

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher
Institutsdirektor

Charakterisierung des Accumulation associated Proteins (Aap) bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung: Interaktionspartner und Funktionelle Aktivierung

Dissertation

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

vorgelegt von:

Christoph Matthias Burdelski
aus Hannover

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 02.08.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. J.-M. Pollok

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. P.-M. Kaulfers

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	5
1.1 Implantierbare Fremdmaterialien in der modernen Medizin	5
1.2 Taxonomie der Staphylokokken	6
1.3 Pathogenese fremdmaterialassoziiertes <i>S. epidermidis</i> Infektionen.....	8
1.3.1 Primäre Adhäsion.....	10
1.3.2 Die akkumulative Phase der <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung.....	11
1.3.3 PIA-unabhängige Mechanismen der <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung.....	13
1.3.4 Das Accumulation associated protein (Aap).....	15
1.3.5 Limitierte Proteolyse von Aap.....	16
1.3.6 Bedeutung der Aap _T Isoform für die <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung.....	16
2 Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Chemikalien und Einwegartikel	19
2.1.2 Laborgeräte.....	22
2.1.3 Nährmedien	23
2.1.4 Lösungen	24
2.1.5 Bakterienstämme	28
2.1.6 Stammsammlung.....	28
2.1.7 <i>E. coli</i> -Stämme	29
2.1.8 Vektoren	29
2.1.9 Oligonucleotide.....	29
2.1.10 pENTR TM /D-Topo-Vektoren und resultierende Destinationsvektoren.....	31
2.1.11 Enzyme.....	32
2.2 Allgemeine mikrobiologische Arbeiten.....	33
2.2.1 Bakterienkultivierung.....	33
2.2.2 Biofilmtest	33
2.2.3 Bestimmung der Bakterienkonzentration in Flüssigmedien	33
2.2.4 Grampräparate	33
2.2.5 Immunfluoreszenz-Test.....	34

2.3	Molekularbiologische Arbeiten mit DNA.....	35
2.3.1	Präparation chromosomaler DNA.....	35
2.3.2	Plasmidpräparation	35
2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	35
2.3.4	DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen (REN)	36
2.3.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	36
2.3.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	38
2.3.7	Sequenzanalyse	38
2.4	Klonierung mit Gateway-Technologie™ (Invitrogen)	39
2.4.1	Direktionale Klonierung von PCR-Produkten.....	39
2.4.2	Clonase-Reaktion	39
2.4.3	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	40
2.4.4	Transformation in einen optimierten Protein-Expressionsstamm	40
2.5	Proteinchemische Methoden	40
2.5.1	Pilotexpression	40
2.5.2	Expression rekombinanter Proteine.....	41
2.5.3	Quantitative Proteinmengenbestimmung nach Bradford	41
2.5.4	SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) –PAGE(Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese)	41
2.5.5	Herstellung von 8 % SDS-Gelen.....	42
2.5.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
2.6	Nachweis von Proteinen in SDS-PAGE	43
2.6.1	Coomassie-Färbung	43
2.6.2	Silber-Färbung.....	44
2.6.3	Western-Blot.....	44
2.7	Affinitätschromatographie	45
2.7.1	Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels His-Tag	45
2.7.2	Aufreinigung mit His-Trap-Säulen.....	46
2.7.3	Probenanalyse.....	47
2.7.4	Liganden-Identifikation mittels HiTrap NHS-activated HP Säulen.....	47
2.8	Gelfiltration	49
2.9	Produktion spezifischen Kaninchen-Antikörpern.....	49
2.10	Präparation von <i>S. epidermidis</i> Oberflächenproteinen.....	51
2.10.1	Präparation zellwandgebundener Staphylokokken-Proteine	51
2.10.2	Präparation zellwandassoziiierter Staphylokokken-Proteine.....	51

2.10.3	Präparation zellwandassoziierter Staphylokokken-Proteine mittels Ultraschall.....	51
2.11	Markierung von Proteinen.....	52
2.11.1	Biotin-Markierung.....	52
2.11.2	Peroxidase-Markierung.....	53
2.12	Proteasen-Charakterisierung.....	53
2.12.1	Zymographie.....	53
2.12.2	SDS-Zymographie.....	53
2.12.3	Reverse Zymographie.....	54
2.13	Isoelektrische Fokussierung.....	54
2.14	Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrie.....	54
2.15	Protein- Interaktionsanalysen.....	54
2.15.1	Far-Western-Blot.....	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Erzeugung rekombinanter Aap (rAap) Abschnitte.....	56
3.1.1	Klonierungsstrategie.....	56
3.2	Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine.....	57
3.3	Beeinflussung der Biofilmbildung bei <i>S. epidermidis</i> durch rAap _{DomA} und rAap _{DomB} -	60
3.4	Gelfiltration der rAap _{DomB} -	61
3.5	Ligandenbindungsassay.....	62
3.5.1	Identifizierung potentieller rAap _{DomB} —Liganden mittels Affinitätschromatographie	63
3.6	Charakterisierung von AaStrA	67
3.6.1	Rekombinante Expression von AaStrA (rAaStrA)	67
3.6.2	Untersuchung des Einflusses von rAaStrA auf die <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung.....	70
3.7	Charakterisierung von rAap _{DomA}	74
3.8	Untersuchung der proteolytischen Aktivität rekombinant exprimierter Domäne-A von Aap mittels Zymographie.....	75
3.9	Bioinformatische Analyse der Aap _{Domäne A} -.....	77
3.10	Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von Aap _{Domäne-A}	78

4 Diskussion.....	80
4.1 Funktion definierter Aap-Subdomänen bei der Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> 5179-R1.....	82
4.2 Aap-Bindungspartner	83
4.3 Eigenschaften, Funktion und Bedeutung von AaStrA	87
4.4 Bedeutung der autoproteolytischen Aktivität bei der Aktivierung von Aap	90
5 Zusammenfassung	93
6 Abkürzungsverzeichnis	95
6.1 Prä- und Suffixe	96
7 Abbildungsverzeichnis.....	97
8 Literaturverzeichnis	98
9 Danksagung.....	113
10 Lebenslauf.....	114
11 Eidesstattliche Erklärung	117

1 Einleitung

1.1 Implantierbare Fremdmaterialien in der modernen Medizin

Der Einsatz von implantierbaren Fremdmaterialien ist heute ein integraler Bestandteil der modernen Medizin. Hierbei werden Fremdmaterialien für den temporären oder permanenten Ersatz von Organfunktionen eingesetzt. Typische Beispiele häufig verwendeter Materialien sind Venenverweilkanülen, zentrale Venenkatheter, Liquorableitungen, künstliche Herzklappen, Linsen und Gelenkendoprothesen. Ein wesentliches Problem der Implantation eines Fremdkörpers ist das Auftreten von Infektionen (Darouiche, 2004). Die Zahl fremdmaterialassoziiierter Infektionen beträgt, bei einer implantatabhängigen Infektionsrate von 4 – 6 %, allein in den USA etwa 240.000 / Jahr (Darouiche, 2004). In Deutschland wird mit etwa 100.000 implantatassoziierten Infektionen pro Jahr gerechnet (Mack et al., 2004) (siehe Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1 Übersicht über implantierte Fremdmaterialien und die Zahl der assoziierten Infektionen in Deutschland

Art des Fremdmaterials	Anwendungshäufigkeit (n/Jahr)	Geschätzte Zahl der Infektionen (n/Jahr)
Zentrale Venenkatheter	1.750.000	17.500 – 87.000
Prothetische Herzklappen	~ 18.000	150 – 1.000
Hüftendoprothesen	222.000	~ 4000
Knieendoprothesen	60.000	< 600 – 3.600
Liquorableitungen	10.000	200 – 2.000
Künstliche Linsen	~ 300.000	< 300 – 900
Herzschritmacher	70.000	700 – 2.100

Grundsätzlich können sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien im Kontext fremdkörperassoziiierter Infektionen isoliert werden. Charakteristisch ist, dass es sich bei den nachgewiesenen Erregern meist um Bakterien der patienteneigenen Flora handelt, so dass diese Infektionen demnach endogenen Ursprungs sind (Geipel and Herrmann, 2005, Mack et al., 2006) (Tabelle 1-2).

Tabelle 1-2: Epidemiologie implantatassoziiierter Infektionen: typische Erreger und deren natürlicher Standort

Spezies	Endogenes Reservoir
Grampositive Kokken	
<i>S. aureus</i>	Nasopharynx
<i>S. epidermidis</i>	Haut, Nasopharynx
Gramnegative Stäbchen	
<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Morganella sp.</i> , <i>Serratia sp.</i>),	Gastrointestinaltrakt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nosokomial, Gastrointestinaltrakt
Pilze	
<i>Candida-sp.</i>	Respirations-, Gastrointestinal- und weiblicher Genitaltrakt

Wichtigste im Kontext fremdmaterialassoziiierter Infektionen nachgewiesene Erregergruppe sind Koagulase-negative Staphylokokken (KNS). Häufigster Erreger ist *S. epidermidis*. (Rupp and Archer, 1994, Wisplinghoff et al., 2003a)

1.2 Taxonomie der Staphylokokken

Staphylokokken sind grampositive Haufenkokken. Sie haben einen Durchmesser von 0,5-1,5µm, bilden keine Sporen und sind Cytochrom-Oxidase negativ. Aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften können 39 verschiedene Gattungen unterschieden werden. Anhand der Fähigkeit, das Enzym Koagulase zu bilden, werden sie in die Gruppen der koagulasepositiven und koagulasenegativen Staphylokokken (KNS) eingeteilt. Die einzige humanpathogene, koagulasepositive Staphylokokkenspezies ist *S. aureus*, der häufigste Vertreter der koagulasenegativen Staphylokokken ist *S. epidermidis*. Während *S. aureus* als humanpathogener Erreger schon lange bekannt ist, wurde zunächst einzig *S. saprophyticus* als typischer Erreger von Harnwegsinfektionen

bei jungen Frauen als humanpathogener Keim angesehen. *S. epidermidis* hingegen galt lange Zeit als harmloser Kommensale auf Haut und Schleimhäuten (Rohde et al., 2010). Im Verlauf der letzten 30 Jahre musste diese Sichtweise jedoch grundlegend revidiert werden. Heute zählen auch andere KNS, und hier insbesondere *S. epidermidis*, zu den wichtigsten Erregern von nosokomialen Infektionen (Goldmann and Pier, 1993, Rupp and Archer, 1994, Vincent et al., 1995). Daten des Centers for Disease Control (CDC) und des National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS) zeigen, dass KNS zu den 5 häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen gehören (Karlowisky et al., 2004). Es werden heute circa 40 % aller nosokomialen Bakteriämien (Karlowisky et al., 2004, Wisplinghoff et al., 2003b, Vincent et al., 1995, Wisplinghoff et al., 2003a, de Silva et al., 2002, Steinbrink and Frommelt, 1995) durch KNS verursacht. Zudem sind KNS bedeutende Erreger postoperativer Wundinfektionen auf Intensivstationen (Rupp and Archer, 1994, Mack et al., 2001). Als typische Risikofaktoren für die Entwicklung einer Infektion durch KNS konnten unter anderem maligne Grunderkrankungen, Chemotherapie, Leukopenie, Frühgeburtlichkeit, Knochenmarkstransplantation und eine HIV-Infektion erkannt werden (Goldmann and Pier, 1993). Fünfundsiebzig Prozent der Infektionen durch KNS entstehen jedoch in direktem Zusammenhang mit der Implantation von Fremdmaterialien (Fidalgo et al., 1990). Die temporäre oder permanente Implantation von Fremdmaterialien wie zentralen Venenkathetern, künstlichen Herzklappen, Liquorableitungen oder Gelenkprothesen kann daher als der überragende Risikofaktor für die Entstehung einer KNS-Infektion betrachtet werden (Darouiche, 2004).

Eine Therapie der fremdkörperassoziierten *S. epidermidis*-Infektionen gestaltet sich schwierig. Es handelt sich in der Regel um persistierende, chronisch verlaufende Infektionen. Eine antibiotische Therapie weist nur sehr schlechte Ansprechraten auf, da es sich bei den *S. epidermidis* Isolat in 90 % der Fälle um methicillinresistente Stämme handelt (Hanberger et al., 2001), was die primäre antibiotische Therapie stark einschränkt. Auch zunächst als sensibel getestete Antibiotika zeigen im klinischen Alltag nur geringe Ansprechraten (Darouiche, 2004, Geipel and Herrmann, 2005, Davenport et al., 1986, Diaz-Mitoma et al., 1987). Als einzige wirklich wirksame Therapie bleibt daher häufig nur die Entfernung und Ersatz des implantierten Fremdkörpers (Geipel and Herrmann, 2005, Darouiche, 2004, Lentino, 2003).

Das erhebliche klinische Problem fremdkörperassoziiierter *S. epidermidis* Infektionen ist ein entscheidender Beweggrund, die molekularen Mechanismen der

Fremdkörperbesiedlung zu untersuchen. Letztendlich ist das Ziel dieser Bemühungen, neue Wege in der Diagnostik, Prophylaxe und Therapie der fremdkörperassoziierten Infektionen zu finden (Rohde et al., 2007, Götz, 2002, O'Gara, 2007, Fitzpatrick et al., 2005b).

1.3 Pathogenese fremdmaterialassoziiertes *S. epidermidis* Infektionen

Frühe elektronenmikroskopische Aufnahmen von *ex vivo* gewonnenen Kathetern zeigten, dass *S. epidermidis* Fremdkörperoberflächen in Form von fest haftenden, mehrlagigen Bakterienkonsortien, so genannten Biofilmen, besiedelt wird (Peters et al., 1982). Herausragendes Charakteristikum ist hier, dass die Bakterien in einer selbst synthetisierten Matrix eingebettet sind (Hall-Stoodley et al., 2004) (Abbildung 1).

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist in der Natur weit verbreitet und findet sich nicht nur bei grampositiven Bakterien, sondern auch bei gramnegativen Erregern, zum Beispiel *Pseudomonas species* (Drenkard and Ausubel, 2002) und Pilzen wie *Candida albicans* (Douglas, 2003).

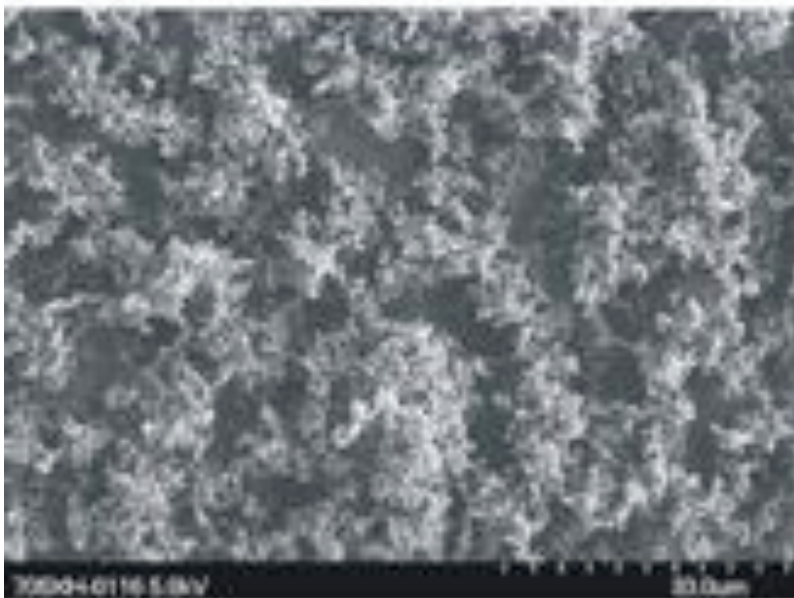


Abbildung 1-1 REM Aufnahme eines Biofilms

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines mit dem prototypischen *S. epidermidis* Isolat 1457 infizierten Fremdkörpers nach 18 h Inkubation (Harris and Martin, 1987). Zu erkennen sind mehrschichtige Zellhaufen, die in einer extrazellulären Matrix eingebettet sind.

Die Entstehung eines Biofilmes lässt sich in zwei Phasen untergliedern. Zunächst adhären freie Bakterienzellen an die zu besiedelnde Oberfläche über Adhäsionsmoleküle der sogenannten primären Adhäsion. Nachfolgend kommt es zur Akkumulation und Reifung der Bakterienarchitektur (siehe

Abbildung 1-2), wobei die meisten Bakterien den direkten Kontakt zur Oberfläche verloren haben und nur über interzelluläre Adhäsion in diesem Zellverband gehalten werden.

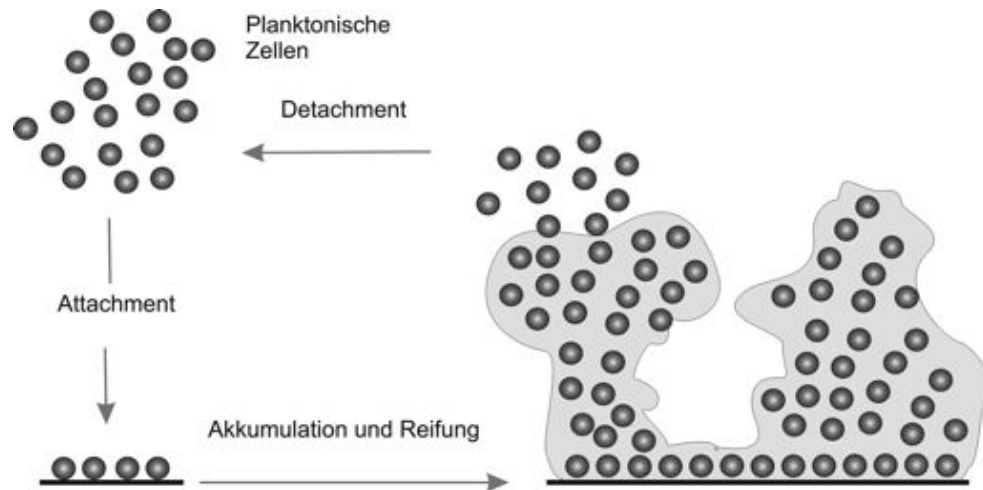


Abbildung 1-2 Biofilmbildung

Schematische Darstellung der Biofilmbildung von Staphylokokken, mit Darstellung der typischen Phasen der Biofilmbildung (nach (Rohde et al., 2010))

Nach der primären Adhäsion (Attachment) bilden die Bakterien eine mehrschichtige Biofilmarchitektur. Durch bislang nicht bekannte Prozesse kann es zur Lösung einzelner Zellen aus dem Biofilm kommen (Detachment). Man nimmt an, dass es *S. epidermidis* dadurch gelingt, neue Absiedlungen zu realisieren.

1.3.1 Primäre Adhäsion

Die Primäre Adhäsion der Staphylokokken an Polymeroberflächen ist ein komplexer Vorgang, welcher durch unspezifische und spezifische Faktoren vermittelt wird. Unspezifische Faktoren mit Einfluss auf die primäre Adhäsion sind die Oberflächenbeschaffenheit des Fremdkörpers, Hydrophobizität und die Ladung des Materials (Ludwicka et al., 1984, Hogt et al., 1985, Mack et al., 2001).

Als spezifische Faktoren werden vor allem bakterieneigene Strukturen bezeichnet, die mit extrazellulären Matrixproteinen des Wirts interagieren können. Proteine wie zum Beispiel Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin und Kollagen werden im so genannten Prozess der Konditionierung schon kurz nach Implantation auf die Fremdkörperoberfläche aufgelagert. Diese stehen nach der Anlagerung an die Fremdkörperoberfläche den bakteriellen Adhäsionsfaktoren als Interaktionspartner zur Verfügung (Gristina et al., 1987). Es konnten bereits verschiedene *S. epidermidis* Oberflächenproteine, die mit diesen extrazellulären Matrixproteinen interagieren, beschrieben werden. So konnte gezeigt werden, dass die Autolysine AtlE und Aae sowie mehrere weitere, bislang nicht näher charakterisierte *S. epidermidis*-Oberflächenproteine, vitronectinbindende Aktivität besitzen (Heilmann et al., 2003, Heilmann et al., 1997, Li et al., 2001). Die Bindung von *S. epidermidis* an

fibrinogenbeschichtete Oberflächen wird durch das 119 kDa *Fibrinogen binding protein* Fbe (SdrG) vermittelt (Nilsson et al., 1998, Pei et al., 1999). Das 1 MDa *Extracellular matrix binding protein* Embp bindet an Fibronectin und scheint die Bindung von *S. epidermidis*-Zellen an entsprechend konditionierte Oberflächen beteiligt zu sein (Williams et al., 2002, Christner et al., 2010). An der Interaktion mit Fibronectin sind auch Teichonsäuren, direkt oder indirekt, beteiligt (Hussain et al., 2001). Schließlich gibt es Hinweise, dass die *S. epidermidis*-Lipase GehD die Bindung an Kollagen vermittelt (Bowden et al., 2002).

Nachdem durch den Prozess der primären Adhäsionen erste Bakterien an die Fremdkörperoberfläche adhärirt haben, beginnt die akkumulative Phase der Biofilmbildung, in welcher sich die komplexe, dreidimensionale Architektur des Biofilms entwickelt.

1.3.2 Die akkumulative Phase der *S. epidermidis* Biofilmbildung

Die akkumulative Phase ist hauptsächlich durch die Synthese einer polymeren, extrazellulären Matrix gekennzeichnet. Sie trägt durch die Vermittlung interzellulärer Adhäsion entscheidend zur Stabilität des bakteriellen Biofilms bei. Wie auch bei der primären Adhäsion sind an der Biofilmakkumulation unabhängige Moleküle funktionell beteiligt.

1.3.2.1 Polysaccharid-abhängige Biofilmbildung

Als Hauptbestandteil der extrazellulären Biofilmmatrix wurden lange Zeit vor allem Polysaccharide beschrieben. Als deren zentrale Komponente konnte das *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA) identifiziert werden (Mack et al., 1992, Mack et al., 1996a). PIA ist ein lineares Homoglykan, welches aus durchschnittlich 130 β -(1,6)-glykosidisch verknüpften N-Acetylglucosaminyleinheiten besteht (Mack et al., 1996b, Sadovskaya et al., 2005). Die PIA-Synthese wird durch die Translationsprodukte des *icaADBC* (*intercellular adhesion ADBC*) Lokus vermittelt (Heilmann et al., 1996b, Gerke et al., 1998, Vuong et al., 2004b). Dem *ica*-Operon ist das Gen *icaR* vorgeschaltet, welches für einen Repressor der *icaADBC*-Transkription kodiert (Conlon et al., 2002, Knobloch et al., 2004). Mittels *icaR* kann die Expression von *icaADBC* in übergeordnete, regulatorische Systeme integriert werden (Knobloch et al., 2004). Hier scheint der alternative Sigmafaktor SigmaB eine zentrale Komponente darzustellen (Knobloch et al., 2004, Knobloch et al., 2001). Daneben sind weitere Regulationssysteme wie Agr, SarA, LuxS und Quorum-sensing-Systeme entdeckt worden, (Tormo et al., 2005, Handke et al., 2007, Kong et al., 2006, Xu et al., 2006), die durch Beeinflussung der

PIA-Synthese die *S. epidermidis* Biofilmbildung steuern können. Die Transkription von *icaADBC* kann zusätzlich durch strukturelle genomische Plastizität gesteuert werden. Hierbei kommt es zu einer reversiblen Insertion des beweglich genutzten Elements in *icaC* (Ziebuhr et al., 1999).

Desweiteren besteht die Möglichkeit der metabolischen Regulation der Transkriptionsaktivität (Vuong et al., 2005).

Die funktionelle Bedeutung von PIA bei der Entwicklung von fremdkörperassoziierten Infektionen konnte im Tiermodell unter Verwendung definierter Mutanten belegt werden (Rupp et al., 1999, Rupp et al., 2001). Vor kurzer Zeit gelang es zusätzlich durch die Etablierung eines *Caenorhabditis elegans*-Modells die Bedeutung von PIA als Virulenzfaktor von *S. epidermidis* zu bestätigen (Begun et al., 2007). Dabei zeigte sich, dass sich *S. epidermidis* durch die Synthese von PIA vor den Effektormechanismen der humoralen und angeborenen Immunität schützen kann und damit die Möglichkeit zur Persistenz von *S. epidermidis* während einer Besiedlung möglich ist (Foster, 2005, Vuong et al., 2004b, Vuong et al., 2004a, Kristian et al., 2008).

Die übergeordnete Bedeutung von *icaADBC* wird dadurch unterstrichen, dass dieser Genlokus nicht nur bei *S. epidermidis*, sondern auch bei vielen anderen KNS und auch bei *S. aureus* nachgewiesen werden kann (Cramton et al., 1999, Rohde et al., 2001a, Rohde et al., 2001b, Kropec et al., 2005, Nilsdotter-Augustinsson et al., 2007, Moretro et al., 2003). Darüber hinaus gelang es, bei gramnegativen Bakterien wie *E. coli*, *Yersinia pestis* und *A. actinomycetem-comitans* *icaADBC*-homologe Genorte nachzuweisen. Im Falle von *E. coli* konnte direkt belegt werden, dass der hier kodierte Enzymapparat die Synthese eines strukturell mit PIA praktisch identischen Polysaccharids ermöglicht (Wang et al., 2004, Kaplan et al., 2004). Aus der Gesamtkonstellation mit der weiten Verbreitung in den verschiedensten mikrobiologischen Familien wurde geschlossen, dass es sich bei der PIA-vermittelten interzellulären Adhäsion um ein generelles Prinzip interzellulärer Adhäsion und der Biofilmbildung bei Bakterien handelt. Tatsächlich konnte durch epidemiologische Studien bei *S. epidermidis*-assoziierten Fremdkörperinfektionen gezeigt werden, dass *icaADBC* bei 50-80 % der klinisch-relevanten Isolate nachgewiesen werden kann (Rohde et al., 2001b, Gelosia et al., 2001, Arciola et al., 2002, Arciola et al., 2001, de Silva et al., 2002, Vandecasteele et al., 2003b, Chaieb et al., 2005, Kozitskaya et al., 2005, Ninin et al., 2006, Ziebuhr et al., 1997). Darüber hinaus waren bei klinisch nicht-signifikanten, kommensalen *S. epidermidis*-Isolaten von gesunden Probanden ohne

Krankenhauskontakt nur in 13-52 % der *icaADBC*-Genort nachweisbar (Rohde et al., 2004, Ziebuhr et al., 1997). Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse wurde postuliert, dass *icaADBC*-negative *S. epidermidis* Isolate im Allgemeinen als apathogen gelten können (Zhang et al., 2003, Yao et al., 2005, Li et al., 2005). Somit schien der Nachweis von *icaADBC* ein geeigneter Parameter zur Unterscheidung zwischen invasiven klinisch-relevanten *S. epidermidis*-Isolaten von harmlosen Kommensalen darzustellen (Mack et al., 2006, Yao et al., 2005, Ziebuhr et al., 1997). Zudem wurde unter der Annahme, dass es sich bei PIA somit um den zentralen Virulenzfaktor von *S. epidermidis* handelt, versucht, PIA als Basis eines Impfstoffes nicht nur zur Prävention von *S. epidermidis*-, sondern auch von *S. aureus*-Infektionen zu verwenden (McKenney et al., 2000, Maira-Litran et al., 2005, Maira-Litran et al., 2004).

