

Untersuchung zur Funktion des
Accumulation associated proteins (Aap)
bei der
Staphylococcus epidermidis
(Evans 1916)
Biofilmbildung

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

von

Melanie Michel

Hamburg, November 2010

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. M. AEPFELBACHER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. A. POMMERENING-RÖSER
Tag der Disputation: 24. September 2010

Hamburg, den 09. September 2010



A. Temming

Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2006 bis Juli 2010 unter Anleitung von Prof. Dr. Martin Aepfelbacher am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg
vorgelegt von
Diplom-Biologin Melanie Michel
aus Neuburg an der Donau

Dissertationsgutachter:	Prof. Dr. Martin Aepfelbacher PD Dr. Andreas Pommerening-Röser
Disputationsgutachter:	PD Dr. Holger Rohde Prof. Dr. Wolfgang Streit

Per aspera ad (a)astra!

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	9
2	Einleitung	11
2.1	Staphylokokken	11
2.1.1	Die Gattung <i>Staphylococcus</i>	11
2.1.2	Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken.....	11
2.1.3	Biofilme.....	13
2.2	Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i>	13
2.2.1	Primäre Bindung	14
2.2.2	Akkumulation.....	15
2.2.2.1	Das Akkumulations-assoziierte Protein (Aap, <i>accumulation associated protein</i>).....	15
2.2.2.2	Das Aap-assoziierte <i>Staphylococcus epidermidis</i> extrazelluläre Adhesin (AaStrA, <i>Aap-associated Staphylococcus epidermidis extracellular adhesin</i>)	17
2.2.3	Freisetzung von <i>S. epidermidis</i> aus den Biofilmen	19
2.3	Zielsetzung	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Material	21
3.1.1	Technische Geräte	21
3.1.2	ÄKTA-System.....	22
3.1.3	Mikroskop	23
3.1.4	Verbrauchsmaterial	23
3.1.5	Chemikalien	24
3.1.6	Antibiotika.....	25
3.1.7	Enzyme.....	26
3.1.8	Bakterien-Stämme	27
3.1.9	Plasmide	28
3.1.10	Oligonukleotide	29
3.1.11	Antikörper	30
3.1.12	Kits	30
3.1.13	Molekulargewichtstandards (Marker)	31
3.1.14	Medien.....	31

3.1.14.1	Bakterienanzucht	31
3.1.14.2	Phagengewinnung, -titration und -transduktion.....	32
3.1.14.3	Protoplastentransformation	32
3.1.15	Puffer und Lösungen	34
3.1.15.1	Allgemein	34
3.1.15.2	Agarose-Gelelektrophorese	34
3.1.15.3	Protoplastentransformation	35
3.1.15.4	Bakterienadhärenztest	36
3.1.15.5	SDS-PAGE und Western Blot.....	36
3.1.15.6	Coomassie-Färbung.....	37
3.1.15.7	Stufenpräparation zellulärer Fraktionen.....	37
3.1.15.8	Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine	37
3.1.15.9	Strippen und Wiederbeladen von HiTrap Chelating Säulen	38
3.1.15.10	ELISA.....	38
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	39
3.2.1.1	Präparation chromosomaler DNS aus Staphylokokken	39
3.2.1.2	Plasmidpräparation.....	39
3.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.2.1.4	Polymerasekettenreaktion (PCR, <i>polymerase chain reaction</i>)	40
3.2.1.5	Restriktionsverdau.....	42
3.2.1.6	Extraktion von DNS aus Agarosegelen.....	42
3.2.1.7	DNS-Sequenzierung.....	43
3.2.1.8	DNS-Ligation	43
3.2.1.9	Klonierung.....	43
3.2.2	Mikrobiologische Methoden	44
3.2.2.1	Chemische Transformation	44
3.2.2.2	Transformation durch Elektroporation.....	45
3.2.2.3	Protoplastentransformation (89).....	46
3.2.2.4	Phagentransduktion (85)	47
3.2.2.5	Homologe Rekombination	48
3.2.2.6	Antibiogramm	49
3.2.2.7	Biofilmassay	50
3.2.2.8	Immunfluoreszenztest (IFT).....	50
3.2.2.9	Bakterienadhärenztest nach dem ELISA-Prinzip.....	51

3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	52
3.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
3.2.3.2	Coomassie-Färbung.....	53
3.2.3.3	Silber-Färbung.....	53
3.2.3.4	Präparation von Proteinen aus <i>S. epidermidis</i>	54
3.2.3.5	Stufenpräparation zellulärer Fraktionen.....	55
3.2.3.6	Expression rekombinanter Proteine	55
3.2.3.7	Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine über IMAC (<i>immobilized metal affinity chromatography</i>) (96).....	56
3.2.3.8	Strippen und Wiederbeladen von HiTrap Chelating Säulen	57
3.2.3.9	Bradford-Assay	58
3.2.3.10	Lowry-Assay	58
3.2.3.11	Western Blot.....	59
3.2.4	Methoden zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion.....	59
3.2.4.1	Far Western Blot	59
3.2.4.2	Dot Blot	60
3.2.4.3	ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	61
3.2.4.4	Analytische Gelchromatographie.....	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Expression und Aufreinigung von AaStrA	63
4.2	Analyse der Interaktion von rAaStrA mit Aap rDomäne-B.....	65
4.2.1	Nachweis der Wechselwirkung von rAaStrA und rDomäne-B mittels Liganden-Dot Blot	65
4.2.2	Nachweis mittels ELISA.....	66
4.2.2.1	Aufbau und Validierung des ELISAs.....	66
4.2.2.2	Interaktions-ELISA rAaStrA mit rDomäne-B	68
4.2.2.3	Untersuchung der Interaktion von rAaStrA und rDomäne-B im Inhibitions-ELISA.....	69
4.2.2.4	Untersuchung zum Einfluss divalenter Ionen auf die Interaktion von rAaStrA und rDomäne-B	70
4.2.3	Analytische Gelchromatographie.....	72
4.2.4	Weitere Interaktionspartner von AaStrA.....	75
4.3	Analyse der Funktion von AaStrA bei der <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung	76
4.3.1	Expression von AaStrA in <i>S. epidermidis</i> Kulturen.....	77

4.3.2	Bakterienadhärenz an AaStrA-beschichteten Oberflächen	78
4.3.3	Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von AaStrA bei der <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung.....	80
4.3.3.1	Biofilminhibition durch Zugabe von rAaStrA	80
4.3.3.2	Biofilminhibition durch Zugabe von anti-rAaStrA-Antiserum.....	81
4.3.3.3	Genetische Untersuchung zur Funktion von AaStrA bei der <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung	82
4.3.3.4	Herstellung einer spezifischen <i>aastra knock out</i> Mutante durch homologe Rekombination	82
4.3.3.5	Einfluss einer <i>in trans</i> Überexpression von <i>aastra</i> auf die Biofilmbildung	84
5	Diskussion	89
5.1	Handelt es sich bei AaStrA um einen Aap Domäne-B-bindenden Interaktionspartner?	90
5.2	Allgemeine Charakteristika von AaStrA.....	94
5.3	Welche Bedeutung hat AaStrA für die <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung?	97
6	Literatur	101
7	Abkürzungsverzeichnis	113
8	Danksagung	116

1 Zusammenfassung

S. epidermidis ist in den letzten Jahren als herausragender Verursacher nosokomialer Infektionen erkannt worden. Die Pathogenität des Erregers begründet sich in der Fähigkeit zur Biofilmbildung auf Implantaten. Essentiell für die *S. epidermidis* Biofilmbildung ist das *Accumulation associated protein* (Aap). Hierbei kommt es zur Interaktion mit *S. epidermidis* Oberflächenproteinen. Eines dieser Proteine ist das bislang nicht beschriebene *Aap associated Staphylococcus epidermidis adhesin* AaStrA. Ziel dieser Arbeit war es, die Wechselwirkung von Aap mit AaStrA näher zu beschreiben und hinsichtlich ihrer Relevanz für den Prozess der Biofilmbildung zu untersuchen.

Die erhobenen Daten geben klare Evidenz, dass AaStrA tatsächlich ein spezifischer Interaktionspartner der Aap Domäne-B ist. Dabei konnte durch ELISA-Untersuchungen eine Dosisabhängigkeit der Wechselwirkung zwischen rAaStrA und rekombinant exprimierter Domäne-B (rDomäne-B) beobachtet werden. Durch die Zugabe von Zinkionen konnte die Interaktion zusätzlich spezifisch um das 3-fache gesteigert und hierdurch Anhalt für eine Rolle von Zinkionen für diese Interaktion gewonnen werden.

AaStrA wird in allen bakteriellen Wachstumsphasen von *S. epidermidis* Stämmen gleichmäßig stark gebildet. Es wurde gezeigt, dass AaStrA ein Zellwand-assoziiertes Protein ist, das nach der Sezernierung aus der Bakterienzelle mit der Bakterienoberfläche wechselwirkt und hierdurch zurück an die Zelloberfläche bindet. Diese Erkenntnisse weisen AaStrA funktionelle Charakteristika zu, die tyischerweise bei Proteinen der SERAM-Gruppe (*secretable extended repertoire adhesive molecules*) gefunden werden können. Untersuchungen zum Einfluss von rekombinant exprimiertem rAaStrA auf die *S. epidermidis* Biofilmbildung zeigten einen schwachen biofilminhibitorischen Effekt des Proteins. Gemeinsam mit dem Nachweis einer Biofilminhibitor durch ein spezifisches anti-rAaStrA-Kaninchenantiserum ergeben sich erste direkte Hinweise auf eine funktionelle Relevanz von AaStrA bei der Aap-vermittelten *S. epidermidis* Biofilmbildung. Zusätzlich ergaben sich durch die *in trans* Expression des AaStrA kodierenden Gens in biofilmmnegativen *S. epidermidis* Stämmen erste Hinweise auf eine eigenständige, Aap-unabhängige Funktion von AaStrA als interzelluläres Adhäsion. Daneben zeigte sich, dass AaStrA an Fibrinogen und Vitronektin binden kann. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass AaStrA nicht nur für die Akkumulationsphase der Biofilmbildung, sondern auch für die primäre Adhärenz von Bakterien an Oberflächen von funktioneller Bedeutung sein könnte.

Die hier dargestellten Untersuchungen haben erstmalig den biochemischen Nachweis erbracht, dass Aap Domäne-B spezifisch mit einem *S. epidermidis* Oberflächenprotein interagiert. Dieser Befund kann als wesentlicher Fortschritt im Verständnis der Aap-abhängigen *S. epidermidis* Biofilmbildung aufgefasst werden. Die detaillierte Darstellung dieser Interaktion und ihrer Bedeutung für die *S. epidermidis* Biofilmbildung kann zukünftig Möglichkeiten für die Entwicklung neuer präventiver und therapeutischer Strategien zur Bekämpfung nosokomialer *S. epidermidis* Implantatinfektionen sein.

2 Einleitung

2.1 Staphylokokken

2.1.1 Die Gattung *Staphylococcus*

Staphylokokken gehören zusammen mit den Gattungen *Micrococcus*, *Planococcus* und *Stomatococcus* zur Familie der *Micrococcaceae*. Staphylokokken (griech. *staphylé*, die Traube) sind grampositive, fakultativ anaerobe Kugelbakterien von 0,5-1,5 µm Durchmesser, die häufig in traubenartigen Haufen vorliegen. Sie sind unbeweglich und bilden keine Sporen. Des Weiteren weisen sie einen sehr niedrigen GC-Gehalt der DNS von 30-39 Molprozent auf (1-3) und sind in der Lage, Katalase zu bilden. Derzeit lässt sich der Genus *Staphylococcus* durch biochemische, molekularbiologische und physiologische Untersuchungen in 41 Spezies einteilen, wovon eine Reihe in weitere Subspezies untergliedert werden kann, so dass derzeit über 50 Taxa bekannt sind (4-10). Der Nachweis der Prothrombin-aktivierenden Plasmakoagulase erlaubt eine Einteilung in Koagulase-negative und Koagulase-positive Staphylokokken (11). *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist hierbei die einzige humanpathogene, Koagulase-positive Spezies, alle anderen sind Koagulase-negativ (12,13).

Der Großteil der bekannten Koagulase-negativen Staphylokokken (CoNS, *coagulase negative staphylococci*) kommen beim Menschen regelmäßig als Besiedlungsflora der Haut vor (1,12,13). Die höchste Populationsdichte mit 10^3 - 10^6 CFU/cm² findet sich an den Ausführungsgängen von Talg- und Schweißdrüsen sowie auf den Schleimhäuten von natürlichen Körperöffnungen (12,14). Dabei haben sich einige Arten stark spezialisiert, so besiedelt *Staphylococcus capitis* fast ausschließlich die behaarte Kopfhaut, während *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) hingegen auf der gesamten Körperoberfläche vorkommt und somit zu den am häufigsten von der Haut des Menschen isolierten Staphylokokkenspezies gehört (1,12,14). Die maximale Dichte dieser Art findet sich in der Axilla (12,15,16).

2.1.2 Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken

S. aureus ist schon lange als humanpathogener Keim bekannt, der unter anderem sowohl eitrige Hautinfektionen als auch Endokarditis auslösen kann (17). Durch die Bildung von

Enterotoxinen ist er in der Lage, spezifische Krankheitsbilder wie zum Beispiel das Toxische Schocksyndrom auszulösen (18).

Aus der Gruppe der CoNS war hauptsächlich nur *S. saprophyticus* als typischer Erreger von Harnwegsinfektionen bei jungen Frauen bekannt (19,20), während andere CoNS im Allgemeinen als klinisch unbedeutend und nicht humanpathogen betrachtet wurden (21). Diese Ansicht hat sich in den letzten 20 bis 30 Jahren drastisch geändert. Inzwischen ist klar, dass CoNS zu den fünf am häufigsten vorkommenden Organismen gehören, die nosokomiale Infektionen verursachen (22). Der am häufigsten isolierte Erreger ist hierbei *S. epidermidis* (12,18). Sie präsentieren sich als typische opportunistische Erreger, die erst bei einer spezifischen oder unspezifischen Immunkompromittierung als Ursache einer Infektion Bedeutung erlangen (23,24). Typischerweise jedoch treten die meisten *S. epidermidis* Infektionen im Zusammenhang mit implantierten Polymermaterialien auf (25). Hierbei handelt es sich zum Beispiel um zentralvenöse oder Peritonealdialysekatheter, künstliche Herzklappen, Herzschrittmacher, Liquorshunts, Gelenk- und Gefäßprothesen und Brustprothesen aus Silikon (22,26). Häufig gelangen die Bakterien bei solchen Infektionen über eine Kontamination des Fremdmaterials durch die Haut des Patienten während der Operation in die Wunde (12). Durch den erhöhten Einsatz von Fremdmaterialien ist auch die Anzahl der Infektionen in den letzten Jahren gestiegen (27). So treten allein in Deutschland bis zu 100.000 Infektionen pro Jahr auf. Aus therapeutischer Sicht stellen diese Fremdkörper-assoziierten Infektionen ein großes Problem dar, da für eine erfolgreiche Behandlung der Infektion häufig nur die Entfernung des entsprechenden Fremdkörpers bleibt (28). Die Möglichkeit einer Antibiotikatherapie wird durch das häufige Vorhandensein von spezifischen Resistenzgenen erschwert (29). Die bekanntesten Beispiele hierfür sind *S. epidermidis* Stämme, die eine Methicillin-Resistenz ausgebildet haben (MRSE, *methicillin-resistant S. epidermidis*) (30,31). Des Weiteren scheinen genau die Mechanismen, die CoNS zum Überleben in ihrem Habitat in und auf dem Menschen ausgebildet haben, dieselben zu sein, die sie zur erfolgreichen Besiedelung anderer Gewebe während einer Infektion benötigen. So ist ihr Erfolg als Pathogen zum einen von der Bildung von Adhäsionsfaktoren, dem Ausweichen des Immunsystems und der Produktion von Gewebe-schädigenden Faktoren, zum Beispiel Toxinen und degradativen Exoenzymen, abhängig (32). Am effektivsten ist hierbei wohl die Fähigkeit, an Fremdmaterialien zu adhären und stabile Biofilme auszubilden (33).

2.1.3 Biofilme

Biofilme bezeichnen eine oberflächengebundene Gemeinschaft von Mikroorganismen, die von einer selbst produzierten hydrierten, polymeren Matrix umgeben sind (29). Sie besitzen eine charakteristische Architektur und Physiologie, sowie eine speziell geregelte Genexpression (34). So werden manche der spezifisch exprimierten Gene für den, im Vergleich zum planktonischen Wachstum, heruntergefahrenen Metabolismus benötigt. Andere wiederum dienen direkt dem Aufbau des Biofilms, wie zum Beispiel die Expression von extrazellulären Makromolekülen wie Bindeproteinen und Polysacchariden (32). In Biofilmen lebende Bakterien sind so vor Angriffen des wirtseigenen Immunsystems geschützt, da die Zellen durch die Matrix geschützt sind und nicht wirksam bekämpft werden können (35,36). Auch weisen sie eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika auf, da manche Wirkstoffe zum einen schlecht durch die Barriere hindurch diffundieren können, zum anderen verursacht das verlangsamte Bakterienwachstum innerhalb eines Biofilms eine Unempfindlichkeit gegen bestimmte Antibiotikaklassen (29,36). Des Weiteren scheint ein Schutz vor rein mechanischen Kräften zu bestehen (37).

Weitere Beispiele für klinisch relevante Biofilmbildner sind unter anderem *Pseudomonas aeruginosa*, dem typischen Erzeuger einer Pneumonie, oder *Haemophilus influenzae*, der eine chronische *Otitis media* hervorrufen kann (29,38).

2.2 Biofilmbildung in *S. epidermidis*

Die Virulenz vieler *S. epidermidis* Stämme besteht darin, dass sie Biofilme auf Fremdmaterialien wie z.B. Kathetern ausbilden. Diese Biofilmbildung besteht aus drei Phasen, die in den folgenden Absätzen genauer erklärt werden (Abb. 1).

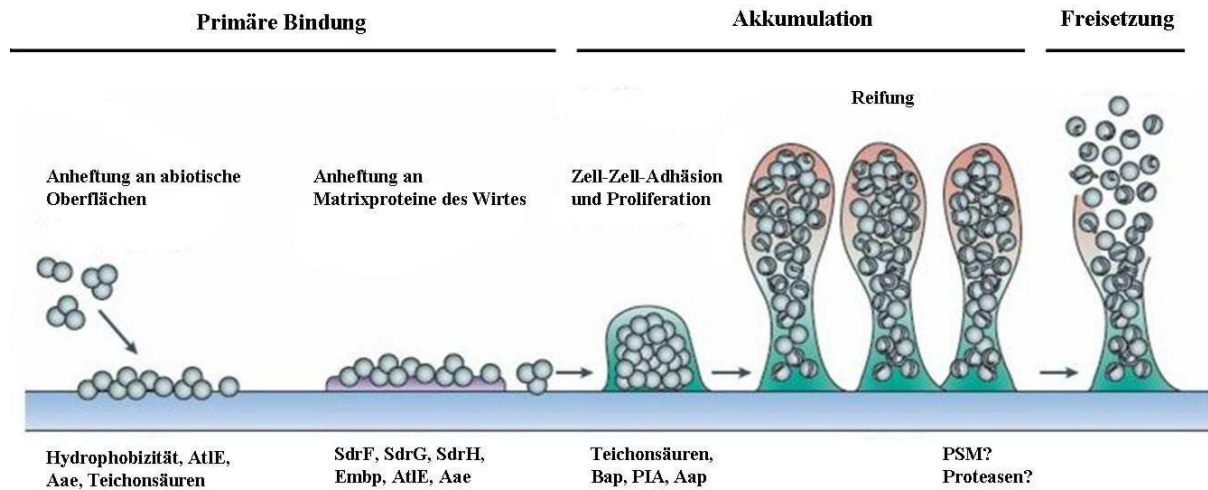


Abb. 1: Biofilmbildung bei *S. epidermidis*. Die Anheftung an unbeschichtetes Material hängt hauptsächlich von der Hydrophobizität der Zelloberfläche ab, während bestimmte bakterielle Oberflächenproteine die Adhäsion an medizinische Fremdkörper vermittelt, die mit Matrixmolekülen des Wirts bedeckt sind. Nach der Adhäsion an die Oberfläche kommt es über Exopolysaccharide, wie zum Beispiel PIA, und spezifischen Proteinen wie Aap, Embp und Bap sowie zu einem kleinen Teil über akzessorische Makromoleküle (zum Beispiel Teichonsäuren) zur interzellulären Aggregation und im Anschluss zur Reifung zu einem differenzierten Biofilm. Der letzte Schritt beinhaltet die Freisetzung planktonischer Bakterien oder kleinerer Zellaggregate. Verändert nach (39).

2.2.1 Primäre Bindung

Der erste Schritt der Biofilmbildung erfolgt durch die primäre Bindung von Bakterienzellen an eine Oberfläche. Die Adhäsion an abiotische Oberflächen, z. B. Katheter, wird dabei hauptsächlich durch die Hydrophobizität der bakteriellen Zelloberfläche vermittelt (40). Dies wird durch spezifische Proteine, wie dem bifunktionalen Adhäsin und Autolysin AtlE (41) und dem Biofilm-assoziierten Protein (Bap, *biofilm associated protein*) (42) unterstützt.

In vivo werden die abiotischen Oberflächen schnell mit wirtseigenen Matrixproteinen bedeckt. Um mit diesen Proteinen interagieren zu können, besitzt *S. epidermidis* eine Vielzahl von Oberflächenproteinen, den so genannten MSCRAMMS (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Diese können entweder durch Sortase A kovalent an die Bakterienoberfläche gebunden sein (43), oder nicht-kovalent mit Oberflächenpolymeren wie Teichonsäuren interagieren (44). Die Bindung an Fibrinogen und Kollagen erfolgt über die kovalent verankerten Proteine SdrG (*serin-aspartat-family-protein G*; auch bekannt als Fbe, *fibronectin binding protein*) und SdrF (45,46), wohingegen die nicht-kovalent gebundenen Autolysine AtlE und Aae eine weniger spezifische Interaktion aufweisen und an Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin binden können (41,47).

2.2.2 Akkumulation

Nachdem die primäre Bindung an eine Oberfläche erfolgt ist, entwickeln sich Biofilme durch interzelluläre Aggregation, die durch viele verschiedene Makromoleküle vermittelt wird. Diese beinhalten Exopolysaccharide und Proteine, welche anscheinend hauptsächlich für die Bildung der extrazellulären Biofilmmatrix verwendet werden. Zusätzlich haben Teichonsäuren (48,49) und extrazelluläre Desoxyribonukleinsäuren (DNS), freigesetzt durch die Lyse vereinzelter Zellen, eine Funktion in der Aggregation (50).

Viele *S. epidermidis* Stämme bilden Biofilme über das von ihnen produzierte, β -1,6-glykosidisch verknüpfte Poly-N-Azetylglukosamin, welches als intrazelluläres Polysaccharid-Adhäsion (PIA, *polysaccharide intercellular adhesin*) bezeichnet wird (33,51-53). Die Synthese und Deazetylierung von PIA erfolgt durch die Genprodukte des *icaADBC*-Lokus (*intercellular adhesion*), einem Teil des *ica*-Operons, welches zusätzlich das regulatorische Element *icaR* enthält (54-56). Neben *S. epidermidis* sind auch andere Mikroorganismen, wie z.B. *S. aureus*, *Yersinia pestis* und *Escherichia coli*, in der Lage, PIA zu produzieren (57-59). Vor nicht allzu langer Zeit fand man heraus, dass PIA bei einigen *S. epidermidis* Stämmen nicht essentiell für die Biofilmbildung ist, d.h. es sind auch Stämme, denen die *ica*-Gene fehlen, in der Lage, Biofilme auszubilden (60). So wurden im Rahmen einer klinischen Studie *S. epidermidis* Stämme aus Infektionen an Gelenkendoprothesen isoliert, die einen biofilmpositiven Phänotyp aufwiesen, jedoch *ica*-negativ waren (61). Dies legte nahe, dass manche Stämme ihre Biofilme zusätzlich oder allein durch spezifische Oberflächenproteine ausbilden (42,62). Ein Beispiel hierfür ist das extrazelluläre Matrix-bindende Protein (Embp, *extracellular matrix binding protein*) (63). Daneben konnte dem Akkumulations-assoziierten Protein (Aap, *accumulation associated protein*) eine Funktion als interzelluläres Adhäsion bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung zugewiesen werden.

2.2.2.1 Das Akkumulations-assoziierte Protein (Aap, *accumulation associated protein*)

Das Akkumulations-assoziierte Protein (Aap, *accumulation associated protein*) wurde im Rahmen der *S. epidermidis* Biofilmbildung lange Zeit als Zellwandanker für PIA vermutet (62,64). Rohde *et al.* (65) konnten jedoch nachweisen, dass proteolytisch gespaltenes Aap die interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung in einem vollkommen Polysaccharid-unabhängigen Hintergrund vermitteln kann.

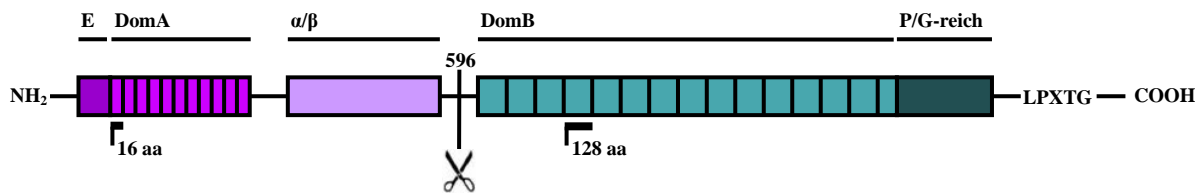


Abb. 2: Aap (1507 AS, 220 kDa). Schematische Darstellung des Proteins: (E) N-terminales Exportsignal; (DomA) Domäne-A, bestehend aus den Wiederholungseinheiten A (je 16 AS); (α/β) globuläre α/β-Region; (DomB) Domäne-B, bestehend aus den Wiederholungseinheiten B (je 128AS); (P/G-reich) Kollagen-ähnliche, Prolin-Glycin-reiche Domäne; (LPXTG) C-terminales Zellwandankermotiv. Die Stelle der Proteolyse (AS 596) ist mit einer Schere gekennzeichnet. Verändert nach (65,66).

Aap ist ein 220 kDa großes Zellwandprotein, das sich aus folgenden Abschnitten zusammensetzt (Abb. 2): N-terminal findet sich ein Exportsignal, gefolgt von der Domäne-A (DomA), die aus 16 Aminosäure-Wiederholungseinheiten besteht und eine strukturelle Homologie zum Oberflächenprotein SasG von *S. aureus* aufweist. Nach einer α/β-Region folgt die Domäne-B (DomB), welche aus einer variierenden Anzahl von 128 Aminosäure-Wiederholungseinheiten, den so genannten G5-Domänen, und einer unvollständigen Einheit von 68 Aminosäuren Länge besteht. Zuletzt schließt sich an die Prolin-Glycin-reiche Domäne das C-terminale LPXTG-Zellwandankermotiv an.

Auf der Zelloberfläche kann Aap in zwei verschiedenen Formen vorkommen: Entweder in voller Länge (220 kDa) oder in der prozessierten Form (140 kDa), die hauptsächlich aus der repetitiven Domäne-B besteht. In einer Studie von Rohde *et al.* (65) konnte gezeigt werden, dass die Biofilmbildung des klinisch relevanten *S. epidermidis* Stamms 5179 von der Expression der verkürzten Isoform von Aap abhängig ist. Exprimierte man das verkürzte Protein in dem biofilmnegativen *S. epidermidis* Stamm 1585, so führte dies zu einem biofilmpositiven Phänotyp, währenddessen die Expression des vollständigen Proteins in einem weiterhin biofilmnegativen Phänotyp resultierte. Es konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung von Aap für die adhäsive Funktion notwendig ist, da durch Zugabe des Protease-Inhibitors α₂-Makroglobulin die Biofilmbildung inhibiert werden konnte. Dies zeigt, dass die Domäne-A des Proteins nicht in der Biofilmbildung involviert ist. Des Weiteren konnte mit aufgereinigter Domäne-A die Biofilmbildung nicht inhibiert werden, während die Inkubation von *S. epidermidis* mit rekombinant exprimierter Domäne-B eine Inhibition der Biofilmbildung zur Folge hatte. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass allein die Domäne-B für die aggregativen Eigenschaften von Aap verantwortlich ist (65). Dennoch ist weitestgehend unklar, auf welcher molekularen Basis diese Interaktion stattfindet. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die G5-Domänen der Aap Domäne-B Zink-abhängige Adhäsionsmoleküle sind, die Analogien zu den Cadherin-Domänen von Säugetiere aufweisen (66). Die G5-Domäne dimerisiert in der Gegenwart von Zn²⁺ und schließt dabei 2-3

Zinkionen in der Mitte des Dimers ein. Durch die Art und Weise, wie Tandem-G5-Domänen miteinander assoziieren, wird ein Zink-Zipper-Mechanismus für die interzelluläre Adhäsion in Staphylokokken-Biofilmen vermutet (66). Mit Hilfe von Biofilmassays konnte gezeigt werden, dass die Biofilmbildung von *S. epidermidis* sowohl durch die Zugabe eines Zink-Chelators als auch durch aufgereinigte, einzelne G5-Domänen inhibiert werden konnte. Es wird angenommen, dass die komplexe dreidimensionale Architektur des Protein-abhängigen Staphylokokken-Biofilms das Resultat der homotypen Selbstassoziation von G5-Domänen ist (66).

2.2.2.2 Das Aap-assoziierte *Staphylococcus epidermidis* extrazelluläre Adhäsion (AaStrA, *Aap-associated Staphylococcus epidermidis extracellular adhesin*)

Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe beschäftigten sich weitergehend mit der Funktion von Aap in der *S. epidermidis* Biofilmbildung. Auf der Suche nach spezifischen Interaktionspartnern der Aap Domäne-B konnte nachgewiesen werden, dass die Domäne-B keineswegs nur homotype Wechselwirkungen eingeht, sondern auch an weitere Oberflächenproteine von *S. epidermidis* bindet (Abb. 3). Dabei handelt es sich um das 120 kDa große Autolysin AtlE und seine Degradationsprodukte, welches eine entscheidende Rolle in der Zellteilung spielt (67). Schon in früheren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass AtlE in der Biofilmbildung durch seine Vitronektin-bindenden Eigenschaften an der primären Adhäsion beteiligt sein könnte (41). Erst kürzlich konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die durch AtlE vermittelte Autolyse freigesetzte chromosomale extrazelluläre DNS (eDNA, *extracellular DNA*) die *S. epidermidis* Biofilmbildung unterstützen kann (68). Des Weiteren konnte ein hypothetisches Staphylokokkenprotein (NP_7639421) identifiziert werden, das bisher noch nicht weitergehend beschrieben wurde. Dieses Protein wurde aufgrund seiner putativen Funktion als Aap-assoziiertes *Staphylococcus epidermidis* Adhäsion (AaStrA, *aap associated Staphylococcus epidermidis adhesin*) bezeichnet.

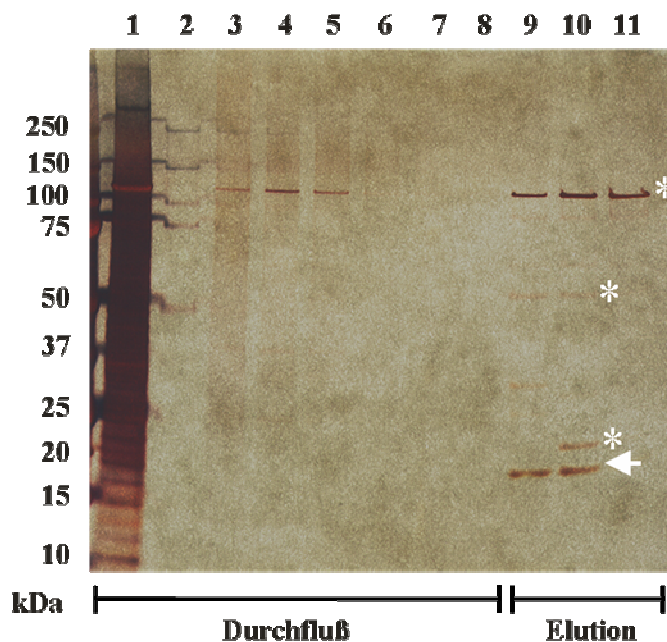


Abb. 3: Isolierung von *S. epidermidis* Oberflächenproteinen mit Aap-bindenden Eigenschaften mittels Affinitätschromatographie. Oberflächenproteine von *S. epidermidis* 5179-R1 wurden über eine mit rekombinanter Aap Domäne-B (rDomB) beladene NHS-Säule geleitet. Nach Spülen der Säulen mit PBS (pH 7,4; Fraktionen 1 – 8) wurde ein pH-Gradient angelegt (Fraktionen 9 – 11). Die entsprechenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Affinitätschromatographie mit SilverSnap™ gefärbt. Die mit * markierten Banden wurden mittels Massenspektrometrie AtLE zugeordnet. Die mit ← markierten Banden wurden als ein hypothetisches Staphylokokkenprotein NP_7639421 identifiziert.

Bei AaStrA handelt es sich um ein 18 kDa großes Protein mit einem theoretischen Isoelektrischen Punkt (pI) von 9,98. Die bioinformatische Analyse (Abb. 4) ergab den Nachweis eines N-terminalen Signalpeptids, bestehend aus 21 Aminosäuren. Bis auf dieses Exportsignal finden sich keine weiteren Homologien mit anderen Proteinen bekannter Funktion.

