004b) Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol* **6**: 269-275.
- Wang, X., Preston, J.F., III, and Romeo, T. (2004) The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* **186**: 2724-2734.
- Warren, D.K., Quadir, W.W., Hollenbeak, C.S., Elward, A.M., Cox, M.J., and Fraser, V.J. (2006) Attributable cost of catheter-associated bloodstream infections among intensive care patients in a nonteaching hospital. *Crit Care Med* **34**: 2084-2089.
- Weidenmaier, C., and Peschel, A. (2008) Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol* **6**: 276-287.
- Widmer, A.F., Frei, R., Rajacic, Z., and Zimmerli, W. (1990) Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis* **162**: 96-102.
- Williams, R.J., Henderson, B., Sharp, L.J., and Nair, S.P. (2002) Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **70**: 6805-6810.
- Xu, L., Li, H., Vuong, C., Vadyvaloo, V., Wang, J., Yao, Y. *et al.* (2006) Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **74**: 488-496.
- Yao, Y., Sturdevant, D.E., Villaruz, A., Xu, L., Gao, Q., and Otto, M. (2005) Factors characterizing *Staphylococcus epidermidis* invasiveness determined by comparative genomics. *Infect Immun* **73**: 1856-1860.

Younger, J.J., Christensen, G.D., Bartley, D.L., Simmons, J.C., and Barrett, F.F. (1987) Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal to clinical outcome. *J Infect Dis* **156**: 548-554.

Ziebuhr, W., Heilmann, C., Götz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E., and Hacker, J. (1997) Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* **65**: 890-896.

Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Löbner, I., Götz, F., and Hacker, J. (1999) A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* **32**: 345-356.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

|                   |                                                                    |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------|
| A <sub>570</sub>  | Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 570 nm               |
| CDC               | englisch: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>        |
| CFU               | koloniebildende Einheiten (englisch: <i>colony forming units</i> ) |
| cm                | Zentimeter                                                         |
| Da                | Dalton                                                             |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>desoxyribonucleic acid</i> )  |
| dNTP              | Desoxy-Nukleotidyl-Triphosphat                                     |
| EDTA              | Ethylendiamintetraessigsäure                                       |
| ELISA             | englisch: <i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>                |
| Embp              | englisch: <i>extracellular matrix binding protein</i>              |
| ica               | interzelluläre Adhäsion ( <i>intercellular adhesion</i> )          |
| IS256             | Insertionselement 256                                              |
| KNS               | Koagulase-negative Staphylokokken                                  |
| M                 | Mol                                                                |
| MHK               | Minimale Hemmkonzentration                                         |
| min               | Minute                                                             |
| ml                | Milliliter                                                         |
| µl                | Mikroliter                                                         |
| µm                | Mikrometer                                                         |
| ng                | Nanogramm                                                          |
| nm                | Nanometer                                                          |
| OD <sub>600</sub> | Optische Dichte bei 600nm Referenzwellenlänge                      |

|         |                                                                                                               |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PBS     | Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: <i>phosphate buffered saline</i> )                                   |
| PCR     | Polymerase-Kettenreaktion (englisch: <i>polymerase chain reaction</i> )                                       |
| PIA     | interzelluläres Polysaccharid Adhäsion (englisch: <i>polysaccharide intercellular adhesin</i> )               |
| RNA     | Ribonukleinsäure (englisch: <i>ribonucleic acid</i> )                                                         |
| TSB BBL | Trypton Soja Brühe (englisch: <i>trypticase soy broth</i> ) der Firma Becton Dickinson, Cockseyville, MD, USA |
| TSBØ    | Trypton Soja Brühe ohne Glukose                                                                               |
| 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                                                                                           |

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> 1457 .....                                                                                                                                                                                                              | 5  |
| <b>Abbildung 2:</b> Vereinfachtes Modell der Regulation der Biofilmbildung in<br><i>S. epidermidis</i> (Mack <i>et al.</i> , 1996b) .....                                                                                                                                            | 10 |
| <b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung der Embp-Domänen-Struktur ba-<br>sierend auf bioinformatischen Untersuchungen ( <a href="http://smart.embl-heidelberg.de">http://smart.embl-<br/>heidelberg.de</a> ) der Embp-Aminosäuresequenz von <i>S. epidermidis</i><br>1585 ..... | 12 |
| <b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der Phagentransduktion von pTXica<br>aus dem Stamm 1457-M13(pTXica) in die <i>S. epidermidis</i> -Stäm-<br>me 1585, 1585-Ra und M135 .....                                                                                              | 37 |
| <b>Abbildung 5:</b> Nachweis von <i>icaA</i> in pTXica-Transduktanten der Stämme <i>S. epi-</i><br><i>dermidis</i> 1585, 1585-Ra und M135 mittels PCR.....                                                                                                                           | 38 |
| <b>Abbildung 6:</b> Nachweis der Embp-Expression von <i>S. epidermidis</i> 1585,<br>1585(pTXica), 1585-Ra, 1585-Ra(pTXica), M135 und<br>M135(pTXica) nach Anzucht unter <i>icaADBC</i> -induzierten<br>und nicht induzierten Bedingungen .....                                       | 39 |
| <b>Abbildung 7:</b> Dokumentation makroskopisch sichtbarer Unterschiede während<br>des Wachstums der verschiedenen Bakterienstämme unter<br><i>icaADBC</i> -induzierten Bedingungen .....                                                                                            | 40 |
| <b>Abbildung 8:</b> Semiquantitativer Biofilmtest der Stämme 1585, 1585-Ra, M135<br>und ihrer korrespondierenden Transduktanten unter induzierten<br>und nicht induzierten Bedingungen .....                                                                                         | 41 |
| <b>Abbildung 9:</b> Semiquantitativer Biofilmtest der <i>S. epidermidis</i> -Stämme 1457<br>und 1457M135.....                                                                                                                                                                        | 42 |
| <b>Abbildung 10:</b> Nachweis von PIA unter induzierten und nicht induzierten Be-<br>dingungen an der Zelloberfläche und im Überstand der Stämme<br>1585, 1585-Ra und ihrer Transduktanten mittels Dot-Blot .....                                                                    | 44 |