Allerdings haben sich in den letzten Jahren die Hinweise darauf verdichtet, dass es sich bei der Staphylokokken-Biofilmmakkumulation nicht um einen monokausalen Prozess, sondern um ein multimodales Geschehen handelt.

Es konnten bei *S. aureus* Hinweise für die Existenz PIA-unabhängiger Mechanismen der Biofilmmakkumulation gefunden (Toledo-Arana et al., 2005, Fitzpatrick et al., 2005a, O'Neill et al., 2007, O'Gara, 2007) und die spezifische Beteiligung des *S. aureus* *Biofilm associated protein* BAP an der PIA-unabhängigen Biofilmbildung dargestellt werden (Latasa et al., 2005). In Analogie finden sich auch bei *S. epidermidis* Hinweise für die Existenz PIA-unabhängiger Mechanismen der Biofilmbildung (Hennig et al., 2007, Petrelli et al., 2006). Somit ist offensichtlich, dass nicht nur die primäre Adhärenz, sondern auch die *S. epidermidis*-Biofilmmakkumulation ein multifaktorielles Geschehen ist.

Im Kontext größerer epidemiologischer Studien, bei welchen gut definierte invasive *S. epidermidis* Stämme untersucht wurden, konnten klinische *S. epidermidis* Isolate gefunden werden, welche zwar biofilmpositiv, aber PIA-negativ waren (Ziebuhr et al., 1997, Frebourg et al., 2000, Vandecasteele et al., 2003a, Klug et al., 2003, Rohde et al., 2007). In vielen Fällen konnte hier gezeigt werden, dass der Biofilm dieser Stämme auf der Aktivität von Proteinfaktoren beruht.

1.3.3 PIA-unabhängige Mechanismen der *S. epidermidis* Biofilmmakkumulation

Es kann als sicher gelten, dass *S. epidermidis* PIA-unabhängige Mechanismen für die Ausbildung eines Biofilms nutzen kann. Erst kürzlich fanden sich Hinweise, dass zum Beispiel extrazelluläre DNA (eDNA) (Steinberger and Holden, 2005, Rice et al., 2007,

Qin et al., 2007) funktionell an der Biofilmbildung beteiligt ist. Daneben zeigten schon frühe Untersuchungen, dass auch Proteine in der extrazellulären Biofilmmatrix vorhanden sind (Hussain et al., 1993). Diese wurden, wie oben beschrieben, jedoch insbesondere mit der primären Adhäsion in Verbindung gebracht (Rohde, 2006). Eindeutige Hinweise für eine zusätzliche Funktion definierter Oberflächenproteine bei der Biofilmmakкумуляtion wurden durch Untersuchung des *S. epidermidis* Stamms 5179-R1 erbracht. Der biofilm-positive Stamm *S. epidermidis* 5179-R1 wurde durch Passage und Selektion adhärenter Bakterien aus dem klinisch-relevanten, *in vitro* Biofilm- und PIA-negativen *S. epidermidis*-Isolat 5179 (Rohde et al., 2001a) erzeugt. Zwischen beiden Stämmen fand sich kein substanzieller Unterschied in der primären Adhäsion, jedoch bildete *S. epidermidis* 5179-R1 makroskopisch sichtbare Zellhaufen. Durch einen Agglutinationsassay mit PIA-Antiserum konnte eine PIA-Bildung ausgeschlossen werden (Rohde et al., 2005a), so dass hier offenbar PIA-unabhängige Mechanismen der interzellulären Adhäsion wirksam sein müssen. Der Biofilm des Stammes 5179-R1 konnte durch Proteinase K-Behandlung, nicht aber durch Natrium-meta-Periodat zerstört werden. Dies lies auf eine rein proteinabhängige Form der Biofilmbildung schließen. Durch SDS-PAGE-Analyse der Oberflächenproteine von *S. epidermidis* 5179 und 5179-R1 konnten 3 unterschiedliche Banden identifiziert werden (siehe Abbildung 1-3). *S. epidermidis* 5179 hatte eine 220 und eine 180 kDa Bande, welche bei *S. epidermidis* 5179-R1 sehr viel schwächer sichtbar waren. Dafür erschien hier eine neue 140 kDa Bande. Durch Massenspektrometrie konnten alle drei Banden dem Accumulation associated protein (Aap) zugewiesen werden (Hussain et al., 1997, Rohde et al., 2005b). Die Massenspektrometrie-Daten wurden durch Western-Blot-Analysen bestätigt.

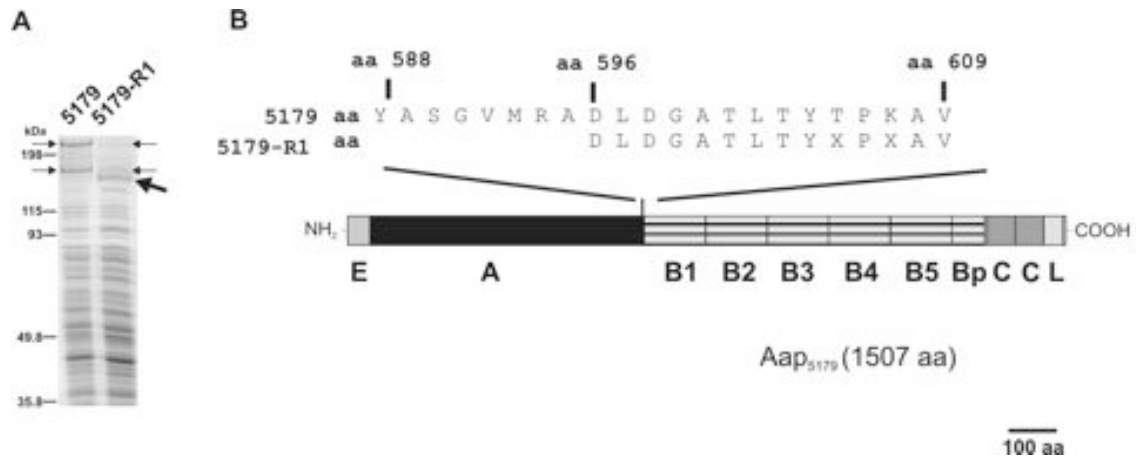


Abbildung 1-3 Aap Isoformen

(A) Analyse von Zellwand-assoziierten Proteinen der Stämme *S. epidermidis* 5179 und 5179-R1 (Rohde et al., 2005b). Während der biofilm-positive Stamm 5179-R1 zwei 220 und 180 kDa große Proteine schwächer bildet (kleine Pfeile), fällt eine zusätzlich, beim biofilm-negativen Stamm 5179 nicht nachweisbare, 140 kDa Bande auf (großer Pfeil). Durch Massenspektrometrie konnten diese Proteine als Aap identifiziert werden. (B) Schematische Darstellung von Aap und den beiden Hauptdomänen A und B (=G5 repeat domain). Durch N-terminale Sequenzierung konnte der Beginn des 140 kDa Aap-Isoform an Position 596 des nativen Aap festgelegt werden. Die Zahl der G5 Domänen ist variabel und kann zur Typisierung von *S. epidermidis* genutzt werden (Monk and Archer, 2007). E, Exportsignal; L, LPXTG Motiv; Bp, partieller repeat.

1.3.4 Das Accumulation associated protein (Aap)

Durch Sequenzierung von *aap* bei *S. epidermidis* 5179 konnte ein offener Leserahmen von 4521 Nukleotiden gefunden werden. Auf Aminosäuren-Ebene zeigt es einen charakteristischen Aufbau: N-terminal beginnt Aap mit einem Exportsignal, gefolgt von einer aus 564 Aminosäuren bestehenden Domäne A, welche eine strukturelle Homologie zu dem *S. aureus* Protein SasG aufweist. Darauf folgt eine Domäne B bestehend aus 5,5 identischen Repeat-Domänen, bestehend aus 128 Aminosäuren. Der C-Terminus wird aus zwei hypothetischen Kollagen-Triple-Helix-Motiven gebildet, denen sich ein LPXTG-Motiv anschließt, welches als Zellwandanker bei grampositiven Bakterien fungiert (Navarre and Schneewind, 1999).

Besonders interessant erscheinen hier die in die repetitive Domäne B eingebetteten G5-Domänen, welchen zum einen eine theoretische N-Acetyl-Glucosamin-Bindung zugeschrieben wird und zum anderen zur allosterischen Regulation von Enzymaktivität und Co-Faktor-Bindung dienen können (Bateman et al., 2005). Die bei *S. epidermidis* 5179-R1 gefundene trunkierte 140 kDa Isoform (Aap_T) bestand im wesentlichen aus der Domäne B.

1.3.5 Limitierte Proteolyse von Aap

Als Ursache der Entstehung der verkürzten Aap-Isoform Aap_T bei *S. epidermidis* 5179-R1 konnte eine spezifische proteolytische Prozessierung des vollständigen Aap dargestellt werden. Während durch den breiten Proteaseinhibitor α -2Makroglobulin eine Inhibition der Prozessierung beobachtet wurde, konnte durch Zugabe des Cysteinproteaseinhibitor E64 keine Inhibition nachgewiesen werden. Hieraus wurde die Vermutung abgeleitet, dass die Prozessierung durch eine Serin- oder Metalloprotease erfolgen muss. Hierbei ist die Aap-Prozessierung offensichtlich von ausschlaggebender Bedeutung für die interzellulär adhäsive Funktion des Moleküls, da durch eine Inhibition der Prozessierung auch die Biofilmbildung des Stamms *S. epidermidis* 5179-R1 gehemmt werden konnte. Interessanter Weise kann die Prozessierung und hieraus resultierende Induktion der *S. epidermidis* Biofilmbildung nicht nur durch staphylokokkeneigene, sondern auch Wirtsproteasen wie Trypsin und Elastase erfolgen (Rohde et al., 2005b).

1.3.6 Bedeutung der Aap_T Isoform für die *S. epidermidis* Biofilmbildung

Ein erster Anhalt für die funktionelle Bedeutung von Aap war durch Biofilminhibitionsexperimente generiert worden. Hier hatte sich gezeigt, dass die Biofilmbildung des Stamm *S. epidermidis* 5179-R1 durch Zugabe eines anti-Aap Antiserums spezifisch gehemmt werden konnte. Evidenz für die funktionelle Bedeutung der Aap-Domänen wurde durch genetische Ansätze gewonnen. Nach *in trans* Überexpression von Aap_T in im biofilmnegativen *S. epidermidis*-Isolat 1585 konnte ein biofilmpositiver Phänotyp nachgewiesen werden (Rohde et al., 2005b) (siehe Abbildung 1-4).

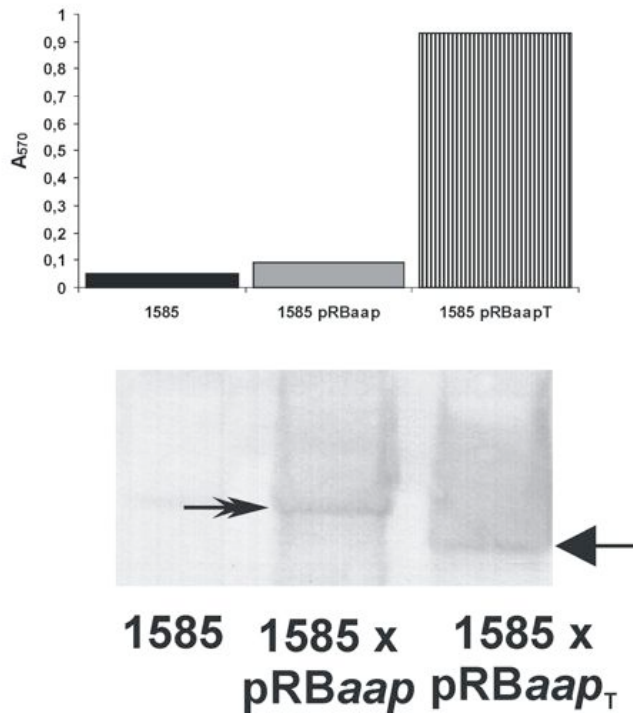


Abbildung 1-4 Einfluss der Aap-Isoformen auf die Biofilmbildung

Biofilm-Assay für das *S. epidermidis* Isolat 1585, 1585 mit Aap_{komplett} und 1585 mit dem trunkierten Aap hier Aap_{DomB}. Deutlich zu erkennen ist das nur das trunkierte Aap in Form der Domäne B einen Biofilm bei dem *S. epidermidis* Isolat 1585 induziert.

Zielsetzung

Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe konnten unter Rückgriff auf genetische Methoden und *in trans* Expression definierter Aap-Subdomänen in einem *aap*-negativen genetischen Hintergrund die Beteiligung von Aap an der *S. epidermidis* 5179-R1 Biofilmbildung darstellen. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aap Domäne-B als Träger der interzellulär adhäsiven Funktion von Aap zu betrachten ist. Um die Funktion von Aap bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung weiter zu charakterisieren, sollten in dieser Arbeit zunächst definierte Aap-Subdomänen rekombinant exprimiert werden. Mit Hilfe dieser rekombinanten Proteine sollten folgende Fragen der Aap-vermittelten Biofilmbildung bei *S. epidermidis* untersucht werden:

1. Welchen Einfluss haben rekombinante Aap-Subdomänen auf die Biofilmbildung des Stamms *S. epidermidis* 5179-R1?
2. Gibt es spezifische Aap Domäne-B Interaktionspartner auf der bakteriellen Oberfläche?
3. Wenn es definierte Aap-Interaktionspartner gibt: Welche Funktion und relative Bedeutung haben diese für die Ausbildung eines biofilmpositiven Phänotyps?
4. Welche Funktion hat die Aap Domäne-A bei der *S. epidermidis*-Biofilmbildung?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Einwegartikel

Alle verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anders angegeben von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) in *pro analysi*-Qualität bezogen.

Tabelle 2-1 Materialien

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Amicon Ultra-15	Aufkonzentrierung	Millipore (Billerica, USA)
Biotinylation Module	Biotinylierung	GE HealthCare
Bradford-Reagenz	Proteinquantifizierung	Bio-Rad (Hercules, USA)
Bovines γ -Globulin	Protein-Konzentrations-Standard	Bio-Rad (Hercules, USA)
Bovines Serum Albumin	Protein-Konzentrations-Standard, Zymographie-Substrat, Western-Blot-Block Adjuvanz	Sigma (St. Louis, USA)
Casein, 12 %	Zymographie	Sigma (St. Louis, USA)
Complete, mini	Proteaseinhibition	Roche (Basel, Schweiz)
Complete, mini EDTA free	Proteaseinhibition	Roche (Basel, Schweiz)
Cryobank	Stammhaltung	Mast Diagnostica (Reinfeld, Deutschland)
Genomic DNA Purification Kit	DNA-Extraktion	Quiagen (Hilden, Deutschland)
His-Trap HP 5ml, 1 ml	Affinitätschromatographie	GE Healthcare (Fairfield, USA)
HiTrap Desalting 5 ml	Affinitätschromatographie	GE Healthcare (Fairfield, USA)
HiTrap Desalting 5 ml	Affinitätschromatographie	GE Healthcare (Fairfield, USA)

HiTrap NHS-Affinitätschromatographie 1 ml	Affinitätschromatographie	GE Healthcare (Fairfield, USA)
IEF Anode Buffer	Isoelektrische Fokussierung	Invitrogen (Carlsbad, USA)
IEF Kathode Buffer	isoelektrische Fokussierung	Invitrogen (Carlsbad, USA)
MES-SDS Running Buffer (25 X)	SDS-Laufpuffer	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Novex IEF-Gel	isoelektrische Fokussierung	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Novex Zymogram Gel 10 % Gelatine	Zymographie	Invitrogen (Carlsbad, USA)
NuPAGE Midi Bis-Tris 10 %, 20 Taschen, 26 Taschen	SDS-Gelelektrophorese	Invitrogen (Carlsbad, USA)
NuPage Mini Bis-Tris 4 -12 % Gradienten Gel, 12 Taschen	SDS-Gelelektrophorese	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Peroxidase-Markierungs-Kit	Proteinmarkierung	Roche (Basel, Schweiz)
Precision Plus dual color Protein Standard	Protein-Größenstandard für SDS-PAGE	Bio-Rad (Hercules, USA)
Profound™ Far-Western Biotinylated Protein:Protein Interaction Kit	Far-Western-Blot	Pierce (Rockford, USA)
Protein Desalting Spin Columns	Entsalzung / Umpufferung	GE Healthcare (Fairfield, USA)
Protein Desalting Spin Columns	Entsalzung / Umpufferung	GE Healthcare (Fairfield, USA)
Sephadex S200	Gelfiltration	GE Healthcare (Fairfield, USA)
SilverSnap® Stain for Mass Spectrometry	Silberfärbung	Pierce (Rockford, USA)

SimplyBlue™ SafeStain	Coomassie-Färbung	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm, 0,45 µm	Sterilfiltrierung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Superdex 10/300 GL	Gelfiltration	GE Healthcare (Fairfield, USA)
Transfer-Buffer (20 X)	Western-Blot Transferpuffer	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Zellkulturschale 96- Loch, 5 cm, 10 cm Durchmesser	Zellkulturschale	Nunc (Roskilde, DK)

2.1.2 Laborgeräte

Tabelle 2-2 Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Verwendung	Hersteller
Akta Prime	Chromatographie	GE Healthcare (Fairfield, USA)
Biofuge 28 RS	Zentrifuge	Heraeus (Osterode, Deutschland)
Biofuge pico	Zentrifuge	Heraeus (Osterode, Deutschland)
Blockthermostat BT 100	Inkubator	Kleinfeld
Chemidoc XRS	Geldokumentations-system	Bio-Rad (Hercules, USA)
Digital Sonifier	Ultraschallzerkleinerer	Branson (Danbury, USA)
Digital-pH-Meter 646	pH-Meter	Knick (Berlin, Deutschland)
DU [®] 530	Photometer	Beckmann (Fullerton, USA)
ELISA Processor II	Photometer	Behring (Marburg, Deutschland)
Geldryer	Geltrockner	Bio-Rad (Hercules, USA)
Mastercycler gradient	Thermocycler	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Megafuge 1.0 R	Zentrifuge	Heraeus (Osterode, Deutschland)
Midi-GelSystem	Gelelektrophorese-System	Invitrogen (Carlsbad, USA)
PC 4400	Waage	Mettler (Giessen, Schweiz)
PowerEase 500	Spannungsquelle	Invitrogen (Carlsbad, USA)

PowerPac 1000	Spannungsquelle	Bio-Rad (Hercules, USA)
Primus 96 plus	Thermocycler	MWG (Eberswalde, Deutschland)
Protean [®] II Xi Cell	Gelelektrophorese- System	Bio-Rad (Hercules, USA)
Sartorius 2432	Waage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Smart Spec [™] 3000	Photometer	Bio-Rad (Hercules, USA)
UV-Transilluminator	Gel-Dokumentations- System	Phase (Lübeck, Deutschland)
X Cell II Blot Module	Western-Blot- Kammer	Invitrogen (Carlsbad, USA)
X Cell Sure Lock [™]	Gel-Elektrophorese- System	Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.1.3 Nährmedien

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

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

BHI-Brühe pH 7,4 +/- 0,2 (Difco) 37 g/l

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

Luria Bertani-Medium (LB-Medium); pH 7,0

Trypton (Oxoid) 10 g/l [wt/vol]

Hefeextrakt (Difco) 5 g/l [wt/vol]

NaCl 10 g/l [wt/vol]

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

SOC-Medium (Invitrogen)

2 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

20 mM Glucose

Trypticase Soja Brühe (TSB-BBL) ; pH 7,3

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

2.1.4 Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit entionisiertem Wasser angesetzt und durch 15 minütiges Erhitzen bei 121 °C autoklaviert.

Lyse-Puffer (Invitrogen)

50 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 7,8

400 mM NaCl

100 mM KCl

10 % Glycerol [v/v]

0,5 % Triton X-100 [v/v]

10 mM Imidazol

Amido-Black-Färbelösung (100 ml)

1 g Amidoblack (BioRad, Hercules), gelöst in 25 % Methanol, 10 % Essigsäure und 65 % ddH₂O

Diese Lösung wurde ohne Autoklavierung verwendet.

His-Tag Bindungspuffer 50 mM Imidazol

0,5 M NaCl

200 ml 0,1M NaPO₄; pH 7,4

25 ml 2 M Imidazol; pH 7,4

ad 1000 ml ddH₂O

Diese Lösung wurde ohne Autoklavierung verwendet.

His-Tag Elutionspuffer 100mM Imidazol 1 % Tween

0,5 M NaCl

200 ml 0,1M NaPO₄

50 ml 2 M Imidazol; pH 7,4

10 ml Tween20 [v/v]

ad 1000 ml

Diese Lösung wurde ohne Autoklavierung verwendet.

NHS-Kopplungs Puffer

0,2 M NaHCO₃

0,5 M NaCl

pH 8,3 (pH Einstellung mit NaOH)

Diese Lösung wurde ohne Autoklavierung verwendet.

NHS-Deaktivierungs Puffer

0,5 M Ethanolamin

0,5 M NaCl

pH 8,3 (pH-Einstellung mit NaOH)

NHS-Spül-Puffer

0,1 M Natriumacetat

0,5 M NaCl

pH 4,0 mit Acetat eingestellt

NHS-Elutionspuffer pH-Gradient

2 M Glycin-HCL pH 2,0

Phosphat gepufferte Natrium-Chlorid-Lösung (PBS)

0,02 M NaPO₄; pH 7,4

0,15 M NaCl

Chaotroper Gelfiltrations-Puffer

6 M Guanidinhydrochlorid, pH 8,6 (pH-Einstellung mit NaOH) in ddH₂O

DNA-Ladepuffer

Bromphenolblau 0,25 % [wt/vol]

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

Ficoll 15 % [vol/vol]

5 x TBE

Tris (Invitrogen) 54 g/l

Borsäure 27,5 g/l

EDTA 0,5 M (pH 8)

TBE wurde ohne Autoklavieren verwendet.

Agarosegel-Laufpuffer –Stammlösung (5x TBE)

Tris (Invitrogen) 54 g/l

Borsäure 27,5 g/l

EDTA 0,5 M (pH 8)

Diese Lösung wurde ohne Autoklavierung verwendet.

Ethidiumbromid-Stammlösung

Es wurde eine Ethidiumbromid-Stammlösung mit 10 mg/ml in ddH₂O angesetzt und ohne Autoklavieren verwendet.

Entfärbelösung für SDS-PAGE

40 % ddH₂O [vol/vol]

50 % Methanol [vol/vol]

10 % Essigsäure [vol/vol]

Diese Lösung wurde ohne Autoklavierung verwendet.

PBS-T

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

Gelatin-Stammlösung

10 mg/ml; gelöst in ddH₂O vorsichtig erwärmt im Wasserbad. Diese Stammlösung wurde ohne Autoklavieren verwendet.

2 M Imidazol-Stammlösung; pH 7,4

27,22 g Imidazol (Fluka-Chemie) auf 200 ml ddH₂O, pH-Wert mit 25 %iger HCl eingestellt. Die Stammlösung wurde ohne Autoklavieren verwendet.

0,1 M NaPO₄; pH 7,4 (1000 ml)

77,4 ml Na₂HPO_{4-s}

22,6 ml NaH₂PO₄

ad 1000 ml ddH₂O

SDS-Stammlösung

Es wurde eine 10 %ige [wt/v] Stammlösung Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS) in ddH₂O angesetzt. SDS wurde ohne Autoklavieren verwendet.

Sucrose-Lösung

50 g Sucrose

ad 100 ml ddH₂O

Diese Lösung wurde ohne Autoklavieren verwendet.

TE; pH 7,4

10 mM Tris·HCl, pH 8.0;

1 mM EDTA

Tris-HCl für SDS-PAGE

1,5 M Tris (Invitrogen) wurde mit 1 M HCl auf pH 8,8 eingestellt

1 M Tris (Invitrogen) wurde mit 1 M HCl auf pH 6,8 eingestellt

Die Lösungen wurden ohne Autoklavieren verwendet.

Proteinpräparationspuffer für zellwandgebundene Proteine

6 ml PBS

30 % Raffinose [wt/vol]

96 µl Lysostaphin

1 µl DNase

6 µl Lysozym (100 mg/ml)

Diese Lösung wurde ohne Autoklavierung verwendet.

2.1.5 Bakterienstämme

Tabelle 2-3 *S. epidermidis* Isolate

Stammname	Charakterisierung	Verwendung
<i>S. epidermidis</i> 5179 (Rohde et al., 2005b)	biofilmnegativ	DNA-Extraktion
	<i>ica</i> -negativ	Proteinexpression
	<i>aap</i> -positiv	Phänotypuntersuchungen
<i>S. epidermidis</i> 5179-R1 (Rohde et al., 2005b)	biofilmpositiv	DNA-Extraktion
	PIA.negativ	Proteinexpression
	<i>aap</i> -positiv	Phänotypuntersuchungen
<i>S. epidermidis</i> 1585	biofilmnegativ	DNA-Extraktion
	<i>ica</i> -negativ	Proteinexpression
	<i>aap</i> -negativ	Phänotypuntersuchungen
<i>S. epidermidis</i> 1457	biofilmpositiv	DNA-Extraktion
	<i>ica</i> -positiv	Proteinexpression
	<i>aap</i> -negativ	Phänotypuntersuchungen
<i>S. epidermidis</i> RP62A	biofilmpositiv	DNA-Extraktion
	<i>ica</i> -positiv	Proteinexpression
	<i>aap</i> -positiv	Phänotypuntersuchungen

2.1.6 Stammsammlung

Zur epidemiologischen Untersuchung mittels PCR, SDS-PAGE und Westernblot wurde eine Stammsammlung aus klinisch nachgewiesenen Hüft- und Knieendoprothesen-Infektionen verwendet (Rohde et al., 2007).

2.1.7 *E. coli*-Stämme

Tabelle 2-4 Verwendete *E. coli* Bakterienstämme für molekularbiologische Arbeiten

Name	Verwendung	Spezifikationen	Hersteller
<i>E. coli</i> Top 10 Chemisch- kompetente Zellen	Generierung der Entry-Klone	Klonwirt: Genotyp F <i>mcrA</i> D (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) F80 <i>lacZ</i> DM15 <i>DlacX74recA1</i> <i>deoR araD139 D (ara-leu)7697</i> <i>galU galK rpsL (StrR) endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>E. coli</i> DH5 α Library efficiency Zellen	Plasmidaufbewahrung	Genotyp F- ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 $\Delta((lacZYA-argF)U169 recA1$ <i>endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>E. coli</i> BL21AI Chemisch- kompetente Zellen	Proteinexpression	Expressionswirt F- <i>ompT hsdSB</i> (<i>rB-mB-</i>) <i>gal dcm</i> <i>araB::T7RNAPtetA</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.1.8 Vektoren

Alle Vektoren wurden von Invitrogen kommerziell erworben. Es handelte sich dabei um den pENTRTM/D-Topo (2580 bp) als ENTR-Vektor, sowie dem pDestTM17-Vektor (6354 bp) als Destinationsvektor.