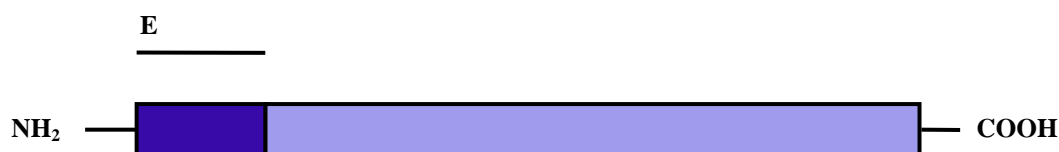


Abb. 4: AaStrA (169 AS, 18 kDa). Schematische Darstellung des Proteins. Bis auf das N-terminale Exportsignal (E), finden sich keine signifikanten Homologien mit anderen Proteinen mit bekannter Funktion.

Es konnte gezeigt werden, dass AaStrA ein Oberflächen-assoziiertes Protein ist und durch autoaggregative Eigenschaften möglicherweise als interzelluläres Adhäsion fungieren könnte. Im Rahmen eines Biofilmassays konnte durch die Zugabe von rekombinant exprimiertem AaStrA zu den beiden Aap- und biofilmbegleitenden Stämmen *S. epidermidis* 1585 und *S. carnosus* TM300 ein biofilmbegleitender Phänotyp induziert werden. Dies lässt ebenfalls

vermuten, dass die Bindung von AaStrA auch unabhängig von Aap stattfinden kann und AaStrA somit als eigenständiges, interzelluläres Adhäsion betrachtet werden kann. Durch eine Präparation der Oberflächenproteine des biofilmbnegativen *S. epidermidis* 5179 und seiner biofilmpositiven Mutante *S. epidermidis* 5179-R1 konnte gezeigt werden, dass AaStrA von beiden Stämmen exprimiert wird. Jedoch wird offensichtlich von *S. epidermidis* 5179 nicht genügend endogenes AaStrA gebildet, um auch hier einen biofilmpositiven Phänotyp zu erzeugen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung von Aap notwendig ist, damit ausreichend stark interzellulär adhäsive Oberflächeneigenschaften vorhanden sind, die bei konstanter AaStrA-Expression ausreichend für einen biofilmpositiven Phänotypen sind (Burdelski, unveröffentlichte Daten).

2.2.3 Freisetzung von *S. epidermidis* aus den Biofilmen

Bakterien können aus den äußeren Schichten des bestehenden Biofilms freigesetzt werden und sind dann in der Lage, sich im Wirtsorganismus zu verbreiten und neue Oberflächen durch Biofilmbildung zu besiedeln.

Der Mechanismus der Biofilmstrukturierung und der Freisetzung einzelner Bakterien ist im Gegensatz zur interzellulären Aggregation bei *S. epidermidis* nur wenig verstanden. Es ist jedoch bekannt, dass eine Kontrolle durch das *Quorum-Sensing*-System *agr* (*accessory gene regulator*) stattfindet, da Biofilme, die eine Störung im *agr*-System haben, dicker werden und einen deutlichen Defekt in der Freisetzung aufweisen (69,70). Bisher werden zwei mögliche Mechanismen der Freisetzung diskutiert: Zum einen die enzymatische Degradation der Biofilm-Exopolymere, zum anderen die Zerstörung nicht-kovalenter Interaktionen durch Detergenzien-ähnliche Moleküle. Für *S. aureus* konnte die enzymatische Degradation einzelner Faktoren des Protein-abhängigen Biofilms bereits als Freisetzungsmechanismus nachgewiesen werden (71), doch für *S. epidermidis* ist die Funktion solcher Proteasen bisher nicht bekannt. Dennoch produziert *S. epidermidis* eine Reihe von Exoproteasen mit einer geringen Substratspezifität, welche möglicherweise der Degradation von Oberflächenproteinen dienen könnten (72-74). Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien, die ebenfalls Poly-N-Azetyl-Glukosamin (PNAG) bilden, scheinen Staphylokokken keine Enzyme für die Hydrolyse von PNAG bzw. PIA zu besitzen (75-77). Alternativ dazu können Detergenzien-ähnliche Moleküle nicht-kovalente (wie elektrostatische oder hydrophobe) Interaktionen zerstören, die zum Beispiel zwischen dem kationischen PNAG und der

anionischen Polymeroberfläche bzw. den hydrophoben Regionen der Bakterienoberfläche auftreten. Es wird vermutet, dass kurze amphipathische, Phenol-lösliche Moduline (PSMs, *phenol soluble modulins*), wie zum Beispiel das *S. epidermidis* δ -Toxin, diese Funktion übernehmen (78). Sowohl die *S. epidermidis* Exoproteasen als auch die PSMs werden strikt über das *agr*-System reguliert (79,80).

2.3 Zielsetzung

Durch die Vorarbeit von C. Burdelski (s. Abschnitt 2.3.2.2) konnte AaStrA als ein neuer, bisher nicht in der Literatur beschriebener Interaktionspartner von Aap identifiziert werden. In Anbetracht der erhaltenen Ergebnisse wurden die Ziele dieser Arbeit wie folgt formuliert:

- 1) Expression und Aufreinigung von rekombinantem AaStrA.
- 2) Weitergehende Charakterisierung bzw. Verifizierung der Interaktion zwischen AaStrA und Aap Domäne-B.
- 3) Analyse der Funktion von AaStrA bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung und Beantwortung der folgenden Fragen:
 - Wo ist AaStrA auf der bakteriellen Zelloberfläche lokalisiert?
 - Kann rekombinantes AaStrA die Biofilmbildung inhibieren?
 - Kann AaStrA in biofilmmnegativen *S. epidermidis*-Stämmen bzw. in *S. carnosus* TM300 mit Hilfe einer homologen Rekombination bzw. einer *in trans* Expression einen biofilmpositiven Phänotyp hervorrufen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Technische Geräte

Gerät	Hersteller
Blotkammer (X Cell II™ Blot Module)	Invitrogen (Karlsruhe)
Brutschrank	Heraeus (Osterode)
Elektrophoresekammern Agarosegele	MWG-Biotech (Ebersberg)
Elektrophoresekammern SDS-PAGE (Mini-PROTEAN Tetra System)	BioRad (München)
Elektroporator (Gene Pulser® II)	BioRad (München)
ELISA Reader (Tecan Infinite M 200)	Tecan (Crailsheim)
Entwicklergerät (Curix 60)	AGFA (Mortsel, B)
Entwicklerkassette	Fuji Film (Düsseldorf)
Feinwaage (Kern ALS 120-4)	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Carl Zeiss (Jena)
Gefrierschrank -80 °C	Kryotek (Hamburg)
Gefrierschränke -20 °C	Liebherr (Biberach a.d. Riss)
Geldokumentationssystem (ChemiDoc™ XRS)	BioRad (München)
Geltrockner (Gel Dryer 543)	BioRad (München)
Kippschüttler (Typ 3015)	GFL (Burgwedel)
Kühlschränke	Liebherr (Biberach a.d. Riss)
Magnetrührer	Gerhardt (Königswinter)
Mikrowelle	Bosch (Stuttgart)
Netzgerät (Consort E425)	Bachofer (Reutlingen)
Netzgerät (Power Ease 500)	Invitrogen (Karlsruhe)
pH-Meter (Digital 646)	Knick (Berlin)
Photometer (Smart Spec plus)	BioRad (München)
Pipetten	Gilson (Den Haag, NL), Eppendorf (Hamburg)
Pipettus Accu-Jet® Pro	Brand (Wertheim)

Reinstwasseranlage	MembraPure (Bodenheim)
Scanner	Canon (Amsterdam, NL)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co. (New Brunswick, NJ)
Schüttelinkubator (Certomat [®] BS-1)	Sartorius (Göttingen)
Sonifizierer (Digital Sonifier [®])	Branson (Danbury, USA)
Sterilwerkbänke	Thermo Scientific
Themocycler (Primus 96 plus)	MWG (Eberswalde)
Thermomixer (Typ 5436)	Eppendorf (Hamburg)
Vakuumpumpe	Vacuubrand (Wertheim)
Vortexer (Reax Top)	Heidolph (Schwabach)
Waage (Kern 572)	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Wasserbad	GFl (Burgwedel)
Zentrifuge (Centrifuge 5415D)	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge (Megafuge 3.0 R)	Heraeus (Osterode)
Zentrifuge (Multifuge 1 S-R)	Heraeus (Osterode)
Zentrifuge (Sorvall RC5B)	DuPont (Wilmington, DE)

3.1.2 ÄKTA-System

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich das System ÄKTApurifier™ 10 der Firma GE Healthcare (München) verwendet. Vor Anschaffung des Geräts 2007 wurde das System ÄKTAprime™ plus genutzt.

Folgende Affinitätssäulen fanden zur Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine Anwendung:

- HiTrap Chelating HP Ni²⁺, 5 ml Säulenvolumen
- HiTrap Chelating HP Zn²⁺, 5 ml Säulenvolumen

Für die analytische Gelchromatographie wurde folgende Säule eingesetzt:

- Superdex 200 10/300 GL, 24 ml Säulenvolumen

3.1.3 Mikroskop

Für die Auswertung der Immunfluoreszenztests (IFTs) wurde folgendes Mikroskop verwendet:

- Zeiss Axioplan (Carl Zeiss, Oberkochen)

Objektiv	Plan-Neofluar 100x/1,3 Öl
Software	Spot Software 4.6 (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, USA)

3.1.4 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Bechergläser	Schott (Mainz)
Deckgläser	Assistent, Karl-Hecht AG (Sondheim)
Erlenmeyerkolben	Schott (Mainz)
Kanülen	Braun (Melsungen)
Kryokonserven	Mast Diagnostika (Reinfeld)
Messzylinder	Roth (Karlsruhe)
Mikrotiterplatten	Greiner (Frickenhausen)
Objektträger	Assistent, Karl-Hecht AG (Sondheim)
Parafilm	Pechiney (Menasha, USA)
Petrischalen	Nunc/Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Pinzetten	Hartenstein (Würzburg)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nürnberg)
Plastikpipetten	Becton Dickinson (Heidelberg)
Quarzküvette (Schichtdicke 10 mm, Zentrum 8,5 mm)	Hellma (Mülheim)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Röntgenfilm	Fuji Film (Düsseldorf)
Schottflaschen	Hassa Laborbedarf (Hamburg)
Skalpell	Braun (Melsungen)
Spritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun (Melsungen)

Sterilfilter (0,22 μm , 0,45 μm)	Sarstedt (Nürnberg)
Steritops	Millipore (Billerica, MA)
Zellschaber	Sarstedt (Nürnberg)
Zentrifugenfilter (Amicon Ultra-15)	Millipore (Billerica, MA)

3.1.5 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Azeton	Merck (Darmstadt)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Arabinose	Invitrogen (Karlsruhe)
Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	J.T. Baker (Deventer, NL)
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Glukose	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Immersionsöl	Zeiss (Oberkochen)
Isopropanol (2-Propanol)	Merck (Darmstadt)
Kälberserumalbumin (BSA)	Serva (Heidelberg)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck (Darmstadt)
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Merck (Darmstadt)
Kristallviolett	Medion Diagnostics (Darmstadt)
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Mowiol	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Natriumchlorid (NaCl)	J.T Baker (Deventer, NL)
Natriumcitrat	Merck (Darmstadt)

Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth (Karlsruhe)
Nickelchlorid (NiCl ₂)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Raffinose	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
Trichloressigsäure	Fluka (Neu-Ulm)
Trihydroxyaminomethan (Tris)	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Merck (Darmstadt)
X-Gal	Fermentas (St. Leon-Rot)
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

3.1.6 Antibiotika

Alle Antibiotika wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) bezogen.

Antibiotikum	Abkürzung	Lösungsmittel	Finale Konzentration [µg/ml]
Ampicillin	Amp	Methanol	100
Chloramphenicol	Cm	Methanol	10
Erythromycin	Ery	Methanol	2,5
Kanamycin	Kan	Methanol	10

3.1.7 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt a. M.) bezogen.

Restriktionsendonuklease	Schnittstelle
AatII	GACGT/C
AvaI	C/YCGRG
BamHI	G/GATCC
EcoRI	G/AATTC
HindIII	A/AGCTT
SacI	GAGCT/C
XbaI	T/CTAGA

Des Weiteren wurden folgende Enzyme verwendet:

Enzym	Hersteller
Lysostaphin (1500 U/ml)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Shrimp Alkaline Phosphatase	USB (Cleveland, OH)
DyNAzyme™ DNA-Polymerase	Finnzyme (Espoo, FIN)
Phusion™ High-Fidelity Polymerase	Finnzyme (Espoo, FIN)
T4 DNA-Ligase	Roche (Basel, CH)
Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.8 Bakterien-Stämme

In dieser Arbeit wurden folgende Bakterien-Stämme verwendet:

Stamm	Charakteristika	Biofilm	Referenz
<i>E. coli</i> One Shot [®] TOP10	Wirt zur Klonierung von Vektoren		Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5 α [™]	Wirt zur Klonierung von Vektoren		(Carlsbad,
<i>E. coli</i> BL21-AI [™]	Wirt zur Expression von Proteinen		USA)
<i>S. aureus</i> RN4220	restriktionsdefizienter Stamm		(81)
<i>S. carnosus</i> TM300	Wirt zur Expression von Staphylokokken-Genen		
<i>S. epidermidis</i> 1457	Blutkulturisolat (UKE), <i>ica</i> -positiv	positiv	(82,83)
<i>S. epidermidis</i> 1457-M10	Tn917-Insertion in <i>icaA</i>	negativ	(83)
<i>S. epidermidis</i> 1457-M12	Tn917-Insertion in <i>purR</i>	negativ	(84,85)
<i>S. epidermidis</i> 1585	isoliert aus einer Portinfektion, <i>ica</i> -negativ, <i>aap</i> -negativ	negativ	(61)
<i>S. epidermidis</i> 1585-Ra	<i>ica</i> -negativ, <i>aap</i> -negativ, <i>embp</i> -positiv	positiv	(63)
<i>S. epidermidis</i> M135	Tn917-Insertion in <i>embp</i> , <i>ica</i> -negativ	negativ	(63)
<i>S. epidermidis</i> 5179	isoliert aus einer ventriculoatrialen Shuntinfektion, <i>ica</i> -negativ, <i>aap</i> -positiv, keine proteolytische Prozessierung von Aap	negativ	(65)
<i>S. epidermidis</i> 5179-R1	<i>ica</i> -negativ, <i>aap</i> -positiv, Aap liegt in proteolytisch prozessierter Form vor	positiv	(65)

Des Weiteren wurden 70 *S. epidermidis* Stämme untersucht, die in der Zeit von 1988 bis 1990 im Rahmen der Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie (UKE) aus Blutkulturen, von zentralen Venenkathetern und Wundabstrichen isoliert wurden (61).

Für die Langzeitlagerung der Bakterien-Stämme bei -80 °C wurde das Stammhaltungssystem Cryobank[™] (Mast Diagnostica/Reinfeld) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für eine rasche Verfügbarkeit wurden die Stämme, gegebenenfalls unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika zur Selektion, auf Blutagarplatten ausplattiert, für 12-24 h bei 37 °C angezüchtet

und anschließend bei 4 °C gelagert.. Für bis zu viermal erfolgte alle 4 Wochen eine Subkultivierung auf frische Blutagarplatten, dann wurden frische Kulturen aufgetaut.

3.1.9 Plasmide

Plasmid	Resistenz- marker	Funktion	Referenz
pCR [®] 4-TOPO [®]	Amp Kan	Klonierungsvektor, <i>blue-white-screening</i> durch MSC in β -Galactosidase-Gen, <i>lac</i> -Promotor	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pENTR [™] /D-TOPO [®]	Kan	Eingangsvektor für TOPO [®] -Klonierungen, T7-Promotor	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pDEST [™] 17	Amp	Protein-Expressionsvektor in <i>E.coli</i> , N-terminaler 6 x HIS-Tag, T7-Promotor	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pBT2	Cm	<i>Shuttle</i> Vektor für Inaktivierung chromosomaler Gene, Temperatur-sensitiv, <i>vegII</i> -Promotor	Brückner (86)
pRB474	Cm	Expressionsvektor in <i>E. coli</i> und Staphylokokken, <i>vegII</i> -Promotor	Brückner (86)
pDEST17 AaStrA	Amp	Überexpression von AaStrA	
pDEST17 DomB	Amp	Überexpression von Aap Domäne-B	
pBT2 5FEK3F	Cm Ery	Generierung einer AaStrA <i>knock out</i> -Mutante	diese Arbeit
pRBaastra	Cm	Expression von AaStrA	diese Arbeit

3.1.10 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz / Schnittstellen	Funktion
Fward 10_30	5'-CACCCCTAATAACATCATTACTTGTT-3'	Amplifikation AaStrA-Fragment AF1
Rev 151_171	5'-TTATACACTCTTCATTGATTCGCC-3'	
Fward 101_131	5'-CACCCAGTACAACAATTAACAAAGGTGAT-3'	Amplifikation AaStrA-Fragment AF2
Rev 301_321	5'-TCAATTATACGTCATTGATACGCG-3'	
Fward 256_276	5'-CACCTTGTTAGTAACAGCTAACGGT-3'	Amplifikation AaStrA-Fragment AF3
Rev 401_420	5'-TTAATAGCCAAAGTTACCTGTAA-3'	
Fward 361_381	5'-CACCTTGGTCATAAAGCTATAAGT-3'	Amplifikation AaStrA-Fragment AF4
Rev 477_504	5'-TTAATTTAAGTCTATACGATATAACTTCACA-3'	
Aaprep5for 3424_3	5'-CACCATTCATTTCGACAAGAAACGTGAG-3'	Amplifikation eines Aap Single Repeats AaStrA
Aaprep5rev 3774_3	5'-TTACGTTGATGTGATTGGATTACCAACTTTC-3'	
5'Astra_for	5'- GAATT CTATCCTGTCGTA CTCGTGCA -3'	<i>knock out:</i> Amplifikation Genabschnitt 5' vor AaStrA-Gen AaStrA
5'Astra_rev	5'- TCTAGA ATATAT GAGCT CATATAT GACGTCTCAC TCCTTTGATTCTTTATG-3' XbaI SacI AatII	
3'Astra_for	5'- GAGCT CAAAGATAAAAATGTGAAGTTATATCG-3' SacI	<i>knock out:</i> Amplifikation Genabschnitt 3' vor AaStrA-Gen AaStrA
3'Astra_rev	5'- TCTAGAGT ACGTGCAGATAAACGTATCG-3' XbaI	
erm_for	5'- GAGCT CAGAGTGATTGGTCTTGCGT-3' SacI	Amplifikation Ery-Resistenzkassette
erm_rev	5'- GACGT CGGTACCATTCAAATTTATCCTTA-3' AatII	

Alle Oligonukleotide wurden in der AG Rohde generiert und von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

3.1.11 Antikörper

Antikörper	Hersteller
AlexaFluor 488 goat anti-rabbit	Invitrogen (Karlsruhe)
anti-rDomäne-B (rabbit)	UKE (Hamburg)
anti-rAaStrA (rabbit)	UKE (Hamburg)
anti-rabbit IgG alkaline phosphatase (goat)	Sigma (München)
anti- <i>S. epidermidis</i> (rabbit)	UKE (Hamburg)
Immuno Pure [®] streptavidin-horseradish peroxidase conjugate	Thermo Scientific (Bonn)
Peroxidase-conjugated AffiniPure donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Dianova (Hamburg)

3.1.12 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (Mannheim)
DC Protein Assay (Lowry-Assay)	BioRad (München)
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (München)
EZ-Link [®] Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit	Pierce (Rockford, IL)
GenElute [™] Five Minute Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
In-Fusion [™] 2.0 Dry-Down PCR Cloning Kit	Clontech (Mountain View, CA)
InstaGene [™] Matrix	BioRad (München)
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel (Düren)
pENTR [™] /D-TOPO [®] Cloning Kit	Invitrogen (München)
Protein Assay (Bradford-Assay)	BioRad (München)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
SilverSNAP [®] Stain For Mass Spectrometry	Pierce (Rockford, IL)
TOPO TA Cloning [®] Kit For Sequencing	Invitrogen (München)
Western Blue [®]	Promega (Madison, WI)

3.1.13 Molekulargewichtstandards (Marker)

Für DNS-Agarosegele bzw. für die SDS-PAGE wurden folgende Größenstandards verwendet:

- λ DNA-HindIII/ Φ X174-HaeIII (Finnzymes, Espoo, FIN)
- Precision Plus Protein™ Standard All Blue (BioRad, München)
- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)

3.1.14 Medien

Alle Medien wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit ddH₂O angesetzt und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert.

Für Agarplatten wurde dem entsprechenden Medium zuvor 14 g/l Bacto®-Agar (BD, Becton Dickinson, Cockseyville, MD, USA) zugesetzt.

Für Softagar wurde dem Medium 7 g/l Bacto®-Agar hinzugefügt..

3.1.14.1 Bakterienanzucht

LB-Medium	10 g/l Trypton (BD)
pH 7,0	5 g/l Hefeextrakt (BD)
	10 g/l NaCl

BHI-Brühe	37 g/l BHI (BD)
<i>(brain heart infusion)</i>	
pH 7,4	

TSB-Medium	30 g/l TSB (BD)
<i>(trypticase soy broth)</i>	
pH 7,3	

B2-Brühe	10 g/l	Caseinhydrolysat
	25 g/l	Hefeextrakt (BD)
	1 g/l	K ₂ HPO ₄
	5 g/l	Glukose
	25 g/l	NaCl

3.1.14.2 Phagengewinnung, -titration und -transduktion

NB2+ Brühe	20 g/l	Nutrient Broth No. 2 (Oxoid)
	0,4 g/l	CaCl ₂

ST-Agar (<i>staphylococcus typing agar</i>)	20 g/l	Nutrient Broth No. 2 (Oxoid)
	0,4 g/l	CaCl ₂
	5 g/l	NaCl
	12 g/l	Bacto [®] -Agar (BD)
	für Softagar:	7 g/l

3.1.14.3 Protoplastentransformation

B-Brühe pH7,4	10 g/l	Pepton (BD)
	5 g/l	Hefeextrakt (BD)
	5 g/l	NaCl
	1 g/l	Glukose
	1 g/l	K ₂ HPO ₄

Difco Antibiotic Medium No. 3	70 g/l	Difco Antibiotic Medium No. 3 (BD)
--------------------------------------	--------	------------------------------------

DM3-Agar	10 g	Bacto [®] -Agar (BD)
		in 250 ml ddH ₂ O
	135 g	Natriumsuccinat [1 M] (pH 7,3 mit Bernsteinsäure eingestellt) in 500 ml ddH ₂ O

5 g Caseinhydrolysat

5 g Hefeextrakt (BD)

in 100 ml ddH₂O

4,6 g K₂HPO₄*3H₂O

1,5 g KH₂PO₄

in 100 ml ddH₂O

20 ml MgCl₂ [1 M]

5 g Glukose

in 10 ml ddH₂O

sterilfiltriert

0,5 g BSA (*albumin bovine fraction V*, Serva)

in 10 ml ddH₂O

sterilfiltriert

Die Komponenten wurden in separaten, detergentienfreien Flaschen angesetzt, autoklaviert und bei einer Temperatur von 70 °C zusammengeführt.

CY-Softagar

25 g/l Caseinhydrolysat

25 g/l Hefeextrakt (BD)

14,75 g/l NaCl

10 g/l Bacto[®]-Agar (BD)

Der CY-Softagar wurde aufgekocht und in 25 ml-Aliquots autoklaviert. Vor dem Einsatz wurde er erneut durch Erhitzen verflüssigt, auf 50 °C abgekühlt, mit einem Volumen gleich temperierten, sterilen 1 M Natriumsuccinat (pH 7,3) und 4 ml Mix (s.u.) gemischt und bei Bedarf mit einem entsprechend verdünnten Antibiotikum versetzt.

3.1.15 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit ddH₂O angesetzt und ohne Autoklavieren verwendet.

3.1.15.1 Allgemein

PBS (20 x)	159,54 g/l	NaCl
<i>(phosphate buffered saline)</i>	3,95 g/l	KCl
pH 7,4	23,57 g/l	Na ₂ HPO ₄
	7,21 g/l	KH ₂ PO ₄
PBS-T		PBS
	0,05 % (v/v)	Tween-20

3.1.15.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNS-Ladepuffer	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylen Cyanol FF
	15 %	Ficoll
Ethidiumbromid	1 mg/ml	EtBr in ddH ₂ O
TBE-Puffer (5x)	60,75 g/l	Tris Base
	30,92 g/l	Borsäure
	7,44 g/l	EDTA

3.1.15.3 Protoplastentransformation

Fusogen	50 ml	SMM
pH 6,5	40 g	Polyethylenglycol (MW 6000) in 100 ml ddH ₂ O

Fusogen wurde zur Sterilisation 1 h im Wasserbad gekocht.

Mix	8 ml	MgCl ₂
	4 ml	Glukose [50 %]
	16 ml	Glycerolphosphat [1,5 M]
	8 ml	BSA [50 %]

Der Mix wurde aus seinen Komponenten frisch angesetzt.

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

SMM	1 M	Saccharose
pH 6,5	0,04 M	Maleinsäure
	0,04 M	MgCl ₂

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

SMMP	16 ml	SMM
pH 6,5	4 ml	Difco Antibiotic Medium No. 3 (BD)

Die Lösung wurde vor Gebrauch aus ihren Komponenten frisch angesetzt.

SMMP + BSA	20 ml	SMMP
	1 ml	BSA [5 %]

Die Lösung wurde vor Gebrauch aus ihren Komponenten frisch angesetzt.

3.1.15.4 Bakterienadhärenztest

Abstilllösung 0,1 M Glycin

Fixierlösung 4 % Paraformaldehyd in PBS
pH 7,5

Für die Fixierlösung wurden 4 g Paraformaldehyd in 80 ml PBS resuspendiert, 200 µl NaOH [5 M] zugegeben und auf einem Magnetrührer auf 60 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde pH 7,5 mit HCl eingestellt und das Volumen auf 100 ml mit PBS aufgefüllt.

Substratpuffer 0,1 M Glycin
pH 10,4 1 mM MgCl₂
1 mM ZnCl₂

Der Substratpuffer wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Substratlösung 1,45 mg/ml Phosphatase Substrat (Sigma 4744)
Substratpuffer

3.1.15.5 SDS-PAGE und Western Blot

NuPAGE® MES SDS-Puffer Invitrogen (Karlsruhe)
(20 x)
(SDS-PAGE)

NuPAGE® LDS-Puffer (4 x) Invitrogen (Karlsruhe)
(SDS-PAGE)

NuPAGE® Transferpuffer 500 mM Bicine
(20 x) 500 mM Bis-Tris
(Westernblot) 20 mM EDTA
pH 7,2 1 mM Chlorobutanol

3.1.15.6 Coomassie-Färbung

Färbelösung	50 % (v/v)	ddH ₂ O
	40 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,0025 % (v/v)	Coomassie Blue R-250

Entfärberlösung	50 % (v/v)	ddH ₂ O
	40 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

3.1.15.7 Stufenpräparation zellulärer Fraktionen

Sc-Lysepuffer pH 7,5	30 % (v/v)	Raffinose
	20 mM	Tris-HCl
	20 mM	MgCl ₂

3.1.15.8 Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine

HIS Binding Buffer pH 7,4	500 mM	NaCl
	20 mM	Natriumphosphatpuffer pH 7,4 [0,1 M]
	40 mM	Imidazol

HIS Elution Buffer pH 7,4	500 mM	NaCl
	20 mM	Natriumphosphatpuffer pH 7,4 [0,1 M]
	250 mM	Imidazol

3.1.15.9 Strippen und Wiederbeladen von HiTrap Chelating Säulen

Stripping Buffer	20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 [0,1 M]
	0,5 M NaCl
	50 mM EDTA

3.1.15.10 ELISA

Substratpuffer	0,1 M Glycin
pH 10,4	1 mM MgCl ₂
	1 mM ZnCl ₂

Der Substratpuffer wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Substratlösung	1,45 mg/ml Phosphatase Substrat (Sigma 4744)
	Substratpuffer

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Präparation chromosomaler DNS aus Staphylokokken

Die Präparation von chromosomaler DNS erfolgte direkt von mit dem gewünschten Stamm beimpften Agarplatten mit Hilfe des InstaGene™ Matrix Kits (BioRad, München). Da sich durch dieses Verfahren die Zellwände von Staphylokokken nicht aufschließen lassen, wurde ein weiterer Lyseschritt durchgeführt. Zusätzlich zu dem Lysepuffer wurden 5 µl Lysostaphin (1500 U/ml) hinzugefügt. Die Suspension wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.1.2 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNS erfolgte aus 2 ml einer Bakterienübernachtskultur in dem entsprechenden Medium unter Verwendung des GenElute™ Five Minute Plasmid Miniprep Kits (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen, gefolgt von einer Denaturierung und Präzipitation der chromosomalen DNS sowie der Proteine, wobei die Plasmid-DNS in Lösung verbleibt (87). Anschließend wurde die DNS in salzarmem Puffer eluiert. Da sich durch das hier beschriebene Verfahren die Zellwände von Staphylokokken nicht aufschließen lassen, wurde ein weiterer Lyseschritt hinzugefügt. Zusätzlich zu dem Lysepuffer wurden 5 µl Lysostaphin 1500 U/ml hinzugefügt. Die Suspension wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese wird zur Auftrennung von z.B. DNS-Fragmenten oder Plasmiden anhand ihrer Größe verwendet. Die Elektrophorese ist ein Verfahren, bei dem geladene Moleküle in einem elektrischen Feld wandern, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit sowohl von Größe und Form der Moleküle, als auch von ihrer

Ladung abhängt. Die negativ geladene DNS wandert im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode, die gegenüber der Geltaschen liegt. Kleine Fragmente wandern hierbei schneller als große. Aufgetragen werden die Proben auf ein Agarosegel, das ein komplexes Fasernetzwerk darstellt. Die Porengröße des Gels kann durch die Agarosekonzentration auf die Größe der aufzutrennenden Fragmente abgestimmt werden. Je kleiner das zu analysierende Fragment ist, desto feinmaschiger sollte das Gel sein, bzw. desto höher muss die Agarosekonzentration gewählt werden.

Für diese Arbeit wurden Agarosegele zwischen 0,5 % (DNS-Fragmente 2-30 kb) und 2 % (DNS-Fragmente bis 100 kb) in 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Die zu analysierenden DNA- oder PCR-Ansätze wurden vor dem Auftragen mit 6x Ladungspuffer versetzt. Parallel hierzu wurde zur Bestimmung der Fragmentgröße der Proben ein DNS-Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in den dafür vorgesehenen Kammern bei 80 bis 120 V. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Die Laufzeit war von der Größe der Proben und der Dichte des Agarosegels abhängig. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad (1 mg/ml) angefärbt und konnte anschließend mit Hilfe des UV-Transilluminators betrachtet und dokumentiert werden.

3.2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*)

Bei der Polymerasekettenreaktion handelt es sich um eine Methode zur automatisierten und enzymatischen *in vitro*-Amplifikation eines definierten DNS-Bereichs. Für die PCR ist erforderlich, dass die Nukleotidsequenz eines Teils des gewünschten Gens bzw. DNS-Abschnitts bekannt ist, um kurze Oligonukleotide (Primer) für die komplementären Sequenzen herzustellen. Der PCR liegt folgender Mechanismus zu Grunde: Die Ziel-DNS wird mittels Hitze denaturiert, d.h. in Einzelstränge aufgetrennt, und hitzestabile DNS-Polymerase, freie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) sowie ein Überschuss zweier inverser Primer werden zugefügt. Nach der Primer-Assoziation an die komplementären Sequenzen der Ziel-DNS liefert die Elongation des Primers durch die DNS-Polymerase eine Kopie der ursprünglichen doppelsträngigen DNS.

Ein typischer PCR-Ansatz, wie er in dieser Arbeit verwendet wurde, ist in Tab. 1 dargestellt. Für reine Kontrollen wurde eine Taq-Polymerase (DyNAzyme, Finnzyme, Espoo, FIN) verwendet. Wurden die PCR-Fragmente jedoch für Klonierungen oder Sequenzierungen benötigt, wurde eine Phusion-Polymerase (Phusion High-Fidelity, Finnzymes, Espoo, FIN)

verwendet, die durch eine *proofreading* Aktivität dafür sorgt, dass weniger fehlerhafte DNS-Sequenzen entstehen.

Tab. 1: Zusammensetzung eines 50 µl-PCR-Ansatzes. A Ansatz mit Taq-Polymerase. B Ansatz mit Phusion-Polymerase.

A		B	
0,5 – 1 µl	DNS	0,5 – 1 µl	DNS
5 µl	F-511 Puffer (10 x)	10 µl	Phusion HF Puffer (5 x)
1 µl	dNTP-Mix (10 mM)	1 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1,5 µl	5`Primer (10 pmol/ml)	1,5 µl	5`Primer (10 pmol/ml)
1,5 µl	3`Primer (10 pmol/ml)	1,5 µl	3`Primer (10 pmol/ml)
0,5 – 1 µl	Taq-Polymerase	0,5 – 1 µl	Phusion-Polymerase
40 – 39 µl	ddH ₂ O	35 – 34 µl	ddH ₂ O

Nach dem Mixen der Komponenten auf Eis, wurden die Reaktionsgefäße im Thermocycler platziert. Die Amplifikation erfolgte mit einem Programm, wie es in Tab. 2 dargestellt ist. Die Temperatur für die Primer-Hybridisierung (*annealing*) war abhängig von dem verwendeten Primer-Paar. Die Zeit für den Elongationsschritt hing von der Größe des zu amplifizierenden Fragments ab.

Tab. 2: PCR-Programme unter Verwendung der Taq- bzw. der Phusion-Polymerase. (*) Die *Annealing*-Temperatur richtet sich nach den verwendeten Primern.