- Abbildung 11:** Graphische Darstellung der gemessenen Absorption in einem ELISA, in dem die optimale Konzentration für die Beschichtung einer Maxi-Sorp-Platte (Nunc) mit interzellulären Polysaccharid-Adhäsın (PIA) ermittelt wurde .....48
- Abbildung 12:** Graphische Darstellung der gemessenen Absorption in einem ELISA, in dem eine Bindung von PIA und rEmbp17383 untersucht wurde .....49
- Abbildung 13:** Graphische Darstellung der Inhibition in einem ELISA-Test zur Untersuchung der Bindung von PIA an rEmbp17383 .....51
- Abbildung 14:** Graphische Darstellung der Inhibition von rEmbp17383 an PIA durch Präinkubation mit N-Acetylglukosamin oder Glukosamin.....53
- Abbildung 15:** Semiquantitativer Biofilmtest der Stämme 1585, 1585-Ra, M135 und ihrer korrespondierenden Transduktanten unter induzierten und nicht induzierten Bedingungen.....54
- Abbildung 16:** Semiquantitativer Biofilmtest der Stämme 1585, 1585-Ra und ihrer Transduktanten 1585M15 und 1585-RaM15 .....56
- Abbildung 17:** Nachweis von Embp in *S. epidermidis* 1585, 1585-Ra und 1585-RaM15 mittels SDS-PAGE und Western Blot.....57
- Abbildung 18:** Nachweis extrazellulärer Proteasen von *S. epidermidis* 1585, 1585-Ra, 1585M15 und 1585-RaM15 mittels *Skim-milk* Hydrolyseagar.....58

## 7.3 Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabelle 1:</b> Schätzung der jährlich in Deutschland auftretenden fremdkörper-assozierten Infektionen (Mack et al., 2005). .....                   | 2  |
| <b>Tabelle 2:</b> Übersicht spezifischer Adhäsionsfaktoren .....                                                                                      | 6  |
| <b>Tabelle 3:</b> Übersicht über die verwendeten Chemikalien.....                                                                                     | 14 |
| <b>Tabelle 4:</b> Übersicht über verwendete Laborgeräte.....                                                                                          | 16 |
| <b>Tabelle 5:</b> Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und die aus ihnen abgeleiteten Transposoninsertionsmutanten .....                    | 20 |
| <b>Tabelle 6:</b> Übersicht über die verwendeten Primer .....                                                                                         | 21 |
| <b>Tabelle 7:</b> Übersicht über die Ergebnisse des PIA-Nachweises auf der Zelloberfläche sowie im Kulturüberstand mittels Koagglutinationstest ..... | 45 |
| <b>Tabelle 8:</b> Übersicht über die Ergebnisse des Koagglutinationstests von 1457 und 1457M135.....                                                  | 46 |

## 7.4 Danksagungen

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Holger Rohde für die Überlassung des Themas und die Übernahme der Aufgaben des Doktorvaters. Seine stete Bereitschaft zum kritischen Gedankenaustausch und ansteckende Freude an der wissenschaftlichen Arbeit gaben mir immer wieder wertvolle Impulse beim Erstellen dieser Arbeit.

Herrn Michael Busche und Frau Dr. S. Frankenberger danke ich für die Hilfe beim Skim-milk-Hydrolyseagartest und der PIA-Präparation.

Außerdem möchte ich mich bei Julia von Freyberg-Rohde, Sandra Schewe, Philip Pehle, Kim Wegert, Manuel Wolters, Gesche Kroll, Chai Jung Wang, Christoph Burdelski, Dr. med. Gefion Franke und Martin Christner für die sehr schöne gemeinsame Zeit in und außerhalb des Labors bedanken.

## 7.5 Curriculum vitae

|               |                                     |
|---------------|-------------------------------------|
| Name          | Ulrike Wendt                        |
| Postanschrift | Eppendorfer Weg 7,<br>20259 Hamburg |
| E-mail        | ulrikewendt@gmx.ch                  |
| Nationalität  | deutsch                             |
| Familienstand | ledig                               |
| Geburtsdatum  | 8. Januar 1983                      |
| Geburtsort    | Braunschweig                        |

### Ausbildung

---

|                 |                                             |
|-----------------|---------------------------------------------|
| 1989-1993       | Grundschule Mascheroder Holz, Braunschweig  |
| 1993-1995       | Orientierungsstufe Lindenberg, Braunschweig |
| 1995-2002       | Gymnasium Gaußschule, Braunschweig          |
| 10/2002-10/2008 | Medizinstudium Universität Hamburg          |
| 08/2004         | 1. Ärztliche Prüfung                        |
| 10/2008         | 2. Ärztliche Prüfung                        |

## 7.6 Erklärung

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

Ulrike Wendt

Hamburg im April 2009