2.1.9 Oligonucleotide

Soweit nicht anders angegeben, wurden die in Tabelle 2-5 aufgelisteten Oligonucleotide mit Vektor NTI entwickelt und anschließend durch die Firma MWG (Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 2-5 Verwendete Oligonukleotide

Name	Verwendung	Sequenz
M13 forward (Invitrogen, Carlsbad, USA)	Sequenzierung Entry-Klone	5'-CTGGCCGTCGTTTAC-3'
M13 reverse (Invitrogen, Carlsbad, USA)	Sequenzierung Entry-Klone	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
T7-Terminator (Invitrogen, Carlsbad, USA)	Sequenzierung Destinations Klone	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
T7-Promotor (Invitrogen, Carlsbad, USA)	Sequenzierung Destinations Klone	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3,
FOR_212AS_R	Erzeugung	5'CACCGGTACAAACAGCTGGTG'3
E2	rekombinanter Proteine	
Forward distal AXA-Motiv	Erzeugung rekombinanter Proteine	5'-CACCGAAGAAAAACAAGTTGATC-3'
Reverse 3'212AS conserved Region	Erzeugung rekombinanter Proteine	5'-TTATGCTTTAGGAGTGTATGTCAATG-3'
Aap rev1	Erzeugung rekombinanter Proteine	5'-CCGAAAGGTAGTCAAACAACGC-3'
5'-AapRT forward	Erzeugung rekombinanter Proteine	5'-CACCGATTTAGATGGTGCAACATTGACAT-3'
Rev 3' Aap	Erzeugung rekombinanter Proteine	5'-AGTTTTTATATGAAATTATTTTCATTACCT-3'
Rev 3'212 AS	Erzeugung rekombinanter	5'-TTATGCTTTAGGAGTGTATGTCAATG-3'

Rev 3'212 AS	Erzeugung rekombinanter Proteine	5'-TTATGCTTTAGGAGTGTATGTCAATG-3'
5'212AS	Erzeugung rekombinanter Proteine	5'-CACCACAGCTGGTGCAGTTCAAT-3'
AaStrA 64 for	Erzeugung rekombinanter Proteine	5'CACCAACAACGTTGAAGCGGCAACT3'
AaStrA 510 rev	Erzeugung rekombinanter Proteine	5'TTATTTATTTAAGTCTATACGATATAACTTCAC AT'3

2.1.10 pENTRTM /D-Topo-Vektoren und resultierende Destinationsvektoren

Alle Vektoren wurden kommerziell erworben, im Nachfolgenden werden die konstruierten Plasmide beschrieben. Zur Generierung der blunt-end PCR Produkte wurden die in Tabelle 2-5 beschriebenen Oligonukleotid-Kombinationen verwendet und wie in Kapitel 2.3.8 vorgegangen.

Tabelle 2-6 Übersicht der konstruierten Plasmide

Verwendete Oligonukleotide	ENTR-Plasmid	Destinationsvektor
Forward AXA Reverse 3'-212AMS	pENTR TM Aap Domäne-A	AapDomA _{pDest 17}
Forward 5'AapRT Reverse 3'	pENTR TM Aap Domäne- B	AapDomB _{pDest 17}
Forward AXA Reverse 3'Aap	pENTR TM Aap komplett	Aapkomplett _{pDest 17}
AaStrA 64 Forward AaStrA 510 Reverse	pENTR TM AaStrA	AaStrA _{pDest 17}

2.1.11 Enzyme

Tabelle 2-7 Enzyme

Name	Verwendung	Hersteller
DNase	DNA-Hydrolyse	Sigma (St. Louis, USA)
Lysostaphin	Zellwandlyse von Staphylokokken	Sigma (St. Louis, USA)
Lysozym	Bakterienlyse	Sigma (St. Louis, USA)
Clonase II Enzyme Mix	Insert Transfer in den Destinationsvektor	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Trypsin	Fraktionierter Verdau, Standardenzym	Pierce (Rockford, USA)
<i>Pfx</i> -Polymerase	Erzeugung blunt-End PCR-Produkte	Invitrogen (Carlsbad, USA)
F-550LTaq-Polymerase	Standard-Polymerase	Finnzyme (Espoo, Finnland)
Phusion	Erzeugung von blunt-End PCR-Produkten	Finnzyme (Espoo, Finnland)
Triplemaster	Langstrecken-PCR	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
<i>EcoR</i> I	Restriktionsendonukleasen	GE Helathcare (Faierfield, USA)
<i>Ava</i> I	Restriktionsendonukleasen	GE Helathcare (Faierfield, USA)
<i>Hind</i> III	Restriktionsendonukleasen	GE Helathcare (Faierfield, USA)
<i>Nco</i> I	Restriktionsendonukleasen	GE Helathcare (Faierfield, USA)

Zur Verwendung der Enzyme wurde nach Herstellervorgaben vorgegangen und die mitgelieferten Puffer verwendet.

2.2 Allgemeine mikrobiologische Arbeiten

2.2.1 Bakterienkultivierung

Die Bakterien wurden zur Stammhaltung auf Agar-Platten im 3-Ösen-Verfahren ausgestrichen, bei 37 °C im Brutschrank bebrütet und anschließend bei 4 °C im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Flüssigkulturen wurden durch Inokulation von Bakterien in das entsprechende Flüssigmedium erstellt und bei 37 °C und 200 rpm bebrütet. Den Medien wurden gegebenenfalls Antibiotika zur Selektion zugesetzt.

2.2.2 Biofilmtest

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung wurde mittels eines semiquantitativen Biofilmtestes (Mack et al., 2001) in Mikrotiterplatten evaluiert. Eine Einzelkolonie wurde dazu in 2 ml TSB-BBL suspendiert und für 6 h bei 37 °C und 200 rpm bebrütet. Aus dieser Vorkultur wurde eine 1:100 Verdünnung im gleichen Medium hergestellt und hiervon je 200 µl in vier Näpfe einer Mikrotiterplatte (Nunc, Nunc) gegeben. Nach 20 h Wachstum bei 37 °C im Brutschrank wurde das Medium ausgeschlagen und die Platte dreimal mit 200 µl PBS pro Napf gewaschen. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend bei 37 °C für 2 h getrocknet und die anheftenden Bakterien mit 50 µl Kristallviolett pro Napf für 5 min gefärbt. Die Färbelösung wurde unter fließendem Wasser vorsichtig ausgespült und nach erneutem Trocknen die Absorption im ELISA Processor II (Behring) bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm bestimmt. Der Biofilmphänotyp wurde durch Bildung des Mittelwertes aus 2 mal 4 Einzelwerten beurteilt. Hierbei galt der Grenzwert von $A_{570} = 0,1$ als Trennwert zwischen biofilmpositivem und biofilmnegativem Phänotyp.

2.2.3 Bestimmung der Bakteriendichte in Flüssigmedien

Flüssigkulturen wurden 1:10 verdünnt und die Absorption bei 600 nm gemessen. Der gemessene Wert ist der sogenannte Optical Density Wert (OD 600). Hierbei lag der lineare Messbereich zwischen 0,1-1, wo eine Beziehung zwischen Bakterienzahl und optischer Dichte vorliegt.

2.2.4 Grampräparate

Zur Herstellung eines nach Gram gefärbten Präparats wurden zunächst die verdünnten Bakterien auf einem Objektträger aufgebracht und an der Luft getrocknet. Danach erfolgte eine Hitzefixierung über einer offenen Flamme. Zur Färbung wurde der

Objektträger für 1-2 min. mit Gentianaviolett bedeckt. Anschließend erfolgte eine Spülung mit Lugol'scher Lösung und eine Inkubation von 1-2 min in dieser Lösung. Eine Entfärbung erfolgte mit 95 % Alkohol. Durch eine kurze Spülung mit Leitungswasser wurde die Entfärbung beendet. Die Gegenfärbung erfolgt mit einer Safraninlösung für 1-2 min.

2.2.5 Immunfluoreszenz-Test

Diese dienen dem mikroskopischen Nachweis von antigenen Strukturen mit Hilfe spezifischer Erst-Antikörper und markierter Zweit-Antikörper. Dafür wurden zunächst Bakterienkulturen auf eine optimale OD₆₀₀ von 0,3 in PBS verdünnt und davon 20 µl auf ein IFT-Objektträger gegeben. Die Lösung wurde anschließend im Brutschrank eingetrocknet und der IFT-Objektträger anschließend für 2 min in -20 °C kaltes Aceton zur Fixierung der Bakterien getaucht. Das Aceton wurde bei Raumtemperatur aufgetrocknet, die Objektträger konnten dann bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert werden. Der Erst-Antikörper wurde 1:50 in PBS + 0,1 % BSA verdünnt und von dieser Lösung 15 µl pro Spot aufgetragen. Der Erst-Antikörper wurde für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Objektträger wurde dreimal für 2 min in PBS gewaschen und anschließend bei 37 °C getrocknet.

Nach vollständiger Trocknung des Objektträgers wurde der Fluoreszenz markierte Zweit-Antikörper (anti-rabbit-IgG) 1:80 in PBS + 0,1 % BSA verdünnt und 15 µl davon pro Spot auf den Objektträger aufgetragen und für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Auswertung erfolgte die Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop.

2.3 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA

2.3.1 Präparation chromosomaler DNA

Chromosomale DNA aus grampositiven Bakterien wurde, nach Anzucht der Bakterien in 2 ml BHI-Brühe, mit Hilfe des Genomic DNA Purification Kit der Firma Qiagen präpariert. Es wurde nach Protokoll vorgegangen. Allerdings wurde zusätzlich ein Lysostaphinverdau vorweg durchgeführt, um die dicke Peptidoglykanschicht der grampositiven Bakterien zu zerstören.

2.3.2 Plasmidpräparation

Plasmidpräparation aus *E. coli* wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das System beruht auf alkalischer Lyse der Bakterienzellen gefolgt von einer Denaturierung und Präzipitation der chromosomalen DNA sowie der Proteine, wobei die Plasmid-DNA in Lösung verbleibt (Birnboim and Doly, 1979). Zur Aufreinigung erfolgt eine Adsorption der Plasmid-DNA an eine Silicatmatrix in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. Die anschließende Elution der DNA erfolgte in salzarmem Puffer. Das Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers. In der Regel wurden 1,5 ml einer LB-Schüttelkultur zur Plasmidpräparation eingesetzt. Das Eluat wurde direkt für Sequenzierung oder zu Restriktionsanalysen eingesetzt.

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Gelelektrophorese wurde zur größenabhängigen Auftrennung von Plasmiden, von Fragmenten gespaltener Plasmide oder dem Nachweis von Amplifikaten aus der PCR eingesetzt (Sambrook et al., 1989). Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden 0,8 - 1,5 %ige [w/v] Agarosegele verwendet. Hochreine Agarose (SeaKem ME Agarose, Cambrex Bioscience Rockland Inc., Rockland, ME USA) wurde in 100 ml 0,5-fach TBE-Puffer aufgekocht, mit 3,3 µl Ethidiumbromidkonzentrat versetzt und in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Die Proben wurden mit 2 µl DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels eingefüllt. Eine Auftrennung erfolgt bei konstanter Spannung von 3-6 V/cm in 0,5-fach TBE als Laufpuffer. Als Größenstandard wurde ein Mix aus *Hind*III gespaltener λ-DNA und *Hae*III gespaltener φX174-DNA (Finnzyme, Espoo, Finnland) aufgetragen. Er enthält 19 Fragmente der folgenden Größen: 23 kb, 9,4 kb, 6,5 kb, 4,3 kb, 2,3 kb, 3 kb, 1,3 kb, 1 kb, 872 bp, 564 bp, 310 bp, 281 bp, 271 bp, 234 bp, 194 bp, 125 bp, 118 bp, 72 bp.

2.3.4 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen (REN)

Um die präparierten Plasmide zu analysieren wurden diese mit den geeigneten Restriktionsenzymen in den korrespondierenden, optimierten Puffern nach Herstellerangaben für 2-24 h bei 37 °C inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die resultierenden Fragmente wurden nach Färbung mit Ethidiumbromid auf einem Transilluminator dargestellt.

2.3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Dazu wurden, je nach DNA und gewünschtem PCR-Produkt, verschiedene Polymerasen benutzt. Die Oligonucleotide um den Start beziehungsweise das Ende definieren wurden mit dem Computerprogramm Vector NTI entwickelt. Durch den Einsatz verschiedener Puffer und Veränderung an Annealing-Temperatur und Elongationszeit konnten die PCR-Bedingungen optimiert und den Bedürfnissen angepasst werden. Die optimalen Annealing-Temperaturen wurden mittels Temperatur-Gradienten-PCR ermittelt. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Zu den Einzelheiten der PCR-Bedingungen siehe auch Tabelle 2-8 PCR-Bedingungen), sowie Tabelle 2-9 Primer-Kombinationen). Es wurden die polymerasespezifischen Puffer verwendet.

Tabelle 2-8 PCR-Bedingungen

Schritt	Temp	Zeit	Wdh.
1. Initiale Denaturierung :	94 °C	2'	1X
2. Denaturierungs- Temperatur	94 °C	30''	35X
3. Annealing Temperatur	siehe Tabelle 2-9	30''	35X
4. Elongationszeit	72 °C	30'' / 500 bp	35X
5. Finale Elongationszeit	72 °C	5'	1X

Tabelle 2-9 Primer-Kombinationen

Fragment	Polymerase	Oligonukleotide	Annealing-Temperatur	Elongationszeit (sek)
rAap _{DomA}	Platinum-Pfx	Forward AXA Reverse 3'-212AMS	49 °C	120
rAap _{DomB}	Platinum-Pfx	Forward 5'AapRT Reverse 3'	62 °C	120
rAap _{komplett}	Platinum-Pfx	Forward AXA Reverse 3'Aap	59 °C	180
rAaStrA	Phusion	AaSTrA 64 Forward AaSTrA 510 Reverse	55 °C	30
M13-Insert	F 550L-Taq / Triplemaster	M 13 forward M13 reverse	55 °C	Je nach Insert
T7-Insert	F550L-Taq / Tripelmaster	T 7 Terminator T 7 Promotor	55 °C	Je nach Insert

2.3.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

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

2.3.7 Sequenzanalyse

Zur Sequenzanalyse wurde der Sequenzierservice der Firma MWG (Martinsried, Deutschland) in Anspruch genommen.

2.3.8 Klonierung mit Gateway-Technologie™ (Invitrogen)

Die Gateway-Technologie ist eine direktionale Klonierungsstrategie, die auf der seitenspezifischen Rekombinationsfähigkeit des Bakteriophagen Lambda beruht. Nach Klonierung in den sogenannten ENTR-Vektor konnte der gewünschte Genabschnitt in einen Destinations-Vektor nach Wahl subkloniert werden. Dadurch kann ein bestimmter Genabschnitt in den gewünschten Vektor kloniert und immer wieder in andere Vektoren umkloniert werden.

2.3.9 Direktionale Klonierung von PCR-Produkten

Um Amplifikate aus PCR-Reaktionen in ein Plasmid einzufügen wurden zunächst die PCR-Produkte entweder via Gel-Extraktion oder PCR-Aufreinigung, wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben, von Polymerase, dNTPs oder Salzen befreit und in TE-Puffer überführt. Als Plasmid wurde der pENTR/D-Topo™ Vektor der Firma Invitrogen verwendet. Dieser Vektor besitzt eine Topoisomerase, welche die Orientierung der PCR-Produkte über sogenannte Überhänge erkennt und damit in über 90 % der Fälle für eine korrekte Orientierung des zu inserierenden PCR-Produktes sorgt. Nach erfolgter Inserierungsreaktion wurde ein Teil der Klonierungsreaktion in *E. coli Top 10* Zellen transformiert. Über eine Kanamycin-Resistenz, konnten Klone selektiert werden. Aus den positiv selektierten Klonen wurden, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, Plasmide präpariert und mittels M13-Primer PCR und ggf. mit anschließender Sequenzierung oder mittels REN-Spaltung auf Korrektheit überprüft. Klone mit korrektem PCR-Insert wurden in die Clonase-Reaktion überführt.

2.3.10 Clonase-Reaktion

Die Clonase-Reaktion wurde durchgeführt, um das PCR-Produkt aus dem ENTR-Vektor in den Destinationsvektor zu überführen. Als Destinationsvektor wurde der pDest™17-Vektor der Firma Invitrogen verwendet. Für diese Reaktion wurde der Clonase-Enzyme-Mix II™ der Firma Invitrogen verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen. Dabei war besonders auf die DNA-Konzentrationen von Destinationsvektor und Enter-Vektor zu achten, da, bei zu starker Konzentrationsverschiebung in eine Richtung, unspezifische Reaktionen ablaufen könnten.

Nach abgelaufener Clonase-Reaktion wurde das Produkt in *E. coli* Library-Efficiency DH5α Zellen transformiert. Durch die Insertion des gewünschten DNA-Fragments in

den pDestTM 17 Vektor wurde eine Chloramphenicol-Resistenz zerstört und eine Ampicillin-Resistenz aktiviert. Dadurch konnten die Klone erfolgreich selektioniert werden. Zusätzlich dazu wurden die Klone mittels T7-Primer PCR überprüft und zusätzlich sequenziert.

2.3.11 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Es wurden chemisch-kompetente *E. coli* Bakterien der Firma Invitrogen verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Von dem zu transformierenden Plasmid wurden 50-150 ng eingesetzt. Dazu wurde es mit einem μ l Salzlösung vermennt und zu den chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein 30 sek. Hitzeschock bei 42 °C um die bakteriellen Exonukleasen zu zerstören. Nun wurde zu dem Ansatz 250-500 μ l SOC-Medium, je nach verwendeter Zellreihe, hinzugegeben und die Bakterien für 30 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach Ablauf der dreissig minütigen Inkubationszeit, wurden die Bakterien auf Luria-Bertani-Agarplatten mit Antibiotikazusatz nach Bedarf ausplattiert. Nach 18 h Wachstum wurden die gewachsenen Klone analysiert.

2.3.12 Transformation in einen optimierten Protein-Expressionsstamm

Als Protein-Expressionsstamm wurde der *E. coli* BL21AI-Stamm der Firma Invitrogen verwendet. Es wurde 1 μ l aufgereinigtes Plasmid aus DH5 α Zellen in die BL21AI chemisch kompetenten *E. coli* Zellen transformiert, hierfür wurde wie in Kapitel 2.3.11 beschrieben vorgegangen.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Pilotexpression

Die Pilotexpression dient Funktionsprüfung der Klone und der Evaluierung der optimalen Expressionsbedingungen für die Proteine. Dafür wurden mehrere Klone in Luria-Bertani-Brühe mit 50 μ g/ml Carbenicillin bei 220 rpm und 37 °C angezüchtet. Nach 16 h wurde eine Hauptkultur mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,05 angesetzt und diese bis zum Erreichen der log-Phase bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 bebrütet. Nun wurden von den Flüssigkulturen jeweils 2 ml in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei – 20 °C gelagert. Die Hauptkulturen wurden geteilt und jeweils eine für jeden Klon mit

0,5 % Arabinose versehen um die Expression zu initiieren. Nach jeweils einer Stunde wurde von den Kulturen 2 ml abpipettiert und bei – 20 °C gelagert. Nach 6 h wurde die Pilotexpression beendet. Die gewonnenen Proben aufgetaut und für 30 min bei 13.000 rpm pelletiert. Zur Aufschließung der Zellen wurden diese wiederholten Temperaturschocks ausgesetzt. Dafür wurde das Pellet in 100 µl Lyse-Puffer resuspendiert und dreimal abwechselnd bei 42 °C und – 80 °C für 5 min inkubiert. Durch die Temperaturschocks wurde die Bakterienwand perforiert und die im Cytosol befindlichen Proteine in den Puffer geschwemmt. Durch eine abschließende Zentrifugation wurden die Bakterienreste pelletiert und der Überstand mit den rekombinanten Proteinen in ein steriles Reaktionsgefäß überführt.

2.4.2 Expression rekombinanter Proteine

Zur Expression der rekombinanten Proteine wurden Vorkulturen der entsprechenden Klone in 10 ml LB-Brühe mit 50 µg/ml Carbenicillin über Nacht kultiviert. Die Vorkultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,05 verdünnt und bis zum Erreichen der *log* Phase, bei einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert. Dann erfolgte die Induktion durch Arabinose mit einer Endkonzentration von 0,5 %. Nach weiteren 4 h erfolgte die Ernte der Zellen. Dazu wurde die Bakterienkultur für 20 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

2.4.3 Quantitative Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Dieses Verfahren basiert auf dem Farbstoff Brilliant Blau G250, welcher bei Bindung an basische oder aromatische Aminosäurereste sein Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm verschiebt.

Zunächst wurde das konzentrierte Bradford-Reagenz der Firma Bio-Rad 1 zu 5 mit ddH₂O verdünnt und anschließend mittels eines Papierfilters von Schwebstoffen befreit. 50 µl Probe wurde in eine 2,5 ml Küvette vorgelegt und mit dem Bradford-Reagenz gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde als zunächst eine Standardverdünnungsreihe mit bovinem Gamma-Globulin gemessen und anschließend die Proteinkonzentration der Proben im Photometer bestimmt.

2.4.4 SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) –PAGE(Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese)

Zur Proteinauftrennung nach Ladung und Größe wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Die Proben wurden in den entsprechenden Probenpuffern aufgenommen und abhängig vom Protokoll weiterverarbeitet. Je nach Gelart wurden verschiedene Laufpuffer

benutzt (siehe Tabelle 2-1). Die Probestaschen wurden mit Puffer gespült, die Proben mit einer Pipette direkt in die Taschen gegeben. Die Spannung betrug 100–200 V; die Laufzeit richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine und gewünschter Fragestellung. Gefärbt wurden die Gele, soweit nicht anders erwähnt, mit SimplyBlue SafeStain (Invitrogen).

2.4.5 Herstellung von 8 % SDS-Gelen

Um SDS-Gele herzustellen wurde nach Angaben der Firma Invitrogen vorgegangen. Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Die unten genannten Lösungen wurden durch Vortexen gemischt und sofort in die Kassetten gegeben. Anschließend wurde das noch flüssige Trenngel mit Wasser überschichtet um ein austrocknen der Gelmatrix zu vermeiden. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngeles nach ca. 1h, wurde das Sammelgel zusammengemischt und auf das Trenngel gegeben. Um die Probestaschen zu formen wurde in das noch flüssige Sammelgel ein Taschenkamm gesteckt, der die gewünschten Taschen formte. Die Gele wurden in Plastik eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2-10 SDS-Gel-Komposition

Lösung	Menge
Trenngel	
Acrylamid 30 %	9,96 ml
Tris-HCl pH 8,8	14,1 ml
10% SDS-Stammlösung	375 µl
ddH ₂ O	6,2 ml
50 %-Sucrose-Stammlösung	6,0 ml
Temed	9,375 µl
APS (50 mg/ml)	937,5 µl
Sammelgel	
Acrylamid 30 %	2,4 ml
Tris-HCl pH 6,8	6,3 ml
10 % SDS-Stammlösung	187,5 µl
H ₂ O	8,55 ml
Temed	5,0 µl
APS (50 mg/ml)	937,5 µl

2.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Durchführung der eigentlichen Elektrophorese wurde je nach Gel-Art unterschiedlich vorgegangen.

Minigel: Ein NuPage™ 4-12 % Bis-Tris Gradientengel (Invitrogen) wurde mit Aliquots einer Proteingesamtkonzentration von 0,01-1,0 µl, die mit 1x Probenpuffer versetzt waren, beladen. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte in einer X Cell Sure Lock™ Elektrophoresekammer bei 200 V für 1 h. Als Laufpuffer diente der NuPage® MES SDS Running Buffer (Invitrogen).

Maxigel Ein SDS-Polyacrylamidgel bestehend aus Sammelgel und Trenngel wurde in einer Protean® II Xi Cell (BioRad) Kammer hergestellt. Zuerst wurde das 11%ige Trenngel (11 % Acrylamid, 33,5 ml dH₂O, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,2 % Ammoniumpersulfat (APS) und 0,2 % TEMED) gegossen, wobei APS und TEMED die Polymerisation auslösen. APS wurde vor Gebrauch als 10 % [w/v] Stammlösung frisch angesetzt. Zur Entfernung von Luftblasen wurde das frische Gel mit 500 µl Butanol überschichtet und härtete 1 h aus. Nach Abgießen des Butanols wurde das 4 %ige Sammelgel (4% Acrylamid, 6,1 ml dH₂O, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,2 % SDS, 0,2 % APS und 0,2 % TEMED) gegossen und Probenaschen durch das Einstecken eines Kamms erzeugt. Das Gel wurde mit Aliquots einer Gesamtproteinkonzentration von 0,01-10 µg beladen, die mit 10 µl 1x Probenpuffer versetzt waren und vor Beladen des Gels 10 min bei 70 °C aufgekocht wurden. Als Größenstandard wurden 10 µl des Precision Plus Prestained Protein Standard ohne Probenpuffer und Aufkochen appliziert. Die Proben wurden bei 25 mA in das Sammelgel einlaufen gelassen und bei 35 mA für ca. 3 h nach ihrer Größe aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x Elektrophoresepuffer.

2.5 Nachweis von Proteinen in SDS-PAGE

2.5.1 Coomassie-Färbung

Es wurde der Simply-Blue Safestain der Firma Invitrogen verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen. Das SDS-Gel wurde für 1 min in 100 ml ddH₂O in der Mikrowelle erhitzt und für 1 min bei RT auf einem Schüttelinkubator gespült und danach das ddH₂O durch frisches ersetzt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden 30 ml SimplyBlue™ hinzugefügt und das Gel für 45 sek in der Mikrowelle erhitzt. Das Gel wurde für 15 min bei RT in der Färbelösung belassen. Zum

Entfärben wurde das Färbemittel abgegossen und durch ddH₂O ersetzt. Nach 10 min wurde für eine höhere Sensitivität dieser Färbemethode eine 20 %ige NaCl Lösung dazugegeben.

2.5.2 Silber-Färbung

Die Silberfärbung ist eine äußerst sensitive Methode um Proteine in der SDS-PAGE anzufärben. Hierfür wurde das SilverSnap™ der Firma Pierce verwendet. Hierbei wurden nur ultrareine Chemikalien verwendet. Hier beschrieben ist die Färbung eines Mini-Geles, bei Midi-Gelen wurde entsprechend das doppelte Volumen der Lösungen verwendet.