	Taq-Polymerase		Phusion-Polymerase		
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	98 °C	2 min	30 Zyklen
Denaturierung	94 °C	45 sek	98 °C	20 sek	
Primer-Hybridisierung	(*) °C	45 sek	(*) °C	20 sek	
Elongation	72 °C	1 min	72 °C	40 sek	
Finaler Syntheseschritt	72 °C	5 min	72 °C	5 min	
Schluss-Inkubation	4 °C		unendlich		

Nach erfolgter PCR wurden 10 µl des Reaktionsansatzes entnommen und mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

3.2.1.5 Restriktionsverdau

DNS-Restriktionsenzyme erkennen spezifische palindromische Sequenzen innerhalb eines DNS-Moleküls und schneiden sie durch die Hydrolyse zweier Phosphodiester-Bindungen. Dadurch entstehen entweder „klebrige“ (*sticky ends*, 5`-und 3`-Überhänge) oder glatte (*blunt ends*, keine 5`-und 3`-Überhänge).

Plasmid-DNS wurde aus *E. coli* oder Staphylokokken extrahiert und einer Spaltung mit Restriktionsenzymen unterzogen. Ein typischer Restriktionsansatz wird in Tab. 3 dargestellt. Dabei wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet, der je nach Bedarf mit BSA (100 µg/ml) versetzt wurde. Nach dem Mixen des Ansatzes erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 2 h oder über Nacht.

Tab. 3: 20 µl-Restriktionsansatz.

5 µl	DNS
1 µl	Enzym
2 µl	Puffer
10 µl	ddH ₂ O

Anschließend wurden die Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

3.2.1.6 Extraktion von DNS aus Agarosegelen

Nach Spaltung der DNS mit Restriktionsenzymen und Auftrennung der Fragmente in einem Agarosegel wurde die dem gewünschten Fragment entsprechende Bande unter UV-Licht-Kontrolle mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion des DNS-Fragments aus dem Agarosewürfel erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin Extract II Kits (Macherey & Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers.

Die Reinheit und Menge des aufgereinigten Fragments wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

3.2.1.7 DNS-Sequenzierung

Die DNS-Sequenzanalyse wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt.

3.2.1.8 DNS-Ligation

DNS-Ligasen sind Enzyme, die zwei DNS-Stränge über eine Phosphodiester-Bindung miteinander verbinden (ligieren).

Um die Vektor-DNS mit dem gewünschten DNS-Insert zu ligieren, müssen beide zuerst mit demselben Restriktionsenzym verdaut werden. Die Ligationsreaktion wurde mit der T4-DNS-Ligase (Roche, Basel, CH) über Nacht bei 16 °C durchgeführt. Ein typischer Ligationsansatz ist in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Ligationsansatz

1 µl	Vektor-DNS
3 µl	Insert-DNS
1 µl	Ligasepuffer (10 x)
1 µl	T4-DNS-Ligase
4 µl	ddH ₂ O

Nach der Ligation wurden 1-5 µl des Reaktionsansatzes direkt für die Transformation von Bakterienzellen verwendet.

3.2.1.9 Klonierung

Die Klonierung von PCR-Amplifikaten erfolgte mit Hilfe des TOPO[®] TA Cloning Kits (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers. Ein typischer Reaktionsansatz ist in Tab. 5 Dargestellt. Der im Kit enthaltene, bereits linearisierte Vektor pCR[®]4-TOPO[®] bzw. pENTR[™]/D-TOPO[®] besitzt beidseitig 3'-Desoxythymidin-Überhänge. Mit Hilfe der kovalent an den Vektor gebundenen Topoisomerase I wurden Vektor und Amplifikate ligiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Da die *multiple*

cloning site des Vektors pCR[®]4-TOPO[®] in einem *lacZ*-Gen liegt, konnten Klone mit einer erfolgreichen Insertion anhand eines *blue-white screenings* (88) identifiziert werden.

Tab. 5: Klonierungsansatz

1 μ l	Vektor-DNS
1-4 μ l	PCR-Amplifikat
1 μ l	Salzlösung
ad 5 μ l	ddH ₂ O

Um AaStrA bzw. dessen Fragmente in dem Expressionsstamm *E. coli* BL21-AI exprimieren zu können, wurden mit Hilfe des Gateway[®]-Systems der Firma Invitrogen (Karlsruhe) weitere Klonierungsschritte durchgeführt, die auf sequenzspezifischen DNS-Rekombinationen beruhen, die durch spezifische Rekombinasen katalysiert werden.

3.2.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.2.1 Chemische Transformation

Herstellung chemisch kompetenter Bakterien:

Für die Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21-AI bzw. *E. coli* TOP10 beimpft und bei 37 °C, 200 Upm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit 2 ml Vorkultur beimpft und bei 37 °C, 200 Upm inkubiert, bis die OD_{600nm} 0,5 betrug. Die Suspension wurde bei 4°C und 5500 Upm für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 25 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min, 4000 Upm bei 4 °C. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml eiskaltem Glycerinpuffer (0,1 M CaCl₂ / 20 % Glycerin in ddH₂O) resuspendiert, auf 100 μ l-Aliquots aufgeteilt und entweder sofort für die Transformation verwendet oder bei -80 °C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Chemische Transformation:

Für die chemische Transformation wurden entweder gekaufte *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21-AI bzw. *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe) oder selbst hergestellte chemisch kompetente Zellen verwendet.

Zu 50 µl Bakterienzellen wurden 2 µl des jeweiligen Klonierungsansatzes bzw. 5-10 ng DNS gegeben, durch vorsichtiges Invertieren miteinander vermischt und für 5-30 min auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden Hitzeschock bei 41 °C für 30 Sekunden wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 250-450 µl zimmerwarmen SOC-Medium (Invitrogen, München) wurden die Reagenzgefäße fest verschlossen und für 1 h, 200 Upm und 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 10, 20, 50 und 100 µl der Transformationsansätze auf den entsprechenden Selektivmedien ausplattiert und bei 37 °C für 24-72 h inkubiert.

3.2.2.2 Transformation durch Elektroporation

Herstellung elektrokompetenter *S. carnosus*:

Für die Vorkultur wurden 5 ml B2-Brühe mit einer Kolonie *S. carnosus* TM300 beimpft und bei 37 °C, 200 Upm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml B2-Brühe mit 2 ml Vorkultur beimpft und bei 37 °C, 200 Upm inkubiert, bis die OD_{600nm} 0,6 betrug. Um weiteres Zellwachstum zu verhindern, wurden alle nachfolgenden Schritte auf Eis bzw. mit vorgekühlten Gefäßen und Lösungen durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben erfolgten alle Zentrifugationsschritte für 15 min bei 4 °C und 4300 Upm.

Für die Zellernte wurde die Bakteriensuspension in zwei Falcon-Röhrchen überführt und für 15 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde das Medium abzentrifugiert. Um alle Salzurückstände zu entfernen, wurden die Zellen durch zweimaliges Resuspendieren und Zentrifugieren in 50 ml ddH₂O gewaschen. Dann wurden die Pellets vorsichtig in je 25 ml ddH₂O resuspendiert und in einem Falcon-Röhrchen vereint. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet zuerst in 10 ml kaltem 10 % Glycerin resuspendiert und abzentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 2,5 ml kaltem 10 % Glycerin wurde erneut zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet vorsichtig in 1 ml kaltem 10 % Glycerin aufgenommen und vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in 100 µl-Aliquots aufgeteilt, die direkt für die Elektroporation verwendet wurden.

Elektroporation:

Für die Elektroporation wurden entweder frische elektrokompetente Zellen oder auf Eis aufgetaute Aliquots eingesetzt und mit 0,5-10 µl eines Plasmids versetzt. Diese Mischung wurde blasenfrei in den Spalt einer vorgekühlten 0,1 cm *gap* Küvette (BioRad, München) eingefüllt. Die Elektroporation erfolgte bei 100 Ω, 2,1 kV und Raumtemperatur für etwa 2,3-2,5 ms. Die transformierten Zellen wurden anschließend in 400 µl vorgewärmter B2-Brühe aufgenommen und für 1 h bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt, um die Expression der plasmidkodierten Resistenzgene zu gewährleisten. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf LB-Agarplatten, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, ausplattiert. Transformanden erschienen in der Regel nach etwa 2 Tagen.

3.2.2.3 Protoplastentransformation (89)

Zur Transformation von *S. epidermidis* 1457-M12- bzw. *S. carnosus* TM300-Protoplasten wurde im Wesentlichen das Protokoll von Götz verwendet. Um sicherzustellen, dass sich keine Detergenzienreste in den verwendeten Gefäßen befanden, wurden alle Glasgeräte und Zentrifugenbecher vor Gebrauch gründlich mit entionisiertem Wasser und ddH₂O gespült und anschließend erneut autoklaviert.

Herstellung von Protoplasten:

Eine Kolonie M12 bzw. TM300 wurde in 15 ml B-Brühe eingerührt und bei 37 °C, 200 Upm über Nacht geschüttelt. Aus dieser Vorkultur wurden 2,5 ml in 800 ml B-Brühe überführt und für etwa 3 h inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von 0,5 wurden die Zellen geerntet. Um weiteres Zellwachstum zu verhindern, wurden alle nachfolgenden Schritte auf Eis und mit kalten Lösungen durchgeführt. Durch Zentrifugation bei 6232 x g und 4 °C für 15 min wurden die Zellen pelletiert und von Restmedium befreit. Das Pellet wurde in 100 ml SMMP+BSA resuspendiert und in 4 100 ml Erlenmeyerkolben aufgeteilt. Zur Lyse der Zellwände wurden die Kolben mit 10, 20, 40 und 80 µl Lysostaphin (1500 U/ml) versehen und für 16 h bei 30 °C im Wasserbad ohne Schütteln inkubiert. Die Protoplasten wurden anschließend durch Zentrifugation bei 2700 x g und 4 °C für 40 min geerntet und der Überstand verworfen. Die Protoplasten wurden in 2 ml SMMP ohne BSA durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert und in 300 µl-Aliquots in 10 ml Polystyrolröhrchen bei -80 °C gelagert.

Transformation von Protoplasten:

Zur Transformation wurden entweder frische Protoplasten oder bei Raumtemperatur aufgetaute Aliquots eingesetzt und mit 10-35 µl eines Plasmids versetzt. Die Fusion der Protoplasten mit dem Plasmid wurde durch Zugabe von 2 ml Fusogen ausgelöst. Die Suspension wurde vorsichtig durch Schwenken des Röhrchens gemischt, bis kaum noch Schlieren zu sehen waren. Nach 2 min wurde das Fusogen durch Zugabe von 7 ml SMMP ohne BSA verdünnt und dadurch die Fusion gestoppt. Die Protoplasten wurden bei Raumtemperatur für 20 min bei 6232 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml SMMP ohne BSA durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert und die Protoplasten unverdünnt auf DM3-Agar ausplattiert. Um die Expression der plasmidkodierten Gene zu gewährleisten, erfolgte ein Inkubationsschritt für 4 h bei 37 °C. Zur Selektion wurden die Bakterien dann mit 3 ml CY-Softagar mit 10 µg/ml Chloramphenicol überschichtet. Transformanten erschienen in der Regel nach etwa 48 h.

3.2.2.4 Phagentransduktion (85)

Bei der Phagentransduktion handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Gene und Plasmide mit Hilfe eines Bakteriophagen von einem Bakterium auf das nächste übertragen (transduziert) werden. In dieser Arbeit wurde hierfür der Phage AGC verwendet.

Herstellung eines plasmidtragenden Phagenlysates:

Eine Vorkultur des plasmidtragenden Bakterienstammes in NB2+ versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum (hier: 20 µg/ml Chloramphenicol) wurde 1:100 im gleichen Medium zur Hauptkultur verdünnt und bei 37 °C, 200 Upm inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 0,1-0,2 erreicht wurde. Anschließend wurden 500 µl der Bakteriensuspension mit 500 µl Phagensuspension und 3 ml auf 42 °C erwärmten STA-Softagar vermischt und dies zügig auf vorbereitete STA-Platten verteilt. Es folgte eine Inkubation für 24 h bei 30 °C.

Um die Phagen aus dem Softagar zu extrahieren, wurden 3,5 ml NB2+-Brühe dazugegeben und die Softagarschicht mit einem sterilen Glasspatel zerkleinert. Nach dem Überführen in ein 50 ml Falcon-Röhrchen wurde die Suspension für 10 Sekunden 40 % Amplitude sonifiziert und der Agar durch Zentrifugation bei 5000 Upm für 45 min bei 4 °C von dem Phagenlysat abgetrennt. Um eventuelle Agarreste zu entfernen, wurde der Überstand in ein neues Falcon-

Röhrchen gegeben und erneut bei 5000 Upm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene Phagenlysats wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Plaquetitration:

Um die Phagenkonzentration eines Lysats zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Hierzu kultivierte man den Empfängerstamm, wie für die Herstellung eines Phagenlysats beschrieben, und inkubierte ihn in gleicher Weise mit dem in Stufen von 10^{-3} - 10^{-9} in NB2+ verdünnten plasmidtragenden Phagenlysats auf STA-Platten für 24 h bei 30 °C. 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_{600nm} von 11 in NB2+-Brühe suspendiert. Von der Bakteriensuspension wurde 1 ml mit dem gleichen Volumen des plasmidtragenden Phagenlysats vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von 40 µl 1 M Natriumcitrat wurde die Absorption der Phagen gestoppt. Das Medium wurde bei 5000 Upm für 15 min und 4 °C abzentrifugiert, das Zellpellet zweimal mit 2 ml BHI-Medium versetzt mit 20 mM Natriumcitrat gewaschen und in 3 ml des gleichen Mediums resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C in einem Schüttelinkubator. Die Suspension wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum (hier: 20 µg/ml Chloramphenicol) und 3 ml BHI-Softagar vermischt und auf BHI-Agarplatten versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum (hier: 20 µg/ml Chloramphenicol) verteilt. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert. Transduktanden wurden in der Regel nach 24-48 h isoliert.

3.2.2.5 Homologe Rekombination

Die homologe Rekombination wurde in dieser Arbeit zur Generation einer AaStrA *knock out*-Mutante verwendet, d.h. es sollte gezielt über homologe DNS-Sequenzen das AaStrA-codierende Gen durch eine Erythromycin-Kassette ersetzt werden. Hierzu wurde über Phagentransduktion das Plasmid pBT2 5FEK3F in die *S. epidermidis* Stämme 1585 und 1457 eingebracht. Der verwendete Vektor liegt bei 30 °C stabil in der Bakterienzelle vor. Bei höheren Temperaturen jedoch wird er instabil und aus der Zelle entfernt.

Für die Vorkultur wurde ein durch Phagentransduktion erhaltener Bakterienklon in 10 ml B-Medium mit 2,5 µg/ml Erythromycin resuspendiert und für 8 h bei 30 °C, 200 Upm inkubiert. Da es sich bei der homologen Rekombination um einen vollkommen natürlichen und zufälligen Mechanismus handelt, der von außen nicht direkt gesteuert werden kann, mussten die Bakterien dazu „animiert“ werden. Durch Zugabe des Antibiotikums Erythromycin bei 30 °C wurden sie unter Selektionsstress gesetzt. Dies sollte bewirken, dass es zur Paarung und zum sogenannten *crossing-over* der homologen Genabschnitte kommt (90). Für die Hauptkultur wurde die Vorkultur 1:100 in 500 ml B-Medium mit 2,5 µg/ml Erythromycin verdünnt und für 24 h bei 45 °C, 200 Upm inkubiert. Durch die Erhöhung der Temperatur auf bis zu 45°C sollte ein Ausschalten des *aastra*-Gens durch den Einbau der Erythromycin-Kassette und die Entfernung des Vektors pBT2 aus dem Genom erreicht werden. Dann wurde die Hauptkultur erneut 1:100 in 500 ml B-Medium mit 2,5 µg/ml Erythromycin verdünnt und für 8 h bei 45 °C, 200 Upm inkubiert. Für die letzte Passage wurde die Kultur 1:100 in 500 ml B-Medium mit 2,5 µg/ml Erythromycin verdünnt und für 24 h bei 45 °C, 200 Upm inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese Kultur je nach Kulturstärke in den Verdünnungsstufen 1:1-1:1000 sowohl auf BHI-Agar + 2,5 µg/ml Erythromycin als auch auf BHI-Agar + 2,5 µg/ml Erythromycin + 10 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert und bei 45 °C inkubiert. Die nach 24-48 h auf BHI + 2,5 µg/ml Erythromycin gewachsenen Klone wurden zur Kontrolle sowohl auf BHI + 2,5 µg/ml Erythromycin als auch auf BHI + 2,5 µg/ml Erythromycin + 10 µg/ml Chloramphenicol ausgestrichen und bei 45 °C inkubiert. Klone, die nur auf BHI + Erythromycin gewachsen sind, wurden erneut auf beide Selektionsplatten gepickt und bei 37 °C inkubiert.

Neben dieser Methode wurden weitere Ansätze nach Fitzgerald (91) und Brückner und Jäger durchgeführt.

3.2.2.6 Antibiogramm

Die Resistenzmuster der verwendeten Stämme wurden in regelmäßigen Abständen mit Hilfe eines Antibiogramms bestimmt. Bei dieser Methode werden Filterblättchen, die mit Antibiotika getränkt sind, auf eine Müller-Hinton-Platte (Oxoid) aufgelegt, welche gleichmäßig über die ganze Fläche mit dem zu testenden Keim beimpft ist. Diese Platte wird 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. Der Test wurde für folgende Antibiotika durchgeführt: Penicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Tetracyclin, Gentamycin und Ciprofloxacin.

3.2.2.7 Biofilmassay

Die Fähigkeit von *S. epidermidis* Stämmen zur Biofilmbildung wurde mittels eines semiquantitativen Biofilmtests untersucht (92). Als Positivkontrolle diente der biofilmpositive *S. epidermidis* 1457, als Negativkontrolle der biofilmnegative *S. epidermidis* 1457-M10. Für den Biofilmtest wurde eine Einzelkolonie in 2 ml TSB suspendiert und für 6 h bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Für die Untersuchung von plasmidtragenden Stämmen wurde dem Medium zusätzlich das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Aus der Vorkultur wurde eine 1:100-Verdünnung im gleichen Medium hergestellt. Davon wurden je viermal 200 µl in die Kavitäten einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (NunclonΔ, Nunc, Roskilde, DK) gegeben und für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgegossen und die Platte dreimal mit 200 µl PBS je Kavität gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Die anheftenden Bakterien wurden mit 50 µl Kristallviolett pro Kavität für 5 min gefärbt. Die Färbelösung wurde unter fließendem Wasser vorsichtig ausgespült und nach erneutem Trocknen die Absorption im ELISA Reader Tecan Infinite M 200 (Tecan, Crailsheim) bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm bestimmt. Der Biofilm-Phänotyp wurde durch die Bildung des Mittelwertes der gemessenen Kavitäten beurteilt. Hierbei galt ein Grenzwert (*cut off*) von A_{570} von 0,1 als Trennpunkt zwischen biofilmpositiven und -negativen Phänotyp.

3.2.2.8 Immunfluoreszenztest (IFT)

Eine Übernachtskultur wurde 1:100 in 2 ml TSB verdünnt und für 6 h bei 37 °C, 200 Upm inkubiert. Dann wurde das Medium abzentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und eine OD_{600nm} von 0,2 eingestellt. Auf einen Objektträger für Immunfluoreszenz (bioMérieux, Marcy l'Etoile, F) wurden pro Spot 20 µl Bakteriensuspension gegeben und getrocknet. Nach einer 2-minütigen Fixierung der Zellen in eiskaltem Aceton wurde der

Objektträger getrocknet und konnte, wenn er nicht sofort weiter verwendet wurde, bei 4 °C gelagert werden. Der Erstantikörper wurde entsprechend in PBS-T verdünnt, 20 µl davon auf die mit Zellen beschichteten Spots gegeben und für 1 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde dreimal für 2 min mit PBS gewaschen. Der zweite, fluoreszenzmarkierte Antikörper AlexaFluor 488 [1:500] wurde ebenfalls in PBS-T verdünnt, 20 µl davon auf die Spots gegeben und für 1 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für je 2 min in PBS und einmal in ddH₂O. Nach dem Trocknen wurde der Objektträger mit Mowiol eingedeckelt.

3.2.2.9 Bakterienadhärenztest nach dem ELISA-Prinzip

Mit Hilfe dieser Methode kann die Interaktion intakter Bakterienzellen mit einem bestimmten Antigen, z.B. einem Protein, nachgewiesen werden. Dazu wurden in dieser Arbeit Mikrotiterplatten mit den als Interaktionspartner in Frage kommenden Proteinen beschichtet und anschließend mit verschiedenen Staphylokokken-Stämmen inkubiert. Mit einem gegen Staphylokokken gerichteten Erstantikörper und einem Meerrettich-Peroxidase markierten Zweitantikörper konnte die Interaktion schließlich nachgewiesen werden.

Beschichten der Mikrotiterplatten:

Die Mikrotiterplatten wurden zuerst mit je 100 µl/Kavität einer definierten Protein-Lösung für ca. 24 h bei 4 °C inkubiert. Sofern nicht anders angegeben wurden die Platten zwischen den Inkubationsschritten dreimal mit je 200 µl PBS-T gewaschen. Um nicht-beschichtete Bereiche zu Blocken, wurden die Kavitäten mit je 100 µl proteinfreiem Blockpuffer (Thermo Scientific, Bonn) bei 4 °C für mindestens 1 h geblockt. Platten, die nicht direkt weiter verwendet wurden, konnten nach dem Blocken getrocknet und mit Parafilm verschlossen bei 4 °C gelagert werden.

Vorbereitung der Bakterienverdünnungen:

Der gewünschte Bakterienstamm wurde für die Vorkultur in 2 ml TSB bei 37 °C und 200 Upm über Nacht inkubiert. Für die Hauptkultur wurde die Vorkultur 1:100 in 30 ml TSB verdünnt und bei 37 °C und 200 Upm für 6 h inkubiert. Für die Zellernte wurde die Bakteriensuspension bei 5000 Upm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 30 ml PBS gewaschen und anschließend in 15 ml PBS resuspendiert. Eine

OD_{600nm} von 0,4 wurde eingestellt und eine Verdünnungsreihe in 1:2-Verdünnungsschritten in PBS hergestellt.

ELISA:

Je 100 µl der Bakterienverdünnungen wurde pro Kavität in die Platte pipettiert und diese für 1 h bei RT inkubiert. Gebundene Zellen wurden mit 100 µl Fixierlösung für 10 min bei RT fixiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen mit 200 µl Abstilllösung für 20 min bei 37 °C abgestillt. Dann wurde die Platte mit je 200 µl proteinfreiem Blockpuffer (Thermo Scientific, Bonn) bei RT für 1 h geblockt. Nicht unmittelbar weiter verwendete Platten konnten nach dem Blocken getrocknet und mit Parafilm verschlossen bei 4°C gelagert werden. Je 100 µl des gegen Staphylokokken gerichteten Erstantikörpers wurden in die Kavitäten gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Inkubation mit je 100 µl des Meerrettich-Peroxidase markierten Zweitantikörpers für 1 h bei 37 °C. Nach Zugabe von je 100 µl Substrat wurden die Platten bei 37 °C im Brutschrank belassen. Die Entwicklung der Enzym-Substrat-Reaktion wurde über einen Zeitraum von 3-4 h im 30 min-Rhythmus bei 405 nm und der Referenzwellenlänge 492 nm im ELISA Reader Tecan Infinite 200 (Tecan, Crailsheim) gemessen.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, *sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld aufgetrennt.

Vor der Auftrennung werden die Proteine durch Zugabe des Detergenz SDS denaturiert. Dies hat den Vorteil, dass nicht-kovalente Proteinaggregate aufgelöst werden und die Proteine sich im Gel annähernd proportional zu ihrer Größe bewegen. Dies rührt daher, dass das negativ geladene SDS sehr effizient an Proteine bindet und die Eigenladung des Proteins in der Regel vernachlässigbar wird, d.h. das Verhältnis von Ladung zu Größe ist für jedes Protein annähernd gleich. Dadurch lässt sich das Molekulargewicht eines unbekanntes Proteins durch den Vergleich mit einem Protein-Standard bestimmen.

Am häufigsten, wie auch in dieser Arbeit, wird das System nach Laemmli (93) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen, einem Trenngel (unten) und einem Sammelgel (oben), die sich beide im Hinblick auf den pH, die Ionenstärke und die Porengröße unterscheiden. Die Proben werden im Sammelgel zunächst konzentriert, bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden. Dieses führt zu schärferen Banden und erlaubt größere Probenvolumina als in Gelen ohne Sammelgel.

In dieser Arbeit wurden in der Regel 10 und 14 %-ige Trenngele gegossen, das Sammelgel war stets 4 %-ig. Die Geldicke betrug 1 mm. Die Proben wurden anstelle von SDS mit 4 x LDS-Probenpuffer (N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz, Invitrogen, Karlsruhe) versetzt, bei 90 °C für 10 min denaturiert und anschließend 24 µl des Gemisches auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese fand in der Regel bei 150 V für 45 min statt. Als Laufpuffer diente der NuPAGE® MES SDS Running Buffer (Invitrogen, Karlsruhe).

3.2.3.2 Coomassie-Färbung

Wurde ein SDS-Gel nach dem Lauf nicht für einen Western Blot benötigt, wurde es mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau R-250 angefärbt. Der Triphenylfarbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt die Proteine damit unspezifisch an (94). Diese Färbemethode kann zur semi-quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet werden. Die Nachweisgrenze liegt bei ungefähr 100 ng Protein pro Bande.

In dieser Arbeit wurde ein Gel für ca. 15 min mit Coomassie angefärbt. Um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde mehrmals mit einer Entfärberlösung und schließlich einmal mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde das Gel auf Filterpapier gebracht und im Gelrockner getrocknet.

3.2.3.3 Silber-Färbung

Die Silber-Färbung ist ein weiteres Verfahren zur Visualisierung von Proteinbanden in SDS-Gelen und wesentlich sensitiver als die Coomassie-Färbung. Die Nachweisgrenze liegt hier bei 0,1-1 ng Protein pro Bande. Diese Methode kann jedoch nur bedingt zur Quantifizierung von Proteinen eingesetzt werden, da das Silber (Ag) die in ihrer Zusammensetzung stark variierenden Proteine unterschiedlich stark anfärbt. Die chemische Reaktion ähnelt der in der

Fotografie verwendeten Reaktion: Nach der Fixierung in einer Essigsäure/Ethanol-Lösung wird das Polyacrylamid-Gel mit Silbernitrat behandelt. Die Ag^+ -Ionen binden an Proteine und werden durch die Zugabe von alkalischem Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert, das die Proteine im Gel schwarz färbt (95).

Für diese Arbeit wurde das Kit SilverSNAP[®] Stain For Mass Spectrometry (Pierce, Rockford, IL) verwendet und die Färbung nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf einem Filterpapier im Geltrockner getrocknet.

3.2.3.4 Präparation von Proteinen aus *S. epidermidis*

Methode 1:

Für die Extraktion von Proteinen wurden Bakterien unter den gewünschten Bedingungen kultiviert. Zur Zellernte wurden in der Regel 10 ml der Kulturen auf Eis entnommen und für 20 min bei 5000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen.

Um die Zellwände aufzuschließen, verdaute man das in 375 µl PBS resuspendierte Pellet mit 5µl Lysostaphin (1500U/ml) für 30 min bei 37 °C. Nach Zugabe von 125 µl 4 x LDS-Probenpuffer wurde der Ansatz für 10 min auf 90 °C erhitzt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei 13000 Upm und 4 °C, um Zelltrümmer zu beseitigen. Der Überstand konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

Methode 2:

Für die Präparation von Proteinen aus stationären Kulturen wurden Übernachtskulturen der zu untersuchenden *S. epidermidis* Stämme 1:100 in eine 20 ml Hauptkultur BHI und gegebenenfalls unter der Zugabe des entsprechenden Antibiotikums in Petrischalen verdünnt und bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst, die Kulturen in je einem Falcon-Röhrchen abzentrifugiert und einmalig mit je 20 ml PBS gewaschen. Nach dem Resuspendieren der Pellets in je 10 ml PBS wurde die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ aller Kulturen der niedrigsten OD angepasst. Von jeder Kultur wurden 10 ml entnommen und abzentrifugiert. Die Pellets wurden in je 250 µl 1 x LDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 90 °C aufgekocht und abzentrifugiert. Der Überstand konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

3.2.3.5 Stufenpräparation zellulärer Fraktionen

Mit Hilfe dieser Methode wurden Proteine aus dem Zellüberstand, der Zelloberfläche und dem Protoplasten gewonnen.

Für die Vorkultur wurde eine Bakterienkolonie in 2 ml TSB resuspendiert und für ca. 20 h bei 37 °C inkubiert. Diese wurde anschließend 1:100 in 100 ml TSB verdünnt und für 6 h bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde bei 3500 g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Das Zellpellet wurde in 10 ml Sc-Lysepuffer versetzt mit 200 µg/ml Lysostaphin vorsichtig resuspendiert und für 30 min in einem 37 °C-warmen Wasserbad inkubiert. Um die so präparierten Oberflächenproteine von den Bakterienprotoplasten zu trennen, wurde die Suspension für 15 min bei 6000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand und das Zellpellet wurden getrennt bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Um die Proteine aus den Überständen zu präparieren, wurde eine TCA-Fällung durchgeführt. Hierzu wurde den Überständen 5 % TCA (v/v) zugesetzt und für 30 min schwenkend auf Eis inkubiert. Bei 13000 g wurden die Proteine für 20 min bei 4 °C pelletiert, zweimal mit 2 ml eiskaltem Aceton gewaschen und anschließend getrocknet. Die fertig präparierten Proteine wurden dann in 0,5 M Tris-HCl (pH 8) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Für die Extraktion der Proteine aus den Protoplasten wurde das Pellet in 250-500 µl 1 x LDS-Probenpuffer resuspendiert und mit 10 µg/ml DNase versetzt. Nach einer Inkubation für mindestens eine halbe Stunde bei RT wurde der Ansatz für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend die Zelltrümmer für 20 min bei 6000 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.3.6 Expression rekombinanter Proteine

Vor die Vorkultur wurde in 20 ml LB-Medium versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin eine Kolonie des Stammes *E. coli* BL21-AI pDEST17 AaStrA bzw. *E. coli* BL21-AI pDEST17 DomB gelöst und über Nacht inkubiert. Alle Inkubationsschritte fanden bei 37 °C und 200 Upm statt.

Am nächsten Tag wurde die OD_{600nm} der Vorkultur bestimmt und so in 1 l LB-Medium versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin verdünnt, dass die End-OD_{600nm} 0,05 in der Hauptkultur betrug (i.d.R. 1:100). Die Kultur wurde im Schüttler inkubiert. Bei Erreichen der OD_{600nm} 0,4

wurde die Expression der Proteine mit 0,2% Arabinose (gelöst in ddH₂O) induziert und die Kultur für weitere 4 h im Schüttler belassen. Für die Zellernte wurde die Kultur auf große Zentrifugenbecher aufgeteilt und bei 4 °C und 6000 Upm für 20 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde entweder sofort für die Proteinaufreinigung weiterverarbeitet oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.3.7 **Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine über IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*) (96)**

Für die Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine wurde das Zellpellet einer 1 l-Expressionskultur (s.o.) in 50 ml Binding Buffer (50 µl/ml Hauptkultur) resuspendiert und auf 4 50 ml-Falkon-Röhrchen verteilt. Um die Proteine zu schonen und Enzymaktivitäten zu reprimieren fanden alle Schritte auf Eis statt. Um die Bakterienzellen aufzuschließen, wurden sie bei 65 % Mikrotip Amplitude für 1 min 20 sek geschallt. Dabei wurde ein Schallintervall von 10 sek Schall und 10 sek Pause gewählt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 20 min bei 4 °C und 6000 Upm. Die Überstände wurden in einem neuen Falcon-Röhrchen vereint und mit 0,2 µm Spritzenvorsatzfiltern sterilfiltriert. Bei Bedarf wurde mit einem 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter vorfiltriert.

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine fand über das ÄKTApurifier™-System (GE Healthcare, München) bei 4 °C mit einem jeweils für das betreffende Protein etablierten Programm statt.

Die Proteine wurden nach der IMAC-Methode aufgereinigt. Hierbei handelt es sich um eine Affinitätschromatographie über immobilisierte Metallionen (IMAC, *immobilized metal affinity chromatography*). Das Prinzip beruht auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen dem HIS-Tag des rekombinanten Proteins und den Ni²⁺- bzw. Zn²⁺-Ionen auf der Oberfläche der Säulenmatrix. Gibt man ein Proteingemisch auf die Säule, bindet der im Histidin enthaltene Imidazol-Ring an die Ionen der Matrix, während alle anderen, unerwünschten Proteine aus der Säule ausgespült werden (auch bezeichnet als *flow through*). Da z.B. auch Metalloproteasen oder andere histidinhaltige Proteine mit der Matrix interagieren, ist zu beachten, dass im verwendeten Bindepuffer eine geringe Menge Imidazol vorhanden ist, um diese Proteine, die keinen HIS-Tag besitzen, von der Säule zu spülen. Danach wird das gebundene Protein durch eine gezielte Veränderung der Pufferverhältnisse von der Säule eluiert. In dieser Arbeit wurde hierfür die Konzentration des im Puffer enthaltenen Imidazols

um das 5-fache erhöht. In dieser Konzentration konkurriert Imidazol mit dem HIS-Tag um die Ionen-Chelat-Bindungsstellen und verdrängt es schließlich.

Für die Aufreinigung der Aap rDomäne-B wurde eine 5 ml HiTrap Chelating Ni²⁺-Säule, für AaStrA eine 5 ml HiTrap Chelating Zn²⁺-Säule verwendet. Nach der Elution der Proteine von der Säule wurden die betreffenden Fraktionen vereinigt und über Amicon Ultra-15 Zentrifugenfilter (Millipore, Billerica, MA) aufkonzentriert und in PBS umgepuffert.

Die aufgereinigten Proteine wurden bei -80 °C in 1-5 ml Aliquots gelagert. Solange ein Aliquot in Verwendung war, wurde es bei 4 °C gelagert.

3.2.3.8 Strippen und Wiederbeladen von HiTrap Chelating Säulen

Durch die häufige Verwendung von HiTrap Chelating Säulen für die Proteinaufreinigung verbrauchen sich diese relativ schnell, d.h. die gebundenen Ionen werden nach und nach aus der Säule gespült, wodurch sich deren Bindekapazität drastisch verschlechtert.

Das Strippen und Wiederbeladen der HiTrap Chelating Säulen fand über das ÄKTApurifier™-System (GE Healthcar, München) bei 4 °C und einer Puffer-Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min (1 ml Säule) bzw. 5 ml/min (5 ml Säule) statt.

Zum Entfernen der in der Säule verbliebenen Ionen („stripfen“) wurde diese zuerst mit 5 Säulenvolumen (SV) ddH₂O gespült. Dann wurden 5-10 SV EDTA-haltiger Stripping Buffer über die Säule gegeben, bis anhand der Absorption und Leitfähigkeit ersichtlich war, dass keine weiteren Ionen mehr von der Säule gespült wurden. Es folgte ein Waschschrift mit je 5-10 SV Binding Buffer und ddH₂O. Um eventuelle Verunreinigungen aus der Säule zu entfernen wurde diese mit 2 SV 1 M NaOH beschickt und für 1-2 h bei 4 °C inkubiert. Dann wurde gründlich mit 10 SV Binding Buffer und 5-10 SV ddH₂O gespült. Zum Beladen der Säule mit „frischen“ Ionen wurde diese mit 0,5 SV 0,1 M NiSO₄ bzw. 0,1 M ZnCl₂ beladen und für 15 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschrift bei verminderter Puffer-Fließgeschwindigkeit mit je 5 SV ddH₂O und Binding Buffer. Für die Lagerung der Säule wurde diese abschließend mit 20 % Ethanol befüllt.

3.2.3.9 Bradford-Assay

Der Bradford-Assay ist eine der gebräuchlichsten kolorimetrischen Methoden zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Der Test beruht auf einer Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an die kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen in saurer Lösung. Durch diese Komplexbildung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (ungebundene, kationische, rote Form) auf 595 nm (unprotonierte, anionische, blaue Sulfonatform) verschoben. Häufig werden Standardproteine wie z.B. BSA zur Kalibrierung der Messungen verwendet. Bei der Messung eines Proteingemischs können jedoch je nach Zusammensetzung für gleiche Proteinmengen unterschiedliche Ergebnisse erhalten werden, weshalb der zwar sehr sensitive Assay hier ungenau ist (97).

In dieser Arbeit wurde das Protein Assay Kit von BioRad (München) nach dem Protokoll für die Messung in Küvetten nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.3.10 Lowry-Assay

Der Lowry-Assay stellt eine weitere kolorimetrische Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen dar. Der Test beruht auf zwei Reaktionen: Im ersten Schritt findet die Biuret-Reaktion statt, d.h. Cu^{2+} -Ionen bilden in alkalischer Lösung einen Komplex mit dem Protein und werden zu Cu^+ -Ionen reduziert. Im zweiten Schritt wird nun Folin-Ciocalteu Reagenz zugegeben, bindet an das Protein und wird langsam zu Molybdänblau reduziert. Die daraus resultierende Blaufärbung wird bei 750 nm gemessen und mittels eines Standards die Proteinkonzentration bestimmt (98). Der Lowry-Assay ist wesentlich empfindlicher als die Biuret-Reaktion an sich, allerdings ist er auch störanfälliger, d.h. er wird durch Pufferbestandteile wie z.B. EDTA, HEPES oder Triton-X beeinflusst.

In dieser Arbeit wurde das DC Protein Assay Kit von BioRad (München) im Mikrotiterformat nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.3.11 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF) übertragen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Minigele wurde dazu das X Cell II™ Blot Module (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Laufpuffer diente der NuPAGE® Transferpuffer (Invitrogen, München). Der Transfer fand in der Regel für 1 h bei 30 V statt.

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle folgenden Inkubationsschritte bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator durchgeführt. Dazwischen wurde die Membran für dreimal 10 min in PBS-T gewaschen. Die Membran wurde über Nacht entweder in proteinfreiem Blockpuffer (Thermo Scientific, Bonn) oder in 3 % Milchpulver (w/v) bei 4 °C geblockt. Nach einem einmaligen Waschriff für 10 min wurde zur Detektion des gewünschten Proteins der entsprechende Antikörper in PBS-T verdünnt und für 1 h auf der Membran inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper für 1 h. Zur Detektion des Protein-Antikörper-Komplexes wurde die Membran mit ECL *western blotting detection reagent* (Amersham, Freiburg) für 1 min inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mittels Röntgenfilm.

3.2.4 Methoden zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion

3.2.4.1 Far Western Blot

Während der Western Blot dazu verwendet wird, bestimmte Proteine zu detektieren, findet der Far Western Blot Anwendung in der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Der Unterschied zwischen den Methoden besteht darin, dass der Blot vor der Antikörperzugabe mit einem Protein inkubiert wird, von dem angenommen wird, dass es mit dem zu untersuchenden Protein interagiert.

Der Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran fand unter denselben Gegebenheiten wie im Western Blot statt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle folgenden Inkubationsschritte bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator durchgeführt. Dazwischen wurde die Membran für dreimal 10 min in PBS-T gewaschen. Die Membran wurde über Nacht entweder in proteinfreiem Blockpuffer (Thermo Scientific, Bonn) oder in 3 % Milchpulver (w/v) bei 4 °C geblockt. Nach einem einmaligen Waschriff für 10 min wurde

die Membran mit einer bestimmten Konzentration eines rekombinant exprimierten Proteins für 1 h inkubiert. Zur Detektion des nun potentiell an die Membran gebundenen Proteins wurde der entsprechende Antikörper in PBS-T verdünnt und für 1 h auf der Membran inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper für 1 h. Zur Detektion des Protein-Antikörper-Komplexes wurde die Membran mit ECL *western blotting detection reagent* (Amersham, Freiburg) für 1 min inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mittels Röntgenfilm.

3.2.4.2 Dot Blot

Der Dot Blot stellt eine vereinfachte Variante zum Western Blot dar. Anstatt ein Proteingemisch zuvor gelelektrophoretisch aufzutrennen, wird das Gemisch bzw. das sauber aufgereinigte Protein direkt auf eine PVDF-Membran pipettiert (Punkt, *dot*) und anschließend entweder mit einem Protein oder mit Antikörpern detektiert. Diese Methode sagt zwar nichts über die Größe eines Moleküls aus, erspart jedoch viel Zeit und ermöglicht die Kontrolle der Anwesen- bzw. Abwesenheit eines Proteins. Protein-Protein-Interaktionen können so ebenfalls untersucht werden.

Dot Blot:

Eine PVDF-Membran wurde der Anzahl der Proben entsprechend zugeschnitten, mit Methanol aktiviert, anschließend mit PBS gewaschen und auf ein mit PBS befeuchtetes Filterpapier gelegt. Von einem Probengemisch bzw. von dem puren zu untersuchenden Protein wurden Verdünnungsstufen in PBS angefertigt und je 5 µl auf die Membran aufgebracht. Wenn alle Proben gebunden haben, wurde die Membran über Nacht entweder in proteinfreiem Blockpuffer (Thermo Scientific, Bonn) oder in 3 % Milchpulver (w/v) bei 4 °C geblockt. Alle weiteren Schritte entsprachen denen des Western Blots bzw. des Far Western Blots.

Verwendung biotinylierter Proteine:

Eine weitere hier verwendete Methode ist der Einsatz von biotinylierten Proteinen. Diese wurden hauptsächlich dann verwendet, wenn zuvor eine unspezifische Antikörperbindung beobachtet und somit keine genaue Aussage zu einer Protein-Protein-Interaktion gemacht werden konnte.

Ein Protein wurde nach Angaben des Herstellers mit Hilfe eines Kits (EZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit, Pierce, Rockford, IL) mit Biotin gekoppelt. Die Membran wurde nach dem Blocken einmal mit PBS-T gewaschen und anschließend für 1 h mit 5 µg/ml biotinyliertem Protein inkubiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator durchgeführt. Dazwischen wurde die Membran für dreimal 10 min in PBS-T gewaschen. Die Membran wurde für 1 h mit einem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper [1:7500] inkubiert. Für die Detektion der Protein-Protein-Interaktion wurde Western Blue[®]-Substrat (Promega, Madison, WI) nach Angaben des Herstellers verwendet. Bevor eine unspezifische Färbung des Hintergrunds stattfand, wurde die Enzymreaktion durch Spülen der Membran in ddH₂O gestoppt und diese anschließend getrocknet.

3.2.4.3 ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Der ELISA kann mit Hilfe einer enzymvermittelten Reaktion die Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper nachweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine ELISA-Variante etabliert, die zum direkten Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion dient.

Hierzu wurden sterile Mikrotiterplatten mit Antigen 1 beschichtet, indem 100 µl der Antigen 1-Lösung (3 µg/ml Aap rDomäne-B) in die Kavitäten pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Sofern nicht anders angegeben wurden die Mikrotiterplatten zwischen den Inkubationsschritten vorsichtig dreimal mit je 200 µl PBS-T bei Raumtemperatur (RT) gewaschen. Um nicht-beschichtete Bereiche zu blocken, wurden die Kavitäten mit je 100 µl proteinfreiem Blockpuffer (Thermo Scientific, Bonn) bei 4 °C für mindestens 1 h inkubiert. Dann wurden je 100 µl der Antigen-Lösung 2 (variierte Konzentrationen rAaStrA) zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Es folgte die Inkubation mit je 100 µl des gegen das Antigen 2 gerichteten Erstantikörpers für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurden je 100 µl des Meerrettich-Peroxidase markierten Zweitantikörpers darauf gegeben und ebenfalls für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von je 100 µl Substrat wurden die Platten bei 37 °C im Brutschrank belassen. Die Entwicklung der Enzym-Substrat-Reaktion wurde über einen Zeitraum von 3-4 h im 30 min-Rhythmus bei 405 nm und der Referenzwellenlänge 492 nm im ELISA Reader Tecan Infinite 200 (Tecan, Crailsheim) gemessen.

3.2.4.4 Analytische Gelchromatographie

Bei der Gelchromatographie, auch bezeichnet als Gelfiltration oder Größenausschluss-Chromatographie, handelt es sich um ein chromatographisches Analyseverfahren, bei dem Makromoleküle nach ihren Molekülmassen aufgetrennt werden. Als stationäre Phase werden in der Regel poröse Polymere in granulöser Form, z.B. Sephadex, verwendet. Das Trennprinzip beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Molekülen zwischen einem Gelkompartiment und dem umgebenden Medium. Kleinere Moleküle diffundieren in die Poren der Gelkügelchen und werden zurückgehalten, während Moleküle, deren Größe den Porendurchmesser überschreiten, an den Gelkörnern entlang wandern können. Größere Moleküle werden so schneller von der Säule eluiert als kleinere. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, diese Methode für den Nachweis einer Interaktion zwischen zwei Proteinen anhand der Größe des vermutlich entstandenen Komplexes zu nutzen.

Hierzu wurden die Proteine rAaStrA und rDomäne-B in verschiedenen molekularen Mischungsverhältnissen bei 4 °C auf einer Laborsonne miteinander vorinkubiert, bevor sie über eine kalibrierte Superdex 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare, München) aufgetrennt wurden. Um eine mögliche Größenverschiebung nachzuweisen, wurden die Proteine auch einzeln in der jeweiligen Verdünnung (in PBS) über die Säule gegeben. Es wurde das ÄKTApurifier™ System bei 4 °C genutzt. Als Laufpuffer diente PBS mit einer Pufferfließgeschwindigkeit von 0,1-0,5 ml/min. Es wurden 1 ml-Fractionen gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

4 Ergebnisse

4.1 Expression und Aufreinigung von AaStrA

Ein entscheidender Schritt für die biochemische Charakterisierung von AaStrA und der Rolle des Proteins in der *S. epidermidis* Biofilmbildung war die rekombinante Expression und Aufreinigung von AaStrA.

Hierzu wurde *aastra* mittels PCR amplifiziert und das resultierende Amplifikat in den Vektor pDEST™17 kloniert. Das Konstrukt wurde nach der Kontrolle der Sequenz in den Expressionsstamm BL21-AI™ eingebracht (Burdelski, unveröffentlicht). Die Expression des Proteins fand wie in Kap. 3.2.3.7 beschrieben statt. Für die anschließende Aufreinigung wurden HiTrap Chelating Säulen verwendet, die mit unterschiedlichen Ionen beladen waren.

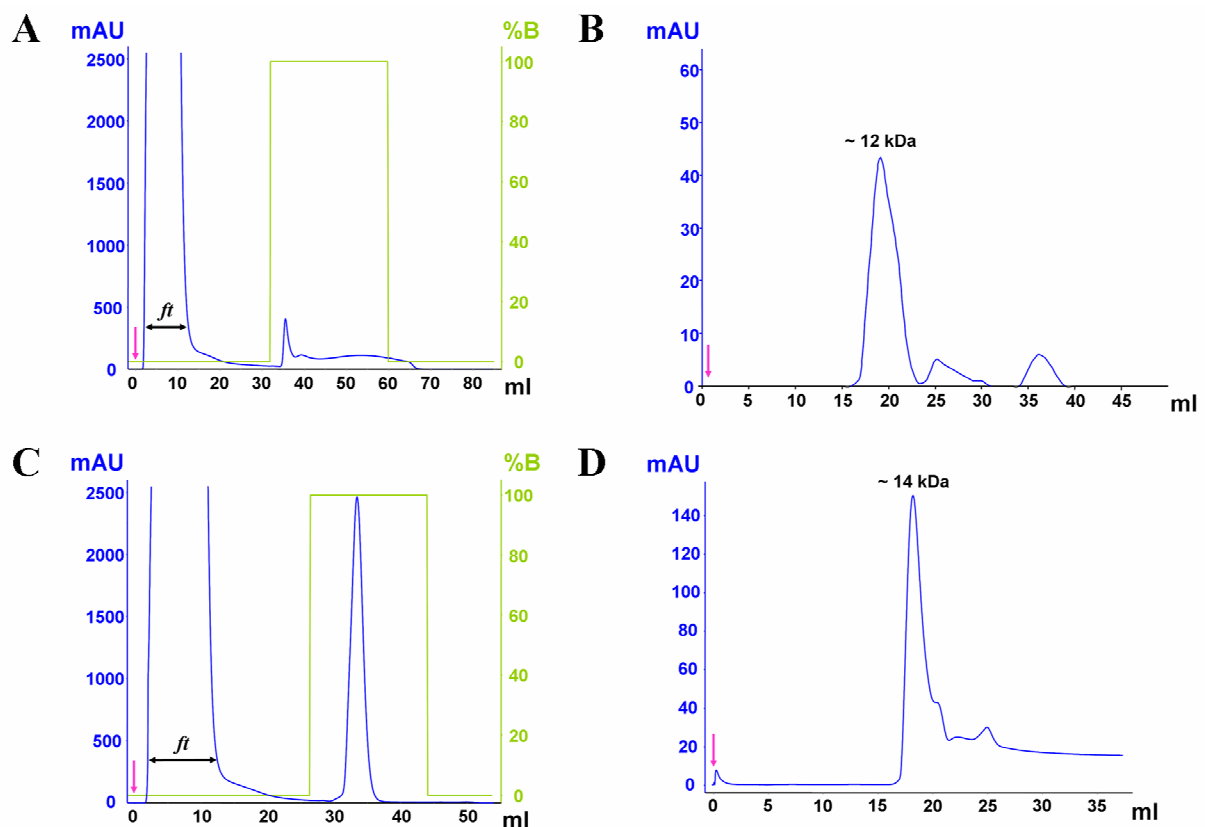


Abb. 5: Aufreinigung von rAaStrA. Elutionsprofile der Affinitätschromatographie an einer (A) mit Nickel-beladenen und (C) mit Zink-beladenen HiTrap Chelating Säule. Graphiken B und D: Elutionsprofile der Gelchromatographie über eine Superdex 200 10/300 GL-Säule des über (B) Nickel und (D) Zink aufgereinigten Proteins. Zu B: Die Gelchromatographie dieser Proteinpräparation wurde unter Verwendung des ÄKTAprime™ plus-System durchgeführt. Pfeil: Injektion des Proteins, gelöst in PBS, auf die jeweilige Säule. *ft*: flow trough. Blau: Absorption 280 nm. Grün: Konzentration des HIS Elution Buffers in Prozent [v/v].

Da standardmäßig meist mit Nickelionen beladene Säulen zur Aufreinigung von HIS-markierten Proteinen verwendet werden, wurde initial eine solche auch in dieser Arbeit eingesetzt. Das Elutionsprofil (Abb. 5 A) zeigt nach der Injektion von 5 ml *E. coli*-Zellysats (präpariert nach der Induktion der AaStrA-Expression, Pfeil) einen steilen Anstieg der Absorption bei 280 nm und einen Peak, welcher sich über ein Volumen von ca. 15 ml verteilte. Dieser bezeichnet den sogenannten *flow through* (*ft*), also alle Proteine des Zellysats, die nicht an der Säule gebunden wurden. Nach dem Auswaschen dieser unspezifischen Proteine wurde die Konzentration des Elutionspuffers auf 100 % (grüne Linie) erhöht, so dass das über den HIS-Tag gebundene AaStrA von der Säule verdrängt wurde. Die Absorption steht zwar in keinem direkten Verhältnis zur Konzentration des eluierten Proteins, dennoch lässt sie orientierende Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration zu. Es ist erkennbar, dass nach etwa 5 ml HIS Elution Buffer nur relativ wenig Protein von der Säule eluiert wurde. Zudem scheint bis zum Ende des Elutionsschrittes weiteres Protein von der Säule gespült worden zu sein. Hierbei könnte es sich ebenfalls um rAaStrA, das noch nicht von der Säule verdrängt wurde, oder um andere histidinreiche Proteine handeln. Die Sauberkeit des über die Nickel-Säule aufgereinigten rAaStrAs wurde zusätzlich zur SDS-PAGE mit Hilfe der Gelchromatographie analysiert. Hierzu wurden die Fraktionen des Elutionspeaks (hier: Fraktion 35-36 ml) vereinigt und 500 µl davon auf eine Superdex 200 10/300 GL-Säule gegeben. Das Elutionsprofil (Abb. 5 B) zeigt einen relativ breiten Peak (Spitze bei ca. 19 ml). In dem Versuch, die Ausbeute an rekombinantem AaStrA zu erhöhen, wurde eine Zink-Säule verwendet. Das Elutionsprofil (Abb. 5 C) unterscheidet sich stark von dem der Nickel-Säule. Der Elutionspeak weist keine Schulterpeaks auf, was vermuten lässt, dass keine Verunreinigungen vorhanden sind. Des Weiteren konnte die Proteinausbeute um das 5-fache erhöht werden. Auch die Kontrolle mittels Gelchromatographie (Abb. 5 D) zeigte, dass das über die Zink-Säule aufgereinigte rAaStrA in reiner Form vorlag und keine Verunreinigungen vorhanden waren. Durchschnittlich konnten nach einer Proteinaufreinigung über Zinksäulen 1,5 mg/ml AaStrA erhalten werden. Im Vergleich dazu wurden zuvor über Nickelsäulen durchschnittlich 0,3 mg/ml AaStrA erhalten.

Alle weiteren Aufreinigungen von rekombinant exprimierten AaStrA wurden mit Hilfe der Zink-Säule durchgeführt.

4.2 Analyse der Interaktion von rAaStrA mit Aap rDomäne-B

Die Interaktion von AaStrA mit der Aap Domäne-B sollte im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung rekombinat exprimierter Proteine (rAaStrA und rDomäne-B) in unabhängigen Testsystemen (Liganden-Dot Blot, ELISA, analytische Gelchromatographie) untersucht und validiert werden.

4.2.1 Nachweis der Wechselwirkung von rAaStrA und rDomäne-B mittels Liganden-Dot Blot

Der Dot Blot bot die Möglichkeit, die Interaktion von rAaStrA mit rDomäne-B zu untersuchen. Hierzu wurden Verdünnungsreihen beider Proteine wie in Kap. 3.2.4.3 beschrieben auf PVDF-Membranen immobilisiert und entweder mit 5 µg/ml biotinyliertem rAaStrA oder mit 5 µg/ml biotinylierter rDomäne-B inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels an alkalische Phosphatase gekoppeltes Streptavidin detektiert.

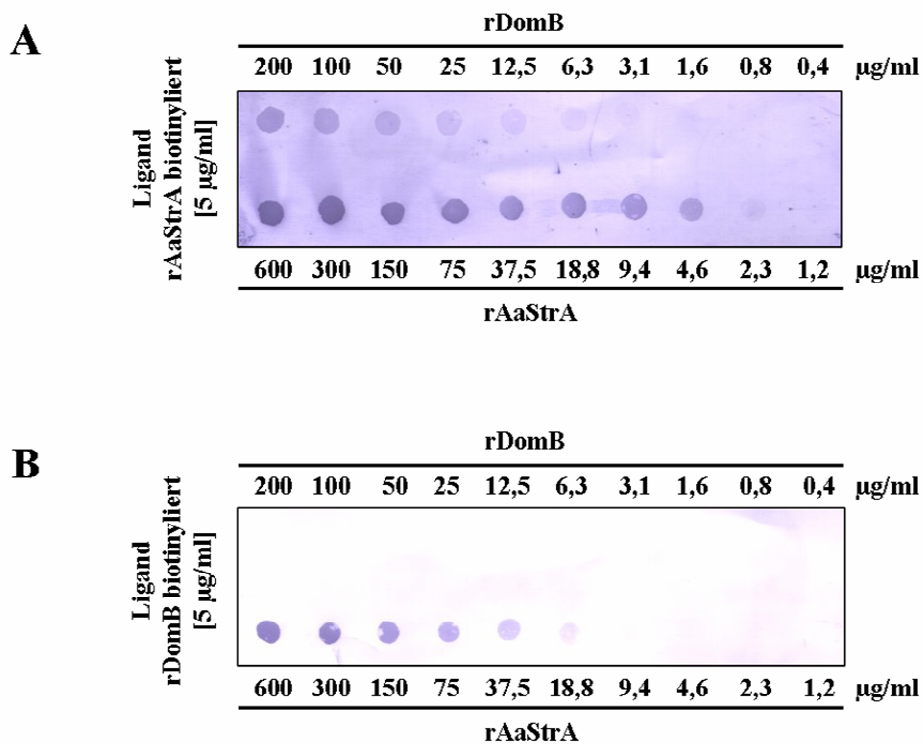


Abb. 6: Dot Blot zur Untersuchung der Interaktion zwischen (A) biotinyliertem rAaStrA [5 µg/ml] beziehungsweise (B) biotinylierter rDomäne-B [5 µg/ml] mit rAaStrA und rDomäne-B, immobilisiert auf einer PVDF-Membran. Gebundenes Protein wurde mittels an alkalische Phosphatase gekoppeltes Streptavidin nachgewiesen.

Nach dem Entwickeln der Blots wurde deutlich, dass rAaStrA offensichtlich an sich selbst bindet, also homotyp interagiert (Abb. 6 A). Ebenfalls konnte eine Bindung an rDomäne-B nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich, dass rDomäne-B als Ligand an immobilisiertes rAaStrA bindet (Abb. 6 B). Es konnte kein Hinweis für eine Bindung von gelöster rDomäne-B an immobilisierte rDomäne-B gefunden werden (Abb. 6 B). Durch den Dot Blot konnte nur eine reine Interaktion der biotinylierten rDomäne-B mit rAaStrA bis zu einer Konzentration von 18,8 µg/ml nachgewiesen werden (Abb. 6 B). Als Negativkontrolle wurden Membranen mit immobilisierter rDomäne-B und rAaStrA mit markiertem Streptavidin ohne vorherige Inkubation mit dem Proteinliganden durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Hier konnte kein Hinweis auf eine unspezifische Bindung des Streptavidins an die Zielproteine gefunden werden.

Sowohl die Selbstassoziation von rAaStrA als auch die alleinige Bindung der rDomäne-B an rAaStrA konnte durch Far Western Blots bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Nachweis mittels ELISA

Die direkte Interaktion von rAaStrA mit rDomäne-B sollte mittels eines ELISAs gezeigt werden. Hierzu sollte ein Interaktionspartner auf der Oberfläche einer unbehandelten Greiner Bio-One PS-Mikrotiterplatte immobilisiert und anschließend mit dem putativen Liganden inkubiert werden. Um eine Interaktion nachzuweisen, sollte je nach Versuchsanordnung ein Aap rDomäne-B- oder rAaStrA-spezifisches Kaninchenantiserum eingesetzt werden.

4.2.2.1 Aufbau und Validierung des ELISAs

Im Rahmen der Etablierung eines ELISA-Systems zur Untersuchung einer Interaktion zwischen rAaStrA und rDomäne-B sollte zunächst ausgeschlossen werden, dass das zum Nachweis des gebundener Liganden eingesetzte Antiserum unspezifisch mit dem immobilisierten Bindungspartner reagiert. Zudem sollte die optimale zur Beschichtung der Mikrotiterplatte einzusetzende Proteinkonzentration festgelegt werden.

Um festzulegen, ob es zu einer Kreuzreaktion der Antiseren mit den Bindungspartnern kommt, wurden Lösungen mit unterschiedlichen rAaStrA- oder rDomäne-B-Konzentrationen

angesetzt, in eine Mikrotiterplatte pipettiert und über Nacht inkubiert. Zum Nachweis von gebundenem Protein wurde jeweils das anti-rAaStrA- oder anti-rDomäne-B-Kaninchenantiserum verwendet. Alle weiteren Schritte wurden wie in Kap. 3.2.4.4 durchgeführt.

Der Versuch ergab, dass weder das anti-rDomäne-B- noch das anti-rAaStrA-Kaninchenantiserum an die unbeschichtete Oberfläche band (nicht dargestellt). Jedoch zeigte sich, dass das anti-rDomäne-B-Kaninchenantiserum mit vergleichbarer Effizienz oberflächengebundenen rAaStrA nachwies wie das spezifische anti-rAaStrA-Kaninchenantiserum. (Abb. 7 A). Das anti-rAaStrA-Antiserum hingegen zeigte selbst nach 120 min Inkubation nach Zugabe des Substrats keine Kreuzreaktivität mit rDomäne-B (Abb. 7 B). Dies zeigte, dass rAaStrA nicht für die Beschichtung der Mikrotiterplatten in Frage kam, die Versuche jedoch mit rDomäne-B-beschichteten Platten ohne die Gefahr unspezifischer Aktivität durchgeführt werden konnten.

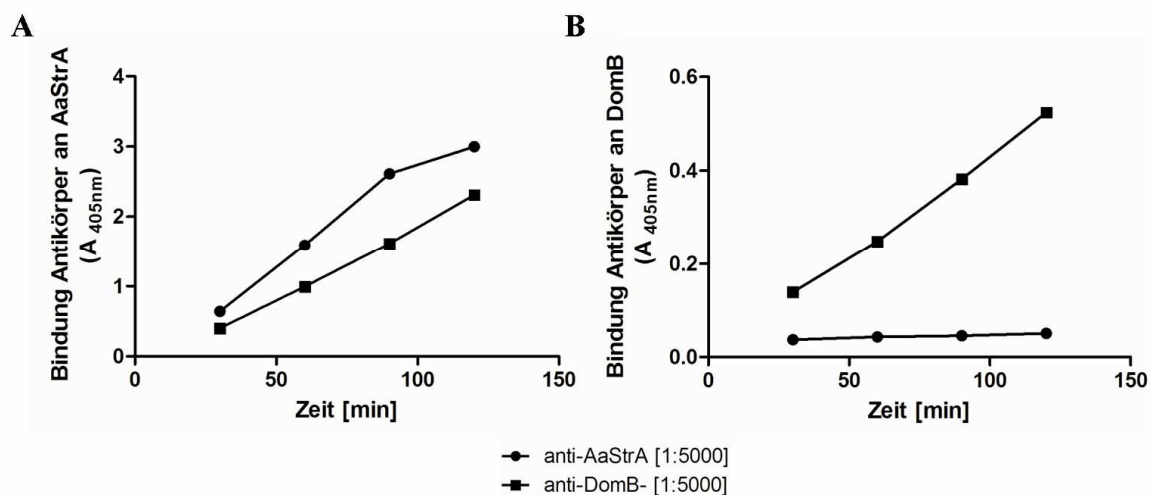


Abb. 7: ELISA zur Ermittlung einer möglichen Kreuzreaktion zwischen den Antiseren anti-rAaStrA beziehungsweise anti-rDomäne-B und (A) oberflächengebundenem rAaStrA [10 µg/ml] beziehungsweise (B) oberflächengebundener rDomäne-B [10 µg/ml]. Die Antiseren wurden in Verdünnungsstufen von 1:5000-1:30000 eingesetzt. Gebundenes Antiserum wurde mit einem an alkalische Phosphatase konjugiertem anti-Kaninchenantiserum nachgewiesen. Die Messungen fanden alle 30 min über einen Zeitraum von 2 h statt, um eine mögliche späte Bindung der Antiseren an die immobilisierten Proteine ausschließen zu können. Es konnte zwischen den Verdünnungsstufen der Antiseren kein Unterschied in der Protein-Antiserum-Reaktion beobachtet werden. In der Abbildung wurde exemplarisch die Messung der Antiserum-Verdünnungsstufe 1:5000 dargestellt.

Um nun die optimale Beschichtungskonzentration für rDomäne-B zu ermitteln, wurden Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Konzentrationen der rekombinant exprimierten Domäne-B beladen. Nach Inkubation über Nacht wurde gebundenes Protein mittels des spezifischen anti-rDomäne-B-Antiserums sowie eines an alkalische Phosphatase konjugiertem anti-Kaninchenantiserums nachgewiesen.

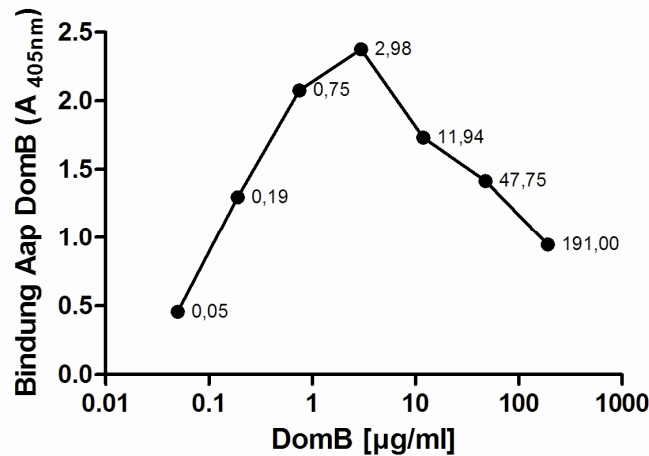


Abb. 8: Darstellung des ELISAs zur Evaluierung der optimalen rDomäne-B-Konzentration zur Beschichtung einer unbehandelten Mikrotiterplatte. Unterschiedliche Konzentrationen der an der Oberfläche gebundenen rDomäne-B [0,05-191 $\mu\text{g/ml}$] (geometrische Verdünnungsreihe) wurden mit anti-rDomäne-B-Antiserum [1:50000] und eines an alkalische Phosphatase konjugiertem anti-Kaninchenantiserums nachgewiesen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert zweier gemessener Kavitäten eines exemplarischen Versuchs.

Die Auswertung der Messungen (Abb. 8) ergab, dass rDomäne-B in einer Konzentration von 3 $\mu\text{g/ml}$ die Oberfläche absättigt. In Konzentrationen von 0,05 bis 3 $\mu\text{g/ml}$ rDomäne-B konnte eine stetige Zunahme der Absorption beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Polymeroberfläche bei diesen Konzentrationen nicht vollständig mit rDomäne-B abgesättigt wurde. In Konzentrationen von 3 bis 191 $\mu\text{g/ml}$ jedoch wurde eine Abnahme der Absorption beobachtet. Dies lässt vermuten, dass es bei erhöhten rDomäne-B-Konzentrationen zu Instabilität des Proteins auf der Oberfläche kommt, wodurch es bei Spülvorgängen von der Oberfläche gewaschen werden kann.

In den weiteren ELISA-Untersuchungen wurde 3 $\mu\text{g/ml}$ rDomäne-B für die Beschichtung der Mikrotiterplatten verwendet.

4.2.2.2 Interaktions-ELISA rAaStrA mit rDomäne-B

Um nun die Interaktion zwischen rAaStrA und rDomäne-B nachzuweisen, wurden Mikrotiterplatten mit 3 $\mu\text{g/ml}$ rDomäne-B wie in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben beschichtet. Als Negativkontrolle wurden mit PBS beschickte Kavitäten verwendet. Nach dem Blocken der mit Protein-beschichteten Kavitäten wurde eine Verdünnungsreihe von rAaStrA angesetzt und in die Kavitäten pipettiert. Gebundenes rAaStrA wurde mit anti-rAaStrA-Antiserum und einem an alkalische Phosphatase konjugierten anti-Kaninchenantiserum nachgewiesen.