Zunächst wurde das Gel zweimal 15 min in ddH₂O gespült, um das SDS aus dem Gel zu entfernen. Anschließend wurde das Gel in einer Fixierlösung, bestehend aus 60 % ddH₂O, 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure, für zweimal 15 min fixiert. Im Anschluss an die Fixierung wurde das Gel zweimal in 50 ml 10 %igem Ethanol für 5 min gewaschen. Vor dem weiteren Procedere wurde das Gel zweimal für 5 min in ddH₂O gewaschen. Das so präparierte Gel konnte nun der eigentlichen Färbeprozedur unterzogen werden. Alle nun benutzten Lösungen wurden direkt vor Gebrauch angesetzt. Zunächst wurde das Gel mit der Sensitizer-Lösung, 50 µl Stocklösung auf 25 ml ddH₂O, für exakt eine Minute inkubiert und anschließend das Gel 2 mal für jeweils eine Minute gewaschen. 25 ml der Färbelösung wurden mit 250 ml Verstärkerlösung versetzt und für 5 min auf das Gel gegeben. Nach dem Abgießen der Färbelösung wurde das Gel zweimal für 20 sek in ddH₂O gespült und anschließend mit dem Entwickler für 2-3 min, bis zum gewünschten Färbegrad entwickelt, die Färbereaktion wurde durch Abgießen des Entwicklers und Zugabe von 5 % Essigsäure gestoppt.

2.5.3 Western-Blot

Um weiterführende Versuche mit gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen durchzuführen wurden diese per Elektrotransfer auf eine PVDF- Membran übertragen. Dafür wurde das X Cell II™ Blot Module (Invitrogen) benutzt. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die Laufzeit betrug 1 h bei 30V; als Laufpuffer diente der NuPage Transferpuffer 1x mit 10 % Methanol. Der Blot diente als Ausgangsmaterial für verschiedene weiterführende Versuche. Wurde der Blot nicht sofort verarbeitet, musste er bei – 20 °C gelagert werden. Dafür wurde er zunächst zwischen Filterpapier getrocknet und anschließend eingeschweisst. Vor weiterer Verarbeitung musste er zunächst aufgetaut und mit Methanol angefeuchtet werden. Vor

Inkubation mit Antikörpern mussten die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt werden. Dafür wurde der Blot über Nacht und bei 4 °C mit PBS + 0,05 % Tween20™ (PBS-T) und 1 % fettfreiem Milchpulver oder BSA inkubiert. Danach wurde der Blot dreimal mit PBS-T gespült. Nun folgte die Inkubation mit dem Erst-Antikörper, der zwischen 1:5000 und 1:20000 in PBS-T verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei RT und 150 rpm auf einem Horizontal-Schüttler. Anschließend wurde der Blot gewaschen um die freien, nicht gebundenen Antikörper, von dem Blot zu entfernen. Dafür wurde der Blot ein mal 15 min und 2 mal 5 min mit PBS-T gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran mit dem entsprechenden Zweitantikörper, also einem Antikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist, inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde die Zweitantikörperlösung abgegossen und der Blot einmal 15 min und zweimal 5 min mit PBS-T gewaschen. Abschließend erfolgte ein Spülschritt mit ddH₂O. Je nach verwendetem Zweit-Antikörper wurde der Blot entweder mit Alkalischer Phosphatase Substrat oder Peroxidase Substrat inkubiert. Bei Alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörpern ist direkt ein lila Farbumschlag auf der Blotmembran zu erkennen, bei der Peroxidase muss das Signal auf der Blotmembran mittels Röntgenfilm nachgewiesen werden. Durch Inkubation der Peroxidase mit dem Substrat wird in einer chemischen Reaktion Licht freigesetzt, welches den Röntgenfilm schwärzt. Gebundene Antikörper bilden dann ein Bandenmuster, welches den jeweiligen Proteinen zugeordnet werden kann.

2.6 Affinitätschromatographie

2.6.1 Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels His-Tag

Ziel der Aufreinigung war es, die rekombinanten Proteine in möglichst reiner Form zu erhalten. Dafür wurde wie folgt vorgegangen. Die Flüssigkulturen wurden für 30 min bei 4 °C und 6000 rpm pelletiert, es wurden Kulturvolumina zwischen 100 und 2000 ml gewählt. Anschließend wurde das Pellet in HisTrap Binding-Buffer (50 µl Puffer / ml Kulturvolumen) resuspendiert. Um die intrazellulären Proteine freizusetzen wurden die Bakterien mit Ultraschall aufgeschlossen. Danach wurde die Probe erneut bei 6000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert und der Überstand mit dem rekombinanten Protein sterilfiltriert in ein frisches Gefäß überführt.

2.6.2 Aufreinigung mit His-Trap-Säulen

Die Vorbereitung der HisTrap-Säule geschah wie folgt: Pro ml Säulenvolumen wurde diese initial mit 5 ml ddH₂O gespült und anschließend mit 0,5 ml 0,1M Nickel-Salz-Lösung beladen. Darauf folgte eine erneute Spülung mit 5 ml pro ml Säulenvolumen ddH₂O. Die Proteinaufreinigung im His-Trap Verfahren beruht auf immobilisierten Nickelionen welche mittels eines Spacerarms an hoch verdichtete Agarose gekoppelt sind. Über die Nickel-Ionen werden die C- oder N-terminal an dem gewünschten Protein fusionierten poly-Histidin-Reste gebunden, die eine intrinsische Affinität zu zweiwertigen Metallionen haben.

Dabei wird zur Kopplung der sechsfach Histidinmarkierung an die Nickel-ionen eine Imidazolkonzentration von 50 mM (HisTrap Binding Puffer, Puffer A) eingehalten um unspezifische Bindungen von Protein endogenen poly-Histidin-Resten an die Nickel-Ionen zu verhindern. Um die His- Proteine wieder zu mobilisieren werden sie mit einem kombinierten Imidazol-Tween 20 Gradienten von den Nickel-Ionen abgespült und fraktioniert aufgefangen.

Zur Evaluation der Elutionsbedingungen wurde eine Imidazol/Tween20 Gradientenelution (HisTrap Elutionspuffer, Puffer B) durchgeführt. Die ermittelten optimalen Konzentrationen wurden dann für weitere Aufreinigungen als Standard verwendet.

Tabelle 2-11 Flussprogram der 1 ml His-Trap-Säule (Äkta-Prime-System)

Breakpoint (ml)	Fluss (ml/min)	Weichenstellung	% Puffer B	Fraktionsgröße	Verwendung
0	1	Load	0	0	
20	1	Inject	0	3	Proben- injektion
40	1	Load	0	1	
60	1	Load	100	1	Elutions- beginn
70	1	Load	100	1	
80	1	Load	0	3	Spülen

Breakpoint: Durchflussvolumen; Fluss: Flussgeschwindigkeit; % B: Anteil Elutionspuffer

Tabelle 2-12 Flussprogram der 5 ml His-Trap-Säule (Äkta-Prime-System)

Breakpoint (ml)	Fluss (ml/min)	Weichenstellung	% Puffer B	Fraktionsgröße	Verwendu ng
0	1	Load	0	0	
100	1	Inject	0	7	Proben- injektion
200	1	Load	0	5	
300	1	Load	100	5	Elutions- beginn
350	1	Load	100	5	
400	1	Load	0	7	Spülen

Breakpoint: Durchflussvolumen; Fluss: Flussgeschwindigkeit; % B: Anteil Elutionspuffer

Als Pumpe wurde die Äkta-Prime der Firma GE Healthcare benutzt. Die gewonnenen Proben wurden in Reagenzgläsern aufgefangen, mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.6.3 Probenanalyse

Die Proben wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit überprüft, die Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode nach Umpufferung in PBS mit Amicon-Ultra Filtereinheiten bestimmt.

2.6.4 Liganden-Identifikation mittels HiTrap NHS-activated HP Säulen

Um Liganden eines definierten Proteins zu identifizieren wurden die HiTrap NHS-activated HP Säulen der Firma GE Healthcare verwendet. Grundlage dieser Technik ist die Immobilisation eines Proteins durch kovalente Bindung an eine Säulenmatrix, hier N-Hydroxysuccinimid. Die so immobilisierte Substanz dient nun als potentieller Bindungspartner für potentielle Liganden. Es wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen und eine Flussrate von 1 ml/min angewendet.

Kopplungsreaktion:

Es wurden in 1,5 ml Kopplungspuffer 10 mg/ml Protein gelöst. Die NHS-Säule wurde mit 2 ml 1 mM HCl zur Auswaschung des Isopropanols und zur Aktivierung der

Säulenmatrix. Anschließend wurde das Protein im Kopplungspuffer auf die Säule gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei wurde eine peristaltische Pumpe verwendet, um die Kopplungslösung in der Säule zirkulieren zu lassen und damit die Kopplungsreaktionseffizienz zu steigern.

Deaktivierung und Waschung:

Nach der Inkubation wurde die Säule nach folgendem Schema deaktiviert und gewaschen. Es wurden abwechselnd jeweils dreimal mit 2 ml Puffer A (0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3) und B (0,1 M Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4) zur Spülung der Säule verwendet. Zur Neutralisierung des pH Wertes wurde die Säule mit 0,05 M NaPO₄, pH 7,4, gespült.

Ligandenidentifizierung:

Zur Vorbereitung der NHS-Affinitätschromatographie wurde die HiTrap NHS-HP Säule zunächst mit Wasch- und Elutionspuffer equilibriert (siehe Tabelle 2-13).

Über diese Säule wird nun ein Proteingemisch gegeben und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Spülung der Säule mit NHS-Bindungspuffer (Puffer A). Dabei werden alle unspezifischen Gemischbestandteile entfernt und nur Liganden zurückgehalten, die mit hoher Affinität gebunden haben. Die Elution erfolgt mit dem oben beschriebenen pH-Gradienten-Puffer (Puffer B), welcher in der Lage ist die zu erwartende Bindung zu lösen, es wurden verschiedene Elutionspuffer nach festem Schema evaluiert (siehe Tabelle 2-13). Die Eluate wurden fraktioniert aufgefangen und mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert.

Tabelle 2-13 NHS-Affinitätschromatographie Protokoll 1 ml Säule

Breakpoint (ml)	Fluss (ml/min)	Weichenstellung	% B	Fraktionsgröße	Verwendung
0	1	Load	0	0	Equilibrierung
5	1	Load	100	2	Equilibrierung
10	1	Load	0	2	Equilibrierung
20	1	Load	100	2	Equilibrierung

Injektion der Proteinlösung, Inkubation 45 min bei RT

Breakpoint (ml)	Fluss (ml/min)	Weichenstellung	% B	Fraktionsgröße	Verwendung
0	0,5	Load	0	1	Probeninjektion
5	0,5	Load	0	0,5	Spülung
10	0,5	Load	100	0,5	Ligandenelution

Breakpoint: Durchflussvolumen; Fluss: Flussgeschwindigkeit; % B: Anteil Elutionspuffer

Banden im Elutionsbereich wurden ausgeschnitten und durch Massenspektrometrie identifiziert.

2.7 Gelfiltration

Die Gelfiltration ist eine Technik um Stoffgemische nach der Größe ihrer Einzelkomponenten aufzutrennen. Das Prinzip ist dabei, dass große Moleküle nicht in die Poren der Matrix eindringen können und deshalb an der Matrix vorbei gespült werden. Die kleineren Moleküle müssen die Poren der Matrix durchdringen und wandern deshalb langsamer durch die Gelmatrix als die großen Moleküle. Durch ein langes Säulenbett kann so ein Stoffgemisch nach Größe seiner Komponenten aufgetrennt werden.

2.8 Produktion spezifischen Kaninchen-Antikörpern

Um spezifische Kaninchen-Antikörper zu generieren wurden rekombinant exprimierte und affinitätschromatographisch aufgereinigte Proteine verwendet. Als Immunisierungsreagenz diente das Freund'sche Adjuvanz komplett und inkomplett. Die Proteinmenge betrug pro Immunisierung und Tier 100 µg in 500 µl PBS. Dieses

wurde mit 500 µl komplettem Freund'schen Adjuvanz homogenisiert. Es wurde direkt vor der Immunisierung ein Präimmunserum gewonnen. Nach 4 Wochen wurde eine Boost-Immunisierung mit gleicher Proteinkonzentration in inkomplettem Freund'schen Adjuvanz durchgeführt. Nach weiteren 4 Wochen wurde Serum gewonnen um den Immunisierungserfolg nachzuweisen, bzw. um eine weitere Immunisierung bei Bedarf durchzuführen. Nach Ablauf der Immunisierung wurde das Serum aliquotiert und bei – 20 °C eingefroren. Eine Anzeige an den Tierschutzbeauftragten des Universitäts-Klinikums Hamburg-Eppendorf wurde rechtzeitig eingereicht (Aktenzeichen A10a/444_Immunisierung).

2.9 Präparation von *S. epidermidis* Oberflächenproteinen

2.9.1 Präparation zellwandgebundener Staphylokokken-Proteine

Oberflächenproteine wurden für Interaktions-Tests mit rekombinanten Proteinen oder zum Nachweis von bestimmten Proteinen benötigt. Handelte es sich dabei um Proteine mit einem als Zellanker fungierenden LPXTG-Motiv (Navarre and Schneewind, 1994) musste die gesamte Zellwand abgelöst werden ohne dabei intrazelluläre Proteine freizusetzen. Dafür wurde zunächst eine Über-Nacht-Vorkultur des entsprechenden Stammes in TSB-BBL bei 37 °C und 220 rpm angezüchtet. Am nächsten Morgen wurde die Vorkultur mit 1:100 verdünnter Vorkultur im gleichen Medium angesetzt. Nach 18 h wurde die Kultur in ein frisches Gefäß überführt und für 30 min bei 6000 rpm und bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen und erneut für 30 min bei 4 °C und 6000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet im Verhältnis 1:10 mit Protein-Präparations-Puffer resuspendiert und für 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Abschließend wurde die Bakterien-Suspension erneut pelletiert und der Überstand, mit den präparierten Proteinen in ein frisches Gefäß überführt. Die Oberflächenproteine wurden entweder direkt oder nach Umpufferung verwendet, bzw. bei –20 °C in Aliquots eingefroren.

2.9.2 Präparation zellwandassoziierter Staphylokokken-Proteine

Bei den lediglich zellwandassozierten Oberflächenproteinen konnte sehr viel einfacher vorgegangen werden. Auch hier wurde eine Vorkultur 1:100 in frisches TSB-BBL verdünnt und für 20 h bei 220 rpm und 37 °C bebrütet. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C für 30 min pelletiert. Um Nährmediumreste zu entfernen wurde einmal mit PBS gespült und erneut wie im vorherigen Schritt zentrifugiert. Das Pellet wurde in zweifach LDS-Probenauftragspuffer resuspendiert und 10 min bei 70 °C aufgekocht um die Proteine von der Zellwandoberfläche abzulösen. Die abgetrennten Proteine wurden durch Zentrifugation von den Bakterien getrennt. Die Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

2.9.3 Präparation zellwandassoziierter Staphylokokken-Proteine mittels Ultraschall

Zunächst wurden Vorkulturen in BHI-Brühe bei 37 °C und 200 rpm über Nacht angeimpft. Anschließend wurden pro Isolat zweimal 1 l BHI-Brühe mit 10 ml Vorkultur

beimpft und anschließend für 24 h bei 80 rpm und 37 °C inkubiert. Die Kulturen wurden nur bei 80 rpm inkubiert, damit ein mikroaerophiles Milieu in den Kulturen herrscht, welches die Biofilmbildung begünstigt. Nach Ablauf der 24 h wurden die Kulturen bei 4 °C und 6000 rpm für 20 min pelletiert, der Überstand abgegossen. Die Pellets wurden in 20 ml 0,9 % NaCl, pH 6 resuspendiert und zusammengeführt. Die Trennung der Zellwand-assoziierten Proteine von den Protoplasten erfolgte per Ultraschall auf Eis mit vier 30 sekundigen Schallstößen mit 50 % Leistung über den Microtip. Zwischen den Schallstößen wurde eine dreissigsekündige Pause eingelegt, um die Probe auf Eis abkühlen zu lassen. Nach abgeschlossener Ultraschallbehandlung wurden die Suspensionen für 15 min bei 5000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 min und 4 °C. Der Überstand wurde dann durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert. Abschließend erfolgte eine Aufkonzentrierung mit 5 ml Amicon-Ultra Einheiten.

2.10 Markierung von Proteinen

Die Markierung der rekombinaten Proteine mit verschiedenen Techniken sollte die Bindungsfähigkeiten zwischen verschiedenen Proteinen visualisieren. Es wurden unterschiedliche Techniken angewandt. Die unmarkierten Proteine wurden via Dot-Blot oder SDS-PAGE und anschließendem Western-Transfer auf PVDF-Membranen immobilisiert. Die Membranen wurden mit PBS-T gewaschen und anschließend mit dem markierten Protein bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 120 rpm inkubiert. Die Bindung der markierten Proteine an die immobilisierten Proteine wurde durch Zugabe des geeigneten Substrates und mit Hilfe des geeigneten Detektionsverfahren nachgewiesen

2.10.1 Biotin-Markierung

Zur Markierung von primären Amingruppen mit Biotin wurde das ECL Biotinylation Modul der Firma Amersham-Biosciences verwendet. Es wurde nach Protokoll vorgegangen. Das Protein wurde auf eine Konzentration von 1 mg/ml in PBS verdünnt, das Gesamtvolumen betrug 2,5 ml. 40 µl der Biotinylierungslösung wurden zu diesem Ansatz gegeben und 1h bei RT vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde dieser Ansatz über eine Sephadex G-25 Säule gegeben. Dieser Schritt diente der Trennung von überschüssigem Biotin und den markierten Proteine. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Die biotinylierten Proteine wurden bei 2-8 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.10.2 Peroxidase-Markierung

Zur Markierung von primären Amingruppen mit aktivierter Peroxidase aus Meerrettich wurde das Peroxidase-Markierungs-Kit der Firma Roche Applied Science (Penzberg, Deutschland) verwendet. Es wurde nach Protokoll vorgegangen. Die Lösungen wurden wie im Hersteller-Protokoll angegeben angesetzt. Das Protein wurde 1:6 mit PBS auf 4,0mg/ml verdünnt. Davon wurden 50 µl mit 250 µl Natriumcarbonat pH 9,8 vermischt. Zu dieser Lösung wurden 100 µl Peroxidase-Lösung gegeben und vermischt. Dieses Gemisch wurde 2 h bei RT inkubiert.

Um die Kopplungsreaktion zu stoppen wurden 40 µl Triethanolamin dazugegeben und gemischt. Darauf wurden 50 µl Natriumborhydrid hinzugefügt und für 30 min bei 2-8 °C inkubiert. Anschließend wurden erneut 25 µl der Triethanolamin-Lösung hinzugefügt und für 2 h bei 2-8 °C inkubiert. Zur Stabilisierung des Konjugates wurden 10 µl der Glycinlösung-Lösung hinzugegeben und vermischt. Zur Überführung in den Lagerungspuffer wurde eine Zentrifugation in Amicon-Ultra- Einheiten durchgeführt. Die markierten Proteine wurden bei 4 °C gelagert und schnellstmöglich verwendet.

2.11 Proteasen-Charakterisierung

2.11.1 Zymographie

Die Zymographie ist eine Technik zur Visualisierung von proteolytischer Aktivität in einer Probe. Es wurden verschiedene Techniken angewandt um, entsprechend den Bedürfnissen und dem Naturell der zu untersuchenden Fragestellungen gerecht zu werden.

2.11.2 SDS-Zymographie

Die Zymographie vereint die Auftrennungsmöglichkeiten einer SDS-PAGE mit einem relativ sensitiven Verfahren der proteolytischen Aktivität, welche dann einem bestimmten Fragment zugewiesen werden kann. Dafür wurde ein SDS-Gel hergestellt, welches im Endvolumen 1mg/ml Gelatine enthielt. Als Laufpuffer wurde ein Tris-Glycin Puffer verwendet, ebenso basiert der Ladepuffer auf Tris-Glycin. Die Proben wurden zunächst nach Größe aufgetrennt. Um vorzeitige Aktivierung möglicher Proteasen zu vermeiden wurden die Zymogram-Gele während des Laufes auf 4 °C gekühlt. Damit die Proben ihre proteolytische Aktivität entwickeln konnten musste das Zymogram-Gel nach Beendigung der Auftrennung renaturiert werden, das heisst von SDS befreit werden. Dafür wurde ein Puffer mit 2,5 % Triton X-100 verwendet und zweimal für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach erfolgter Renaturierung

wurde das Zymogram-Gel im Entwicklungspuffer für 30 min bei Raumtemperatur equilibriert. Anschließend wurde der Puffer gewechselt und das Gel für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dieser Equilibrierung erfolgte die Inkubation bei 37 °C im Brutschrank für 72 h. Anschließend wurde das Gel mit Amido-Black gefärbt. Proteolytische Aktivität wird durch bandenspezifische Aufhellungen im Gel angezeigt.

2.11.3 Reverse Zymographie

Die Reverse Zymographie (Oliver et al., 1997) wurde dafür benutzt, spezielle Substrate bzw. Protease-Inhibitoren, bei vielen verschiedenen Bedingungen zu evaluieren. Dafür wurden die Proben mit Substrat bzw. Protease-Inhibitor bei geeigneter Temperatur in einem Reaktionsgefäß inkubiert. Erst nach Inkubation erfolgte die Auftrennung per SDS-PAGE. Durch Vergleich mit der ursprünglichen Probe konnten Aussagen über das Proteolyseverhalten getroffen werden.

2.12 Isoelektrische Fokussierung

Die Isoelektrische Fokussierung trennt Proteine durch ihre unterschiedlichen isoelektrischen Punkte in einem pH-Gradienten-Gel auf. In diesem Gel wandern die Proteine im elektrischen Feld bis sie ihren Neutralpunkt erreicht haben und sowohl die negativen als auch die positiven Ionen im Gleichgewicht stehen. Dadurch können Proteine unterschiedlicher Art mit gleicher Größe voneinander getrennt werden. Es wurden pH-Gradienten Gele der Firma Invitrogen benutzt und nach Protokoll vorgegangen.

2.13 Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrie

Um Proteinbanden in SDS-PAGE-Elektrophoresen zu identifizieren wurde mit Dr. Buck aus der Abteilung für klinische Chemie des Universitäts-Klinikums-Hamburg Eppendorf zusammengearbeitet. Es wurden die Techniken Massenspektrometrie und Edmann-Sequenzierung angewandt. Für die Massenspektrometrie wurden Banden aus gefärbten SDS-PAGE ausgeschnitten, für die Edmannsequenzierung wurden die Proben zunächst via Western-Blot auf PVDF-Membranen immobilisiert und anschließend der Blot mit 0,25 % Coomassie in 50 % ddH₂O, 40 % Methanol und 10 % Essigsäure gefärbt.

2.14 Protein- Interaktionsanalysen

Zur Protein-Interaktionsanalyse wurde im Wesentlichen eine NHS-basierte Affinitätschromatographie (siehe Kapitel 2.6.4), Gelchromatographie (siehe Kapitel 2.7)

oder die Far-Western-Blot Methode verwendet (siehe 2.14.1). Durch die Analyse mit unterschiedlichen Verfahren sollte ein systematischer Fehler ausgeschlossen werden.

2.14.1 Far-Western-Blot

Die Far-Western Methode ist eng verwandt mit der Western-Blot Technik. Auch hier werden 1 bis 10 ng eines Proteins zunächst mittels SDS-Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und anschließend per Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Darauf folgt ein Blockierschritt der Membran mit 3 % BSA oder Milchpulver, der unspezifische Bindungsstellen absättigen soll. Bei einem Far-Western-Blot werden allerdings statt Erst-Antikörper gegen ein bestimmtes Protein, ein potentieller Bindungspartner in einer geeigneten Konzentration, von zum Beispiel 10 µg/ml, dazugegeben und genauso auf der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit PBS-T gewaschen. Dieser Bindungspartner kann entweder vor der Verwendung mit Biotin oder Meerrettich Peroxidase markiert sein oder es wird ein spezifischer Peroxidase markierter Antikörper gegen das eingesetzte Protein verwendet, um seine Bindung an die immobilisierten Proteine nachzuweisen. Der Bindungsnachweis erfolgte durch die Exposition eines Röntgenfilms auf der Blot-Membran.

3 Ergebnisse

3.1 Erzeugung rekombinanter Aap (rAap) Abschnitte

Um die Funktion der Aap Subdomänen bei der *Staphylococcus epidermidis* Biofilmbildung detaillierter untersuchen zu können sollten zunächst das Volllängen-Aap sowie die Aap-Subdomänen A und B (Abbildung 3-1) in *E. coli* rekombinant überexprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt werden

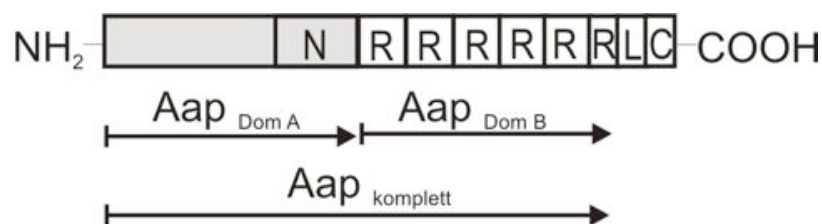


Abbildung 3-1 Übersicht Aap

Schematische Darstellung von Aap und seinen Subdomänen. Die Domäne-A, hier grau unterlegt dargestellt, beinhaltet am Übergang zur Domäne-B, hier weiß dargestellt, eine 212 Aminosäure große Domäne (N), welche im Vergleich mit Aap-Homologen (zum Beispiel SasG) hochgradig konserviert ist. Die Aap_{Domäne B} besteht aus 5,5 repeats (R). C-terminal befindet sich ein Kollagen-Helix-Motiv (C) und ein LPXTG-Motiv (L). Sowohl der Zellanker als auch das Kollagen-Helix-Motiv wurden im Rahmen der Konstruktion der Expressionsklone nicht amplifiziert und sind dementsprechend in den resultierenden rekombinanten Proteinen nicht vorhanden.

Um dieses Ziel zu erreichen wurden unter Verwendung spezifischer Primer die korrespondierenden kodierenden Abschnitte amplifiziert und mittels der Gateway-Technologie zunächst in den Vektor pENTR/D-Topo und anschließend in den Destinationsvektor pDest17TM-Vektor eingebracht. In diesem wurde das jeweilige Fragment an seinem 5'-Ende mit einem für ein His₆-Tag kodierenden Abschnitt fusioniert. Diese Markierung ist für die anschließende Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) von essentieller Bedeutung.