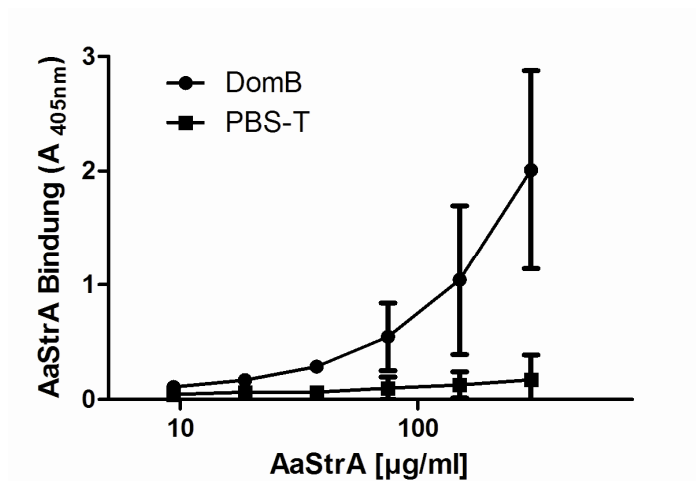


Abb. 9: ELISA zum Nachweis der Interaktion zwischen rAaStrA und an der Oberfläche gebundener rDomäne-B. Die Kavitäten wurden mit 3 µg/ml rDomäne-B beschichtet. rAaStrA wurde in Konzentrationen von 300-9,38 µg/ml (geometrische Verdünnungsreihe) eingesetzt. Gebundenes rAaStrA wurde mit anti-rAaStrA-Antiserum [1:5000] und eines an alkalische Phosphatase konjugiertem anti-Kaninchenantiserums nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten mit PBS-T behandelte Oberflächen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert und der Standardabweichung (Fehlerbalken) von 3 unabhängigen Experimenten (à 4 gemessener Kavitäten).

Bei Untersuchung der Bindung an die mit rDomäne-B beschichtete Oberfläche zeigte sich eine konzentrationsabhängige Beziehung zwischen dem eingesetzten rAaStrA und dem gemessenen ELISA-Signal (Abb. 9). Es konnte keine Sättigung der Bindung dargestellt werden. Auch bei hohen rAaStrA Konzentrationen konnte keine Bindung an die unbeschichtete Oberfläche nachgewiesen werden. Dieser Befund weist auf eine Interaktion zwischen rAaStrA und rDomäne-B hin.

4.2.2.3 Untersuchung der Interaktion von rAaStrA und rDomäne-B im Inhibitions-ELISA

Mit Hilfe des Inhibitions-ELISAs (kompetitiver ELISA) sollte untersucht werden, ob die Bindung von rAaStrA an immobilisierte rDomäne-B durch eine Vorinkubation mit rDomäne-B inhibiert werden kann.

Hierzu wurde eine konstante Konzentration rAaStrA [150 µg/ml] mit variierenden Konzentrationen [0,4-100 µg/ml] rDomäne-B für 1 h bei 4 °C vorinkubiert. Im Anschluss wurde das so vorbehandelte rAaStrA bezüglich seiner rDomäne-B-bindenden Aktivität im ELISA untersucht.

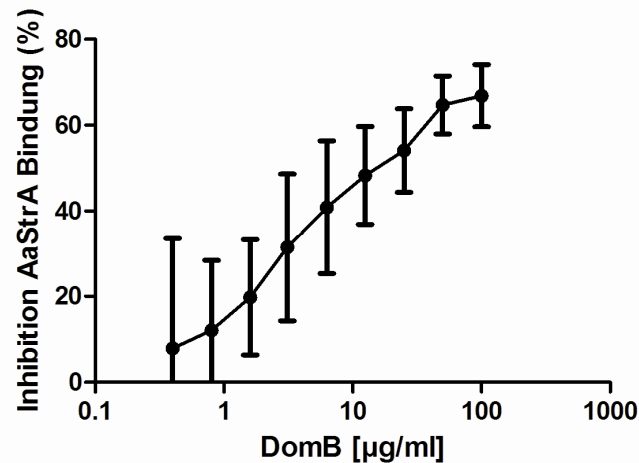


Abb. 10: ELISA zum Nachweis der Inhibition der AaStrA-Bindung rDomäne-B. rAaStrA [150 µg/ml] wurde mit variierenden Konzentrationen von rDomäne-B [100-0,4 µg/ml] (geometrische Verdünnungsstufen) für 1 h vorinkubiert und anschließend auf mit rDomäne-B [3 µg/ml] beschichtete Oberflächen gegeben. Als Negativkontrolle dienten mit PBS-T behandelte Oberflächen (nicht gezeigt). An die Oberfläche gebundener rAaStrA-rDomäne-B-Komplex wurde mit anti-rAaStrA-Antiserum und einem an alkalische Phosphatase konjugierten anti-Kaninchenantiserum nachgewiesen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert und der Standardabweichung (Fehlerbalken) der Inhibition der AaStrA-Bindung (%), berechnet aus 3 unabhängigen Experimenten (à 4 gemessener Kavitäten). Die Inhibition wurde nach folgender Formel berechnet: $(1 - A_{405} \text{ rAaStrA-rDomB}_{\text{vorinkubiert}} / A_{405} \text{ rAaStrA}) \times 100$.

Die Messungen zeigten, dass das ELISA-Signal mit steigender Konzentration der für die Vorinkubation verwendeten rDomäne-B-Menge das rAaStrA abgesenkt wurde. Bei einer zur Vorinkubation eingesetzten Menge von 100 µg/ml rDomäne-B konnte eine maximale Reduktion des ELISA-Signals um 70 % erzielt werden. (Abb. 10) Dieser Befund kann als Evidenz für eine direkte Wechselwirkung zwischen rAaStrA und gelöster rDomäne-B gewertet werden.

4.2.2.4 Untersuchung zum Einfluss divalenter Ionen auf die Interaktion von rAaStrA und rDomäne-B

Conrady *et al.* (66) haben biochemische Evidenz für eine homotype Interaktion der Aap Domäne-B gewonnen. Offensichtlich ist diese Interaktion Zink-abhängig. Dies führte im Rahmen dieser Arbeit zu der Frage, ob die rAaStrA-rDomäne-B-Interaktion ebenfalls abhängig von divalenten Ionen sein könnte.

Um diese Frage zu beantworten, wurde eine rAaStrA-Lösung [150 µg/ml] mit 5-20 µM ZnCl₂ versetzt, bevor sie immobilisierter rDomäne-B inkubiert wurde. Diese Zink-Konzentrationen entsprechen in etwa der physiologischen Konzentration im humanen Plasma (etwa 10 µM). Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, in welchen die Wechselwirkung von rAaStrA

und rDomäne-B in Anwesenheit unterschiedlicher MgCl_2 -Konzentrationen untersucht wurde. Als Kontrolle der Interaktion selbst wurde die Bindung von rAaStrA an rDomäne-B in Abwesenheit von divalenten Ionen in destilliertem Wasser getestet. Als Negativkontrolle dienten mit PBS behandelte Oberflächen.

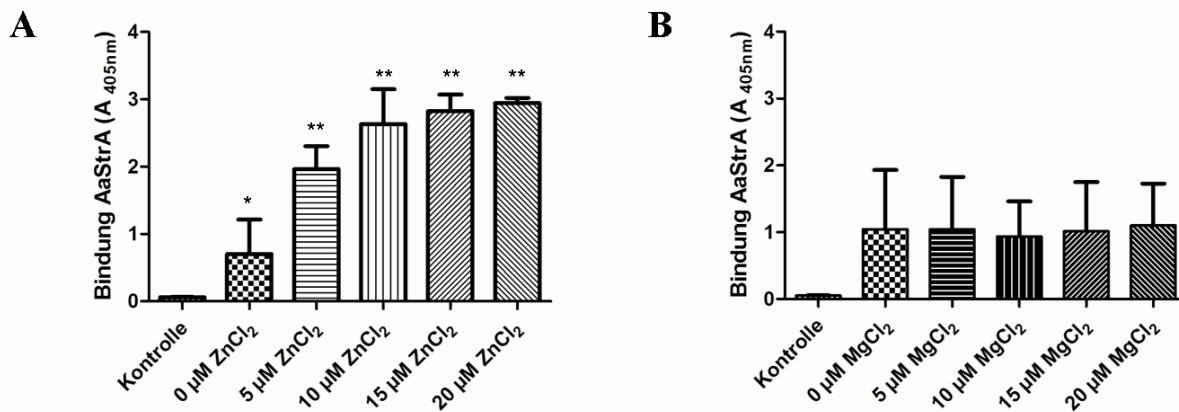


Abb. 11: Einfluss von divalenten Ionen auf die rAaStrA-rDomäne-B-Interaktion. ELISAs zur Bindung von rAaStrA [150 µg/ml] mit an die Oberfläche gebundener rDomäne-B [3 µg/ml] wurden in der Anwesenheit beziehungsweise Abwesenheit von (A) ZnCl_2 beziehungsweise (B) MgCl_2 in Konzentrationen von 0-20 µM durchgeführt. Als Negativkontrollen wurde die Bindung von rAaStrA an eine mit PBS vorbehandelte Oberfläche untersucht. Gebundenes rAaStrA wurde mit anti-rAaStrA-Antiserum [1:5000] und einem an alkalische Phosphatase konjugierten anti-Kaninchenantiserum nachgewiesen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert und der Standardabweichung (Fehlerbalken) von 2 unabhängigen Experimenten (à 10 gemessener Kavitäten). Sternchen (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede des Mittelwertes im Vergleich zur Messung ohne Zugabe von divalenten Ionen (1 way ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test, Signifikanzniveau 0,05).

Die Messungen ergaben, dass die Interaktion von rAaStrA mit rDomäne-B durch die Zugabe von Zn^{2+} im Vergleich zu der Positivkontrolle bis um das 3-fache gesteigert werden konnte (Abb. 11 A). Ab einer Konzentration von 10 µM ZnCl_2 konnte kaum noch eine Veränderung in der Absorption gezeigt werden. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von MgCl_2 nicht zu einer Zunahme der Bindung von rAaStrA an rDomäne-B (Abb. 11 B). Unabhängig von der MgCl_2 -Konzentration konnte keine Zunahme des ELISA-Signals beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass die Interaktion von rAaStrA und rDomäne-B Zink-abhängig erfolgt. Hierbei scheint die Interaktion nicht generell durch zweiwertige Ionen verstärkt zu werden.

4.2.3 Analytische Gelchromatographie

Die Ergebnisse der Dot-Ligandenassays sowie des ELISAs erbrachten Hinweise, dass rAaStrA an immobilisierte rDomäne-B bindet. Um Evidenz für eine Wechselwirkung der beiden Proteine in gelöster Form und gegebenenfalls Hinweise auf die Stöchiometrie des rDomäne-B-rAaStrA-Komplexes zu erhalten, sollte die Interaktion der beiden rekombinanten Proteine mittels einer analytischen Gelchromatographie untersucht werden.

Hierzu wurde, wie in Kap. 3.2.4.4 beschrieben, das Verhalten von drei Ansätzen beim Lauf über eine kalibrierte Superdex 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare, München) untersucht. In den ersten zwei Ansätzen wurde rAaStrA in einer Konzentration von 60 μM (gelöst in PBS) untersucht, im zweiten Lauf rDomäne-B in einer Konzentration von 20 μM (gelöst in PBS). Bei einem dritten Ansatz wurden die beiden Interaktionspartner gemischt (rAaStrA: 60 μM , rDomäne-B: 20 μM , gelöst in PBS), für eine Stunde bei 4 °C vorinkubiert und dann gemeinsam auf die Säulenmatrix aufgetragen.

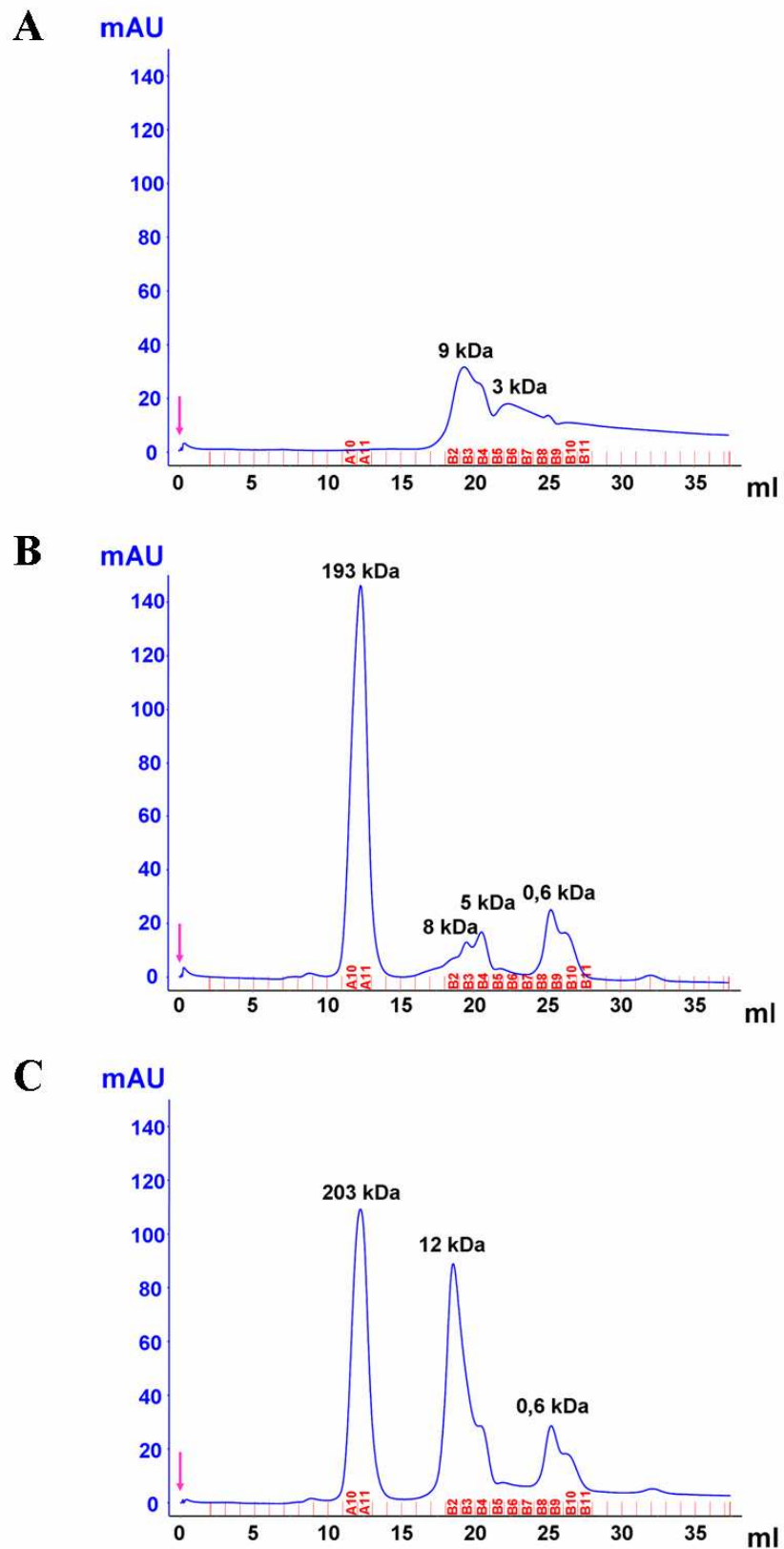


Abb. 13: Analytische Gelchromatographie (aGC) über eine kalibrierte Superdex 200 10/300 GL Säule mit 24 ml Säulenvolumen (GE Healthcare, München). Elutionsprofile der **(A)** aGC von rAaStrA [60 μ M], **(B)** aGC von rDomäne-B [20 μ M], **(C)** aGC rAaStrA und rDomäne-B nach einstündiger Vorinkubation. Pfeil: Injektion der Proteine auf das Säulenbett. Blau: Absorption 280 nm. Rot: Fraktionen, die für Western Blot (Abb.14) eingesetzt wurden. Laufpuffer: PBS. Fließgeschwindigkeit: 0,5 ml/min.

Die rot markierten Fraktionen (Abb. 13 A-C) wurden zur genaueren Untersuchung der Proteinzusammensetzung mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Western Blots wurden mit anti-rDomäne-B- oder anti-rAaStrA-Antiserum inkubiert und die gebundenen Antikörper mittels des an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpers detektiert.

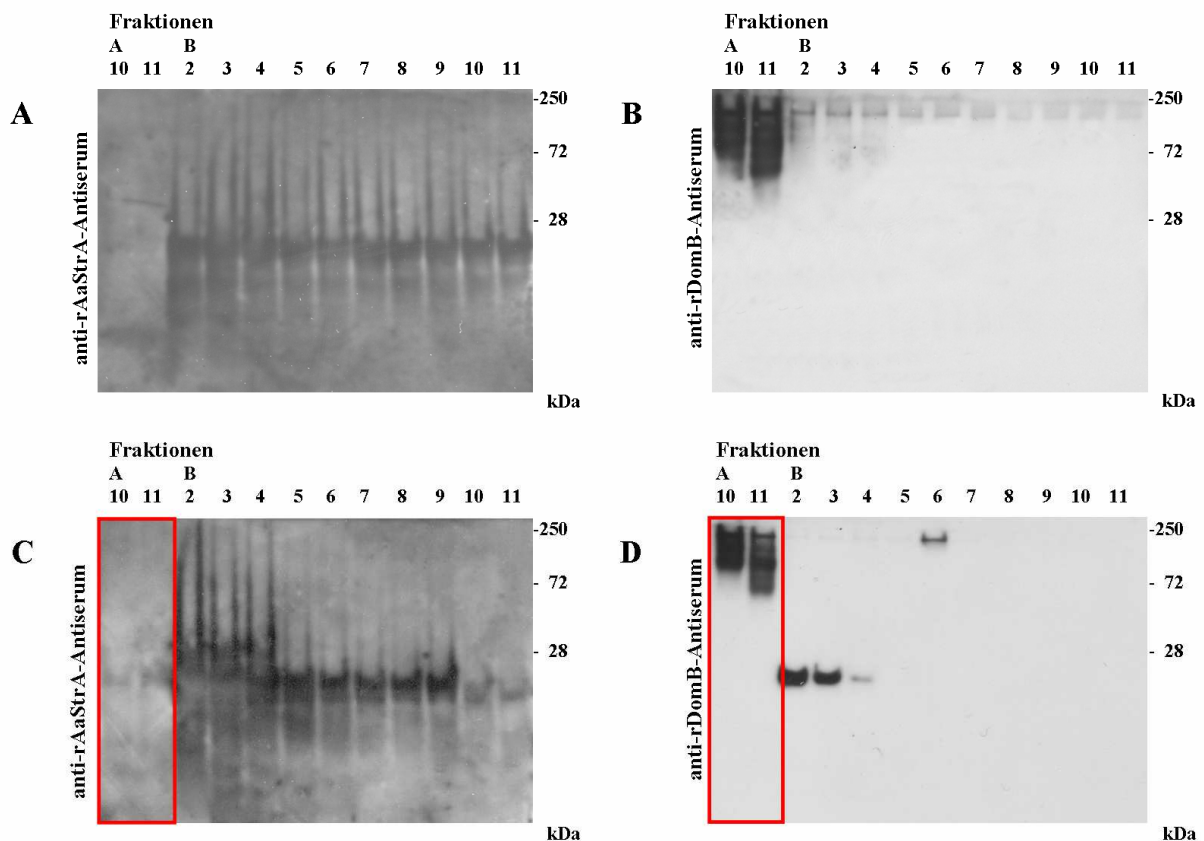


Abb. 14: Western Blots zur analytischen Gelchromatographie (aGC). Die aGC fand über eine kalibrierte Superdex 200 10/300 GL Säule mit 24 ml Säulenvolumen (GE Healthcare, München) statt. Die Fraktionen wurden auf einem 10 %-SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. **(A)** aGC von rAaStrA [60 μ M], detektiert mit anti-rAaStrA-Antiserum [1:10000]. **(B)** aGC von rDomäne-B [20 μ M], detektiert mit anti-rDomäne-B-Antiserum [1:20000]. **(C)** aGC AaStrA und rDomäne-B nach 1-stündiger Vorinkubation, detektiert mit anti-rAaStrA-Antiserum [1:10000]. **(D)** aGC AaStrA und rDomäne-B nach einstündiger Vorinkubation, detektiert mit anti-rDomäne-B-Antiserum [1:20000]. Als Sekundärantikörper wurde jeweils an Peroxidase gekoppeltes anti-Kaninchenantiserum verwendet. Rote Markierungen: In den Fraktionen A10 und A11 konnte nach der Vorinkubation rAaStrA gemeinsam mit rDomäne-B detektiert werden.

In der Analyse der im Rahmen der aGC von rAaStrA [60 μ M] gewonnenen Fraktionen konnte rAaStrA ab der Fraktion B2 bis hin zur Fraktion B11, parallel zu dem breiten, während der aGC aufgezeichneten Absorptionspeak (Abb. 13 A), nachgewiesen werden (Abb. 14 A). Der Western Blot der aGC von rDomäne-B [20 μ M], detektiert mit anti-rDomäne-B-Antiserum, hingegen verdeutlicht, dass die größere rDomäne-B, entsprechend des Chromatogramms, bereits in den Fraktionen A 10-11 (Abb. 14 B) nachweisbar war. In späteren Fraktionen konnten nur noch Spuren des Proteins im Western Blot nachgewiesen werden. Die Fraktionen

A10, 11 und B2-11 nach der Auftrennung des Gemisches von rAaStrA und rDomäne-B wurden ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Mittels anti-rDomäne-B-Antiserums konnte das rekombinante Protein nach gemeinsamer Elution mit rAaStrA in den Fraktionen A10 und 11 detektiert werden. Die Präinkubation mit rAaStrA führte also nicht zu einer Veränderung des Laufverhaltens dieses rekombinanten Proteins. Die Untersuchung der identischen Fraktionen unter Verwendung des anti-rAaStrA-Kaninchenantiserums konnte rAaStrA ebenfalls analog zu den Befunden bei isolierter Analyse durch Gelfiltration in den Fraktionen B2-11, dargestellt werden. Zusätzlich fand sich das Protein jedoch auch in den Fraktionen A10 und 11. Da die Eichung der Kurve ergeben hatte, dass in diesen Fraktionen Proteine mit einem molekularen Gewicht von etwa 193 kDa eluieren, eluiert rAaStrA nach Vorinkubation mit rDomäne-B offensichtlich bei einem scheinbar höheren Molekulargewicht. Dieser Befund lässt sich durch die Bindung von rAaStrA an rDomäne-B und ein damit verbundenes, verändertes Elutionsverhalten erklärt werden und weist auf eine direkte Interaktion von rAaStrA und rDomäne-B hin.

4.2.4 Weitere Interaktionspartner von AaStrA

Da bei der Biofilmbildung von *S. epidermidis* verschiedenste Proteine an der primären Bindung beteiligt sind, stellte sich die Frage, ob auch rAaStrA auch eine Interaktion mit Matrixmolekülen wie Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin aufweist.

Um diese Frage zu beantworten wurden ELISA-Untersuchungen durchgeführt, bei welchen eine Mikrotiterplatte mit Fibrinogen [10 µg/ml], Fibronectin [10 µg/ml] oder Vitronectin [1 µg/ml] beschichtet und anschließend mit rAaStrA [600-18,8 µg/ml] inkubiert. Gebundenes rAaStrA wurde mit anti-rAaStrA-Antiserum detektiert. Als Negativkontrolle dienten mit PBS-T-behandelte Oberflächen.

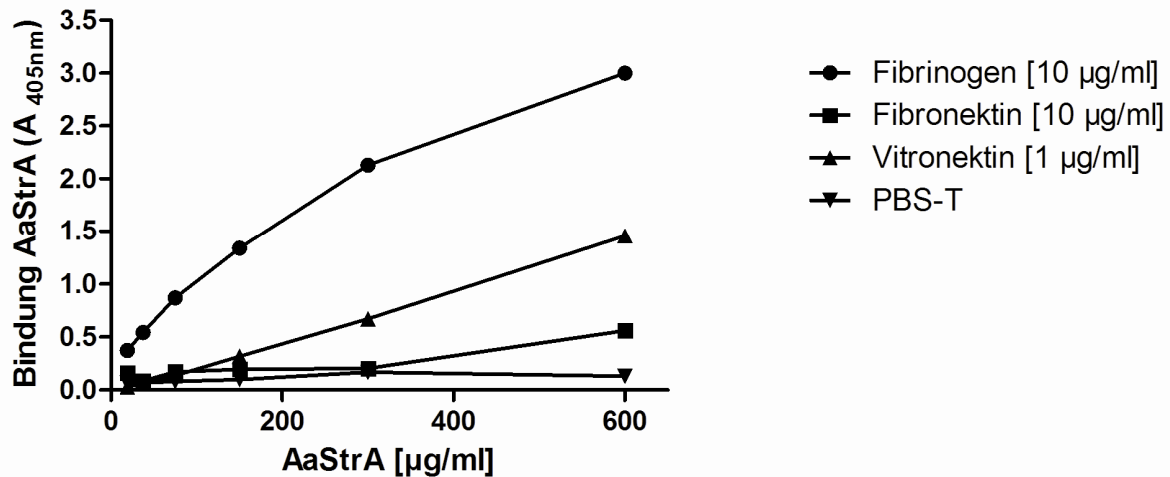


Abb. 15: ELISA zum Nachweis der Interaktion zwischen rAaStrA und an der Oberfläche gebundenem Fibrinogen [10 µg/ml], Fibronectin [10 µg/ml] und Vitronectin [1 µg/ml]. rAaStrA wurde in Konzentrationen von 600-18,8 µg/ml (geometrische Verdünnungsreihe) eingesetzt. Gebundenes rAaStrA wurde mit anti-rAaStrA-Antiserum [1:5000] nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten mit PBS-T behandelte Oberflächen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert einer gemessenen Kavität eines exemplarischen Versuchs.

Die Auswertung des ELISAs ergab, dass rAaStrA konzentrationsabhängig mit Fibrinogen-beschichteten Oberflächen interagiert. Ebenso konnte eine Bindung an Vitronectin beobachtet werden. Eine Interaktion von rAaStrA mit Fibronectin hingegen scheint nicht gegeben, da sich die Messwerte kaum von denen der Kontrolle PBS-T-beschichteter Oberflächen unterscheiden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass AaStrA mit diversen Matrixmolekülen interagieren kann.

4.3 Analyse der Funktion von AaStrA bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung

PCR-Untersuchungen an 70 *S. epidermidis*-Stämmen, die in der Zeit von 2001 – 2004 aus Infektionen nach Hüft- oder Knieendoprothesen isoliert wurden (61), ergaben, dass 69 der 70 Stämme *aastra* in ihrem Genom aufweisen (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass AaStrA offensichtlich eine breite Relevanz bei klinischen *S. epidermidis* Stämmen hat. Um diese weiter zu untersuchen, sollte zunächst die zeitliche Dynamik der AaStrA-Bildung in verschiedenen Wachstumsphasen untersucht und die Lokalisation von AaStrA auf der Bakterienoberfläche nachgewiesen werden.

4.3.1 Expression von AaStrA in *S. epidermidis* Kulturen

Zunächst sollte geklärt werden, ob AaStrA in jeder Phase des bakteriellen Wachstums gleichermaßen stark exprimiert wird, oder ob die Expression erst an einem bestimmten Zeitpunkt verstärkt stattfindet. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob es zwischen einem biofilmmnegativen und einem biofilmpositiven *S. epidermidis* Stamm zu Unterschieden in der AaStrA-Expression kommt.

Hierzu wurden, wie in Kap. 3.2.3.5 beschrieben, die Oberflächenproteine der Stämme *S. epidermidis* 5179 (keine Aap-Prozessierung, biofilmmnegativ) und 5179-R1 (Aap-Prozessierung, biofilmpositiv) nach 4, 6, 8 und 24 h Wachstum in TSB-Schüttelkulturen präpariert. Diese Proteinpräparationen wurden zum einen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und AaStrA mittels Western Blot unter Verwendung des anti-rAaStrA-Kaninchenantiserums nachgewiesen. Zum anderen wurden diese Proben in geometrischen Verdünnungsstufen auf einer PVDF-Membran immobilisiert und AaStrA mittels des anti-rAaStrA-Kaninchenantiserums nachgewiesen.

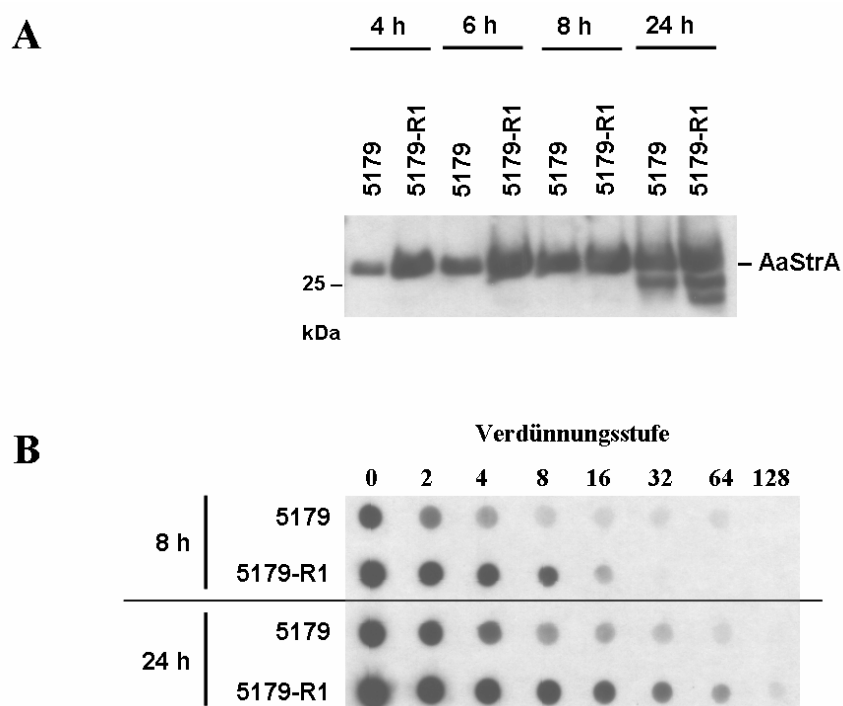


Abb. 16: Expression von AaStrA. (A) SDS-PAGE der Oberflächenproteine der Stämme *S. epidermidis* 5179 und 5179-R1. Bakterien wurden nach 4, 6, 8, 24 h geerntet und mittels PBS auf eine einheitliche OD₆₀₀ eingestellt. Aus dieser Suspension wurden identische Volumina entnommen und die Oberflächenproteine der darin enthaltenen Bakterien präpariert. Diese wurden auf ein 10 %-SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion von AaStrA fand mit anti-rAaStrA-Antiserum und an Peroxidase gekoppeltes anti-Kaninchenantiserum statt. (B) Dot Blot der Oberflächenproteine der unter (A) beschriebenen Proben. Die Proben wurden geometrisch verdünnt, auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit anti-rAaStrA-Antiserum und an Peroxidase gekoppeltes anti-Kaninchenantiserum detektiert.

Die Expressionsuntersuchungen ergaben, dass AaStrA zu allen untersuchten Zeitpunkten in etwa gleich stark gebildet wurde. Im Western Blot fand sich im Vergleich zu den Zeitpunkten der exponentiellen Wachstumsphase lediglich nach 24 h Kultur ein etwas stärkeres Signal. Auffallend war, dass das anti-rAaStrA-Signal zu allen Zeitpunkten bei *S. epidermidis* 5179-R1 stärker war als bei *S. epidermidis* 5179. Um zu untersuchen, ob der Stamm 5179-R1 tatsächlich mehr AaStrA auf seiner Oberfläche trägt als *S. epidermidis* 5179, wurden die nach 8 und 24 h Kultur gewonnenen Oberflächenproteinpräparationen geometrisch verdünnt und auf eine PVDF Membran aufgetragen. Bei der Detektion von AaStrA mittels anti-rAaStrA-Antiserum fand sich, dass von der Oberfläche des Stamms 5179-R1 zum Zeitpunkt nach 8 Stunden Kultur etwa viermal soviel AaStrA isoliert werden kann als vom Stamm *S. epidermidis* 5179. Da die Expression von *aastra* auf mRNA-Niveau keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen 5179-R1 und 5179 aufweist (Franke, Rohde, unveröffentlichte Daten), kann dieser Befund als Hinweis auf eine verstärkte AaStrA Oberflächenbindung bei *S. epidermidis* 5179-R1 bewertet werden.

4.3.2 Bakterienadhärenz an AaStrA-beschichteten Oberflächen

Die Analyse zur Lokalisation von AaStrA legte die Vermutung nahe, dass AaStrA mit der *S. epidermidis* Oberfläche interagiert. Um funktionelle Evidenz für diese Wechselwirkung zu erhalten, sollte die Bindung von Bakterienzellen an auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiertes rAaStrA untersucht werden. Die verwendete Oberfläche (Polystyren, Greiner) unterstützt in unbehandelter Form nicht die bakterielle Bindung. Sollte es zu einer Interaktion von rAaStrA mit der *S. epidermidis* Oberfläche kommen, so sollte es durch die Beschichtung dieser Oberfläche mit rAaStrA zu einer Verstärkung der Bakterienzellbindung kommen.

Die Greiner Polystyren-Mikrotiterplatten wurden mit 5 µg/ml rAaStrA über Nacht beschichtet und vorsichtig gewaschen. Anschließend wurden definierte Bakterienzellzahlen auf die Oberfläche aufgebracht und, nach Inkubation und mehreren Waschschritten, gebundene Zellen durch ein anti-*S. epidermidis*-Antiserum dargestellt. Hier zeigte sich, dass das verwendete anti-*S. epidermidis*-Antiserum unspezifisch an die mit rAaStrA beladene Oberfläche band. Somit konnten die gebundenen Bakterien durch diesen Ansatz nicht dargestellt werden. Um dennoch in diesem Testsystem Evidenz für eine Bindung von *S. epidermidis* an die AaStrA-beschichtete Oberfläche zu gewinnen, wurden rAaStrA-

beschichtete, mit 5 µg/ml BSA beschichtete und unbeschichtete Mikrotiterplatten verwendet, um einen Biofilmassay durchzuführen.

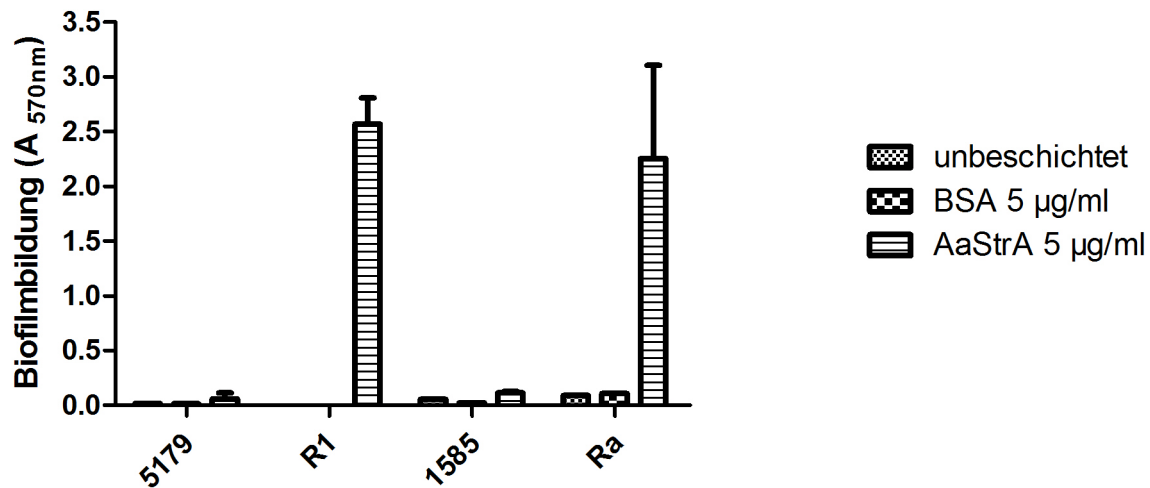


Abb. 17: Biofilmbildung auf unterschiedlich behandelten Polystyren-Oberflächen. Die Beschichtung der Oberfläche mit rAaStrA [5 µg/ml] ermöglichte es *S. epidermidis* 5179-R1 und 1585-Ra, an die sonst abweisende Oberfläche zu binden und Biofilme zu bilden. Die Oberfläche unterstützt in unbeschichteter Form bakterielle Adhärenz nicht und erlaubt daher nicht die Ausbildung eines Biofilms. Somit kann ein biofilmpositiver Phänotyp in diesem Testsystem als indirekter Ausdruck für eine Wechselwirkung zwischen Bakterium und rAaStrA betrachtet werden. Als Kontrollen wurden sowohl unbeschichtete als auch mit BSA [5 µg/ml] behandelte Oberflächen verwendet. Die Biofilme wurden mit Kristallviolett angefärbt die Absorption bei 570 nm (Referenz A_{405}) gemessen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert und der Standardabweichung (Fehlerbalken) von 3 unabhängigen Experimenten (à 4 gemessener Kavitäten).

Es zeigte sich, dass die biofilmpositiven Stämme *S. epidermidis* 5179-R1 und 1585-Ra auf der mit rAaStrA-beschichteten Platte einen Biofilm ausbildeten (Abb. 17), während auf der mit BSA beschichteten sowie der unbeschichteten Oberfläche keine Biofilmbildung beobachtet werden konnte. Da die Ausbildung eines Biofilms von der festen Bindung von *S. epidermidis* an die Oberfläche abhängt, kann aus diesen Beobachtungen indirekt geschlossen werden, dass es tatsächlich zu einer Bindung der *S. epidermidis* Oberfläche an rAaStrA kommt. Da auch der aap-negative *S. epidermidis* Stamm 1585-Ra einen Biofilm ausbildete ist diese Bindung offensichtlich unabhängig von der Bildung von Aap. Die biofilmnegativen *S. epidermidis* Stämme 5179 und 1585 bildeten an keiner der getesteten Oberflächen einen Biofilm.

4.3.3 Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von AaStrA bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung

4.3.3.1 Biofilminhibition durch Zugabe von rAaStrA

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass AaStrA an die Domäne-B von Aap binden kann. Es sollte nun die Frage geklärt werden, in wie weit diese Bindung funktionell an der Biofilmbildung beteiligt ist.

Im Rahmen eines Biofilmassays sollte getestet werden, ob durch die Zugabe von rAaStrA die Biofilmbildung von *S. epidermidis* inhibiert werden kann. Hierzu wurden die *S. epidermidis* Stämme 5179-R1 und 1457 verwendet. Während *S. epidermidis* 5179-R1 einen Aap-abhängigen Biofilm bildet, ist bei dem Stamm 1457 die Biofilmbildung von der PIA-Bildung abhängig.

Der Biofilmassay wurde wie in Kap. 3.2.2.7 beschrieben durchgeführt, jedoch wurde bei der Durchführung der Hauptkultur in den Mikrotiterplatten das TSB mit unterschiedlichen Konzentrationen rAaStrA (0 μ M-8 μ M) supplementiert.

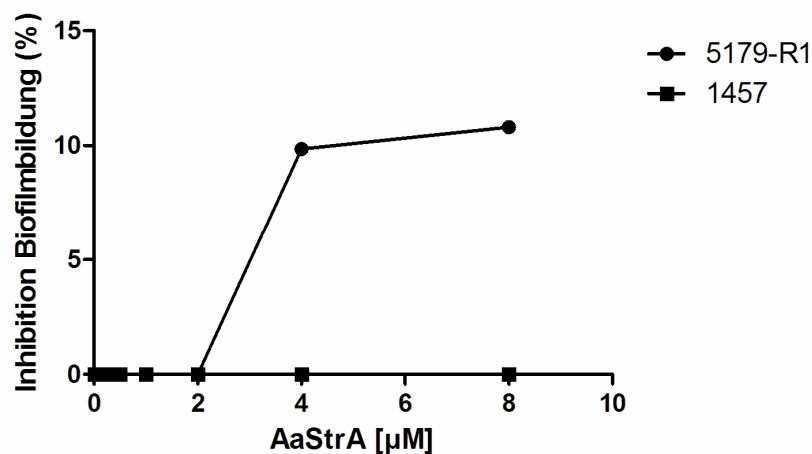


Abb. 18: Untersuchung des Einflusses von rAaStrA auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 5179-R1 (Aap-abhängiger Biofilm) und *S. epidermidis* 1457 (PIA-abhängiger Biofilm) im Biofilmassay. Dem wachsenden Biofilmen wurde rAaStrA in Konzentrationen von 0-8 μ M (geometrische Verdünnungsstufen) zugesetzt. Nach 24 h Inkubation wurden die Biofilme mit Kristallviolett angefärbt und die Absorption bei 570 nm (Referenz A_{405}) gemessen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert zweier gemessener Kavitäten eines exemplarischen Experiments. Die Inhibition wurde nach folgender Formel berechnet: $(1 - A_{570} \text{ mit rAaStrA} / A_{470} \text{ ohne rAaStrA}) \times 100$.

Es zeigte sich, dass bei keiner der eingesetzten rAaStrA-Konzentrationen ein inhibitorischer Effekt auf die PIA-abhängige Biofilmbildung des Stamms 1457 erzielt werden konnte. Selbst in Gegenwart von 8 μ M rAaStrA bildete der Stamm einen starken Biofilm, der sich

quantitativ nicht von der Kultur ohne rAaStrA-Zusatz unterschied. Im Gegensatz dazu fand sich ein Effekt von rAaStrA auf die Biofilmbildung des Stammes 5179-R1. Ab einer rAaStrA-Konzentration von 4 μM konnte eine Inhibition der Biofilmbildung um etwa 10 % nachgewiesen werden. Mit der Zugabe von 8 μM rAaStrA konnte dies nur minimal gesteigert werden. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass die Zugabe von rAaStrA die Aap-abhängigen Biofilmbildung inhibiert.

4.3.3.2 Biofilminhibition durch Zugabe von anti-rAaStrA-Antiserum

Um einen weiteren Beleg für die direkte funktionale Beteiligung von AaStrA in der Biofilmbildung zu erhalten, wurde untersucht, ob anti-rAaStrA-Antiserum einen spezifischen Effekt auf die Biofilmbildung der Stämme *S. epidermidis* 5179-R1 und 1457 hat.

Hierzu wurden Biofilmassays wie in Kap. 3.2.2.7 beschrieben durchgeführt, jedoch wurde bei der Durchführung der Hauptkultur in den Mikrotiterplatten das TSB mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen von anti-rAaStrA-Antiserum (0-1:800) supplementiert. Als Kontrollen dienten das vor der Immunisierung erhaltene Präimmunsrum und das anti-rDomäne-B-Antiserum, welche beide in denselben Verdünnungsstufen eingesetzt wurden.

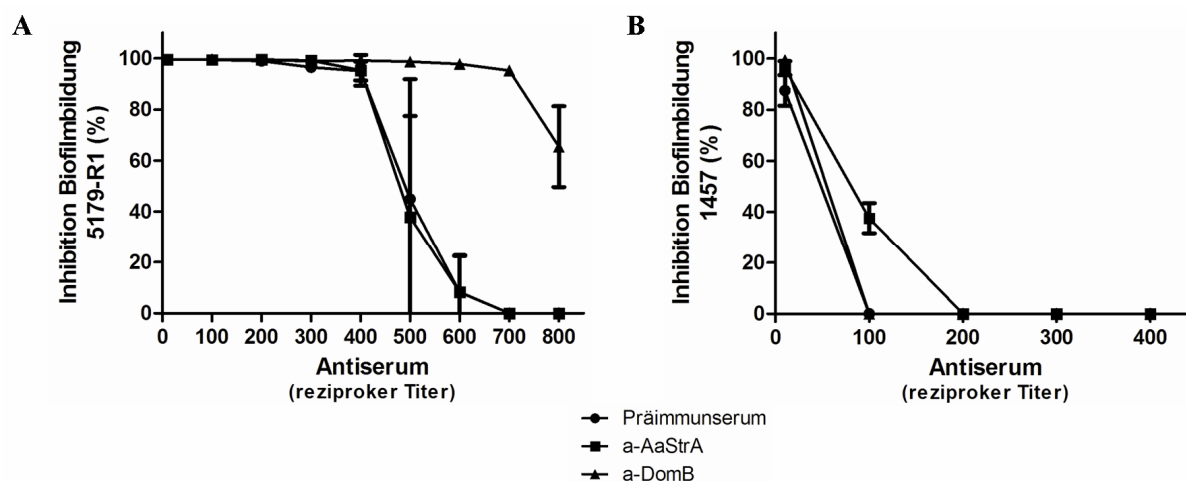


Abb. 19: Einfluss von anti-rAaStrA-Antiserum auf die die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 5179-R1 (Aap-abhängiger Biofilm) und *S. epidermidis* 1457 (PIA-abhängiger Biofilm) im Rahmen eines Biofilmassays. Dem wachsenden Biofilmen wurde anti-rAaStrA-Antiserum in geometrischen Verdünnungsstufen von 0-1:800 zugesetzt. Die Biofilme wurden mit Kristallviolett angefärbt und die Absorption bei 570 nm (Referenz A_{405}) gemessen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert und der Standardabweichung (Fehlerbalken) von 3 unabhängigen Experimenten (≈ 4 gemessener Kavitäten). Die Inhibition wurde nach folgender Formel berechnet: $(1 - A_{570} \text{ mit Antiserum} / A_{570} \text{ ohne Antiserum}) \times 100$.

Ähnlich den Ergebnissen von Rohde et al. (65) konnte auch hier ein spezifischer Einfluss von anti-rDomäne-B-Antiserum auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 5179-R1 beobachtet werden (Abb. 19 A). Bis zu einer Serumverdünnung von 1:700 konnte der Biofilm um nahezu 100 % inhibiert werden. Auf den Biofilm von 1457 zeigte dieses Antiserum jedoch keine signifikante Wirkung (Abb. 19 B). Durch anti-rAaStrA-Antiserum konnte bis zu einer Verdünnung von 1:400 eine fast 100 %-ige Biofilminhibition bei 5179-R1 erreicht werden. Erst ab einer Verdünnung von 1:700 konnte kein Effekt mehr beobachtet werden (Abb. 19 A). Bei 1457 konnte der Biofilm durch einen 1:10 Verdünnungsschritt um 100 % inhibiert werden, doch schon ab einer Verdünnung von 1:100 (38 % Inhibition) konnte kaum noch eine Wirkung erzielt werden (Abb. 19 B). Dies lässt vermuten, dass das anti-rAaStrA-Antiserum besonders bei 5179-R1 in der Lage ist, an die für die Biofilmbildung relevanten Bindungsstellen zu binden und somit die interzelluläre Aggregation zu stören. Allerdings wurde derselbe Effekt auch mit dem Präimmunserum erhalten, das als Negativkontrolle dienen sollte. Daher lässt sich der beobachtete Effekt nicht spezifisch auf die Anwesenheit von anti-rAaStrA-Antikörpern im Immunserum zurückführen. Es wird vermutet, dass durch das Präimmunserum Bindungsstellen unspezifisch abgesättigt werden.

4.3.3.3 Genetische Untersuchung zur Funktion von AaStrA bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung

Um zusätzlich zu den oben geschilderten phänotypischen Untersuchungen Evidenz für die funktionelle Beteiligung von AaStrA an der *S. epidermidis* Biofilmbildung zu erhalten, sollte eine definierte *aastra knock out* Mutante durch allelen Genaustausch generiert werden. Um die Spezifität möglicher phänotypischer Änderungen zu überprüfen, sollte zudem ein Plasmidkonstrukt zur *in trans* Expression von AaStrA erstellt werden.

4.3.3.4 Herstellung einer spezifischen *aastra knock out* Mutante durch homologe Rekombination

Die homologe Rekombination, auch bezeichnet als alleler Genaustausch, wurde zur Konstruktion einer *aastra knock out* Mutante verwendet. Wünschenswert wäre eine Mutation des *ica*-negativen, *aap*- und *aastra*-positiven Stammes *S. epidermidis* 5179 gewesen, der

jedoch durch das Fehlen der proteolytischen Prozessierung von Aap einen biofilmnegativen Phänotyp aufweist. Da sich dieser Bakterienstamm jedoch genetisch nicht manipulieren lässt, wurden die Stämme *S. epidermidis* 1585 und 1457 gewählt. Bei 1585 handelt es sich um einen bereits biofilmnegativen, *ica*- und *aap*-negativen, jedoch *aastra*-positiven Stamm, der aus einer Portinfektion isoliert wurde (61). 1457 hingegen ist ein biofilmpositiver, *ica*- und *aastra*-positiver Stamm, gewonnen aus einem Blutkulturisolat (82,83).

In dieser Arbeit wurde nach folgendem Prinzip verfahren (Abb. 20). Das Gen *aastra* sollte durch eine Erythromycin-Kassette (EK) ersetzt werden, die als Resistenzmarker positiver Klone dienen sollte. Flankiert wurde dieser DNS-Abschnitt durch Gensequenzen, die homolog zu den angrenzenden Genabschnitten im 5'- und 3'-Bereich des *aastra*-Gens waren (5'-Frag bzw. 5F, 3'-Frag bzw. 3F). Dieses Konstrukt wurde in den *shuttle* Vektor pBT2 kloniert, einem Temperatur-sensitiven Vektor mit einem *vegII*-Promotor, der speziell zur Inaktivierung chromosomaler Gene konstruiert wurde (86).

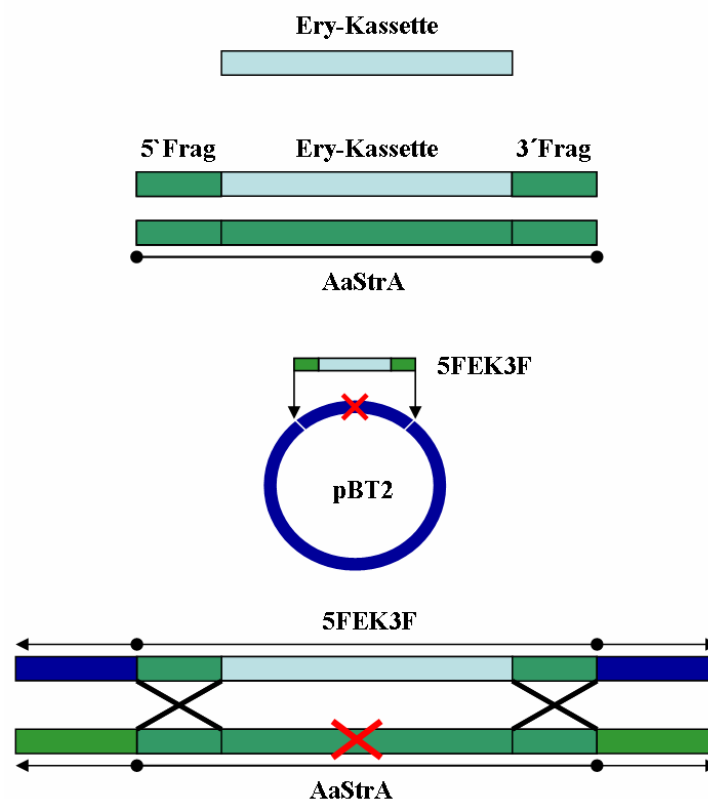


Abb. 20: Graphische Darstellung der Konstruktion einer *AaStrA* knock out Mutante unter Verwendung des *shuttle* Vektors pBT2. Zur Selektion des Gen knock outs soll *aastra* durch eine Erythromycin-Kassette (Ery-Kassette) ersetzt werden. Die Resistenzkassette wird flankiert von DNS-Fragmenten (Frag), die homolog zu den Genabschnitten vor (5'Frag) und hinter (3'Frag) *aastra* sind. Das fertige Konstrukt wird über Restriktionsschnittstellen in den thermosensitiven Vektor pBT2 eingebracht. Nach erfolgter Phagentransduktion des Plasmids in die Stämme *S. epidermidis* 1585 und 1457 werden positive Klone unter Zugabe von Erythromycin in das Medium und unter Erhöhung der Temperatur von 30 °C auf 45 °C unter Stress gesetzt. Dadurch soll ein Genaustausch über die homologen Sequenzen und somit der knock out von *aastra* erwirkt werden.

Leider konnte trotz verschiedenster Versuchsansätze, in denen unter anderem die Konzentration des Antibiotikums, die Temperatur und das Medium verändert wurden, keine Mutante erhalten werden, bei welcher selektiv durch zwei *crossing-over* Ereignisse die Resistenzkassette in das Chromosom integriert worden war. Alle Mutanten, die gefunden wurden, wuchsen unter nicht-permissiven Bedingungen sowohl auf nur Erythromycin- wie auch Erythromycin- und Chloramphenicol-haltigen Nährböden. Dies zeigt, dass bei diesen Mutanten durch ein einfaches *crossing-over* Ereignis das Plasmid in das Chromosom ko-integriert worden war.

4.3.3.5 Einfluss einer *in trans* Überexpression von *aastra* auf die Biofilmbildung

Durch die *in trans* Expression von *aastra* in genetisch unabhängigen, biofilmbildungsfähigen *S. epidermidis* Stämmen und in *S. carnosus* TM300 sollte untersucht werden, ob durch eine Überexpression von *aastra* eine Induktion der Biofilmbildung erzielt werden kann.

Dazu wurde *aastra* in den Expressionsvektor pRB474 (86) kloniert (Abb. 21) und durch Phagentransduktion in die Stämme *S. epidermidis* 1457-M10, biofilmbildungsfähig durch eine Tn917-Insertion in *icaA*, sowie in *S. epidermidis* 1585, *ica*- und *aap*-negativ, eingebracht. Als weiterer Ansatz wurde das Konstrukt über Protoplastentransformation in den Stamm *S. carnosus* TM300 eingebracht, um eine mögliche Abhängigkeit von AaStrA für *S. epidermidis* Oberflächenproteine zu untersuchen.

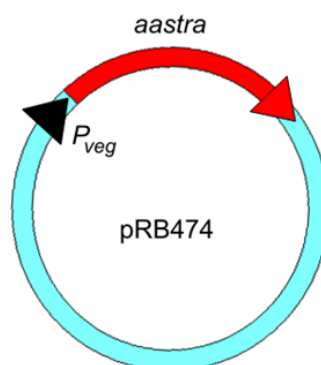


Abb. 21: Graphische Darstellung des pRB*aastra* für die Expression von AaStrA in biofilmbildungsfähigen *S. epidermidis* und *S. carnosus* Stämmen. *aastra* wurde über Restriktionsschnittstellen in den Vektor pRB474 kloniert. Dieser enthält einen *vegII*-Promoter und ist für die Proteinexpression in Staphylokokken geeignet. Das Konstrukt wurde mittels Phagentransduktion in die Stämme *S. epidermidis* 1585 und 1457-M10 und des Weiteren mittels Protoplastentransformation in den Stamm *S. carnosus* TM300 eingebracht.

Um zu untersuchen, ob und in welchen Mengen AaStrA von den erhaltenen positiven Klonen im Vergleich zu den Originalstämmen exprimiert wird, wurde zunächst ein IFT durchgeführt. Die Bakterien wurden hierzu in einer OD_{600nm} 0,3 auf IFT-Objektträgern fixiert und mit anti-rAaStrA-Antiserum und dem sekundären Alexa488-Antikörper markiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mittels des Zeiss Axioplan-Mikroskops (Carl Zeiss, Oberkochen) bei einer 1000-fachen Vergrößerung erstellt.

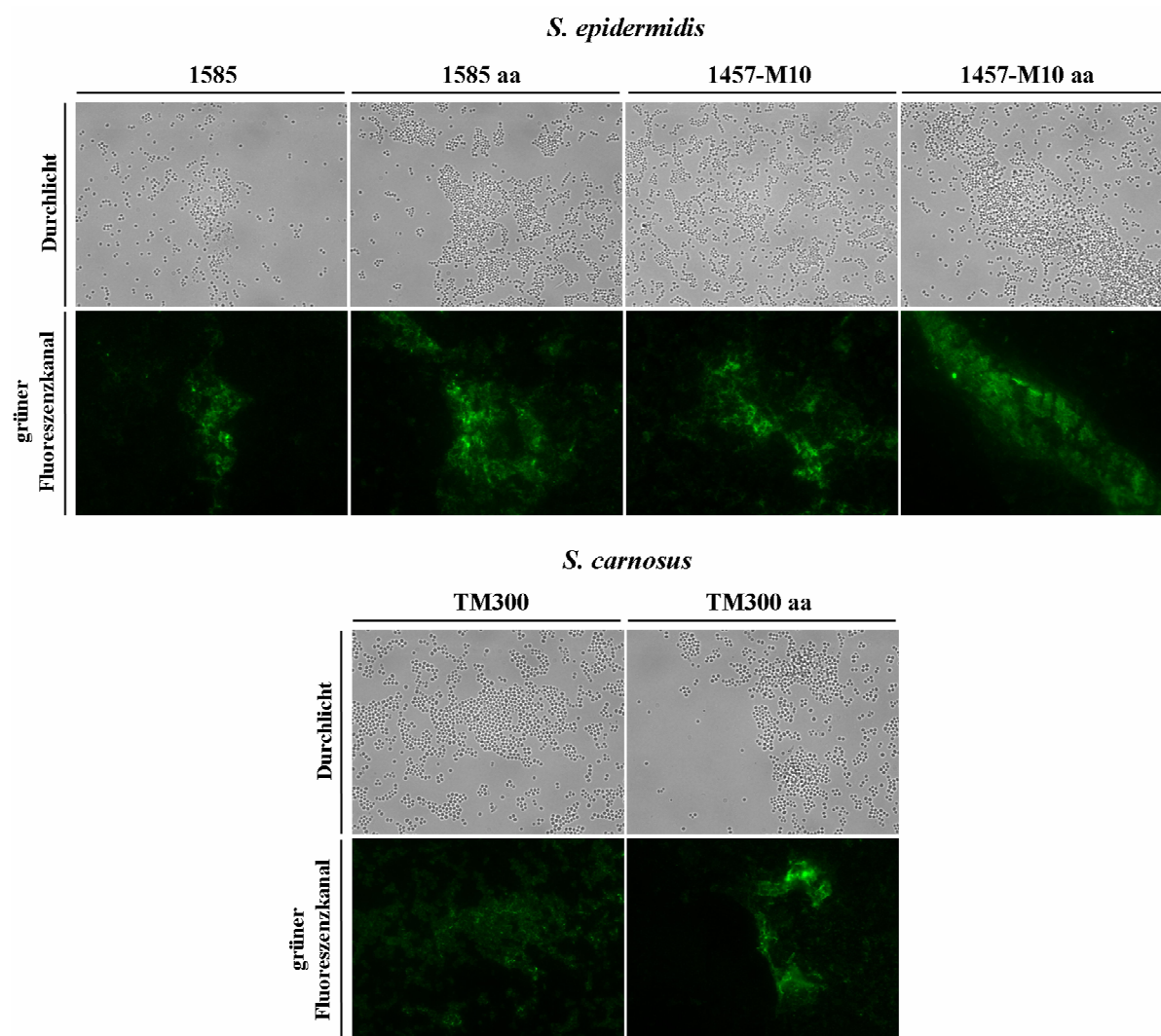


Abb. 22: Immunfluoreszenzbilder der *S. epidermidis* Stämme 1585, 1457-M10 und *S. carnosus* TM300 sowie der mit pRBaastra (aa) transformierten Klone bei einer 1000-fachen Vergrößerung. Die Bakterien wurden in einer OD_{600nm} 0,3 auf IFT-Objektträgern fixiert und anschließend mit anti-rAaStrA-Antiserum [1:1000] und dem sekundären Alexa488-Antikörper [1:200] markiert.

In allen Ansätzen wurde AaStrA auf den Bakterienoberflächen nachgewiesen werden. Ein Unterschied in der AaStrA-Konzentration zwischen den Originalstämmen *S. epidermidis* 1585 und 1457-M10 konnte dabei nicht beobachtet werden. Bei den mit pRBaastra transformierten Stämmen konnte im Vergleich zu den Originalstämmen keine

erhöhte AaStrA-Expression nachgewiesen werden. Bei *S. carnosus* TM300 konnte kein AaStrA auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Dies wurde erwartet, da es sich hier um einen *aastra*-negativen Stamm handelt (Abb. 24). Bei der Untersuchung des mit pRBaastra transformierten Stamms konnte hingegen ein positives Immunfluoreszenzsignal als Ausdruck einer AaStrA-Expression nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob dennoch quantitative Unterschiede in der AaStrA Expression bei den *S. epidermidis* Wildtyp-Stämmen sowie den mit pRBaastra transformierten Klonen nachweisbar sind, wurden Verdünnungsreihen von Oberflächenproteinpräparationen mittels Dot Blot auf das Vorhandensein von AaStrA untersucht.

Pro Verdünnung wurden 5 µl der jeweiligen Proteinpräparation auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Zur Kontrolle des Antiserums und für das Abschätzen der vorliegenden Konzentration wurde rAaStrA in Konzentrationen von 0,1-6,3 µg/ml mitgeführt. Zur Detektion wurde anti-rAaStrA-Antiserum verwendet.

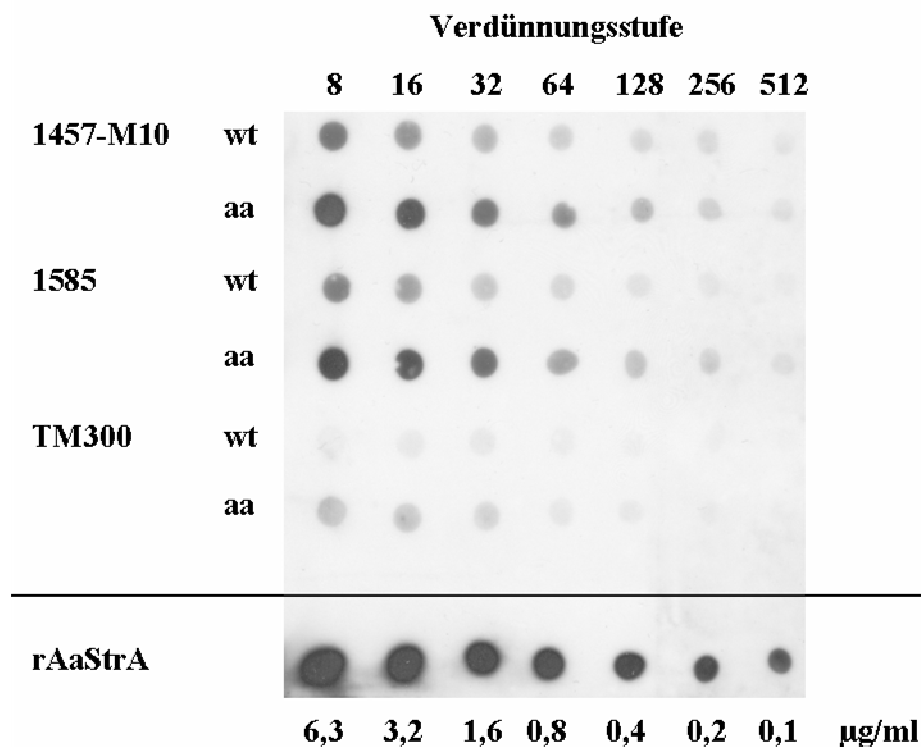


Abb. 23: Dot Blot der Oberflächenproteine der *S. epidermidis* Stämme 1457-M10, 1585 sowie *S. carnosus* TM300 sowie den mit pRBaastra (aa) transformierten Klonen. Die Proben wurden auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit anti-rAaStrA-Antiserum und an Peroxidase gekoppeltes anti-Kaninchenantiserum detektiert. Als Positivkontrolle diente rAaStrA [6,3-0,1 µg/ml]. Die Verdünnungen erfolgten in 1:2-Schritten und wurde von rechts nach links aufgetragen (Angabe als reziproker Titer).

Der Dot Blot (Abb. 23) ließ erkennen, dass sowohl 1457-M10 wt als auch 1585 wt AaStrA bilden. Bei den mit pRBaastra transformierten Stämmen konnte AaStrA jedoch bis zu einer

höheren Verdünnungsstufe (1457-M10 aa: 1:128; 1585 aa: 1:64) nachgewiesen werden. *S. carnosus* TM300 wt bildete kein AaStrA. Dies war zu erwarten, da dieser Stamm kein *aastra*-kodierendes Gen besitzt (PCR Abb. 25 A). Nach der Komplementierung mit pRBaastra konnte eine schwache AaStrA-Expression (Nachweis bis zu einer Verdünnung von 1:16) nachgewiesen werden.

Es sollte nun geprüft werden, welche Konsequenz die Überexpression von AaStrA auf die Biofilmbildung der genetisch unabhängigen Stämme nimmt. Hierzu wurden Biofilmassays der Stämme *S. epidermidis* 1457-M10, 1457-M10 pRBaastra, *S. epidermidis* 1585, 1585 pRBaastra sowie *S. carnosus* TM300 und TM300 pRBaastra durchgeführt.

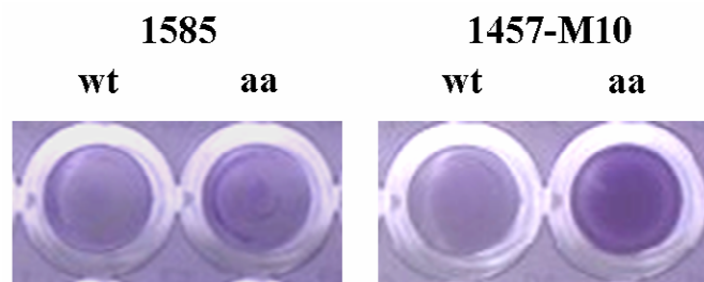


Abb. 24: Biofilmassay der Stämme *S. epidermidis* 1585 und 1457-M10 wt sowie der mit pRBaastra (aa) transformierten Klone. Die angehefteten Zellen wurden mit Kristallviolett angefärbt.

Die Untersuchung der Biofilmbildung ergab, dass die biofilmbildungsfähigen *S. epidermidis* Stämme 1457-M10 und 1585 nach der Komplementierung mit dem Vektor pRBaastra einen veränderten Phänotypen aufwiesen (Abb. 24). Während die Wildtypstämme weiterhin biofilmbildungsfähig blieben, konnte bei den *aastra*-transformierten Stämmen eine Biofilmbildung beobachtet werden.