3.1.1 Klonierungsstrategie

Zunächst wurde der gewünschte Aap-Abschnitt unter Verwendung der Primer Forward AXA und Revers 3' (Aap_{komplett}), Forward AXA und Revers 3' 212-AMS (Aap_{Domäne A}), Forward 5' AapRT und Revers 3' (Aap_{Domäne B}) mittels Platinum-Pfx Polymerase aus der chromosomalen DNA von dem *S. epidermidis* Isolat 5179 amplifiziert (siehe auch Tabelle 2-9). Hierdurch konnten *blunt-end* Amplifikate erzeugt werden. Diese wurden direktional in den pENTR/D-Topo Vektor (siehe Kapitel 2.3.8) kloniert, woraus die

Konstrukte pENTR/D-Topo Aap_{komplett}, pENTR/D-Topo Aap_{DomA} und pENTR/D-Topo Aap_{DomB} entstanden. Die Kontrolle der Klone erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen-Verdau, PCR und Sequenzierung. Durch die Clonase-Reaktion wurde der entsprechende Genabschnitt aus dem pENTR/D-Topo Vektor in den Destinationsvektor pDest17TM subkloniert. In den resultierenden Konstrukten pDest17-Aap_{komplett}, pDest17-Aap_{DomA} und pDest17-Aap_{DomB} wird die jeweils klonierte Sequenz 5' im Leseraster mit dem genetischen Code für eine His₆-Markierung fusioniert. Die entsprechenden Konstrukte wurden in den Expressionstamm *E. coli* BL21AI eingebracht.

3.2 Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Eine Pilot-Expression wurde zur Evaluierung der Expressionsfähigkeit der einzelnen Klone durchgeführt. Die Klone, welche eine quantitativ optimale Expression ermöglichten, wurden für die weiteren Expressionsexperimente gewählt. Als Auswahlkriterien galten hier schnelle Expression nach Induktion mit Arabinose und hoher Proteinertrag. Dafür wurde, wie im Material und Methodenteil Kapitel 2.4.1 beschrieben, vorgegangen

Die während der Pilotexpression ermittelten Kulturbedingungen wurden verwendet, um größere Mengen rekombinanten Proteins präparieren zu können. Dafür wurde das Protokoll wie im Kapitel 2.4.2 beschrieben angewendet. Durch Variation der Elutionsbedingungen konnten schließlich Bedingungen gefunden werden, welche die Aufreinigung großer Mengen der verschiedenen rekombinanten Aap-Domänen in ausreichender Reinheit erlaubte. Durch die Gradientenelution evaluiert, konnte für alle rekombinanten Aap-Fragmente folgender Elutionspuffer festgelegt werden: 0,05 M NaPO₄, 0,5 M NaCl, 100 mM Imidazol, 0,1% Tween20 [v/v], pH 7,4. Beispielhaft sei hier ein Affinitätschromatogramm einer rAap_{komplett} gezeigt (siehe Abbildung 3-2)

Damit konnte ein schonendes und gleichzeitig Reinheit versprechendes Aufreinigungsverfahren etabliert werden. Anschließend an die IMAC-Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurde eine Aufkonzentrierung mit Amicon-Ultra 5 ml Säulen durchgeführt und die Proteinkonzentrationen zwischen 2-10 mg/ml eingestellt. Dabei wurden die Proteine gleichzeitig in PBS umgepuffert, um die eventuell bindungsinterferierenden Substanzen Imidazol und Tween 20 aus der Proteinaufreinigung zu entfernen. Abschließend wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt.

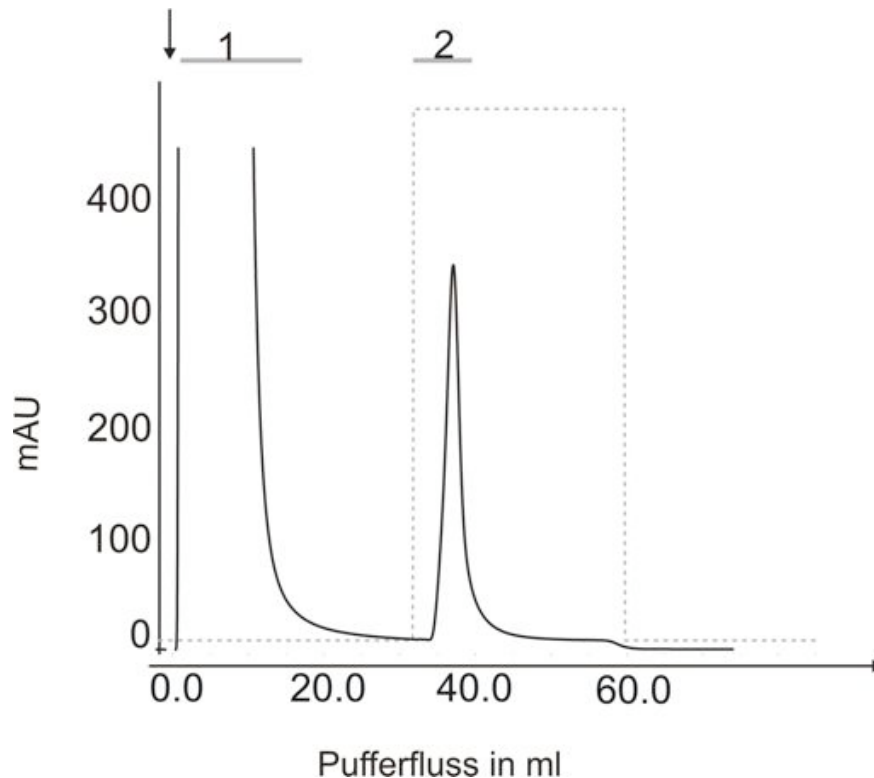


Abbildung 3-2 Affinitätschromatographie von rAap_{komplett}

Aufreinigung von rAap_{komplett} mittels IMAC. Gezeigt wird das Elutionsprofil der His-Trap Säule nach Beladung mit *E. coli* Zellextrakten die Probeninjektion in das Säulensystem ist mit einem Pfeil markiert. Die Absorption bei 280 nm, als schwarze Kurve gezeigt, markiert den Proteinabfluss aus der Säulenmatrix. Die Konzentration des Elutionspuffers (in % des Puffer B) ist als grau-gestrichelte Linie dargestellt. Kurvengipfel 1 bezeichnet das unaufgereinigte Proteingemisch mit dem rekombinanten Protein. Kurvengipfel 2 zeigt die Elution des nun aufgereinigten Proteins.

Im Anschluss folgte die gelelektrophoretische Aufreinigung mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (siehe Abbildung 3-3 A und B).

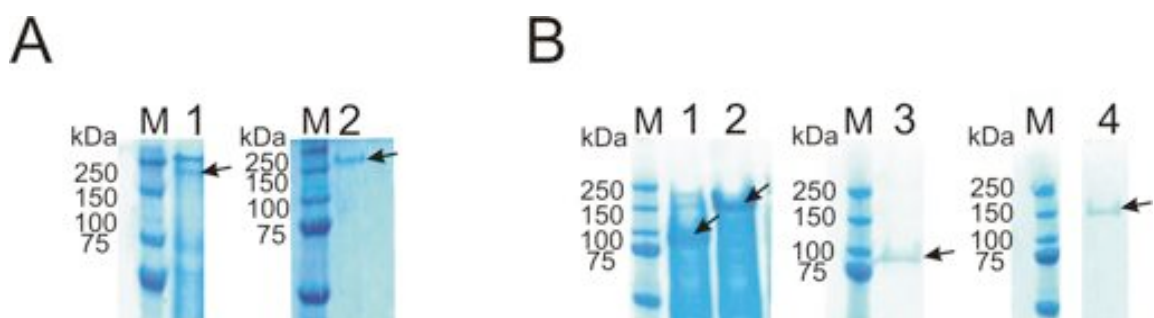


Abbildung 3-3 Analyse der rekombinanten Expression und affinitätschromatographischen Aufreinigung von Aap und seinen Subdomänen mittels SDS-PAGE.

(A) Aufreinigung von rekombinanten Vollängen Aap (rAap). In Spur 1 wurden ein *E. coli* BL21AI Rohextrakt 4 Stunden nach Induktion der Aap Expression aufgetragen. In Spur 2 wurde korrespondierend eine repräsentative Aap-haltige Fraktion nach Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels Nickel Affinitätschromatographie. Pfeile kennzeichnen rAap (erwartetes Molekulargewicht 160 kDa). M, Marker

(B) Aufreinigung von Aap Domäne A und B. In Spur 1 und 2 wurden *E. coli* BL21AI Rohextrakte 4 Stunden nach Induktion der Aap Domäne A und B Expression aufgetragen. Spuren 3 und 4 zeigen korrespondierend repräsentative rAap_{DomäneA} und rAap_{DomäneB}-haltige Fraktion nach Aufreinigung der rekombinanten Proteine mittels Nickel-Affinitätschromatographie. Pfeile kennzeichnen jeweils die rekombinanten Proteine (erwartete Molekulargewichte: rAapDomäneA, 64 kDa; rAapDomäneB, 94 kDa). M, Marker

Wie in Abbildung 3-3 ersichtlich scheint das Molekulargewicht der rAap_{Domäne A} bei circa 100 kDa zu liegen, das errechnete Molekulargewicht ist aber 63,11 kDa. Ähnliches gilt für die rAap_{Domäne B} welche auf einer Höhe von circa 150 kDa im SDS-PAGE aufgetrennt wurde. Das tatsächliche Molekulargewicht der rAap_{Domäne B} liegt bei 94,77 kDa. Die Differenz zwischen diesen Molekulargewichten kann durch besondere Ladungseigenschaften dieser speziellen Proteine erklärt werden. Auch unabhängige Gruppen haben ähnliches beobachtet (T. Foster, persönliche Korrespondenz).

3.3 Beeinflussung der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* durch rAap_{DomA} und rAap_{DomB}

Nachdem die rekombinanten Proteine erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden konnten, sollten diese zunächst in Biofilminhibitionsstudien eingesetzt werden, um so ihren Einfluss auf die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 5179-R1 zu untersuchen. Dafür wurden verschiedene Mengen der rAap_{DomB}- oder rAap_{DomA} zu Kulturen von *S. epidermidis* 5179-R1 gegeben und deren Einfluss auf den Biofilmphänotyp untersucht (Abbildung 3-4).

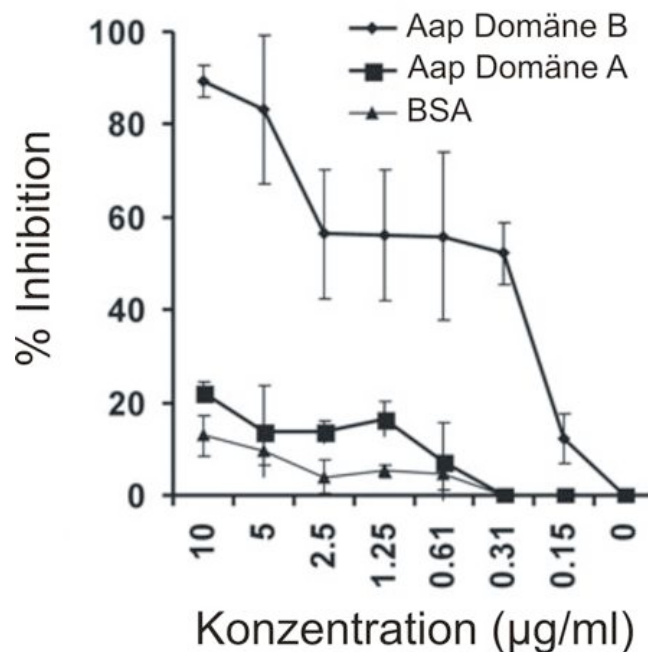


Abbildung 3-4 Biofilminhibitions-Assay

Darstellung des Einflusses von rAap-Domäne-A und -Domäne-B auf die Biofilmbildung von von *S. epidermidis* 5179-R1. Als Negativkontrolle wurde bovines Serumalbumin verwendet. Es ist ein konzentrationsabhängiger, signifikanter inhibitorischer Effekt der Domäne B auf die Biofilmbildung von 5179-R1 zu erkennen.

Durch die Zugabe von rAap_{DomB}- konnte die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 5179-R1 konzentrationsabhängig inhibiert werden. Im Gegensatz dazu hatte die Zugabe von rAap_{DomA} und von BSA keinen Einfluss auf die Biofilmbildung dieses Stammes. Diese Ergebnisse zeigen, dass offensichtlich die rAap_{DomB}- für die interzelluläre Aggregation notwendigen Oberflächenstrukturen absättigt und dadurch eine Biofilmbildung verhindert. Dies weist auf die direkte Beteiligung der Aap_{Domäne-B} an der Biofilmbildung hin.

3.4 Gelfiltration der rAap_{DomB}-

Grundsätzlich muss Aap_{Domäne-B}, um als interzelluläres Adhäsins aktiv zu werden, mit Oberflächenstrukturen auf Nachbarzellen interagieren. Hierbei kann es sich grundsätzlich um homotype oder heterotype Interaktionen handeln. Homotype Interaktionen können zur Auto-Aggregatbildung mit der Ausbildung hochmolekularer Komplexe führen. Um solche als Hinweis für homotype Interaktionen nachzuweisen, wurde rAap_{DomB}- (errechnetes Molekulargewicht 94,71 kDa) mittels analytischer Gelfiltration auf einer Tricorn S-200 10/300 GL Säule filtriert und das Molekulargewicht bestimmt (siehe Abbildung 3-5). Im Falle der Bildung von rAap_{DomB}-Aggregaten konnte erwartet werden, daß das Protein mit einem scheinbar höheren Molekulargewicht eluiert.

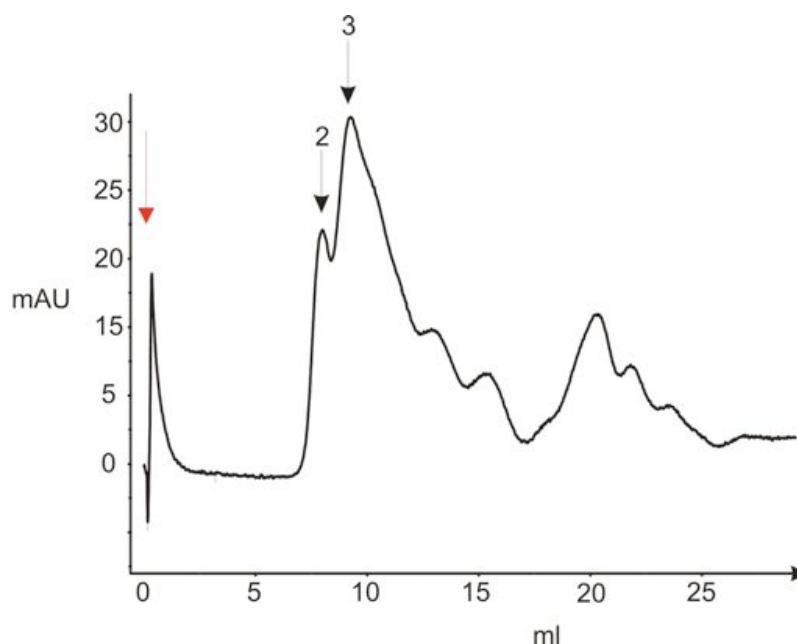


Abbildung 3-5 Analyse von rAap_{DomB}- mittels Gelchromatographie.

Rekombinante rAap_{DomB} (1 ml, Konzentration 500 µg/ml) wurde auf das Gelbett einer Tricorn S-200 10/300 GL Säule aufgetragen (roter Pfeil). Die Elution erfolgte mit PBS bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Das aufgezeichnete Elutionsprofil bei 280 nm zeigt zwei korrespondierend zu einem geschätzten Molekulargewicht von 144 kDa (2) und 77 kDa (3).

In PBS gelöst eluierte rAap_{DomB} im Bereich von 144 kDa als dimerisiertes Protein und im Bereich von 77 kDa als monomeres Protein. Eine prinzipielle Adhäsivfunktion von rAap_{DomB} auf molekularer Ebene wurde damit erstmals nachgewiesen. Im Kontext dieses Ergebnisses und der Ergebnisse von Conrady et al., 2008, welche eine Zink-abhängige Adhäsion der G5-Domänen der Aap_{DomB} nahelegten, führten wir

weitergehende Untersuchungen zur Aap Domäne B Adhäsivfunktion durch. Dabei sollten nicht nur homotype sondern auch heterotype Interaktionen molekularbiologisch nachgewiesen werden. Die Divergenz von errechnetem und hier gezeigtem Molekulargewicht lässt sich auf spezifische Proteineigenschaften zurückführen und wurde ebenfalls von unabhängigen Forschungsgruppen (T. Foster persönliche Korrespondenz) beobachtet.

3.5 Ligandenbindungsassay

Als orientierende Untersuchung diene zunächst ein Ligandenbindungsassay in Form eines Far-Western-Blots. Hierzu wurde aufgereinigte rAap_{DomB} biotinyliert. (siehe Kapitel 2.10.1) Das so markierte Molekül wurde hinsichtlich seiner Fähigkeit getestet, als Ligand an im SDS-PAGE aufgetrennte und auf einer PVDF-Membran immobilisierte rAap_{DomB}, rAap_{DomA} oder Oberflächenproteinpräparationen von *S. epidermidis* 5179 und 5179-R1 zu binden.

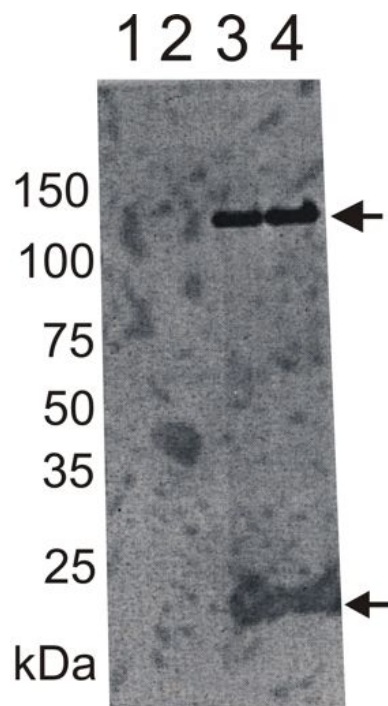


Abbildung 3-6: Far-Western-Blot mit biotinylierter rAap-DomB

Untersuchung der Bindung von biotinylierter rAap-DomB an geblottete *S. epidermidis* Oberflächenproteine im Far-Western-Blot. Rekombinante Aap-Domäne-A (Spur 1), -Domäne-B (Spur 2) sowie Oberflächenproteinpräparationen der *S. epidermidis* Stämme 5179 (Spur 3) und 5179-R1 (Spur 4) wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und die Membran nach Blockierung mit biotinylierter Aap Domäne-B (5 µg/ml) inkubiert. Nach Spülen wurde gebundene rAap_{DomB} mittels peroxidasemarkiertem Streptavidin und Chemilumineszenz-Reagenz nachgewiesen. In den Oberflächenproteinpräparationen konnte eine Bindung an zwei, etwa 140 beziehungsweise 20 kDa große Proteine nachgewiesen werden.

Nach Inkubation über Nacht der geblotteten Proteine mit biotinylierter rAap_{DomB}- (5 µg/ml) wurde die Membran gespült und das gebundene rAap_{DomB}- mittels Peroxidase-markiertem Streptavidin detektiert (siehe Abbildung 3-6). In diesem Versuch konnte keine Bindung der markierten rAap_{DomB}- an rAap_{DomA} oder rAap_{DomB}- detektiert werden. Stattdessen ist eine Bindung an Proteine aus den Oberflächenproteinpräparationen mit einem ungefähren Molekulargewicht von etwa 140 kDa und 20 kDa nachweisbar. Damit konnte Evidenz dafür gefunden werden, dass offensichtlich eine Interaktion von rAap_{DomB}- mit *S. epidermidis*-Oberflächenproteinen stattfindet. Mit dem Ziel, diese Interaktion unter Verwendung eines unabhängigen Verfahrens zu bestätigen, sowie die potentiellen Aap Domäne-B Interaktionspartner zu isolieren und zu identifizieren, wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt.

3.5.1 Identifizierung potentieller rAap_{DomB}—Liganden mittels Affinitätschromatographie

Um die im Far-Western-Liganden Assay detektierten, potentiellen Aap Domäne-B bindenden Proteine, anzureichern und zu identifizieren, wurde rAap_{DomB}- an NHS-aktivierter Sepharose gekoppelt. Hierfür wurde, wie oben beschrieben (siehe 2.6.4), vorgegangen. Über diese Matrix wurden Oberflächenproteinpräparationen der *S. epidermidis* Isolate 5179 und 5179–R1 Oberflächenproteine geleitet. Nach Probenauftrag und Spülen mit PBS (pH 7,4) zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurden verschiedene Puffer (0,9% NaCl, chaotrope Salze wie 6 M Guanidin-HCl pH 8,6 und 8 M Harnstoff, oder saure Tris-Puffer wie 50 mM Tris-Hcl (pH 3) und 2 M Tris-HCL (pH 2)) zur Elution von affin gebundenen Proteinen evaluiert. Fraktionen der resultierenden Eluate wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE und Silberfärbung auf das Vorhandensein von Proteinen hin analysiert. Als Kontrolle wurde zum Vergleich eine NHS-Säule mit rAap_{DomA} beladen. (Abbildung 3-7)

Zu erkennen ist in den Abbildung 3-7 A und B, dass sowohl nach Beladung der mit rAap_{DomB}-beladenen Säule mit Zelloberflächen-Ultraschallextrakten nach Spülen der Säule mit 15 ml PBS, pH 7,4, durch Anlage eines 2M Tris-HCl-Gradienten bei Erreichen von pH 2 Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten (140 kDa, 45 kDa, 25 kDa und 20 kDa) von der Säulenmatrix eluiert wurden. Proteine dieser Größen konnten unabhängig davon gefunden werden ob Oberflächenproteinpräparationen des Stamms *S. epidermidis* 5179 oder –R1 auf die Säule aufgetragen wurden. Um diese Proteine zu identifizieren wurden die entsprechenden Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und die so darstellbaren Banden nach Färbung mit Coomassie aus dem Gel

ausgeschnitten. Im Anschluss wurden diese Proben mittels MALDI-TOF weiter analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die in der Abbildung 3-7 markierten Proteine mit den Molekulargewichten von 140, 45, 25 kDa zweifelsfrei dem *S. epidermidis* Autolysin AtlE zugeordnet werden können. Das Auftreten multipler Banden ist am ehesten als Resultat der diesem Protein inhärenten autoproteolytischen Funktion zu betrachten (Heilmann et al., 1997).

Die Peptidmassenanalyse des 20 kDa Proteins erbrachte die Aminosäuresequenz KYFHPIYSYNPNSNEKY, welche dem hypothetischen *S. epidermidis* Protein YP_187866 zugeordnet werden konnte. Die Massenspektrometrie wurde mit dem Q-TOF- und der Tandemmassenspektrometrie-Verfahren durchgeführt und hierbei bestätigt.

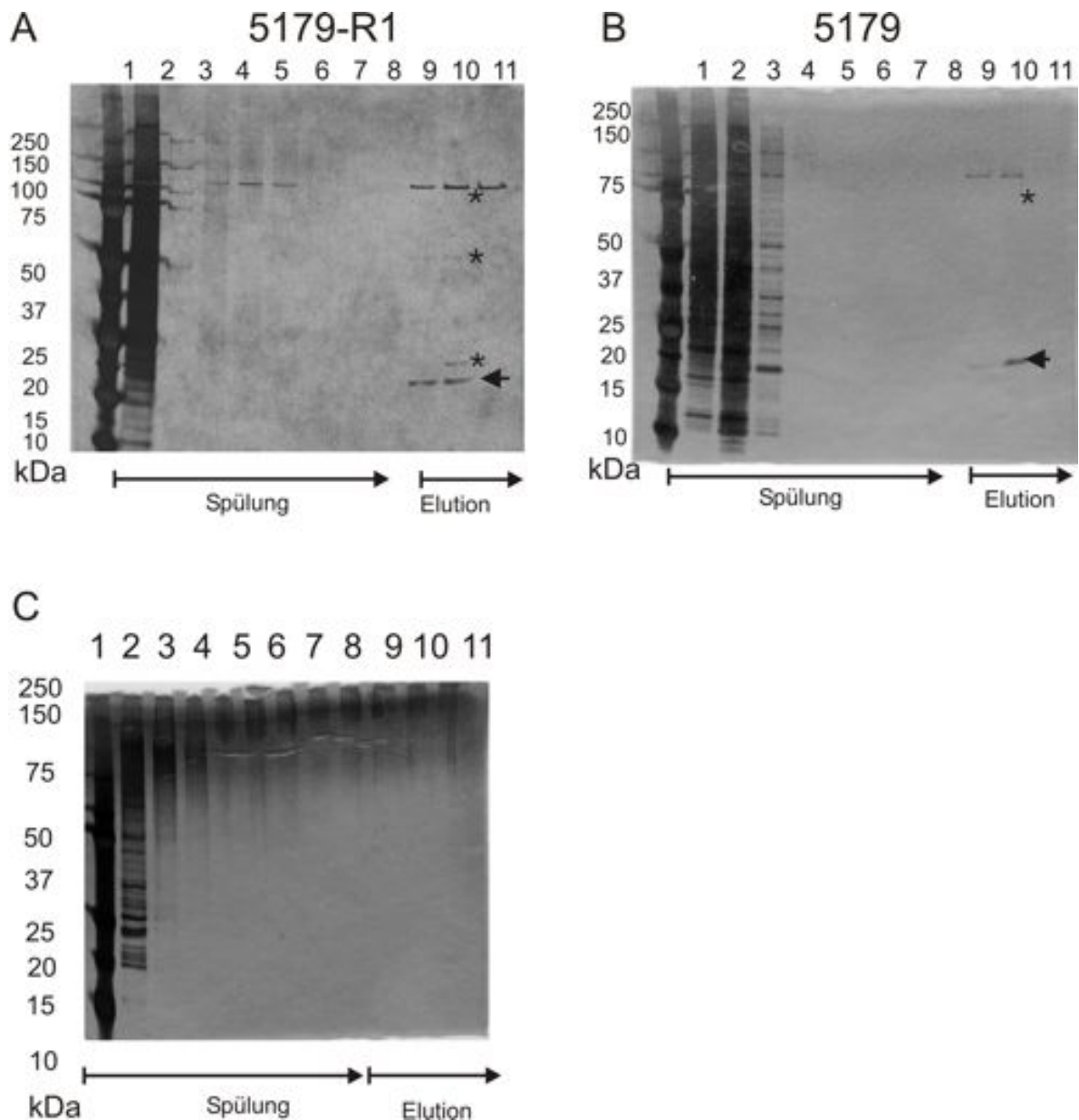


Abbildung 3-7 NHS-basierte Affinitätschromatographie zur Ligandenidentifikation

Isolierung von *S. epidermidis* Oberflächenproteinen mit Aap-bindenden Eigenschaften mittels Affinitätschromatographie. Oberflächenproteine von *S. epidermidis* 5179 und 5179-R1 wurden über eine mit rAap_{DomB}- (A, B) beziehungsweise rAap_{DomA} (C) 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 mit SilverSnap™ gefärbt. Die in A und B mit * markierten Banden wurden mittels Massenspektrometrie AtlE zugeordnet. Die mit ← markierten Banden wurden als ein hypothetisches Staphylokokkenprotein NP_7639421 identifiziert.