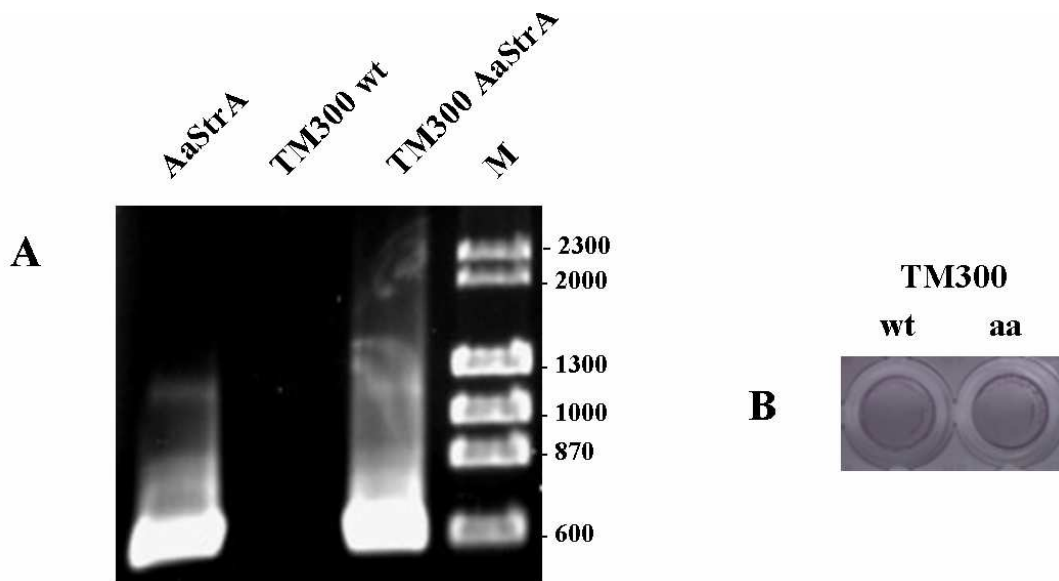


Abb. 25: Untersuchung der Stämme *S. carnosus* TM300 wt und TM300 AaStrA (komplementiert mit pRBaastra). **(A)** Elektrophorese von PCR-Amplifikate. Die PCR erfolgte mit den Primern AaStrA_for und AaStrA_rev. Als Positivkontrolle diente *aastra*. Die Amplifikate wurden auf 1,5 % Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese im Ethidiumbromidbad angefärbt. **(B)** Biofilmassay des Stammes *S. carnosus* TM300 und des mit pRBaastra transformierten Klons. Die angehefteten Zellen wurden Kristallviolett angefärbt.

S. carnosus TM300 jedoch verblieb sowohl vor als auch nach der Komplementierung mit pRBaastra biofilmmnegativ (Abb. 25 B). Da *S. carnosus* andere Oberflächenproteine als *S. epidermidis* aufweist, legen diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass AaStrA *S. epidermidis* Oberflächenproteine als Interaktionspartner benötigt, um eine Biofilmbildung zu induzieren.

5 Diskussion

S. epidermidis ist ein ubiquitär auf der Haut des Menschen vorkommendes, kommensales Bakterium, das durch die zunehmende Verwendung von Fremdmaterialien in der modernen Medizin in den letzten Jahren als herausragender Verursacher nosokomialer Infektionen erkannt wurde. Die Pathogenität des ansonsten harmlosen Erregers begründet sich in der Fähigkeit, einen mehrschichtigen Biofilm auf Oberflächen polymerer Kunststoffe und anderer Materialien auszubilden (52,99,100). Die Biofilmbildung läuft dabei in drei Schritten ab. Nach der primären Adhärenz an die zu besiedelnde Oberfläche kommt es zur Akkumulation der Zellen und zur Reifung zu einem differenzierten Biofilm, bevor in einem letzten Schritt einige planktonische Bakterien freigesetzt werden, die an anderer Stelle wiederum einen Biofilm ausbilden können (29). Während der Reifung des Biofilms werden die Zellen, die in keinem direkten Kontakt zur Oberfläche stehen, durch interzelluläre Adhäsion im Bakterienverband gehalten. Diese wird neben dem interzellulären Polysaccharid-Adhäsın (PIA) auch durch Proteine realisiert. In dieser Arbeit war dabei besonders das Akkumulations-assoziierte Protein (Aap) von Interesse, das in prozessierter Form über die Domäne-B Biofilmbildung vermittelt. Erste Hinweise für die funktionelle Beteiligung der Aap Domäne-B konnte aus Experimenten abgeleitet werden, in denen der Einfluss der Zugabe von rekombinanter Domäne-B auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 5179-R1 untersucht wurde. Es zeigte sich hier, dass durch diese Maßnahme die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 5179-R1 um bis zu 90 % konzentrationsabhängig inhibiert werden kann (62,65). Daneben konnte die *S. epidermidis* Biofilmbildung durch Aap Domäne-B-spezifische Antikörper inhibiert werden (65,101). Im Rahmen von Voruntersuchungen war es gelungen, mittels eines Affinitätschromatographie-basierten Ansatzes zwei putative Aap-Interaktionspartner aus Oberflächenproteinpräparationen von *S. epidermidis* aufzureinigen. Bei einem dieser Proteine handelt es sich um das *S. epidermidis* Autolysin AtlE (55). Daneben konnte ein bisher unbekanntes 18 kDa Staphylokokkenprotein, das als Aap-assoziiertes *Staphylococcus epidermidis* Adhäsın (AaStrA) bezeichnet wurde, als putativer Aap Domäne-B-Interaktionspartner identifiziert werden. Aufbauend auf diese Vorarbeiten sollten in dieser Arbeit im Wesentlichen folgende Fragen untersucht werden: Ist AaStrA tatsächlich ein Interaktionspartner der Aap Domäne-B? Welche generellen Eigenschaften besitzt AaStrA? Welche spezifische Rolle spielt AaStrA in der *S. epidermidis* Biofilmbildung?

5.1 Handelt es sich bei AaStrA um einen Aap Domäne-B-bindenden Interaktionspartner?

Für viele bakterielle Proteine konnte nachgewiesen werden, dass sie die Autoaggregation von Zellen über eine homophile Proteininteraktion vermitteln. Dieser Mechanismus wurde zum Beispiel für das Protein H von *S. pyogenes* (102), das Oberflächen-exponierte Hämagglutinin von *B. pertussis* (103) und Antigen 43 (104), das an der *E. coli* Biofilmbildung beteiligt ist, beschrieben. Formal können bakterielle Oberflächenproteine mittels homotyper oder heterotyper Interaktion die Wechselwirkung zwischen benachbarten Bakterienzellen realisieren. Kürzlich gelang es Conrady *et al.* (66) durch Einsatz von biophysikalischen und biochemischen Methoden nachzuweisen, dass die B-Domäne von Aap homotype Wechselwirkungen eingeht. Diese sollen nach den Ergebnissen dieser Gruppe auch funktionell für die Ausbildung eines Biofilms von Bedeutung sein.

Im Rahmen der Voruntersuchungen konnte keine Evidenz für die Existenz dieser homotypen Interaktionen dargestellt werden. Vielmehr war es gelungen, präliminär die Existenz heterotyper Interaktionen zu beschreiben. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten geben klare Evidenz, dass AaStrA tatsächlich ein spezifischer Interaktionspartner der Aap Domäne-B ist. Generell konnte die Wechselwirkung von rekombinant exprimiertem AaStrA (rAaStrA) und rekombinant exprimierter Domäne-B (rDomäne-B) im Dot-Liganden Bindungsassay nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte durch Einsatz eines hier entwickelten ELISA, bei welchem rDomäne-B auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit rAaStrA inkubiert worden war, eine Dosisabhängigkeit dieser Wechselwirkung dargestellt werden: Je mehr rAaStrA in der wässrigen Lösung vorhanden war, desto mehr trat in Wechselwirkung mit der an der Oberfläche gebundenen rDomäne-B und ließ sich dort mittels eines AaStrA-spezifischen Kaninchenantiseraums nachweisen. Diese Bindung konnte konzentrationsabhängig durch Präinkubation mit rekombinantem AaStrA inhibiert werden. Somit erscheint es zum jetzigen Zeitpunkt möglich, dass die Aap Domäne-B über mindestens zwei definierte Interaktionspartner verfügt: AaStrA und die Domäne-B selbst. Weitere Untersuchungen müssen die Existenz weiterer Partner, vor allem des AtlE, verifizieren.

Ein zentraler Aspekt der Untersuchung von Conrady *et al.* (66) war der Nachweis, dass die homotype Interaktion der Domäne-B Zink-abhängig erfolgt. In der Folge wurde die Vermutung geäußert, dass es sich bei den repetitiven, sogenannten G5-Domänen, die ein wesentliches Strukturmerkmal der Domäne-B darstellen, um Zink-bindende Domänen

handelt. Hieraus wurde abgeleitet, dass die homotype Dimerisierung von unabhängigen Domäne-B-Molekülen nach Art eines Zink-Zipper-Mechanismus ablaufen könnte. Belege für die funktionelle Bedeutung der Zink-abhängigen Dimerisierung konnte in Experimenten gewonnen werden, in welchen gezeigt wurde, dass die Biofilmbildung von *S. epidermidis* sowohl durch die Zugabe eines Zink-Chelators als auch durch aufgereinigte, einzelne G5-Domänen inhibiert werden konnte. Aus diesen Vorarbeiten wurde in dieser Arbeit die Frage aufgeworfen, ob Zinkionen auch einen Einfluss auf die Interaktion von rDomäne-B mit rAaStrA aufweist.

Erste Hinweise auf eine generelle Beeinflussung der Eigenschaften von AaStrA durch Zink waren schon im Rahmen der Optimierung der rAaStrA-Expression registriert worden. Zu Beginn der Arbeit wurde das rekombinant exprimierte AaStrA im Standardverfahren über Nickel-Säulen aufgereinigt. Es zeigte sich jedoch, dass das aufgereinigte Protein stets als Pentamer vorlag, anstelle des gewünschten Monomers. Da es sich um ein bislang unbekanntes Protein handelte, wurde angenommen, dass es sich bei dem Pentamer unter Umständen um die funktionelle Form des Proteins handeln könnte. Da der Komplex weder durch Denaturierung in SDS-haltigen Puffern gelöst werden konnte, noch eine Aufreinigung von Monomeren unter denaturierenden Bedingungen durch Zugabe von Harnstoff bzw. Guanidin-Hydrochlorid in die Aufreinigungspuffer gelang, wurde eine Umklonierung der *aastra*-Sequenz in den Vektor pDESTTM15 vorgenommen. Hierbei handelt es sich um einen Protein-Expressionsvektor mit der Sequenz für einen N-terminalen GST-Tag. Es wurde erhofft, durch diesen 26 kDa großen Tag eine Konformationsänderung des Proteins zu bewirken, um die Stabilität und Löslichkeit des Fusionsproteins zu erhöhen, so dass es als Monomer aufgereinigt werden konnte. Da aber auch dieser Ansatz nicht zu dem gewünschten Ergebnis führte, wurde versucht, HIS-markiertes AaStrA über modifizierte Säulen aufzureinigen. Es ist bekannt, dass es bei einer Proteinaufreinigung über Nickelsäulen zu einem „Auslaufen“ der Ionen von der Säule kommen kann. Die eluierten Nickelionen binden in einigen Fällen an die HIS-Tags der Zielproteine, wodurch es zur Bildung unlöslicher Komplexe kommen kann. Die Aufreinigung über mit Zinkionen beladene Säulen führte zu einer bis zu 5-fach höheren Ausbeute an Protein, das sich bei einer Kontrolle mittels SDS-PAGE und Gelchromatographie als Monomer herausstellte. Dieses Phänomen ließe sich zum Beispiel durch eine verbesserte Bindungskapazität der mit Zink beladenen Säule im Vergleich zur Nickel-beladenen Säule erklären. Diese könnte darauf beruhen, dass rAaStrA in diesem Fall nicht nur über den His-Tag, sondern auch über eine mögliche endogen Zink-bindende Aktivität an die Säulenmatrix binden kann.

Um den Einfluss von Zink auf die AaStrA-Domäne-B-Interaktion zu untersuchen, wurde Zink in Konzentrationen von 5-20 μM in den rAaStrA-rDomäne-B Interaktions-ELISA Untersuchungen eingesetzt. Dies entspricht in etwa der physiologischen Menge im humanen Blutplasma (105). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von Zink die Interaktion zwischen rDomäne-B und rAaStrA bis um das 3-fache gesteigert werden konnte. Die Verwendung von Magnesium zeigte keinerlei Auswirkungen auf die Interaktion zwischen rDomäne-B und rAaStrA. Zink hat also einen spezifischen Einfluss auf die AaStrA-Domäne-B-Interaktion und kann diese verstärken. Conrady *et al.* vermuten, dass sich die Zink-abhängige Selbstassoziation der Aap Domäne-B als eine Art Abwehrmechanismus gegen die Immunantwort entwickelt haben könnte (66). Die Zink-Konzentrationen, die die Zytokin-Freisetzung erhöhen und die Wirts-Immunantwort verstärken, reichen aus, um die Biofilmbildung von Staphylokokken zu begünstigen (106). Mastzellen, Basophile und Eosinophile besitzen große Mengen an Zn^{2+} in sekretorischen Granula, die während der Degranulation freigesetzt werden (107-109). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Verstärkung der Biofilmbildung auch im Zusammenhang mit AaStrA sein. Die genaue Stöchiometrie der Interaktion, das heißt wie viele AaStrA-Moleküle für die Interaktion mit der Aap Domäne-B benötigt werden, bzw. wie viele Zn^{2+} -Ionen daran beteiligt sein könnten, muss dabei in Zukunft noch genauer geklärt werden (Abb. 26). Hierbei wäre die Analyse der Kristallstruktur der einzelnen Moleküle und des gebildeten Komplexes hilfreich. Die Berechnung der Bindungskonstante könnte dabei weitere Informationen über die Stabilität des AaStrA-Domäne-B-Komplexes liefern. Auch weitere Analysen über eine optimierte analytische Gelchromatographie könnten weiteren Aufschluss darüber geben.

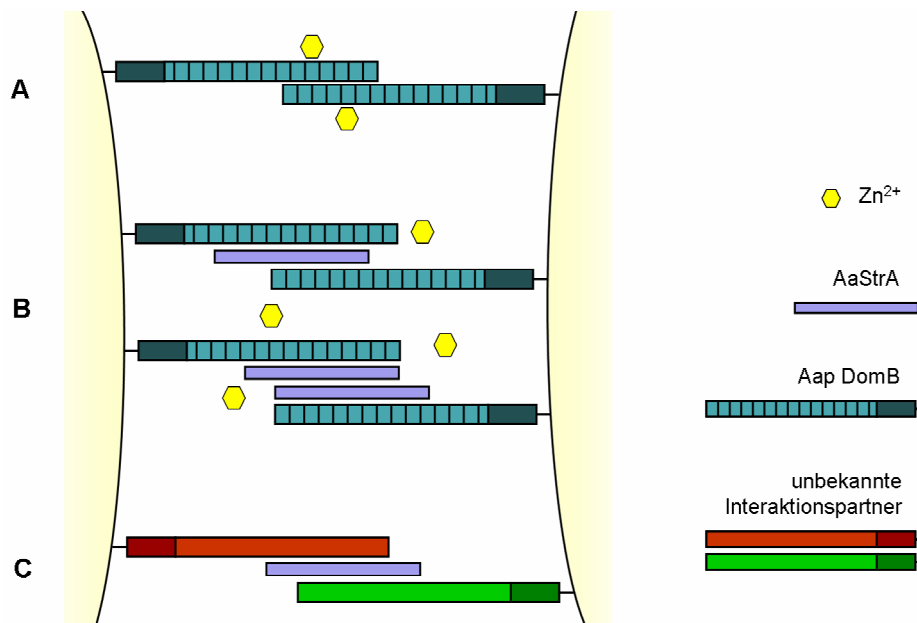


Abb. 26: Modell der interzellulären Adhäsion im Staphylokokken Biofilm. Verschiedene Modelle können auf dem Boden bisheriger Untersuchungen entwickelt werden. (A) Zink-vermittelte Selbstassoziation zweier Aap Domäne-B-Moleküle. (B) AaStrA-vermittelte Interaktion zweier Aap Domäne-B-Moleküle. Hierbei ist derzeit die Stöchiometrie und Organisation des AaStrA – Domäne-B-Komplexes und die Relevanz von Zinkionen offen. (C) AaStrA-vermittelte Interaktion zweier unbekannter Interaktionspartner.

Alignment-Untersuchungen ergaben, dass G5-Domänen bei Bakterien weit verbreitet unter den Zelloberflächen-bindenden Proteinen sind (110,111). In vielen Fällen sind sie mit Domänen assoziiert, die eine bekannte enzymatische Funktion besitzen. Dies führte zu der Annahme, dass eine Rolle der G5-Domäne die Direktionierung von Proteinen zu spezifischen subzellulären Kompartimenten sein könnte. Eine weitere mögliche Funktion könnte die allosterische Regulation der Enzymdomäne beziehungsweise eine Art Co-Faktor-Bindung daran sein (112). Es zeigte sich auch, dass die Anzahl der G5-Domänen (*repeats*) in der Aap Domäne-B eine entscheidende Rolle in der Zellaggregation spielen. So konnten Macintosh *et al.* (113) zeigen, dass mit steigender Anzahl an B-*repeats* eine stärkere Adhäsion an Corneozyten stattfand, was eine zusätzliche Funktion der Domäne-B in der Verstärkung der Domäne-A-abhängigen Adhärenz an die Haut vermuten lässt. Conrady *et al.* (66) konnten weiterhin zeigen, dass für die korrekte, funktionelle Faltung der rekombinant exprimierten Domäne-B der halbe B-*repeat* am C-Terminus vorhanden sein muss. Dies führte zu der Frage, ob die Anzahl der G5-Domänen auch einen Einfluss auf die AaStrA-Domäne-B-Interaktion haben, bzw. welcher Abschnitt von AaStrA genau für die Bindung an die Aap Domäne-B verantwortlich ist. Hierzu wurde AaStrA in vier Genabschnitte (AaStrA-Fragmente AF 1-4) geteilt und ebenso wie die Sequenz für einen Domäne-B-*repeat* (ASR, *aap single repeat*) jeweils in den Vektor pDESTTM17 kloniert. Ziel war es, die einzelnen Abschnitte zu exprimieren, aufzureinigen und anschließend in Protein-Protein-Interaktionsassays zu

untersuchen. Leider ist es im Laufe dieser Arbeit nicht gelungen, Protein-exprimierende Klone zu erhalten. Es ist denkbar, dass die Proteinfragmente, die eine Größe von 5-14 kDa haben, insgesamt zu klein sind, um über den ebenfalls kurzen 6x-HIS-Tag mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt zu werden. Weitere Versuchsansätze könnten darin bestehen, die Fragmente an einen GST-Tag zu koppeln, der wesentlich größer ist und somit leichter aufgereinigt werden kann. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, die Proteininteraktionen über ein *Yeast-two-hybrid*-System zu testen. Diese Methode hätte zum Vorteil, dass alle Proteine gleichzeitig unter *in vivo*-ähnlichen Verhältnissen untersucht werden und potentielle Interaktionen direkt sichtbar gemacht werden könnten.

5.2 Allgemeine Charakteristika von AaStrA

Bei AaStrA handelt es sich um ein vergleichsweise kleines Protein bestehend aus 170 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 18 kDa, das mit einem theoretischen pI von 9,98 extrem basisch ist. Zu Beginn wurde davon ausgegangen, dass AaStrA ein Wachstumsphasen-abhängiges Expressionsprofil aufweist. In einer quantitativen *real-time* RT-PCR-Untersuchung konnte jedoch gezeigt werden, dass AaStrA in allen bakteriellen Wachstumsphasen gleichmäßig stark exprimiert wird. Die Menge des exprimierten Proteins unterschied sich dabei jedoch in den klonal unabhängigen Stämmen (Franke, Burdelski, Rohde, unveröffentlichte Daten). Die Vermutung, dass es sich bei AaStrA um ein Oberflächen-assoziiertes Protein handelt, konnte hier mittels differentieller Präparation von Proteinen aus unterschiedlichen Kompartimenten (Überstand, Zellwand-assoziiert, Zellwandgebunden, intrazellulär) bestätigt werden. Nach der Expression wird AaStrA aus der Bakterienzelle sezerniert, befindet sich dann aber nicht präferentiell im Kulturüberstand, sondern in der Fraktion Zellwand-assoziiierter Proteine. Dies spricht dafür, dass AaStrA nach Freisetzung in den extrazellulären Raum zurück an die Zelloberfläche bindet. Ein Nachweis von AaStrA auf der Bakterienoberfläche selbst konnte mittels ELISA-Untersuchungen nicht erbracht werden. Die dafür auf einer Polystyren-Oberfläche immobilisierten *S. epidermidis* Stämme wurden mit anti-rAaStrA-Antiserum inkubiert, welches jedoch ebenfalls unspezifische Bindungen an die Bakterienoberfläche sowie an die Polystyrenoberfläche aufwies. Daher wurden die ELISA-Untersuchungen *vice versa* durchgeführt. Dabei wurden Polystyren-Mikrotiterplatten verwendet, die in unbehandelter Form keine bakterielle Bindung an die Oberfläche unterstützen. Nach der Beschichtung der Oberflächen mit rAaStrA zeigte

sich jedoch, dass die biofilmpositiven Stämme *S. epidermidis* 5179-R1 und 1585-Ra einen Biofilm ausbildeten, während auf den Kontrolloberflächen keine Biofilmbildung beobachtet werden konnte. Da die Ausbildung eines Biofilms von der festen Bindung von *S. epidermidis* an die Oberfläche abhängt, kann aus diesen Beobachtungen geschlossen werden, dass es tatsächlich zu einer Bindung der *S. epidermidis* Oberfläche an rAaStrA kommt.

Durch diese Eigenschaft weist AaStrA funktionelle Charakteristika auf, die typischerweise bei Proteinen der sogenannten SERAM-Gruppe (*secretable extended repertoire adhesive molecules*) gefunden werden können (114). Obwohl die Proteine, die der SERAM-Gruppe zugesprochen werden, häufig strukturell unterschiedlich sind und keinerlei Homologien untereinander aufweisen, besitzen sie doch gemeinsame charakteristische Eigenschaften. Sie binden adhäsive Wirtsfaktoren und/oder vermitteln die bakterielle Adhäsion an Wirtsmoleküle, Zellen oder Gewebe. Ebenso interagieren sie mit einer großen Vielzahl an Wirtsliganden, wobei sie einige Eigenschaften miteinander teilen, mit denen sie störend in die Immunabwehr des Wirts eingreifen können. Zu den bekanntesten Proteinen der SERAM-Gruppe gehören unter anderem das extrazelluläre Fibrinogen-bindende Protein (Efb, *extracellular fibrinogen binding protein*), das extrazelluläre Matrix-bindende Protein (Embp, *extracellular matrix binding protein*) und das extrazelluläre Adhärenzprotein (Eap, *extracellular adherence protein*). Eap ist ein 60-72 kDa großes Protein, das in variierenden Größen in 96 % aller klinischen *S. aureus* Isolate, jedoch nicht in *S. epidermidis* Isolaten nachgewiesen werden konnte (115). Es ist ein sehr saures Protein, dem das typische LPXTG-Motiv fehlt, welches die Verankerung des Proteins in der Bakterienzellwand vermittelt. Dennoch kann Eap nach der Sekretion an die Bakterienoberfläche zurückbinden. Dies wird durch Interaktionen zwischen Eap und Komponenten der Bakterienoberfläche, wie zum Beispiel einer neutralen Phosphatase (116), Teichonsäuren (117) bzw. durch die Selbstassoziation von Eap bewerkstelligt. Eine Rolle von Eap bei der *S. aureus* Biofilmbildung wurde bislang noch nicht beschrieben. Vielmehr stand in den bisher veröffentlichten Arbeiten vor allem die Fähigkeit des Proteins im Vordergrund, mit einer Vielzahl von extrazellulären Matrixproteinen wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, Kollagen und Elastin zu interagieren (118). Eine weitere besondere Eigenschaft des Proteins ist die Bindung an das endotheliale Zelladhäsionsmolekül ICAM-1, wodurch die Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen und deren konsekutive Diapedese inhibiert wird (119). Wie bereits erwähnt, gibt es einige Parallelen zwischen AaStrA und den Proteinen der SERAM-Gruppe, denn obwohl es keinerlei Strukturhomologien zu den Proteinen aufweist, besitzt es doch ähnliche Funktionen. Es handelt sich hier um ein extrem basisches Protein, das

unter Umständen sowohl über seine Ladung in Wechselwirkung mit Oberflächenproteinen treten kann, als auch mit spezifischen Interaktionspartnern eine Bindung eingehen kann. Mit Hilfe eines ELISAs konnten erste Hinweise gefunden werden, dass es, parallel zu Eap, Fibrinogen und Vitronektin binden kann. Ob diese Interaktion jedoch tatsächlich auch für die primäre Adhärenz von funktioneller Bedeutung ist und AaStrA somit nicht nur in der Akkumulationsphase der Biofilmbildung eine Rolle spielt, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Eine Möglichkeit stellt hierbei die Generierung von *aastra knock out* Mutanten und deren Untersuchung in Oberflächenbindungsassays dar. Um eine solche Mutante zu erzeugen, wurde in dieser Arbeit ein Vektor konstruiert, mit dessen Hilfe *aastra* in den Stämmen *S. epidermidis* 1585 und 1457 durch homologe Rekombination und Insertion einer Erythromycin-Resistenzkassette inaktiviert werden sollte. Wünschenswert wäre ein *knock out* des Gens im *ica*-negativen, *aap*- und *aastra*-positiven Stamm *S. epidermidis* 5179 gewesen, der durch das Fehlen der proteolytischen Prozessierung von Aap einen biofilmnegativen Phänotyp aufweist. Leider lässt sich dieser Bakterienstamm nicht genetisch manipulieren. Im Rahmen dieser Arbeit war es trotz verschiedenster Versuchsansätze nicht möglich, positive *knock out* Mutanten zu erhalten. Da zur Kontrolle des *knock outs* das Gen *aastra* durch eine Erythromycin-Resistenzkassette ersetzt werden sollte, sollten positive Klone sich primär durch ihre Resistenz gegen dieses Antibiotikum hervorheben. Alle untersuchten Mutanten wiesen jedoch zusätzlich eine Resistenz gegen Chloramphenicol, dem Resistenzmarker des Vektors pBT2, auf. Es kann vermutet werden, dass lediglich Mutanten erhalten wurden, in deren Genom ein *single cross over* mit der Folge einer Kointegration des Vektors stattgefunden hat. Der zweite Schritt der homologen Rekombination, der das Entfernen des Vektors aus dem Genom beinhaltet, scheint nicht stattgefunden zu haben. Es wäre jedoch auch möglich, dass die Menge der untersuchten Klone pro Ansatz zu niedrig war. Für zukünftige Ansätze wären die weitere Variation der Antibiotikakonzentrationen und Temperaturen, sowie die Verwendung anderer Medien denkbar.

Auch die Frage, ob AaStrA ebenso wie Eap immunmodulatorische, antiinflammatorische Eigenschaften besitzt, wird zukünftig von großem Interesse sein. Dies würde auch zum Verständnis dazu beitragen, weshalb *S. epidermidis* als kommensaler Erreger auf der menschlichen Haut persistieren kann. Die Tatsache, dass in 69 der 70 untersuchten klinischen *S. epidermidis* Stämme *aastra* im Genom nachgewiesen werden konnte, weist auf eine größere biologische Relevanz dieses Proteins bei der Kolonisation der menschlichen Haut bzw. bei Infektionen hin. Die Biofilmbildung dieser klinischen Isolate beruht dabei auf verschiedenen Mechanismen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass AaStrA nicht

zwangsläufig auf ein Aap-abhängiges System angewiesen zu sein scheint, sondern auch eine Rolle in PIA-, Embp oder Bap-abhängigen Biofilmen spielen könnte. Inwiefern *aastra* dabei einer Regulation durch ein *quorum sensing*-System oder anderer Regulatoren unterliegt (34,69,70,79), ist bisher unbekannt.

5.3 Welche Bedeutung hat AaStrA für die *S. epidermidis* Biofilmbildung?

Die Tatsache, dass *aastra* im Genom klinischer *S. epidermidis* Isolate weit verbreitet ist, deutet darauf hin, dass dieses Protein durchaus eine größere Bedeutung für die *S. epidermidis* Biofilmbildung haben könnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass rAaStrA ab einer Konzentration von 2 μ M die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 5179-R1 ebenfalls um bis zu 12 % inhibiert. Eine Inhibition des Stammes *S. epidermidis* 1457 konnte nicht festgestellt werden. Diese Diskrepanz kann auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass *S. epidermidis* 1457 einen PIA-abhängigen Biofilm ausbildet (51,120), bei dem AaStrA nicht notwendiger Weise eine Rolle spielt. Die Inhibition des Aap-abhängigen Biofilms von Stamm 5179-R1 weist darauf hin, dass AaStrA hier eine funktionelle Bedeutung haben könnte. Die Hemmung des Biofilms ließe sich zum Beispiel über die Absättigung funktionell relevanter Oberflächenstrukturen durch exogenes rAaStrA erklären, die dann nicht mehr für die Akkumulation der Zellen zur Verfügung stehen.

Die funktionelle Bedeutung von AaStrA für die Aap-abhängige Biofilmbildung des Stamms 5179-R1 konnte in weiteren Experimenten validiert werden, bei welchen der Einfluss von anti-rAaStrA-Antiserum auf die Biofilmbildung untersucht wurde. Rohde *et al.* (65) konnten bereits nachweisen, dass durch die Zugabe von anti-rDomäne-B-Antiserum die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 5179-R1 inhibiert werden kann. Dieser Befund konnte hier auch mit einem unabhängig gewonnenen anti-rDomäne-B-Antiserum reproduziert werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass anti-rDomäne-B-Antiserum selbst bei hohen Verdünnungsstufen (Verdünnung bis 1:800) die Biofilmbildung von 5179-R1 inhibiert. Dieses Antiserum hemmte die Biofilmbildung des Stamms 1457 jedoch nur bis zu einer Verdünnung von 1:10. Das anti-rDomäne-B-Antiserum bindet an die adhäsiven Oberflächenstrukturen des Stammes 5179-R1, speziell an das prozessierte Aap, und verhindert so eine Akkumulation der Bakterienzellen über diese. Der Einfluss auf den Stamm 1457 ist geringer, da es sich hier um einen PIA-vermittelten Biofilm handelt, in dem die Aap Domäne-B keine signifikante Rolle spielt. Das anti-rAaStrA-Antiserum inhibierte den

Biofilm von 5179-R1 bis zu einer Verdünnung von 1:600 und den Biofilm von 1457 bis zu einer Verdünnung von 1:150. Der Einfluss von anti-rAaStrA-Antiserum auf den Biofilm des Stammes 5179-R1 ist ein erneuter Hinweis darauf, dass es sich bei AaStrA um einen Interaktionspartner der Aap Domäne-B handelt, da es, ebenso wie das anti-rDomäne-B-Antiserum, an die adhäsive Domäne-B des prozessierten Aaps auf der Oberfläche zu binden scheint und somit die Biofilmbildung inhibiert. Allerdings lässt die Teilinhibition des Biofilms von *S. epidermidis* 1457 auch den Schluss zu, dass AaStrA auch bei der PIA-abhängigen Biofilmbildung funktionell beteiligt sein könnte.

Vorversuche ergaben, dass durch die Zugabe von rekombinantem AaStrA zu wachsenden, biofilmmnegativen *S. epidermidis* Kulturen eine Biofilmbildung induziert werden konnte (Burdelski, Rohde, unveröffentlichte Daten). Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von rAaStrA zu den biofilmmnegativen *S. epidermidis* Stämmen 5179 (*aap*-positiv) und 1585 (*aap*-negativ) konzentrationsabhängig zur Ausbildung eines Biofilms führte. Hieraus kann die Vermutung abgeleitet werden, dass AaStrA unabhängig von Aap als interzelluläres Adhäsion aktiv ist. Diese Vermutung konnte durch *in trans* Expressionsversuche erhärtet werden. Durch die Überexpression von AaStrA in den vormals biofilmmnegativen Stämmen *S. epidermidis* 1457-M10 (Tn917-Insertion in *icaA*) und 1585 (*ica*- und *aap*-negativ) konnte ein biofilmpositiver Phänotyp induziert werden. Für die Fähigkeit von AaStrA, auch unabhängig von Aap Biofilmbildung zu vermitteln, scheinen jedoch *S. epidermidis*-spezifische Oberflächenfaktoren notwendig zu sein. Diese Hypothese kann aus der Beobachtung abgeleitet werden, dass die *in trans* Expression von AaStrA in dem *aap*-negativen Surrogatwirt *S. carnosus* TM300 nicht zu einem biofilmpositiven Phänotyp führte. Um die Rolle spezifischer *S. epidermidis* Oberflächenproteine für die Wechselwirkung mit AaStrA näher zu beschreiben, ist die Generierung einer spezifischen *knock out* Mutante vordringliches Ziel. Rohde *et al.* (65) klonierten den Vektor pR*Baap*_T in den biofilmmnegativen *S. epidermidis* Stamm 1585. Mit Hilfe dieses Vektors wurde Aap Domäne-B konstitutiv exprimiert und somit ein biofilmpositiver Phänotyp erzeugt. Hier stellt sich nun die Frage, ob der *aastra*-positive *S. epidermidis* 1585 nach einem gezielten Ausschalten des *aastra*-Gens nach der Komplementation mit dem Vektor pR*Baap*_T ebenfalls biofilmpositiv wird, oder ob er biofilmmnegativ verbleibt. Wäre letzteres der Fall, ist dies ein weiterer Hinweis dafür, dass AaStrA eine entscheidende Rolle in der *S. epidermidis* Biofilmbildung einnimmt. Wie AaStrA tatsächlich in einem Biofilm angeordnet ist und welche Bedeutung es in der Dynamik der Biofilmbildung einnimmt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Hierbei könnte die Isolation des AaStrA-Domäne-B-Komplexes aus dem „lebenden“ Biofilm, sowie die

Analyse der räumlichen Anordnung von AaStrA mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie von Interesse sein.