Um mit dieser Methodik die adhäsive Funktion der Aap_{DomA} zu analysieren, wurde ebenfalls rAap_{DomA} an die Säulenmatrix gekoppelt und anschließend mit den präparierten Oberflächenproteinen von *S. epidermidis* 5179-R1 inkubiert. Nach durchgeführter Spülung und anschließender Gradientenelution mit Tris-HCl pH 2 konnten keine gebundenen Proteine eluiert werden. Wie in Abbildung 3-7 C zu

erkennen, ist in diesem Versuchsaufbau keine Interaktion von *S. epidermidis* 5179-R1 Oberflächenproteinen mit der immobilisierten rAap_{DomA} nachweisbar.

Zur Bestätigung der Bindung von Aap_{Domäne-B} an die durch Affinitätschromatographie nachgewiesenen Proteine, und um auszuschliessen, dass das 20 kDa Protein und AtlE aufgrund von unspezifischen Wechselwirkungen mit der NHS-Säulen-Matrix eluierten, wurden die entsprechenden, in der Affinitätschromatographie gewonnenen Fraktionen 9 - 11 in einem Far-Western-Blot (siehe Kapitel 2.14.1) auf ihre Bindungsfähigkeit an biotinylierte rAap_{DomB}- getestet. Zum Vergleich wurden verdünnte oberflächenassoziierte Proteine von *S. epidermidis* 5179 und 5179-R1 zusätzlich eingesetzt.

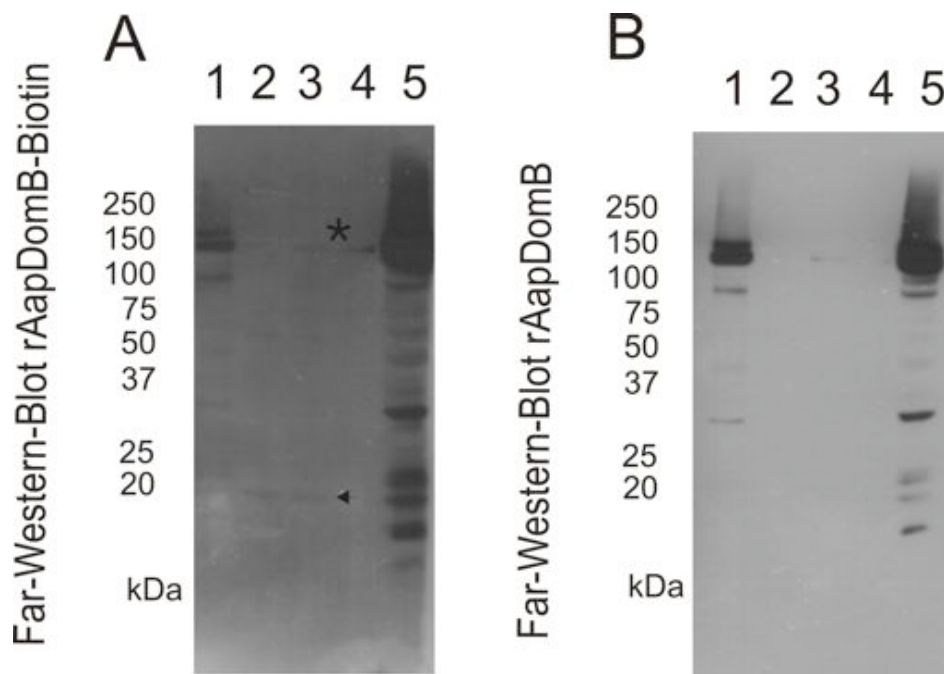


Abbildung 3-8 Far-Western-Blot rAap_{Dom B}

Analyse der in der Affinitätschromatographie gewonnenen Fraktionen mit potentiell Aap Domäne-B-bindenden Proteinen mittels Far-Western Blot. Die in Abbildung 3-8 gezeigten Fraktionen 1 und 2 (Spur 1 und 2) sowie 9, 10 und 11 (Spuren 3, 4 und 5) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran mittels Western-Blot transferiert und mit biotinmarkierter rAap_{DomB}- (5 µg/ml; A) und Peroxidase-markiertem Streptavidin (10 µg/ml; B) bei Raumtemperatur inkubiert. Gebundene rAap_{DomB}- wurde dann mittels Peroxidase-markiertem Streptavidin und Chemilumineszenz-Reagenz nachgewiesen.

In diesem Experiment konnte eine Bindung der rAap_{DomB}- an die als 140, 45, 25 kDa AtlE-Fragmente sowie an das unbekannte 20 kDa Protein dargestellt werden (Abbildung 3-8 A). Somit erscheint es wahrscheinlich, dass es sich bei den nachgewiesenen Proteinen tatsächlich um Interaktionspartner der Aap Domäne-B handelt und ihr Nachweis nicht auf eine unspezifische Wechselwirkung mit der

Säulenmatrix zurückzuführen ist. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass im Kontrollexperiment, in welchem nur Peroxidase-markiertes Streptavidin eingesetzt wurde, ein schwaches Signal auf Höhe von AtlE nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-8 B). Dieses war zwar im Vergleich zum Experiment mit Biotin-markiertem rAap_{DomB}- schwächer, dennoch kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass hier eine unspezifische Interaktion von AtlE mit Streptavidin vorliegt.

3.6 Charakterisierung von AaStrA

Aufgrund der hier dargestellten Interaktion mit der Aap_{Domäne B} wurde das neu identifizierte *S. epidermidis* Protein YP_187866 als *Aap associated Staphylococcus epidermidis extracellular Adhesin* (AaStrA) benannt. AaStrA wird durch einen 510 bp großen offenen Leserahmen kodiert (SERP0270) und besteht aus 169 Aminosäureresten mit einem abgeleiteten Molekulargewicht von 18 kDa und einem theoretischen P_I von pH 9,91 (<http://expasy.org/tools/protparam.html>). Mittels bioinformatischer Analyse (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) der abgeleiteten Aminosäuresequenz konnte gezeigt werden, dass AaStrA ein typisches Exportmotiv aufweist (Aminosäure 1–21, Abbildung 3-9). Somit liegt die strukturelle Voraussetzung für eine extrazelluläre Lokalisation vor. Es konnten kein, für grampositive Erreger typisches, Zellwandanker-Motiv nachgewiesen werden.



Abbildung 3-9 Schematische Darstellung von AaStrA

Schematische Darstellung der abgeleiteten Aminosäuresequenz von AaStrA. N-terminal findet sich ein Signalpeptid (S), welches für den Export des Moleküls in den extrazellulären Raum verantwortlich sein könnte. C-terminal dieses Peptids finden sich keine signifikanten Homologien mit anderen Proteinen bekannter Funktion. Die Länge des rekombinant erzeugten rAaStrA ist durch eine graue Unterlegung gekennzeichnet. An Aminosäureposition 60-76 des Voll-Längen-Proteins befindet sich das durch Massenspektrometrie identifizierte Peptid mit der Aminosäuresequenz KYFHPIYSYNPNSNEKY..

3.6.1 Rekombinante Expression von AaStrA (rAaStrA)

Um die Funktion von AaStrA bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung näher aufzuklären, sollte das Protein rekombinant als His6-Fusionsprotein exprimiert werden. Um dieses Ziel zu erreichen wurde die Gateway-Technologie (Invitrogen) verwendet. Zur

Erzeugung der ENTR-Klone wurde *aastra* (nt 64-510) unter Verwendung der Primer AaStrA 64for ENTR und AaStrA 510 reverse amplifiziert (siehe Tabelle 2-9 Primer-Kombinationen), in den Vektor pENTR/D eingebracht und in den Expressionsvektor pDEST17 subkloniert. Das resultierende Plasmid pDEST*aastra* wurde in den *E. coli* Expressionsstamm BL21AI transformiert (siehe Kapitel 2.3.8).

Zur Optimierung der Expressionsbedingungen erfolgte dann eine Pilotexpression unabhängiger Klone (siehe Kapitel 2.4.1). Es wurden die Zellextraktionen von expressionsinduzierten und nicht induzierten BL21AI Kulturen einer SDS-PAGE unterzogen und miteinander verglichen (siehe Abbildung 3-11 A). Ein geeigneter Klon wurde dann zur Expression von rAaStrA verwendet. Das rekombinante Protein wurde mittels Nickel-basierter Affinitätschromatographie aufgereinigt. Abbildung 3-10 zeigt ein repräsentatives Elutionsprofil der Affinitätschromatographie, Abbildung 3-11 B zeigt den Aufreinigungserfolg in einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung.

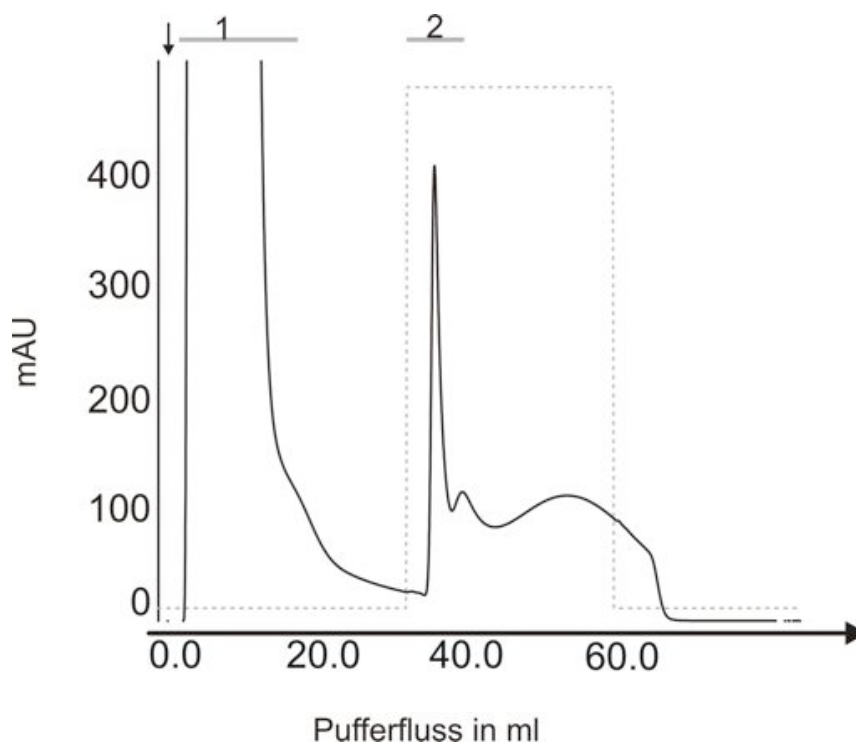


Abbildung 3-10 Affinitätschromatographische Aufreinigung von rAaStrA

Aufreinigung von rAaStrA mittels IMAC. Gezeigt wird das Elutionsprofil der His-Trap Säule nach Beladung mit *E. coli* Zellextrakten die Probeninjektion in das Säulensystem ist mit einem Pfeil markiert. Die Absorption bei 280 nm, als schwarze Kurve gezeigt, markiert den Proteinabfluss aus der Säulenmatrix. Die Konzentration des Elutionspuffers (in % des Pufferflusses) ist als grau-gestrichelte Linie dargestellt. Kurvengipfel 1 bezeichnet das unaufgereinigte Proteingemisch mit dem rekombinanten Protein. Kurvengipfel 2 zeigt die Elution des nun aufgereinigten Proteins.

Als Spülpuffer wurde ein 0,05 M NaPO₄-, pH 7,4, 0,5 M NaCl-, 50 mM Imidazol-, pH 7,4 Puffer verwendet. Als Elutionspuffer wurde ein 0,05 M NaPO₄-, pH 7,4, 0,5 M NaCl-, 200 mM Imidazol-, 0,1% Tween20, pH 7,4 Puffer verwendet. Unter diesen Bedingungen rAaStrA in hoher Konzentration (bis 10 mg/ml) und Reinheit aufgereinigt werden (Abbildung 3-11B).

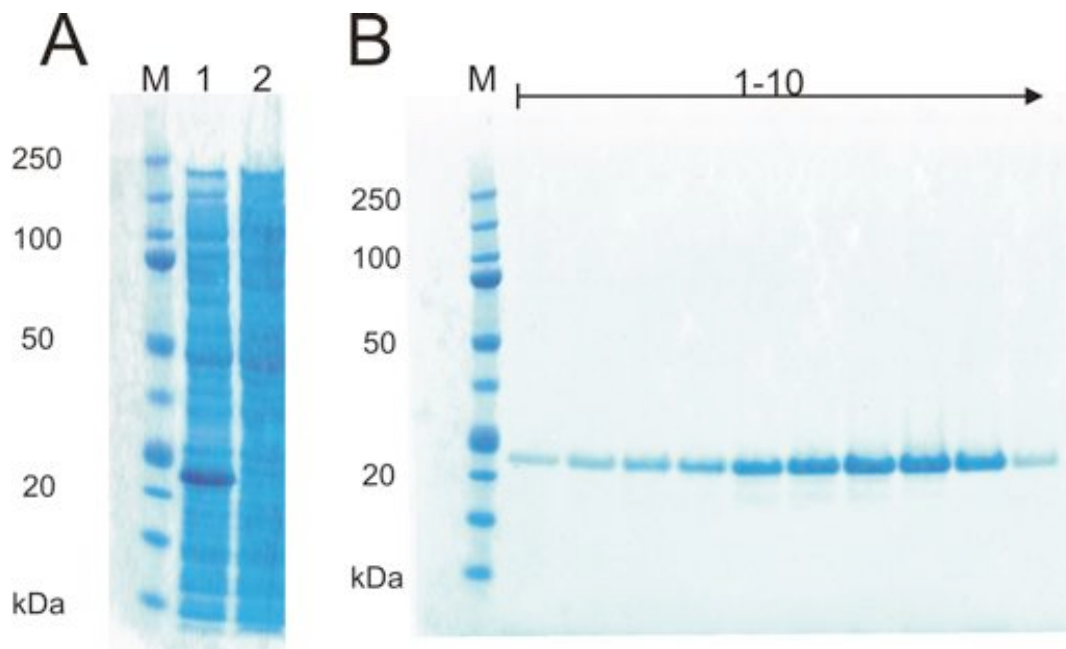


Abbildung 3-11 SDS-PAGE rAaStrA

A: Pilotexpression AaStrA; **B:** Affinitätschromatographische Aufreinigung von AaStrA; **M:** Marker; In Abbildung A gezeigt sind *E. coli* Zellextrakte, Spur 1 mit Induktion der Expression von rAaStrA durch Zugabe von Arabinose, 2 zeigt eine uninduzierte Zellextraktprobe. In Abbildung B: werden die affinitätschromatographisch aufgereinigten Fraktionen von rAaStrA gezeigt.

3.6.2 Untersuchung des Einflusses von rAaStrA auf die *S. epidermidis* Biofilmbildung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Zugabe von rAap_{DomB} die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 5179-R1 hemmen kann. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob und in welcher Form rAaStrA die *S. epidermidis* Biofilmbildung beeinflussen kann. Hierzu wurden Biofilm-Assays (Durchführung siehe Kapitel 2.2.2) unter Zugabe unterschiedlicher Mengen von rekombinant erzeugtem und aufgereinigtem AaStrA durchgeführt. Hierbei wurden die *S. epidermidis* Stämme 5179 (biofilmnegativ), *S. epidermidis* 5179-R1 (biofilmpositiv) und 1585 (*aap*-negativ, biofilmnegativ) (siehe Tabelle 2-3) in TSB über Nacht angezüchtet. Diese Vorkultur wurde 1:100 in frischem TSB ohne (als Negativkontrolle) sowie mit unterschiedlichen Konzentrationen rAaStrA verdünnt. Unter Verwendung dieser Verdünnungen wurden Näpfchen einer 96-Well Mikrotiterplatte (Nunc) beschickt und bei 37 °C für 20 h inkubiert. Anschließend wurden nicht adhärente Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Adhärente Zellen konnten durch Gentiana-Violett-Färbung dargestellt werden. Es zeigte sich hierbei, dass die Zugabe von rAaStrA selbst bei einer maximalen Konzentration von 1000 nmol keine inhibitorische Wirkung auf den Biofilm des Stamms *S. epidermidis* 5179-R1 hatte. Vielmehr konnte festgestellt werden, dass die Zugabe von rAaStrA bei den biofilmnegativen *S. epidermidis* Stämmen 5179 und 1585

konzentrationsabhängig zur Ausbildung eines Biofilms führte (Abbildung 3-12). Dieser biofilminduzierende Effekt konnte bei *S. epidermidis* 5179 bis zu einer rAaStrA-Konzentration von 8 nmol und bei *S. epidermidis* 1585 von 125 nmol beobachtet werden. Somit weist AaStrA sowohl bei einem Aap-positiven (5179) wie auch einem Aap-negativen (1585) *S. epidermidis* Stamm eine biofilminduzierende Wirkung auf.

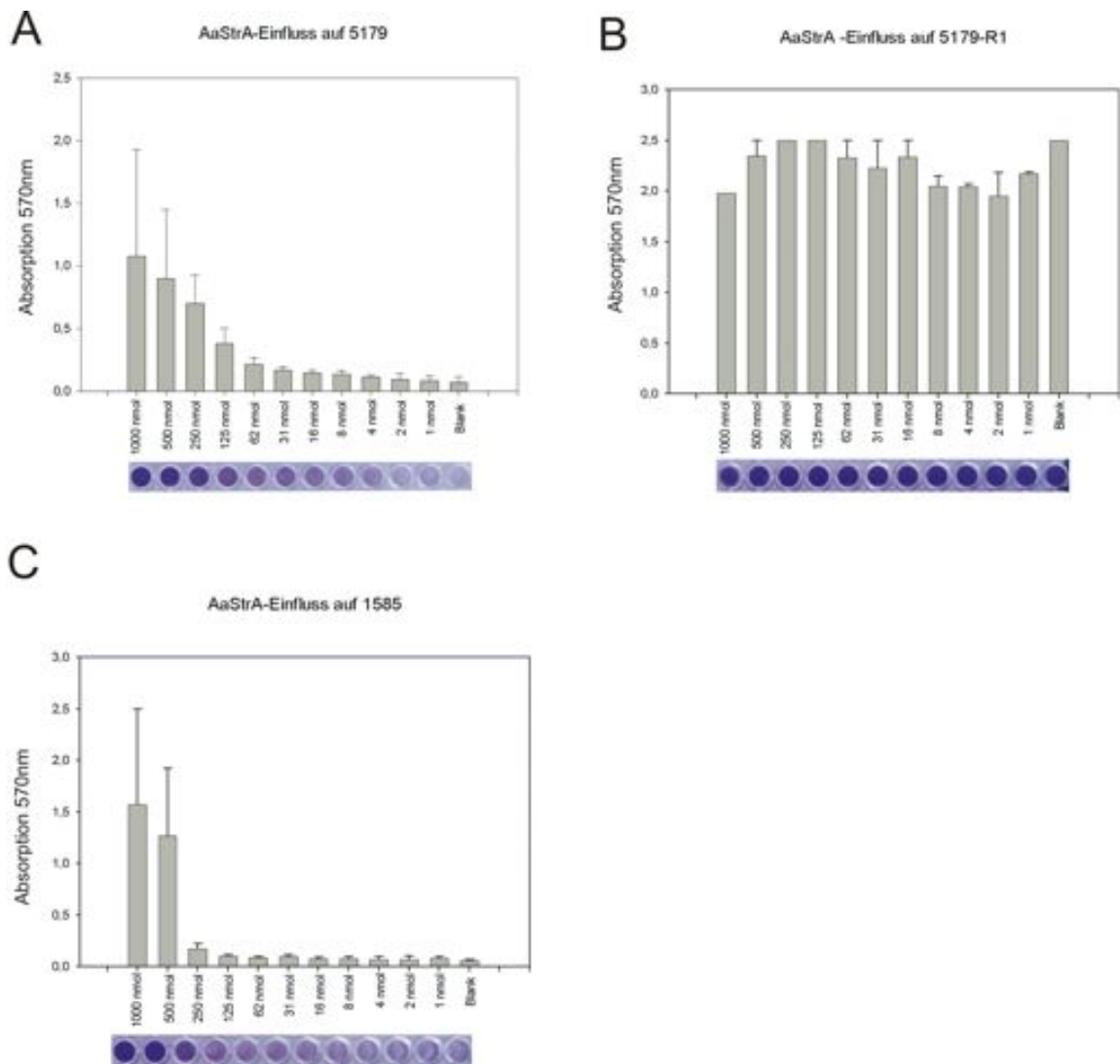


Abbildung 3-12 Biofilm-Assay zur Biofilminduktion durch rAaStrA

Untersuchung des Einflusses von rAaStrA auf die Biofilmbildung. Unterschiedliche Mengen von rAaStrA wurden dem Wachstumsmedium TSB zugesetzt. Nach 20 Stunden Inkubation wurden nicht-adhärenente Zellen abgespült und der zurückbleibende Biofilm mit Gentiana gefärbt. (A) *S. epidermidis* 5179, (B) *S. epidermidis* 5179-R1, (C) *S. epidermidis* 1585. Das Balkendiagramm weist die OD₅₇₀ (+/- Standardabweichung), basierend auf 3 unabhängigen Experimenten und 3 Messwerten, aus. Unter den Diagrammen sind die jeweils korrespondierenden Nöpfchen der Mikrotiterplatten dargestellt.

Der Nachweis einer biofilminduzierenden rAaStrA-Wirkung führte zu der Hypothese, dass AaStrA als interzelluläres Adhäsins sogar Aap-unabhängig Biofilmmakkumulation vermitteln kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde rAaStrA mit einer

Endkonzentration von 250 nmol zu einer Bakteriensuspensionen gegeben, die durch 1:100 Verdünnung einer Übernacht-Kultur von *S. epidermidis* 5179 und 5179-R1 in PBS erzeugt worden war. Nach 8 h wurde diese Suspension 1:100 in PBS verdünnt, ein Aliquot auf einen Objektträgern aufgebracht und nach Gram gefärbt (siehe Abbildung 3-13). Eine identisch behandelte Bakteriensuspension ohne rAaStrA wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

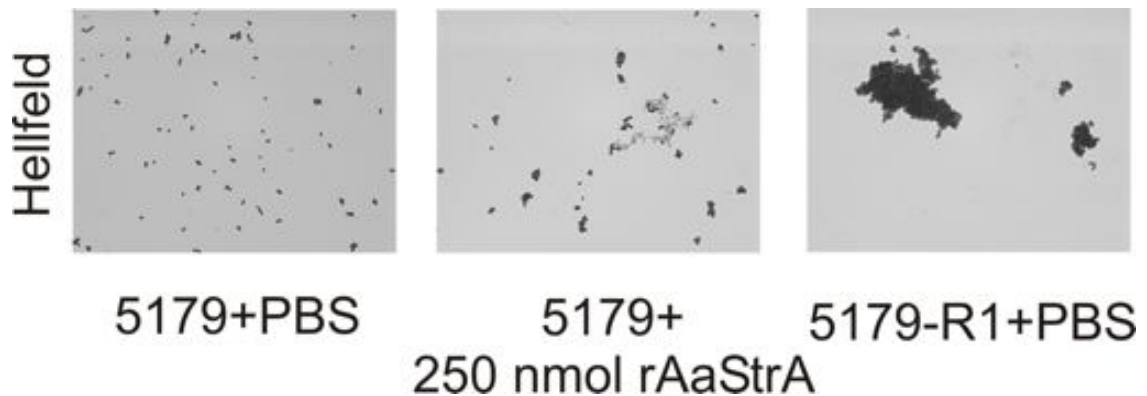


Abbildung 3-13. Grampräparat zur Visualisierung des Einflusses von rAaStrA auf die Biofilmbildung

Darstellung der Induktion von Bakterienzellaggregaten durch rAaStrA im Grampräparat. Durch Zugabe von 250 nmol rAaStrA zu 1:100 in PBS verdünnten Übernachtskulturen. Die Zugabe von rAaStrA führt bei dem biofilmbildungsfähigen Stamm *S. epidermidis* 5179 zur Ausbildung von Zellaggregaten, die ohne rAaStrA nicht beobachtet werden konnten. Als Referenz ist der Stamm *S. epidermidis* 5179-R1 gezeigt, welcher auch ohne exogene rAaStrA-Zugabe große Zellaggregate ausbildet. Die Aufnahmen wurden bei einer 1000-fachen Vergrößerungen gemacht.

Durch die mikroskopische Untersuchung zeigte sich, dass die Zugabe von rAaStrA zu *S. epidermidis* 5179 zur Ausbildung von Bakterienaggregaten führt. Dieses Phänomen weist direkt auf aggregative Eigenschaften von rAaStrA hin. Um als interzelluläres Adhäsion wirksam zu werden, muss exogen zugeführtes rAaStrA an die bakterielle Oberfläche binden. Mit dem Ziel, exogen zugegebenes rAaStrA auf der Oberfläche von *S. epidermidis* 5179 direkt nachzuweisen, wurde ein Immunfluoreszenztest durchgeführt. Hierbei wurden Zellen einer *S. epidermidis* 5179 Übernachtskultur in TSB 1:100 in PBS mit rAaStrA (250 nmol) für 8 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurden *S. epidermidis* 5179 und 5179-R1 jeweils mit dem Volumenäquivalenten PBS behandelt. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterienzellen in PBS gewaschen, in einer geeigneten Verdünnung auf einen IFT-Objektträger aufgebracht und mit dem polyklonalen Anti-AaStrA-Kaninchenantiserum

(1:100 in PBS) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden dann mittels eines Fluoreszein-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen (siehe Abbildung 3-14).