Die detaillierte Erforschung der Staphylokokken ist aus medizinischer Sicht besonders für die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes von Interesse. Infektionen mit Staphylokokken stellen eine enorme Belastung für das öffentliche Gesundheitssystem dar, besonders seit hochvirulente *S. aureus* Stämme auftreten, die sich nicht nur nosokomial unter Immunsupprimierten Menschen verbreiten können, sondern auch gesunde Menschen außerhalb eines Krankenhauses infizieren können (121). Diese gesellschaftsassozierten Stämme verbinden eine enorme Virulenz mit Antibiotika-Resistenzen (CA-MRSA, *community-associated methicillin-resistant S. aureus*). Die Resistenz gegen Methicillin und andere Antibiotika ist auch unter Koagulase-negativen Staphylokokken wie *S. epidermidis* weit verbreitet (122,123). So kann bei vielen Infektionen mit hoch-resistenten Staphylokokken nur noch Vancomycin eingesetzt werden. Daher erscheint die Entwicklung eines Impfstoffes sinnvoll, zumal eine Impfung kaum Resistenzen hervorzurufen vermag und die Möglichkeit zur Prophylaxe bietet (124). Leider stellte sich in den vergangenen Jahren die Identifikation geeigneter Impfantigene als äußerst schwierig heraus. Dies mag damit zu begründen sein, dass viele Staphylokokken-Stämme als Kommensale auf der menschlichen Haut vorkommen und somit das Immunsystem in einem ständigen Kontakt mit Staphylokokken-Antigenen steht. Weiterhin schützt zum Beispiel das von *S. aureus* produzierte Protein A das Bakterium vor der humoralen Immunantwort (125) und auch die Bildung von Biofilmen könnte dazu führen, dass nicht nur der Einsatz von Antibiotika, sondern auch der einer Impfung unwirksam wird (124). Bisher schlugen zwei vielversprechende Impfstoffe, die sich auf jeweils einen Staphylokokken-Virulenzfaktor konzentrierten, fehl (126-128). Die Tatsache, dass pathogene Staphylokokken nicht nur einen einzigen, klar definierten Virulenzfaktor aufweisen, und dass beständig neue Komponenten, wie zum Beispiel AaStrA in dieser Arbeit, entdeckt werden, die an der Pathogenität des Mikroorganismus beteiligt sind, zwingt zum Umdenken. Neuere Ansätze konzentrieren sich nun auf die Kombination systematisch ausgewählter Antigene und scheinen damit mehr Erfolg zu haben. Diese Antigene werden gewählt, weil sie entweder an der Bakterienoberfläche lokalisiert sind, in hohen Mengen produziert werden und eine Rolle in der Virulenz spielen. Unter diesen Aspekten werden derzeit MSCRAMMs und SERAMs (129-134), Polysaccharide wie z.B. PIA (135-138), Teichonsäuren (124), Kapselproteine (126,127,139-141) und auch DNS (142-146) untersucht. Der Einsatz von Impfstoffen speziell gegen *S. epidermidis* ist jedoch nicht völlig unumstritten. Die Eliminierung des kommensal

vorkommenden Bakteriums könnte die Mikroflora der Haut und der Schleimhäute signifikant stören und möglicherweise die Verbreitung pathogenerer Mikroorganismen erleichtern. Dennoch könnten Impfstoffe unter besonderen Umständen, wie z.B. nach einer Operation oder vor und nach der Implantation von medizinischen Fremdkörpern hilfreich sein, um eine Ansiedlung der Bakterien auf der Fremdkörperoberfläche, eine darauf folgende Biofilmbildung und letztendlich eine Infektion zu vermeiden.

6 Literatur

1. **Kloos, W.** 1997. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans, p. 113-137. In K. B. Crossley and G. L. Archer (eds.), *Staphylococci in Human Disease*. Churchill Livingstone, New York.
2. **Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker.** 2001. *Brock Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
3. **Wilkinson, B. J.** 1997. Biology, p. 1-38. In K. B. Crossley and G. L. Archer (eds.), *Staphylococci in Human Disease*. Churchill Livingstone, New York.
4. **Kloos, W. E., D. N. Ballard, J. A. Webster, R. J. Hubner, A. Tomasz, I. Couto, G. L. Sloan, H. P. Dehart, F. Fiedler, K. Schubert, H. de Lencastre, I. S. Sanches, H. E. Heath, P. A. Leblanc, and A. Ljungh.** 1997. Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int J Syst Bacteriol* **47**:313-323.
5. **Kloos, W. E., C. G. George, J. S. Olgiate, L. Van Pelt, M. L. McKinnon, B. L. Zimmer, E. Muller, M. P. Weinstein, and S. Mirrett.** 1998. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int J Syst Bacteriol* **48**:799-812.
6. **Lambert, L. H., T. Cox, K. Mitchell, R. A. Rossello-Mora, C. Del Cueto, D. E. Dodge, P. Orkand, and R. J. Cano.** 1998. *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. *Int J Syst Bacteriol* **48**:511-518.
7. **Probst, A. J., C. Hertel, L. Richter, L. Wassill, W. Ludwig, and W. P. Hammes.** 1998. *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. *utilis* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**:651-658.
8. **Spergser, J., M. Wieser, M. Taubel, R. A. Rossello-Mora, R. Rosengarten, and H. J. Busse.** 2003. *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:2007-2011.
9. **Takahashi, T., I. Satoh, and N. Kikuchi.** 1999. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* **49**:725-728.
10. **De Vos, P., G. M. Garrity, D. Jones, F. A. Rainy, K. H. Schleifer, and W. B. Whitman.** 2009. The Firmicutes, p. 1-1450. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
11. **Sperber, W. H. and S. R. Tatini.** 1975. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **29**:502-505.
12. **Kloos, W. E. and T. L. Bannerman.** 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:117-140.

13. **Waldvogel, F. A.** 2000. *Staphylococcus aureus* (including Staphylococcal Toxic Shock), p. 2069-2092. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (eds.), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, Philadelphia.
14. **Noble, W. C.** 1997. Staphylococcal carriage and skin and soft tissue infection, p. 401-412. In K. B. Crossley and G. L. Archer (eds.), Staphylococci in Human Disease. Churchill Livingstone, New York.
15. **Kloos, W. E. and M. S. Musselwhite.** 1975. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. Appl.Environ.Microbiol. **30**:381-395.
16. **Kloos, W. E.** 1986. Ecology of human skin, p. 37-50. In P. A. Mardh and K. H. Schleifer (eds.), Coagulase-negative Staphylococci. Almqvist and Wiksell International, Stockholm.
17. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N.Engl.J.Med. **339**:520-532.
18. **Peters, G. and G. Pulverer.** 2001. Die Familie der *Micrococcaceae*, p. 250-260. In W. Köhler, H. J. Eggers, B. Fleischer, R. Marre, H. Pfister, and G. Pulverer (eds.), Medizinische Mikrobiologie. Urban und Fischer, München.
19. **Marrie, T. J., C. Kwan, M. A. Noble, A. West, and L. Duffield.** 1982. *Staphylococcus saprophyticus* as a cause of urinary tract infections. J.Clin.Microbiol. **16**:427-431.
20. **Wallmark, G. I., I. Anemark, and B. Telander.** 1978. *Staphylococcus saprophyticus*: A frequent cause of urinary tract infections among female outpatients. J.Infect.Dis. **138**:791-797.
21. **Götz, F. and G. Peters.** 2000. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci, p. 55-88. In F. A. Waldvogel and A. L. Bisno (eds.), Infections Associated with Indwelling Medical Devices. ASM Press, Washington, D.C.
22. **Rupp, M. E. and G. L. Archer.** 1994. Coagulase-negative staphylococci: Pathogens associated with medical progress. Clin.Infect.Dis. **19**:231-243.
23. **Goldmann, D. A. and G. B. Pier.** 1993. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. Clin.Microbiol.Rev. **6**:176-192.
24. **Kotilainen, P., J. Nikoskilainen, and P. Houvinen.** 1990. Emergence of ciprofloxacin-resistant coagulase-negative staphylococcal skin flora in immunocompromised patients receiving ciprofloxacin. J.Infect.Dis. **161**:41-44.
25. **Fidalgo, S., F. Vazquez, M. C. Mendoza, F. Perez, and F. J. Mendez.** 1990. Bacteremia due to *Staphylococcus epidermidis*: microbiologic, epidemiologic, clinical, and prognostic features. Rev.Infect.Dis. **12**:520-528.
26. **Archer, G. L.** 2000. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci, p. 2092-2100. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (eds.), Principles and Practice in Infectious Diseases. Churchill Livingstone, Philadelphia.

27. **O'Grady, N. P., M. Alexander, E. P. Dellinger, J. L. Gerberding, S. O. Heard, D. G. Maki, H. Masur, R. D. McCormick, L. A. Mermel, M. L. Pearson, I. I. Raad, A. Randolph, and R. A. Weinstein.** 2002. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Clinical Infectious Diseases* **35**:1281-1307.
28. **Younger, J. J., G. D. Christensen, D. L. Bartley, J. C. Simmons, and F. F. Barrett.** 1987. Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal to clinical outcome. *J.Infect.Dis.* **156**:548-554.
29. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-1322.
30. **Chambers, H. F.** 1988. Methicillin-resistant staphylococci. *Clin.Microbiol.Rev.* **1**:173-186.
31. **Chambers, H. F.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin.Microbiol.Rev.* **10**:781-791.
32. **Otto, M.** 2004. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front.Biosci.* **9**:841-863.
33. **Mack, D., M. A. Horstkotte, H. Rohde, and J. K. M. Knobloch.** 2006. Coagulase-Negative Staphylococci, p. 109-153. *In* J. L. Pace, M. E. Rupp, and R. G. Finch (eds.), *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. CRC Press, Boca Raton.
34. **Otto, M.** 2009. *Staphylococcus epidermidis* - The 'accidental' pathogen. *Nature Reviews* **7**:555-567.
35. **Heinzelmann, M., D. O. Herzig, B. Swain, M. A. Mercer-Jones, T. M. Bergamini, and H. C. Polk, Jr.** 1997. Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **4**:705-710.
36. **Knobloch, J. K., H. Von Osten, M. A. Horstkotte, H. Rohde, and D. Mack.** 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.
37. **O'Toole, G., H. B. Kaplan, and R. Kolter.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu.Rev.Microbiol.* **54**:49-79.
38. **Ubell, M. L., J. E. Kerschner, P. A. Wackym, and A. Burrows.** 2008. MUC2 expression in human middle ear epithelium of patients with otitis media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **134**:39-44.
39. **Otto, M.** 2009. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nat.Rev.Microbiol.* **7**:555-567.
40. **Vacheethasanee, K., J. S. Temenoff, J. M. Higashi, A. Gary, J. M. Anderson, R. Bayston, and R. E. Marchant.** 1998. Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. *J.Biomed.Mater.Res.* **42**:425-432.

41. **Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters, and F. Götz.** 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol.Microbiol.* **24**:1013-1024.
42. **Tormo, M. A., E. Knecht, F. Götz, I. Lasa, and J. R. Penades.** 2005. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* **151**:2465-2475.
43. **Mazmanian, S. K., G. Liu, E. R. Jensen, E. Lenoy, and O. Schneewind.** 2000. *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections [see comments]. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:5510-5515.
44. **Navarre, W. W. and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **63**:174-229.
45. **Arrecubieta, C., M. H. Lee, A. Macey, T. J. Foster, and F. D. Lowy.** 2007. SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, binds type I collagen. *Journal of Biological Chemistry* **282**:18767-18776.
46. **Hartford, O., L. O'Brien, K. Schofield, J. Wells, and T. J. Foster.** 2001. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology* **147**:2545-2552.
47. **Heilmann, C., G. Thumm, G. S. Chhatwal, J. Hartleib, A. Uekotter, and G. Peters.** 2003. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **149**:2769-2778.
48. **Gross, M., S. E. Cramton, F. Gotz, and A. Peschel.** 2001. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect.Immun.* **69**:3423-3426.
49. **Sadovskaya, I., E. Vinogradov, S. Flahaut, G. Kogan, and S. Jabbouri.** 2005. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect.Immun.* **73**:3007-3017.
50. **Rice, K. C., E. E. Mann, J. L. Endres, E. C. Weiss, J. E. Cassat, M. S. Smeltzer, and K. W. Bayles.** 2007. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **104**:8113-8118.
51. **Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, and R. Laufs.** 1996. 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.
52. **Mack, D., H. Rohde, L. G. Harris, A. P. Davies, M. A. Horstkotte, and J. K. Knobloch.** 2006. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* **29**:343-359.
53. **Rohde, H., S. Frankenberger, U. Zähringer, and D. Mack.** 2010. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to

- Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *European Journal of Cell Biology* **89**:103-111.
54. **Gerke, C., A. Kraft, R. Süßmuth, O. Schweitzer, and F. Götz.** 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J.Biol.Chem.* **273**:18586-18593.
 55. **Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, and F. Götz.** 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol.Microbiol.* **20**:1083-1091.
 56. **Vuong, C., S. Kocianova, J. M. Voyich, Y. Yao, E. R. Fischer, F. R. DeLeo, and M. Otto.** 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J.Biol.Chem.* **279**:54881-54886.
 57. **Darby, C., J. W. Hsu, N. Ghori, and S. Falkow.** 2002. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature.* **417**:243-244.
 58. **Fluckiger, U., M. Ulrich, A. Steinhuber, G. Doring, D. Mack, R. Landmann, C. Goerke, and C. Wolz.** 2005. Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect.Immun.* **73**:1811-1819.
 59. **Wang, X., J. F. Preston, III, and T. Romeo.** 2004. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J.Bacteriol.* **186**:2724-2734.
 60. **Kogan, G., I. Sadvskaya, P. Chaignon, A. Chokr, and S. Jabbouri.** 2006. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol.Lett.* **255**:11-16.
 61. **Rohde, H., E. C. Burandt, N. Siemssen, L. Frommelt, C. Burdelski, S. Wurster, S. Scherpe, A. P. Davies, L. G. Harris, M. A. Horstkotte, J. K. M. Knobloch, C. Rangunath, J. B. Kaplan, and D. Mack.** 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**:1711-1720.
 62. **Hussain, M., M. Herrmann, C. von Eiff, F. Perdreau-Remington, and G. Peters.** 1997. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect.Immun.* **65**:519-524.
 63. **Christner, M., G. Franke, N. N. Schommer, U. Wendt, K. Wegert, P. Pehle, G. Kroll, C. Schulze, F. Buck, D. Mack, M. Aepfelbacher, and H. Rohde.** 2010. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol.Microbiol.* **75**:187-207.
 64. **Mack, D.** 1999. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J.Hosp.Infect.* **43 (Suppl)**:S113-S125.
 65. **Rohde, H., C. Burdelski, K. Bartscht, M. Hussain, F. Buck, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, C. Heilmann, M. Herrmann, and D. Mack.** 2005. Induction of

- Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol.Microbiol.* **55**:1883-1895.
66. **Conrady, D. G., C. C. Brescia, K. Horii, A. A. Weiss, D. J. Hassett, and A. B. Herr.** 2008. A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:19456-19461.
 67. **Biswas, R., L. Voggu, U. K. Simon, P. Hentschel, G. Thumm, and F. Götz.** 2006. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol.Lett.* **259**:260-268.
 68. **Qin, Z., Y. Ou, L. Yang, Y. Zhu, T. Tolker-Nielsen, S. Molin, and D. Qu.** 2007. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **153**:2083-2092.
 69. **Vuong, C., C. Gerke, G. A. Somerville, E. R. Fischer, and M. Otto.** 2003. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J.Infect.Dis.* **188**:706-718.
 70. **Vuong, C., S. Kocianova, Y. Yao, A. B. Carmody, and M. Otto.** 2004. Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. *J.Infect.Dis.* **190**:1498-1505.
 71. **Boles, B. R. and A. R. Horswill.** 2008. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS.Pathog.* **4**:e1000052.
 72. **Dubin, G., D. Chmiel, P. Mak, M. Rakwalska, M. Rzychon, and A. Dubin.** 2001. Molecular cloning and biochemical characterisation of proteases from *Staphylococcus epidermidis*. *Biol.Chem.* **382**:1575-1582.
 73. **Ohara-Nemoto, Y., Y. Ikeda, M. Kobayashi, M. Sasaki, S. Tajika, and S. Kimura.** 2002. Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. *Microb.Pathog.* **33**:33-41.
 74. **Teufel, P. and F. Götz.** 1993. Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. *J.Bacteriol.* **175**:4218-4224.
 75. **Kaplan, J. B., K. Velliyagounder, C. Rangunath, H. Rohde, D. Mack, J. K. Knobloch, and N. Ramasubbu.** 2004. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J.Bacteriol.* **186**:8213-8220.
 76. **Kaplan, J. B., C. Rangunath, N. Ramasubbu, and D. H. Fine.** 2003. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity. *J.Bacteriol.* **185**:4693-4698.
 77. **Kaplan, J. B., C. Rangunath, K. Velliyagounder, D. H. Fine, and N. Ramasubbu.** 2004. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:2633-2636.

78. **Kong, K. F., C. Vuong, and M. Otto.** 2006. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int.J.Med.Microbiol.* **296**:133-139.
79. **Young, C., M. Dürr, A. B. Carmody, A. Peschel, S. J. Klebanoff, and M. Otto.** 2004. Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. *Cell.Microbiol.*
80. **Yao, Y., C. Vuong, S. Kocianova, A. E. Villaruz, Y. Lai, D. E. Sturdevant, and M. Otto.** 2006. Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* accessory-gene regulator response: quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defense. *The Journal of Infectious Diseases* **193**:841-848.
81. **Fairweather, N., S. Kennedy, T. J. Foster, M. Kehoe, and G. Dougan.** 1983. Expression of a cloned *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin determinant in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Infect.Immun.* **41**:1112-1117.
82. **Mack, D., N. Siemssen, and R. Laufs.** 1992. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect.Immun.* **60**:2048-2057.
83. **Mack, D., J. Riedewald, H. Rohde, T. Magnus, H. H. Feucht, H. A. Elsner, R. Laufs, and M. E. Rupp.** 1999. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect.Immun.* **67**:1004-1008.
84. **Knobloch, J. K., S. Jager, M. A. Horstkotte, H. Rohde, and D. Mack.** 2004. RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infect.Immun.* **72**:3838-3848.
85. **Mack, D., H. Rohde, S. Dobinsky, J. Riedewald, M. Nedelmann, J. K. M. Knobloch, H.-A. Elsner, and H. H. Feucht.** 2000. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect.Immun.* **68**:3799-3807.
86. **Brückner, R.** 1992. A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* **122**:187-192.
87. **Birnboim, H. C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl.Acids.Res.* **7**:1513-1523.
88. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning - A laboratory manual.*
89. **Götz, F. and B. Schumacher.** 1987. Improvements of protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiology Letters* **40**:285-288.
90. **Nelson, D. and M. Cox.** 2001. *Lehninger Biochemie.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

91. **Fitzgerald, J. R.** 2007. Targeted gene disruption for the analysis of virulence of *Staphylococcus aureus*, p. 103-112. In Yinduo Ji (ed.), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) protocols. Humana Press.
92. **Christensen, G. D., W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton, and E. H. Beachey.** 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J.Clin.Microbiol.* **22**:996-1006.
93. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
94. **Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, and W. Erhardt.** 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**:255-262.
95. **Rabilloud, T., G. Carpentier, and P. Tarroux.** 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* **9**:288-291.
96. 2002. The recombinant protein handbook: protein purification and simple purification, p. 41-58. Amersham Biosciences.
97. **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.
98. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**:265-275.
99. **Götz, F.** 2002. Staphylococcus and biofilms. *Mol.Microbiol.* **43**:1367-1378.
100. **Rohde, H., D. Mack, M. Christner, C. Burdelski, G. Franke, and J. K. M. Knobloch.** 2006. Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Reviews in Medical Microbiology* **17**.
101. **Sun, D., M. A. Accavitti, and J. D. Bryers.** 2005. Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **12**:93-100.
102. **Frick, I. M., M. Morgelin, and L. Bjorck.** 2000. Virulent aggregates of *Streptococcus pyogenes* are generated by homophilic protein-protein interactions. *Mol.Microbiol.* **37**:1232-1247.
103. **Menozi, F. D., P. E. Boucher, G. Riveau, C. Gantiez, and C. Locht.** 1994. Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis*. *Infect.Immun.* **62**:4261-4269.
104. **Danese, P. N., L. A. Pratt, and R. Kolter.** 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J.Bacteriol.* **182**:3593-3596.

105. **Wellinghausen, N. and L. Rink.** 1998. The significance of zinc for leukocyte biology. *J Leukoc Biol* **64**:571-577.
106. **Driessen, C., K. Hirv, H. Kirchner, and L. Rink.** 1995. Zinc regulates cytokine induction by superantigens and lipopolysaccharide. *Immunology* **84**:272-277.
107. **Gustafson, G. T.** 1967. Heavy metals in rat mast cell granules. *Lab Invest* **17**:588-598.
108. **Pihl, E., G. T. Gustafson, B. Josefsson, and K. G. Paul.** 1967. Heavy metals in the granules of eosinophilic granulocytes. *Scand J Haematol* **4**:371-379.
109. **Sobotka, A. K., F. J. Malveaux, G. Marone, L. L. Thomas, and L. M. Lichtenstein.** 1978. IgE-mediated basophil phenomena: Quantitation, control, inflammatory interactions. *Immunol.Rev.* **41**:171-185.
110. **Ruggiero, A., B. Tizzano, E. Pedone, C. Pedone, M. Wilmanns, and R. Berisio.** 2009. Crystal structure of the resuscitation-promoting factor $[\Delta]_{DUF}RpFB$ from *M. tuberculosis*. *Journal of Molecular Biology* **385**:153-162.
111. **Ruggiero, A., B. Tizzano, A. Geerlof, E. Pedone, C. Pedone, M. Wilmanns, and R. Berisio.** 2007. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a resuscitation-promoting factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Cryst.* **F63**:870-873.
112. **Bateman, A. and C. Yeats.** 2005. The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics* **21**:1301-1303.
113. **Macintosh, R. L., J. L. Brittan, R. Bhattacharya, H. F. Jenkinson, J. Derrick, M. Upton, and P. S. Handley.** 2009. The terminal A-domain of the fibrillar Accumulation-associated protein (Aap) of *Staphylococcus epidermidis* mediates adhesion to human corneocytes. *J.Bacteriol.* **191**:7007-7016.
114. **Chavakis, T., K. Wiechmann, K. T. Preissner, and M. Herrmann.** 2005. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium. *Thromb.Haemost.* **94**:278-285.
115. **Hussain, M., K. Becker, C. von Eiff, G. Peters, and M. Herrmann.** 2001. Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* **8**:1271-1276.
116. **Flock, M. and J. I. Flock.** 2001. Rebinding of extracellular adherence protein Eap to *Staphylococcus aureus* can occur through a surface-bound neutral phosphatase. *J.Bacteriol.* **183**:3999-4003.
117. **Vuong, C., Keller, D., Peschel, A., and Otto, M.** Binding of the Map protein of *Staphylococcus aureus* Newman to the cell wall is dependent on the D-alanylation of teichoic acids. 10th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections ISSI 102-abstract 01. 2002.
Ref Type: Abstract

118. **Palma, M., A. Hagggar, and J. I. Flock.** 1999. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J.Bacteriol.* **181**:2840-2845.
119. **Chavakis, T., M. Hussain, S. M. Kanse, G. Peters, R. G. Bretzel, J. I. Flock, M. Herrmann, and K. T. Preissner.** 2002. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat.Med.* **8**:687-693.
120. **Mack, D., M. Nedelmann, H. A. Elsner, T. Magnus, and R. Laufs.** 1995. Tn917-Insertionen an verschiedenen Insertionsorten führen zu einem biofilmnegativen Phänotyp von *Staphylococcus epidermidis*. *Immun.Infekt.Suppl.1* **23**:144.
121. **Chambers, H. F.** 2005. Community-associated MRSA -- resistance and virulence converge. *N Engl J Med* **352**:1485-1487.
122. Lowy, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111[9], 1265-73. 2003.
Ref Type: Abstract
123. **Raad, I., A. Alrahwani, and K. Rolston.** 1998. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin.Infect.Dis.* **26**:1182-1187.
124. **Otto, M.** 2008. Targeted immunotherapy for staphylococcal infections: focus on anti-MSCRAMM antibodies. *BioDrugs* **22**:27-36.
125. **Graille, M., E. A. Stura, A. L. Corper, B. J. Sutton, M. J. Taussig, J. B. Charbonnier, and G. J. Silverman.** 2000. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**:5399-5404.
126. **Fattom, A., S. Fuller, M. Propst, S. Winston, L. Muenz, D. He, R. Naso, and G. Horwith.** 2004. Safety and immunogenicity of a booster dose of *Staphylococcus aureus* types 5 and 8 capsular polysaccharide conjugate vaccine (StaphVAX) in hemodialysis patients. *Vaccine* **23**:656-663.
127. **Fattom, A. I., G. Horwith, S. Fuller, M. Propst, and R. Naso.** 2004. Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials. *Vaccine* **22**:880-887.
128. **Vernachio, J. H., A. S. Bayer, B. Ames, D. Bryant, B. D. Prater, P. J. Syribeys, E. L. Gorovits, and J. M. Patti.** 2006. Human immunoglobulin G recognizing fibrinogen-binding surface proteins is protective against both *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections in vivo. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**:511-518.
129. **Josefsson, E., O. Hartford, L. O'Brien, J. M. Patti, and T. Foster.** 2001. Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *J.Infect.Dis.* **184**:1572-1580.
130. **Kuklin, N. A., D. J. Clark, S. Secore, J. Cook, L. D. Cope, T. McNeely, L. Noble, M. J. Brown, J. K. Zorman, X. M. Wang, G. Pancari, H. Fan, K. Isett, B.**

- Burgess, J. Bryan, M. Brownlow, H. George, M. Meinz, M. E. Liddell, R. Kelly, L. Schultz, D. Montgomery, J. Onishi, M. Losada, M. Martin, T. Ebert, C. Y. Tan, T. L. Schofield, E. Nagy, A. Meineke, J. G. Joyce, M. B. Kurtz, M. J. Caulfield, K. U. Jansen, W. McClements, and A. S. Anderson.** 2006. A novel *Staphylococcus aureus* vaccine: iron surface determinant B induces rapid antibody responses in rhesus macaques and specific increased survival in a murine *S. aureus* sepsis model. *Infect.Immun.* **74**:2215-2223.
131. **Nilsson, M., J. M. Patti, T. Bremell, M. Höök, and A. Tarkowski.** 1998. Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesin provides protection against *Staphylococcus aureus*-mediated septic death. *J Clin Invest* **101**:2640-9.
132. **Rennermalm, A., Y. H. Li, L. Bohaufs, C. Jarstrand, A. Brauner, F. R. Brennan, and J. I. Flock.** 2001. Antibodies against a truncated *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein protect against dissemination of infection in the rat. *Vaccine* **19**:3376-3383.
133. **Schennings, T., A. Heimdahl, K. Coster, and J. I. Flock.** 1993. Immunization with fibronectin binding protein from *Staphylococcus aureus* protects against experimental endocarditis in rats. *Microbial Pathogenesis* **15**:227-236.
134. **Zhou, H., Z. Y. Xiong, H. P. Li, Y. L. Zheng, and Y. Q. Jiang.** 2006. An immunogenicity study of a newly fusion protein Cna-FnBP vaccinated against *Staphylococcus aureus* infections in a mice model. *Vaccine* **24**:4830-4837.
135. **Cerca, N., T. Maira-Litran, K. K. Jefferson, M. Grout, D. A. Goldmann, and G. B. Pier.** 2007. Protection against *Escherichia coli* infection by antibody to the *Staphylococcus aureus* poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **104**:7528-7533.
136. **Hinnebusch, B. J., R. D. Perry, and T. G. Schwan.** 1996. Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (hms) locus in the transmission of plague by fleas. *Science* **273**:367-370.
137. **Maira-Litran, T., A. Kropec, D. A. Goldmann, and G. B. Pier.** 2005. Comparative opsonic and protective activities of *Staphylococcus aureus* conjugate vaccines containing native or deacetylated Staphylococcal Poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. *Infect.Immun.* **73**:6752-6762.
138. **Vuong, C., J. M. Voyich, E. R. Fischer, K. R. Braughton, A. R. Whitney, F. R. DeLeo, and M. Otto.** 2004. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* **6**:269-275.
139. **Arbeit, R. D., W. W. Karakawa, W. F. Vann, and J. B. Robbins.** 1984. Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **2**:85-91.
140. **Fattom, A. I., J. Sarwar, A. Ortiz, and R. Naso.** 1996. A *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide (CP) vaccine and CP- specific antibodies protect mice against bacterial challenge. *Infect.Immun.* **64**:1659-1665.

141. **Karakawa, W. W., A. Sutton, R. Schneerson, A. Karpas, and W. F. Vann.** 1988. Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect.Immun.* **56**:1090-1095.
142. **Brouillette, E., P. Lacasse, L. Shkreta, J. Bøllanger, G. Grondin, M. S. Diarra, S. Fournier, and B. G. Talbot.** 2002. DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* **20**:2348-2357.
143. **Castagliuolo, I., R. Piccinini, E. Beggiao, G. Palù, C. Mengoli, F. Ditadi, G. Vicenzoni, and A. Zecconi.** 2006. Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Vaccine* **24**:4393-4402.
144. **Gaudreau, M. C., P. Lacasse, and B. G. Talbot.** 2007. Protective immune responses to a multi-gene DNA vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* **25**:814-824.
145. **Nour El-Din, A. N. M., L. Shkreta, B. G. Talbot, M. S. Diarra, and P. Lacasse.** 2006. DNA immunization of dairy cows with the clumping factor A of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* **24**:1997-2006.
146. **Therrien, R., P. Lacasse, G. Grondin, and B. G. Talbot.** 2007. Lack of protection of mice against *Staphylococcus aureus* despite a significant immune response to immunization with a DNA vaccine encoding collagen-binding protein. *Vaccine* **25**:5053-5061.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
(v/v)	<i>Volume per volume</i>
(w/v)	<i>Weight per volume</i>
°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
aa	<i>amino acid</i>
Aae	Autolysin und Adhesin Aae
Aap	<i>accumulation associated protein</i>
AaStrA	<i>Aap associated Staphylococcus epidermidis adhesion</i>
Abb.	Abbildung
agr	<i>Accessorygene regulator</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AtIE	Autolysin E
Bap	<i>biofilm-associated protein</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i>
bp	Basenpaare (<i>base pair</i>)
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
CFU	<i>colony forming units</i>
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CoNS	<i>coagulase negative staphylococci</i>
d.h.	das heißt
ddH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DomA	Aap Domäne-A
DomB	Aap Domäne-B
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	<i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
Embp	<i>extracellular matrix binding protein</i>
Ery	Erythromycin
<i>et al.</i>	et alteri (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
Fbe	<i>Fibronectin binding protein</i>
g	Gramm oder Gravitationskonstante
h	Stunde (<i>hour</i>)
ica	<i>intercellular adhesion</i>
IFT	Immunofluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	Stoffmenge
MRSE	<i>methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis</i>
MSCRAMMs	<i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
ng	Nanogramm
nmol	Nanomol
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	pH-Wert
pI	Isoelektrischer Punkt

PIA	<i>polysaccharide intercellular adhesin</i>
pmol	Pikomol
PNAG	Poly-N-Azetyl-Glukosamin
PSM	<i>phenol soluble modulins</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	rekombinant
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Staphylococcus</i>
SasG	<i>S. aureus surface protein G</i>
SdrF	<i>serin-aspartat-family-protein F, S. epidermidis</i> Oberflächenprotein, bindet Kollagen
SdrG	<i>serin-aspartat-family-protein G, S. epidermidis</i> Oberflächenprotein, bindet Fibrinogen
SdrH	<i>serin-aspartat-family-protein H, S. epidermidis</i> Oberflächenprotein, unbekannte Bindungspartner
SDS	<i>sodium dodecal sulfate</i>
sek	Sekunde(n)
SERAM	<i>secretable extended repertoire adhesive molecules</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth + Glucose</i>
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tn	Transposon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	<i>trypticase soy broth</i>
U	<i>Units</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin Aepfelbacher für die Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachter zu betreuen und die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene durchführen zu können.

Herrn PD Dr. Holger Rohde danke ich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und der Möglichkeit zur Durchführung in seiner Arbeitsgruppe. Seine ständige Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und schier unerschütterliche Zuversicht haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Alles wurde gut.

Herrn PD Dr. Pommerening-Röser danke ich für die Übernahme des Gutachtens meiner Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg und für seine freundliche Unterstützung.

Ganz besonders danke ich allen Mitgliedern der AG Rohde, aber auch den Mitgliedern der anderen Arbeitsgruppen für eine wunderbare Zeit innerhalb und außerhalb des Labors. Besonders erwähnt sei Frau Gesche Kroll, die mit ihrer steten Hilfsbereitschaft und meist grenzenlosen Geduld sehr zu dieser Arbeit beigetragen hat und mir eine liebe Freundin geworden ist. Herrn Michael Busch danke ich für seine mal mehr mal weniger ernst gemeinten Gedankenaustausche mit mir und hoffe, er hat mir tatsächlich vergeben, das ich sein Boot „Junior“ einer ungewollten Maschinenkontrolle unterzogen habe...

Ein sehr großes Dankeschön an meine Eltern Burkard Michel und Gabriele Schmitz, meine Geschwister Sabine und Johannes, meine ganze Familie und meiner besten Freundin Kerstin Hertz. Sie alle waren immer für mich da, haben an mich geglaubt und mich in allen Lebenslagen unterstützt. Ohne sie wäre ich wohl nie soweit gekommen.

Last but not least:

Vielen Dank an meinen Freund Bernd Zobiak. Er hat mich in der Arbeit stets unterstützt und mir bei Problemen, vor allem am Mikroskop, geholfen. Auch privat ist er immer für mich da. Ich kann kaum erwarten, was die Zukunft bringt. Ich liebe Dich!