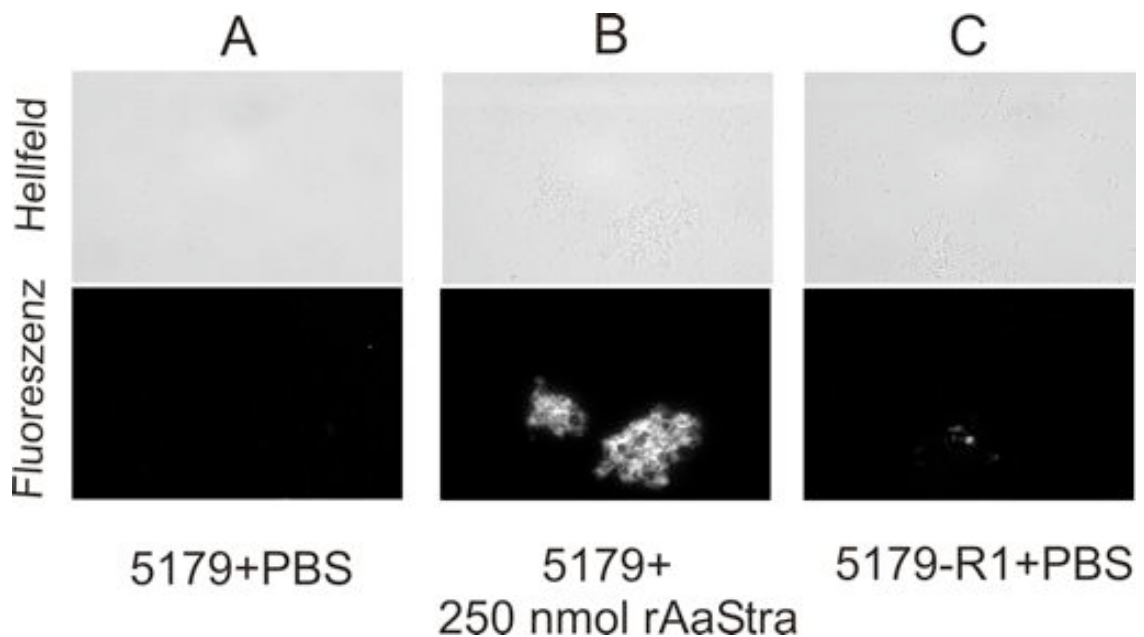


Abbildung 3-14 Immunfluoreszenztest zum rAaStrA-Nachweis auf der Bakterienoberfläche

Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskopie zum direkten Nachweis von AaStrA-auf der Bakterienoberfläche. Bei *S. epidermidis* 5179 ist nach Zugabe von rAaStrA eine deutliche Bakterienaggregation in der Hellfeldmikroskopie und ein Bakterienoberflächen-assoziiertes Anti-AaStrA-Signal in der Fluoreszenzmikroskopie zu erkennen. Zum Vergleich liegen die Negativ-Kontrolle mit dem volumenäquivalent an PBS und der Biofilmpositive Stamm *S. epidermidis* 5179-R1 vor. Die Aufnahmen wurden bei 1000-facher Vergrößerung gemacht.

Bei den unbehandelten Zellen des Stamms 5179 konnte in diesem Test kein rAaStrA auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Konsistent zu den oben beschriebenen Ergebnissen ließen sich bei diesen Bakterien keine Zellaggregate nachweisen. Die Zellen des Stamms *S. epidermidis* 5179-R1 bildeten große Zellaggregate, zeigten jedoch eine nur schwache Reaktivität mit dem anti-rAaStrA-Antiserum. Im Vergleich zu den Negativkontrollen konnte bei *S. epidermidis* 5179 nach Inkubation mit rAaStrA eine starke Immunoreaktivität dargestellt werden. Daneben fanden sich hier große Bakterienzellaggregate. Offensichtlich bindet exogen zugegebenes rAaStrA an die Bakterienoberfläche und induziert so Bakterienzellaggregation. Damit weist AaStrA typische Eigenschaften eines interzellulären Adhäsins auf.

3.7 Charakterisierung von rAap_{DomA}

Im Rahmen der rekombinanten Expression der Domäne-A fiel auf, dass dieses Protein eine deutliche Instabilität aufwies. Grundsätzlich kann dieses Phänomen auf eine Kontamination der Präparation mit einer *E. coli* Protease, eine unspezifische strukturelle Instabilität oder aber auf eine proteolytische Eigenaktivität von rAap_{DomA} zurückgeführt werden. Mit dem Ziel, die Ursache für den spontanen Zerfall von rAap_{DomA} zu identifizieren, wurde zunächst der Effekt des Protease-Inhibitors Complete mini (Roche), welcher ein breites Spektrum an Proteasen inhibieren kann, auf den Zerfall von rAap_{DomA} untersucht (Abbildung 3-15). Es wurde eine Verlaufsbeurteilung der Stabilität der rAap_{DomA} über die Zeit mittels SDS-PAGE durchgeführt. Durch den Vergleich von Proben mit und ohne Proteaseinhibitoren kann ein proteolytischer Zerfall visualisiert werden. Hierzu wurden zwei Aliquots mit identischer Konzentrationen frisch gereinigter rAap_{DomA} bei 37 °C inkubiert. In ein Reaktionsgefäß wurde der Proteaseinhibitor zugefügt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquots der Probe entnommen und bei - 20 °C gelagert. Schließlich wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend nach Coomassie gefärbt

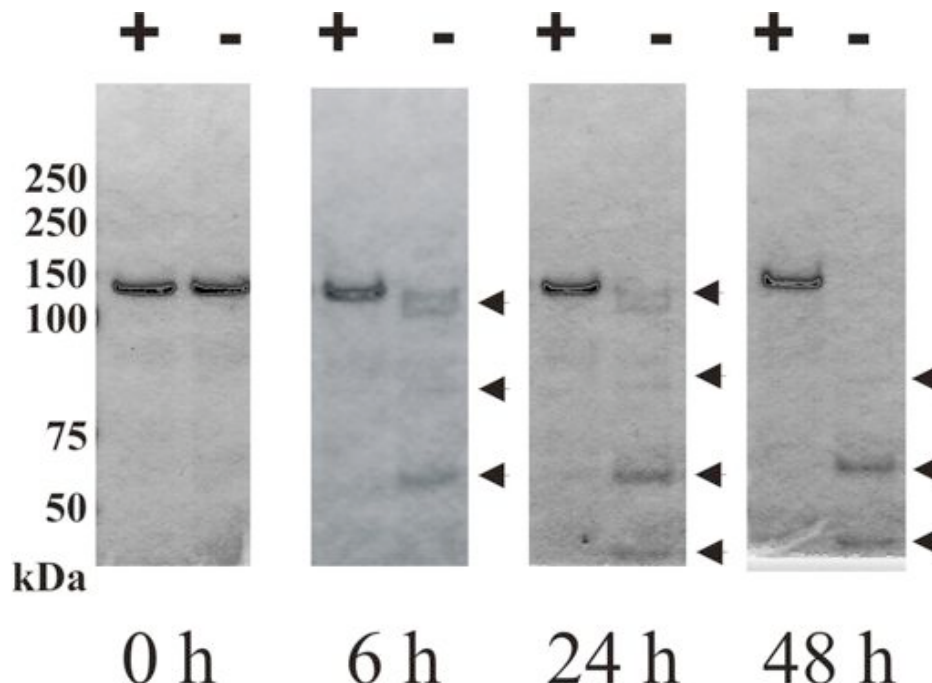


Abbildung 3-15 reverse Zymographie der rAap_{DomA}

Untersuchung der spontanen Degradation der rekombinanten Aap Domäne-A in An (+) - und Abwesenheit (-) des Proteaseinhibitors Complete mini (Roche). rAap_{DomA} wurde bei 37 °C inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und bei - 20 °C gelagert. Die Proben wurden dann gemeinsam mittels SDS-PAGE analysiert. Pfeile verweisen auf Degradationsprodukte von rAap_{DomA}, welche nur bei Inkubation ohne Proteaseinhibitor entstehen.

Die Probe ohne Proteaseinhibitor zerfiel, wie erwartet, zeitabhängig. Nach 48 Stunden konnte keine vollständig erhaltene rAap_{DomA} mehr nachgewiesen werden (Abbildung 3-15; 48 h). Vielmehr fanden sich drei distinkte Banden mit einem ungefähren Gewicht von 80, 60 und 40 kDa, die auch bei wiederholten Untersuchungen unabhängiger Proben reproduzierbar auftraten. Im Gegensatz zu den unbehandelten Proben konnte in Anwesenheit des Proteaseinhibitors keine Degradation der rAap_{DomA} gefunden werden. Hier war selbst nach 48 Stunden das Protein im Wesentlichen intakt. Die Ergebnisse aus Abbildung 3-15 zeigen, dass der Zerfall von rAap_{DomA} nicht auf einen spontanen Zerfall zurückgeführt werden kann, sondern vielmehr Resultat proteolytischer Aktivität ist. Grundsätzlich konnte eine Kontamination der rekombinanten Proteine mit einer *E. coli* Protease nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde die rekombinant exprimierte Domäne-A mittels nicht-denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt sowie eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt. So getrennte Proteine wurden durch Massenspektrometrie weiter untersucht. Es zeigte sich, dass alle Proteine Aap_{DomA} zugeordnet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Es fand sich kein Hinweis für eine Kontamination der Präparation mit einer *E. coli* Protease oder anderen Proteinen. Diese Beobachtung motivierte die Vermutung, dass rAap_{DomA} endogene proteolytische Aktivität aufweist.

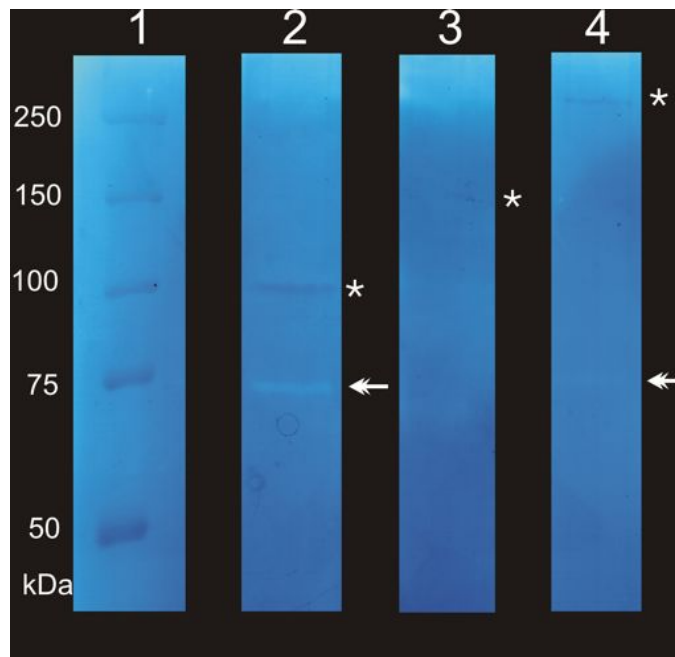
3.8 Untersuchung der proteolytischen Aktivität rekombinant exprimierter Domäne-A von Aap mittels Zymographie

Um die Frage zu klären, ob die proteolytische Aktivität von Aap selbst oder von exogenen Proteasen hervorgerufen wird, wurde eine Zymographie der Aap-Fragmente durchgeführt (Abbildung 3-16 A). Damit sollten zwei Fragen beantwortet werden. Zum einen ob es sich bei der Proteolyse wirklich um einen Aap-endogenen Effekt handelt und, wenn ja, in welchem Bereich von Aap die proteolytische Aktivität lokalisiert ist. Da das rAap_{DomB}-Konstrukt keine AS-Sequenz der Domäne-A beinhaltet sollte hier auch keine proteolytische Aktivität nachweisbar sein. Im Gegensatz dazu sollten sowohl rAap_{DomA} als auch rAap_{komplett} eine proteolytische Aktivität zeigen (Abbildung 3-16 B). Hierzu wurde ein SDS-Polyacrylamid-Gel hergestellt, in welches Gelatine (10 mg/ml) eingegossen wurde. Dieses Gel wurde genutzt, um rAap_{komplett}, rAap_{DomA} und rAap_{DomB} aufzutrennen, ohne die Proben vorher zu erhitzen. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden SDS ausgewaschen und die aufgetrennten Proteine durch Inkubation in Triton X-100 renaturiert. Anschließend wurde das Gel in einem Substratpuffer bei 37 °C für 72 h inkubiert. Um nun mögliche proteolytische Bande

sichtbar zu machen wurde das Zymogram-Gel mit Amido-Black gefärbt. Bei rAap_{DomA} und rAap_{komplett} konnten jeweils proteolytische Banden auf Höhe der 75 kDa Markerbande nachgewiesen werden. Bei rAap_{DomB} konnte keine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden. Um nun die genaue Lokalisation der proteolytischen Bande in der Polypeptidkette von Aap zu bestimmen sollte eine N-Terminale Sequenzierung mittels Edman-Abbau durchgeführt werden.

Um dieses Ziel zu erreichen wurden die rekombinanten Proteine parallel mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die mit der proteolytischen Bande korrespondierende Bande wurde nach Blotting auf eine PVDF-Membran dem Edman-Abbau zugeführt. Der Edmann-Abbau identifizierte als N-terminale Aminosäuresequenz des proteolytischen Fragmentes die Aminosäuresequenz NYSSPFMSLLSMPAD. Diese ist zentral in der Aap Domäne A gelegen (siehe Abbildung 3-16 B).

A



B

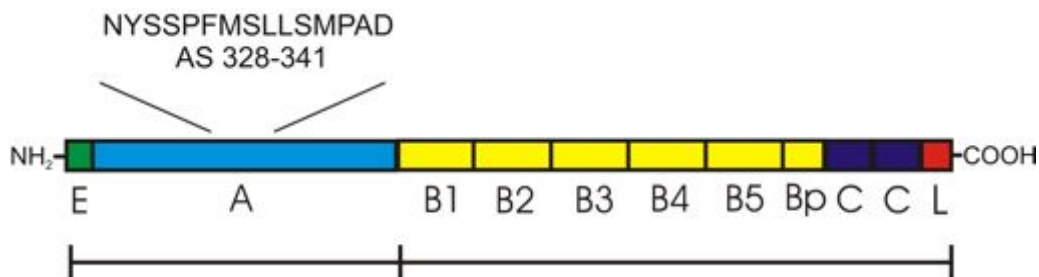


Abbildung 3-16: Analyse der proteolytischen Aktivität von Aap

(A) Untersuchung von rAap_{DomB}, rAap_{DomB}- und rAap_{komplett} mittels Zymographie. Nach Auftrennung in einem Gelatin-haltigen Gel, Entfernung des SDS, Renaturierung der Proteine sowie Inkubation bei 37 °C wurde das Gel mit Amidoblack gefärbt. Eine proteolytische Bande auf Höhe der 75 kDa Markerbande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Ein Sternchen kennzeichnet rekombinantes Protein ohne proteolytische Aktivität. Interessanterweise findet sich bei rAap_{komplett} keine Proteolysebande auf Höhe des Volllängeproteins sondern nur auf Höhe des 75 kDa Degradationsprodukts. (B) Schematische Darstellung von Aap mit Darstellung der Lokalisation und N-terminalen Sequenz der proteolytischen Bande.

3.9 Bioinformatische Analyse der Aap_{Domäne A}

Um die experimentelle Evidenz für eine Aap_{Domäne-A} inhärente proteolytische Aktivität weiter zu erhärten, wurde die Aminosäuresequenz der Aap_{Domäne-A} mittels Merops BLAST (Rawlings et al., 2008) hinsichtlich möglicher Protease-typischer Motive untersucht. Dabei ergab die AS-Sequenzanalyse signifikante Strukturhomologien zu der Protease-Subfamilie M23 B (*non-peptidase* Proteasen), welche zwar einer Protease-Familie zugeordnet werden, ihnen fehlt aber ein oder mehrere katalytische Reste. Ebenso sind Strukturhomologien zu der Familie der Serinproteasen S12 und S13

nachzuweisen. Aus Abbildung 3-17 geht hervor, dass die identifizierten Protease-Motive innerhalb der Region von Domäne-A gefunden werden können, welche in der Zymographie proteolytische Aktivität zugewiesen werden konnte.

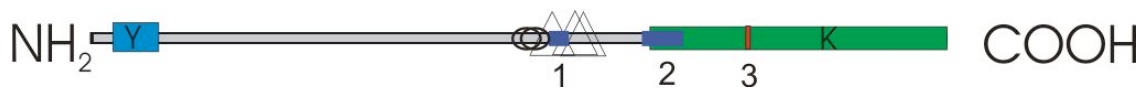


Abbildung 3-17. Strukturdarstellung der Aap_{Domäne-A}

Strukturdarstellung der Aap_{Domäne-A} von *S. epidermidis* 5179 mit Markierung der relevanten Strukturen. Es konnten verschiedene Homologien nachgewiesen werden, die sich im wesentlichen auf eine Region innerhalb der Domäne A beschränken, Y: Y-SIRK-Exportsignal; O: M23b Metallbindungsstelle; K: Region von 212 konservierten Aminosäuren; Δ: aktive Zentren von Serinproteasen von links nach rechts S13, S12 S26b. 1: N-Terminus der Edman-Sequenz; 2: bekannte Deletion in *S. epidermidis* 5179-R1. 3: Serinprotease S13 Struktur analogie.

3.10 Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von Aap_{Domäne-A}

Um die proteolytische Aktivität der rekombinant exprimierten Aap_{Domäne-A} näher zu charakterisieren sollte getestet werden, ob sich diese durch spezifische Cystein-, Serin- oder Metalloprotease-Inhibitoren (Tabelle 3-1) hemmen lässt (Abbildung 3-18). Hierfür wurde die rAap_{DomA} mit den Proteasein-Inhibitoren in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration gemischt und bei 37 °C für 48 h inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 12, 24 und 48 h wurden Proben entnommen und mit dem Proteaseinhibitorgemisch Complete mini[™] inaktiviert. Nach Ablauf der 48 h wurden die Reaktionsgemische mittels SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt und anschließend nach Coomassie gefärbt.

Durch den Vergleich der einzelnen Proben zu der Probe ohne Proteaseinhibitor kann der inhibitorische Effekt dieser Substanzen gezeigt werden.

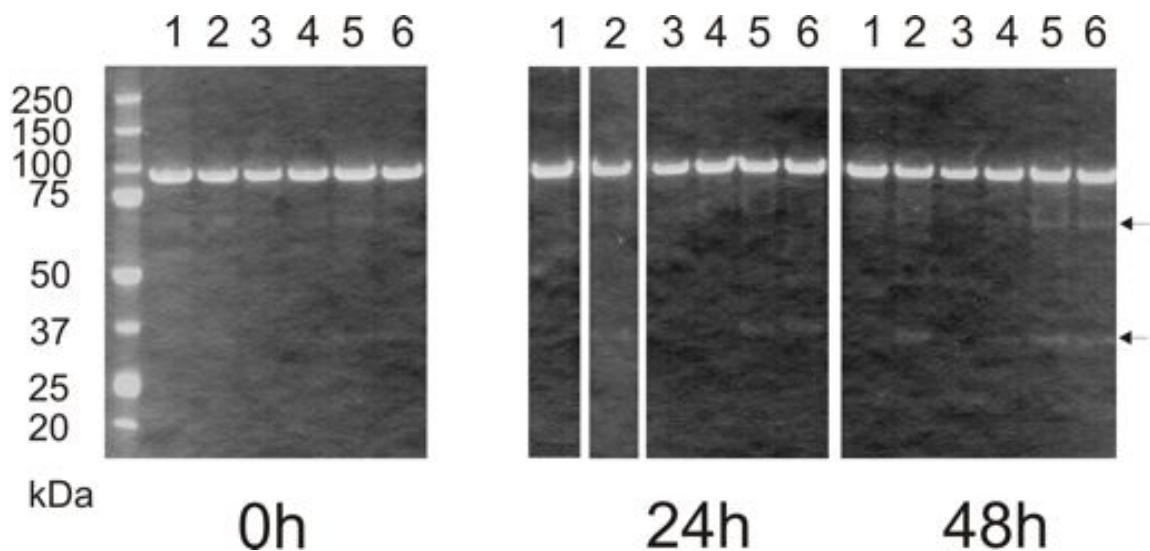


Abbildung 3-18: Spezifische Proteasen-Inhibitionsstudie

Untersuchung der Hemmbarkeit des proteolytischen Zerfalls von Aap Domäne-A. Rekombinant exprimierte Domäne-A wurde mit verschiedenen Proteaseinhibitoren gemischt (Spur 1: AEBSF, Spur 2: 6-Aminohexansäure, Spur 3: Antipain, Spur 4: Aprotinin, Spur 5: Benzamidin-HCl, Spur 6: Ø Protease-Inhibitor). Proben wurden zum Beginn des Experiments und 24 und 48 h später mittels SDS-Page analysiert. Zu erkennen ist eine Stabilisierung von rAap_{DomA} in den Spuren 1 (AEBSF), 3 (Antipain) und 4 (Aprotinin).

Tabelle 3-1: Einfluss verschiedener Proteaseinhibitoren auf den spontanen Zerfall rekombinanter Aap Domäne-A.

Nummer	Protease-Inhibitor	Spezifität	Inhibition der Degradation
1	AEBSF	Serin-Protease-Inhibitor	Ja
2	6-Aminohexan-Säure	Chymotrypsin-ähnliche Proteasen	Nein
3	Antipain	Serin/Cystein-Protease-Inhibitor	Ja
4	Aprotinin	Kompetitiver Serin-Protease-Inhibitor	Ja
5	Benzamidin-HCl	Reversibler Trypsin/Serin Inhibitor	Nein

Die Ergebnisse der reversen Zymographie mit den spezifischen Protease-Inhibitoren lassen eine spezifische Hemmung der Degradation durch die Serin-Protease-Inhibitoren AEBSF, Antipain und Aprotinin erkennen.

4 Diskussion

Durch die zunehmende Verwendung von Fremdmaterialien in der modernen Medizin ist auch die Häufigkeit von Fremdkörper-assoziierten Infektionen stark angestiegen. Als häufigster Erreger kann hier *S. epidermidis* isoliert werden (Rupp and Archer, 1994). *S. epidermidis* ist ein ubiquitär auf der Haut des Menschen vorkommendes grampositives Bakterium. Wesentliche Begründung für das pathogene Potential dieses ansonsten harmlosen kommensalen Erregers ist die Fähigkeit zur Biofilmbildung auf implantierten Fremdmaterialien (Mack et al., 2006, Rohde et al., 2007, Götz, 2002),

Obschon seit drei Jahrzehnten intensiv an der Entstehung von *S. epidermidis* Biofilmen geforscht wird, ist doch gleichwohl die Kenntnis um die molekularen Mechanismen und speziell die an der interzellulären Adhäsion beteiligten Strukturen noch unvollständig. Es konnten verschieden Strukturen, die an der *S. epidermidis* Biofilmbildung beteiligt sind, identifiziert werden (Götz, 2002, Mack et al., 2006). Hierbei wurde insbesondere das interzelluläre Polysaccharidadhäsine PIA, welches durch im *icaADBC*-Operon kodierte Enzymsysteme gebildet wird, detailliert untersucht (Mack, 1999, Heilmann et al., 1996a, Gerke et al., 1998). *icaADBC* sind in klinischen *S. epidermidis* Populationen weit verbreitet (Frebourg et al., 2000, Galdbart et al., 2000, Rohde et al., 2004). Hieraus wurde abgeleitet, dass das *icaADBC*-Operon gleichsam als Virulenzmarker aufgefasst werden kann, welcher, pathogene und apathogene, *S. epidermidis* Stämme unterscheidet (Zhang and Fang, 2001, Gu et al., 2005, Yao et al., 2005, Ziebuhr et al., 1997, Frebourg et al., 2000).

Es ist jedoch auch bekannt, dass neben Polysacchariden auch Proteine Bestandteil der extrazellulären Biofilmmatrix von *S. epidermidis* sind (Hussain et al., 1992). Hierbei wurde ihre Rolle jedoch vor allem eine Rolle in der primären Adhäsion an Fremdkörperoberflächen zugesprochen. Seit kurzem ist jedoch klar, dass auch Proteine als interzelluläre Adhäsine unabhängig von PIA an der Biofilmbildung beteiligt sein können. Neben dem nur oberflächlich charakterisierten Protein Ssp-I (Veenstra et al., 1996) wurde das Biofilm associated protein (Bap) bei *S. epidermidis* beschrieben. Bap kann allerdings nur selten in klinisch-relevanten *S. epidermidis* Isolaten nachgewiesen werden (Cucarella et al., 2004, Cucarella et al., 2002, Cucarella et al., 2001) so dass derzeit die klinische Relevanz bei humanen *S. epidermidis* Infektionen unklar ist. Eine definierte Rolle bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung weist das Aap (Hussain et al., 1997, Sun et al., 2005) auf. Aap kann regelhaft bei klinisch signifikanten *S. epidermidis*

Isolaten nachgewiesen werden (Vandecasteele et al., 2000, Rohde et al., 2004, Rohde et al., 2007, Cotter et al., 2009), so dass vermutet werden kann, dass dieses Protein tatsächlich eine größere Rolle bei der Entstehung von fremdkörperassoziierten Infektionen haben könnte.

Aap liegt in Form fibrillärer Strukturen auf der *S. epidermidis* Zelloberfläche vor (Mack et al., 2007, Banner et al., 2007, Rohde et al., 2007). Das Protein weist eine charakteristische Domänenstruktur auf. C-terminal findet sich ein Exportsignal, welches von der Domäne-A gefolgt wird. Die Domäne-A endet mit einer 212 Aminosäure langen konservierten Region, welche auch in Aap-homologen Staphylokokkenproteinen gefunden werden kann (Roche et al., 2003). Der Domäne-A folgt die Domäne-B, welche aus einer unterschiedlichen Zahl von 128 Aminosäure großen *repeats* besteht (Rohde et al., 2004, Rohde et al., 2005b, Rohde et al., 2007). Diese beinhalten sogenannte G5-Domänen. Das Hauptcharakteristikum dieser Domänenklasse sind 5 hochkonservierte Glycinreste. Diese finden sich ebenfalls in Oberflächenproteinen anderer Organismen wieder (Bateman et al., 2005). Ihre genaue Funktion schien bis vor kurzem unklar, es wurde angenommen, dass sie Peptidoglykan binden oder als allosterische Regulatoren von Enzymen dienen (Bateman et al., 2005). Neueren Ergebnissen zur Folge scheint die G5-Domäne in dem Resuscitation-promoting factor (DeltaDuf) RpfB aus *Mycobacterium spec.* eine zellwandadhäsive Funktion zu besitzen. Diese erlaubt es der katalytischen Domäne des Proteins optimal für eine enzymatische Reaktion orientiert zu sein (Ruggiero et al., 2009)

Aap wurde in dem Biofilm-negativen klinischen *S. epidermidis* Isolat 5179 nachgewiesen, welches eine 220 kDa Aap-Isoform bildet. Eine aus diesem Stamm generierte, Biofilm-positive Revertante *S. epidermidis* 5179-R1 bildet neben der 220 kDa Isoform auch eine verkürzte 140 kDa Isoform, welche im Wesentlichen aus der repetitiven Domäne B besteht. Durch genetische und immnologische Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Domäne B Träger der interzellulär adhäsiven Funktion von Aap ist (Mack et al., 2004).

Untersuchungen unter Verwendung des breiten Proteaseinhibitors α_2 -Makroglobulin haben gezeigt, dass Aap durch eine proteolytische Prozessierung in seine aktive Form überführt wird. Dabei wird die Domäne-A abgespalten und somit die adhäsive Funktion von Aap freigelegt. Der Cystein-Protease-Inhibitor E64 hatte keinen Effekt auf die proteolytische Prozessierung, so dass angenommen wird, dass eine Metallo- oder Serinprotease an der Aap-Prozessierung funktionell beteiligt ist (Rohde et al., 2005b).

Interessanter Weise konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Aap-Homolog SasG bei *S. aureus* nicht nur einen ähnlichen Aufbau wie Aap aufweist, sondern nach proteolytischer Prozessierung auch bei dieser Spezies interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung vermittelt (Corrigan et al., 2007). Für die Stärke der Biofilmbildung ist neben der proteolytischen Prozessierung auch die Anzahl der Wiederholungen in der SasG Domäne B wichtig. Es wurde postuliert, dass eine bestimmte Länge von Nöten ist, um die Distanz zu einer bakteriellen Nachbarzelle zu überbrücken (Corrigan et al., 2007). Neben der Funktion als interzelluläres Adhäsion konnte für SasG auch eine Beteiligung an der Interaktion von *S. aureus* mit humanen Nasenepithelzellen gezeigt und damit die Bedeutung dieses Moleküls für die Besiedlung der menschlichen (Schleim-) Haut hervorgehoben werden (Roche et al., 2003).

4.1 Funktion definierter Aap-Subdomänen bei der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 5179-R1

Durch *in trans* Expression des Aap-Wildtypallels, bestehend aus Domäne A und B, sowie der 140 kDa Isoform bestehend aus der repetitiven Domäne B in einem Biofilm-, *aap*- und *icaADBC*-negativen genetischen Hintergrund konnte genetische Evidenz für die Rolle der Domäne B bei der interzellulären Adhäsion und anschließenden Biofilmbildung gefunden werden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, diese Befunde unter Verwendung rekombinant exprimierter Aap-Subdomänen zu bestätigen. Hierzu wurden zum einen die Aap_{Domäne-A} wie auch Aap_{Domäne-B} rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteine wurden anschließend in Biofilminhibitionsstudien eingesetzt. Hier zeigte sich, dass die Aap-abhängige Biofilmbildung des Stammes *S. epidermidis* 5179-R1 durch Zugabe von rAap_{DomB} konzentrationsabhängig inhibiert werden konnte. Unter Verwendung der rAap_{DomA} konnte keine signifikante Inhibition der Biofilmbildung beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist, dass rAap_{DomB} als Ligand mit spezifischen *S. epidermidis* Oberflächenstrukturen bindet. Diese werden hierdurch abgesättigt und stehen somit nicht mehr für eine Interaktion mit der von *S. epidermidis* 5179-R1 gebildeten 140 kDa Isoform zur Verfügung. Da keine Inhibition unter Verwendung rAap_{DomA} gefunden werden kann, scheint es hier keine signifikante direkte Bindung an die bakterielle Oberfläche mit konsekutiver Absättigung spezifischer Strukturen zu geben. Vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit beschriebenen Daten sowie den Ergebnissen der *in trans* Expression kann die Aap_{Domäne A} somit am ehesten als ein

negativer molekularer Regulator der *S. epidermidis* Biofilmbildung aufgefasst werden. Nach neueren Forschungsergebnissen zur Folge besitzt die Aap Domäne A eine Adhäsivfunktion an Corneozyten (Macintosh et al., 2009). Zur Vermittlung der Adhäsion scheint auch die Aap Domäne B eine Rolle zu spielen, je nach Anzahl der repetitiven Region kann die Aap Domäne-A optimal zur Bindung an die designierte Oberfläche positioniert werden. Neben einer Inhibition der Biofilmbildung durch Zugabe der rAap_{DomB} in das Wachstumsmedium wäre auch ein biofilminduzierender Effekt auf einen biofilmnegativen Stamm denkbar gewesen. In diesem Falle wäre Aap_{Domäne-B} gleichsam als eine Art interzellulärer „Klebstoff“ aufzufassen. Ein biofilminduzierender Effekt war jedoch erst bei Expression der gemeinsamen Expression von Domäne B und dem C-terminalen LPXTG-Zellwandanker-Motiv (Navarre and Schneewind, 1994, Mazmanian et al., 1999) möglich. Dies weist darauf hin, dass die kovalente Verankerung in der Zellwand von funktioneller Bedeutung für die interzellulär adhäsiven Eigenschaften von Aap ist.

4.2 Aap-Bindungspartner

Um als interzelluläres Adhäsion fungieren zu können, muss Aap mit Strukturen auf benachbarten Zellen interagieren. Hierbei kann es sich einerseits um homotype Interaktionen handeln, bei welchen Aap-Moleküle einer *S. epidermidis* Zelle mit denen auf der Oberfläche einer Nachbarzelle lokalisierten Aap-Molekülen wechselwirken. Andererseits ist es jedoch auch denkbar, dass Aap an unabhängige Oberflächenstrukturen bindet, also heterotype Bindungseigenschaften aufweist (Abbildung 4-1).

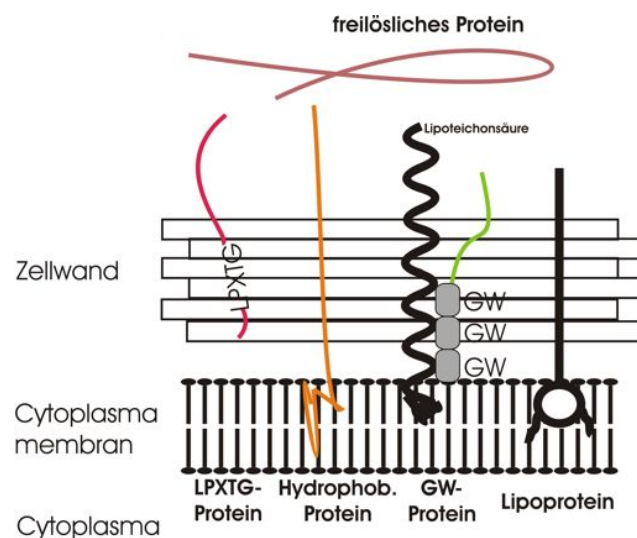


Abbildung 4-1 Übersicht Oberflächenproteine

Schematische Darstellung der diversen bakteriellen Oberflächenproteine von grampositiven Bakterien nach Cabanes et. al 2002 (Cabanes et al., 2002). LPXTG bezeichnet eine spezifische konservierte AS-Sequenz, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Dieses Motiv fungiert als Exportsignal, welches nach Durchschleusung von Cytoplasmamembran und Zellwand das Protein in der Zellwand hält. Hydrophobe Proteine werden aufgrund ihrer Ladung in der Cytoplasma-Membran gehalten und ragen durch die Zellwand hinweg in die bakterielle Umgebung. GW-Proteine beschreiben spezielle Glycin-Tryptophan-Dipeptide, welche nicht-kovalent an Glycosaminoglycan binden und dadurch die Position der Lipoteichonsäuren in der Zellwand stabilisiert. Lipoproteine werden über einen Lipidanker in der Zytoplasmamembran gehalten.

Grundsätzlich sind homotype Interaktion zwischen repetitiven Regionen von Proteinen in der Natur weit verbreitet und stellen ein klassisches Interaktionsmuster von adhäsiven Strukturen dar (Cabanes et al., 2002, Frick et al., 2000). Tatsächlich konnte bei der Untersuchung der rekombinant exprimierten Domäne-B mittels analytischer Gelfiltration in PBS gezeigt werden, dass das 94,77 kDa Protein bei einem deutlich höheren scheinbaren Molekulargewicht von 144 kDa eluierte. Dieses Ergebnis weist auf autoaggregative Eigenschaften der repetitiven Domäne B hin. Dieses Ergebnis passt zu kürzlich publizierten Befunden einer Studie, bei welcher der Einfluss divalenter Kationen auf die Dimersierung von rekombinant exprimierten G5-Domänen untersucht wurde (Conrady et al., 2008). Hier konnte gezeigt werden, dass es abhängig von der Zink-Konzentration zu einer Dimersierung von G5-Domänen kommt. Des Weiteren beschreiben die Autoren, dass durch Zugabe von spezifischen Zink-Chelatoren die Biofilmbildung gehemmt werden kann. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass Aap_{Domäne B} ein Zink-bindendes Protein ist und es Zink-abhängig *S. epidermidis* Zellen aggregieren und damit Biofilmbildung induzieren kann.

In den hier beschriebenen Untersuchungen konnten mittels Far-Western Ligandenbindungsassays und Affinitätschromatographie kein weiterer Anhalt für relevante homotype Interaktionen der Domäne-B gefunden werden. Dies kann an der Tatsache liegen, dass die hier beschriebenen Experimente in Zink-freiem Puffer durchgeführt wurden. Die in der Gelfiltration nachgewiesenen autoaggregativen Eigenschaften könnten so niedrig affin sein, dass sie unter den harschen Bedingungen insbesondere während der Affinitätschromatographie homotype Interaktionen nicht ausreichend stark stabilisieren.

Durch die hier beschriebenen Ergebnisse des Far Western-Liganden Bindungsassays und die Affinitätschromatographie konnte in dieser Arbeit vielmehr erstmals biochemische Evidenz für heterotype Aap_{Domäne B} Interaktionspartner generiert werden. Spezifisch konnte einerseits ein bisher noch nicht beschriebenes 18,79 kDa, hier als Aap associated *Staphylococcus epidermidis* adhesin (AaStrA) bezeichnetes Oberflächenprotein von *S. epidermidis*, als Interaktionspartner identifiziert werden. Des

Weiteren gelang es, Hinweise für eine Wechselwirkung zwischen Aap und dem Autolysin AtlE zu gewinnen.

AtlE ist ein 120 kDa Protein und zeigt eine spezifische Domänenstruktur, bestehend aus zwei bakteriolytisch aktiven Domänen, im Einzelnen einer 60 kDa Amidase- und einer 52 kDa Glucosaminidase-Region (Heilmann et al., 1997, Biswas et al., 2006). AtlE ist ein bereits lange bekanntes Oberflächenprotein, welches zum einen eine entscheidende Rolle in der Zellteilung als Autolysin aufweist (Biswas et al., 2006). Es wird vermutet, dass AtlE durch seine Bindungspartner, wie zum Beispiel Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin über eine Interaktion mit den repetitiven Regionen an der Äquatorialzone immobilisiert wird (Baba and Schneewind, 1998). Darüber hinaus konnte AtlE bereits in der Vergangenheit eine Rolle bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung zugeschrieben werden. Allerdings bezieht sich diese Funktion allein auf die Vitronectin-bindenden Eigenschaften von AtlE, welche in der ersten Phase der Biofilmbildung, also der primen Adhäsion, funktionell von Bedeutung sein könnten (Heilmann et al., 1997). In der Vergangenheit konnte zudem gezeigt werden, dass AtlE durch Steuerung der Freisetzung von chromosomaler DNA indirekten Einfluss auf die *S. epidermidis* Biofilmbildung aufweist (Qin et al., 2007). Durch AtlE-vermittelte Autolyse kann chromosomale extrazelluläre DNA (eDNA) parallel zu PIA die *S. epidermidis* Biofilmbildung unterstützen. Durch den Nachweis einer Interaktion von Aap mit AtlE ist zusätzlich eine Funktion von AtlE in der akkumulativen Phase der Biofilmbildung zu diskutieren. Dabei ist eine Lokalisation der Interaktionsfähigkeit von Aap mit AtlE auf eine der beiden Domänen von AtlE beschränkt, so dass durch eine rekombinate Expression der beiden Subdomänen zum einen eine genauere Diskriminierung dieser erfolgen und zum anderen die adhäsive Funktion auf molekularer Ebene gezeigt werden kann. Eine Lokalisationsangabe der Interaktionsregion von AtlE mit Aap kann mit den derzeitigen Ergebnissen nicht getroffen werden. Wahrscheinlich ist die Interaktionsregion im Bereich der 3 Wiederholungen anzutreffen, welche hauptsächlich in der Amidase, aber auch in der Glucosaminidase anzutreffen sind. (Abbildung 4-2)

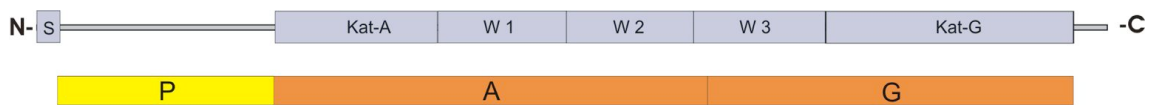


Abbildung 4-2 Schematische Darstellung AtIE

Schematische Darstellung von AtIE und den bekannten funktionellen Domänen. unter Einbeziehung der bekannten funktionellen Einheiten. N-terminal liegt ein aus 30 AS (3 kDa) bestehendes Signalpeptid, dem ein 273AS(18 kDa) Propetid folgt. Im Anschluss daran liegt die 561 AS (60 kDa) lange Amidase-Region, welche im Wesentlichen aus zwei großen *repeats* aufgebaut ist. Hinter der Amidase-Domäne liegt die 472 AS (52 kDa) Glucosaminidase-Region. Das AtIE Protein ist relativ instabil und zerfällt spontan. Die resultierenden Fragmente weisen maximal bakteriolytische Aktivität auf (Heilmann et al., 1997). S: Exportsignalpeptid Y-Sirk; P: Propeptid; A: Amidase-Region; **Kat-A**: katalytisches Zentrum der Amidase; **W1-3**: Aminosäure-Repeat 1-3; G: Glucosaminidase-Region; **Kat-G**: Katalytisches Zentrum der Glucosaminidase-Region

Durch die bis jetzt erarbeiteten Ergebnisse sind mehrere Szenarien der Interaktion zwischen Aap und den potentiellen Liganden AtIE und AaStrA möglich. Unter der Annahme der Immobilisation von Aap an der bakteriellen Oberfläche durch das LPXTG-Motiv als Zellanker und dem Zellwand-ungebunden Vorkommen von AtIE und AaStrA scheinen unten gezeigte Szenarien der Stabilisierung der interzellulären Adhäsion durch Aap und seine Protein-Liganden AtIE und AaStrA am wahrscheinlichsten. Nicht auszuschließen dabei sind allerdings Interaktionen der Aap-AtIE und Aap-AaStrA-Komplexe mit bisher nicht nachgewiesenen Strukturen. wie zum Beispiel PIA, Lipo-Teichonsäuren oder dem Peptidoglycan.

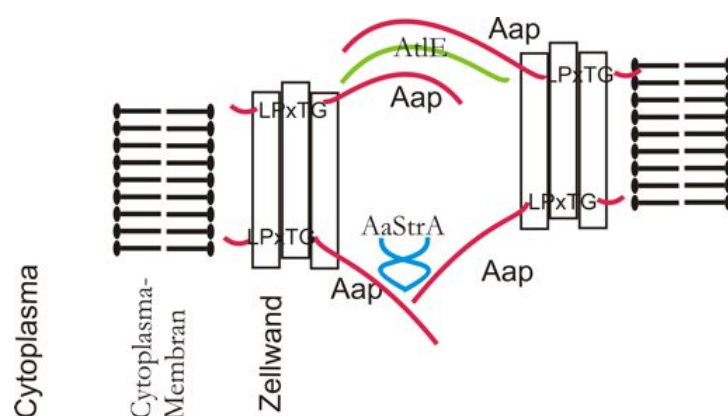


Abbildung 4-3 Zell-Zell-Adhäsion

Schematische Modellvorstellung der Interaktion von Aap Domäne-B mit AtIE und AaStrA. AtIE und AaStrA sind als nicht kovalent an die Bakterienzellwand gebundene Proteine an das zellwandgebundene Aap angelagert und hierdurch an der Aap-vermitteln interzellulären Adhäsion beteiligt.

Die theoretische Überlegung, dass für Aap, eine gewisse Länge in Form von Repetitionen in der Aap Domäne-B nötig ist, um die Distanz zwischen den Bakterienzellen zu überbrücken, erscheint vor dem Hintergrund dieser Abbildung als einleuchtend. Allerdings nicht, um eine homotype Interaktion, sondern um heterotype Interaktionen einzugehen. Ob nun tatsächlich nur ein Molekül AaStrA oder AtIE nötig ist, um zwei Aap-Moleküle zu verbinden, konnte noch nicht geklärt werden. Denkbar wäre ebenfalls eine Interaktion von zwei oder mehr AaStrA Molekülen mit zwei Aap-Molekülen. Nur die genaue Analyse der konnektiven Peptide wird uns in Zukunft darüber Auskunft geben können, in welchem stöchiometrischen Verhältnis diese Interaktion stattfindet. Zudem wird es von großer Bedeutung sein, die relative Bedeutung einzelner an der *S. epidermidis* Biofilmbildung beteiligter Faktoren, namentlich PIA, zu beschreiben. In diesem Zusammenhang wird auch zu klären sein, ob einzelne funktionelle Faktoren synergistisch oder kooperativ zusammen spielen. In früheren Berichten wurde bereits die Vermutung geäußert, das Aap möglicherweise als PIA-bindendes Protein dient (Bateman et al., 2005, Heilmann et al., 1997, Hussain et al., 1997) und hierdurch das Polysaccharid auf der Bakterienoberfläche rekrutiert. Strukturell könnten hierfür die bereits erwähnten G5 Domänen verantwortlich sein. Unter Verwendung der rAap_{DomB} konnte allerdings in präliminären Experimenten keine Evidenz für eine solche Interaktion gefunden werden (Burdelski, Rohde, nicht publizierte Daten). Zukünftig wird diese Frage jedoch in Interaktionsstudien unter Einsatz von sensitiveren Verfahren (zum Beispiel Plasmonresonanz) untersucht werden müssen.

4.3 Eigenschaften, Funktion und Bedeutung von AaStrA

Mit AaStrA konnte ein komplett neuer, bisher unbekannter, an der *S. epidermidis* Biofilmbildung beteiligter Proteinfaktor identifiziert werden. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Proteinfaktoren wie Aap und Bap ist AaStrA ein ausgesprochen kleines Protein bestehend aus 170 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 18 kDa. Der theoretische p_I liegt bei 9.98 und ist damit extrem basisch. Die bioinformatische Analyse des Proteins ergab lediglich den Nachweis eines N-terminalen Signalpeptids, bestehend aus 21 Aminosäuren (Bendtsen et al., 2004), welchem eine die Funktion eines Exportsignals zukommt und nach dem Proteinexport abgespalten wird (Bendtsen et al., 2004). Somit besteht der vermutete funktionelle Anteil dementsprechend aus 149 Aminosäuren.

Die Interaktion von AaStrA und Aap_{Domäne B} konnte in unterschiedlichen Ansätzen biochemisch nachgewiesen werden. Allerdings können derzeit noch keine Aussagen über die exakten Modalitäten dieser Interaktion gemacht werden. So bleibt zu klären, welche minimalen strukturellen Voraussetzungen, zum Beispiel die minimale Zahl der *G5 repeats*, für eine Interaktion von AaStrA und Aap_{Domäne-B} notwendig sind. In diesem Zusammenhang muss die Stöchiometrie der AaStrA- Aap_{Domäne-B} Interaktion, zum Beispiel durch analytische Gelchromatographie, weiter untersucht werden. Im Hinblick auf die bereits dokumentierte Eigenschaft der Aap_{Domäne B}, Zink zu binden, sollte zudem geklärt werden, inwieweit die Interaktion zwischen AaStrA und Aap abhängig von divalenten Kationen ist.

Die hier geschilderten Untersuchungen haben den Nachweis erbracht, dass AaStrA ein oberflächen-assoziiertes Protein ist. Zudem haben Untersuchungen mittels Gelfiltration gezeigt, dass rAaStrA offensichtlich große Aggregate bildet, die selbst durch Hochsalzbedingungen und 4 M Harnstoff nicht auflösen waren. Sowohl die Lokalisation auf der bakteriellen Oberfläche wie auch die autoaggregativen Eigenschaften weisen darauf hin, dass AaStrA möglicherweise selbst als interzelluläres Adhäsion fungieren könnte. Tatsächlich konnte durch Zugabe von rAaStrA bei verschiedenen, genetisch unabhängigen *S. epidermidis* Stämmen Zellaggregation und ein Biofilm-positiver Phänotyp induziert werden (Abbildung 3-12). Dies gelang selbst bei dem *aap*-negativen *S. epidermidis* 1585 und *S. carnosus* TM300 (Daten nicht gezeigt). Somit scheint also die Bindung von AaStrA an die Staphylokokkenoberfläche auch völlig unabhängig von Aap stattzufinden. Folglich kann AaStrA vermutlich als eigenständiges interzelluläres Adhäsion betrachtet werden.

AaStrA konnte im Rahmen der Affinitätschromatographie sowohl in Proteinpräparationen des biofilmb negativen *S. epidermidis* 5179 als auch des biofilmb positiven *S. epidermidis* 5179-R1 nachgewiesen werden. Mittels Western-Blot und quantitativer *real-time* PCR ließ sich kein quantitativer Unterschied der AaStrA Expression zwischen den beiden Stämmen darstellen (Franke, Rohde, nicht publizierte Daten). Hieraus lässt sich auch im Hinblick auf die Biofilminduktionsexperimente unter Verwendung von rekombinantem AaStrA ableiten, dass offensichtlich eine quantitative Beziehung zwischen rAaStrA-Konzentration und Biofilmbildung besteht. Bei *S. epidermidis* 5179 wird offensichtlich nicht ausreichend endogenes AaStrA gebildet, um auch bei diesem Stamm einen biofilmb positiven Phänotyp zu erzeugen. Zudem wird deutlich, dass tatsächlich die proteolytische Prozessierung von Aap notwendig ist, damit

ausreichend stark interzellulär adhäsive Oberflächeneigenschaften resultieren, die bei konstanter AaStrA-Expression ausreichend für einen biofilmpositiven Phänotyp sind. Die gewonnenen Ergebnisse weisen AaStrA funktionelle Charakteristika zu, die typischerweise bei Proteinen der SERAM (Secretable extended repertoire adhesive molecules) Gruppe gefunden werden können (Chavakis et al., 2005). Hierzu gehört bei *Staphylococcus aureus* neben den Proteinen Efb und Emp das *extracellular adherence protein* (Eap) (Chavakis et al., 2005). Eap ist ein 72 kDa Protein, welches erstmalig aufgrund seiner Fibrinogen-bindenden Aktivität identifiziert werden konnte (Palma et al., 1999). Neben dieser Eigenschaft bindet Eap an die bakterielle Zelloberfläche und besitzt aggregative Eigenschaften. Diese könnten zum Beispiel durch eine Interaktion mit Oberflächen-gebundenen neutralen Phosphatase vermittelt werden (Pei and Flock, 2001). Eine Rolle von Eap bei der *S. aureus* Biofilmbildung ist bislang noch nicht beschrieben. Vielmehr beschäftigen sich die bislang publizierten Berichte vor allem mit der Fähigkeit des Proteins, mit einer Vielzahl von extrazellulären Matrixproteinen wie Fibrinogen, Vitronectin, Fibronectin, Kollagen und Elastin zu interagieren (Hussain et al., 2001). Daneben ist eine besondere Eigenschaft des Proteins, durch Bindung an ICAM-1 die Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen und deren konsekutive Diapedese zu inhibieren (Chavakis et al., 2002). Auch für AaStrA konnten erste Hinweise gewonnen werden, dass dieses Protein, parallel zu Eap, Fibrinogen und Fibronectin bindende Aktivität aufweist. (Burdelski, Rohde, nicht publizierte Daten). Ob diese Interaktion tatsächlich auch für die primäre Adhärenz von funktioneller Bedeutung ist, AaStrA also in beiden Phasen der Biofilmbildung eine Rolle spielt, muss zukünftig durch Generierung von *knock-out* Mutanten und deren Untersuchung in Oberflächenbindungsassays geklärt werden. Zudem ist es natürlich von Interesse, ob AaStrA wie auch Eap immunmodulatorischen und antiinflammatorische Eigenschaften besitzt. Hier würden sich erste Ansätze für die Bearbeitung der Frage, warum *S. epidermidis* als kommensaler Erreger auf der menschlichen Haut persistieren kann, ergeben. Die Tatsache, dass AaStrA in einer Sammlung von *S. epidermidis* Isolaten aus Hüft- und Knie-endoprotheseninfektionen nachgewiesen werden konnte, weist auf eine größere biologische Relevanz dieses Proteins bei der Kolonisation der menschlichen Haut beziehungsweise bei Infektionen hin.

4.4 Bedeutung der autoproteolytischen Aktivität bei der Aktivierung von Aap

Aap ist nur nach proteolytischer Spaltung interzellulär-adhäsiv. Zur Entfaltung der interzellulär-adhäsiven Funktion muss die Domäne A von der Domäne B abgespalten werden. Als Proteasen kommen hierfür sowohl Wirts- als auch Staphylokokken-eigene Proteasen in Betracht (Rohde et al., 2005b). Erste Charakterisierungsexperimente der verantwortlichen Proteasen machen eine Beteiligung von Cysteinproteasen unwahrscheinlich.

Die hier erhobenen Daten weisen jedoch darauf hin, dass die Aap_{Domäne-A} selbst proteolytisch aktiv ist. Ausgangspunkt für diese Vermutung war die Beobachtung, dass rAap_{DomA} spontan in definierte Fragmente zerfällt. Es konnte dann mittels Zymographie und Proteaseaktivitätstesten eine proteolytische Aktivität der Domäne-A bestätigt werden. Hierbei ist von Bedeutung, dass eine Kontamination der Präparation rAap_{DomA} mit *E. coli* Proteasen ausgeschlossen werden konnte. Durch die Bestimmung des N-Terminus eines 75 kDa Domäne-A-Fragmentes, welches in der Zymographie proteolytische Aktivität aufwies, konnte die Lokalisation der proteolytischen Aktivität näher bestimmt werden. In der Analyse der abgeleiteten Proteinprimärstruktur fand sich, dass diese Homologie zu den aktiven Zentren von Serinproteasen besitzt. Die gesamte Aap_{Domäne-A} zeigt hohe Strukturhomologien zu der M23b Nonpeptidase Familie (www.merops.com) (Rawlings et al., 2008) zu der die auch die Staphylokokken-Protease Lysostaphin gehört.

Lysostaphin ist ein seit langem bekanntes 27 kDa Protein (Schindler, 1966). Es stellt eine Glycyl-Glycin-Endopeptidase dar, welche die Pentaglycin Kreuzbrücken im Peptidoglycan der Staphylokokken spaltet und damit die Bakterien lysiert. Dieser Effekt konnte in starker Ausprägung für *S. aureus* und etwas schwächer ausgeprägt für *S. epidermidis* nachgewiesen werden. Darüber hinaus wird zusätzlich die Extrazellularmatrix durch Lysostaphin aufgelöst. So konnte auch in einem Maus-Katheter-Infektionsmodell gezeigt werden, dass durch Inkubation mit Lysostaphin eine staphylokokkogene Biofilminfektion eradiziert werden kann (Kokai-Kun et al., 2009, Wu et al., 2003).

Weitere Homologie-Suchen ergaben Ähnlichkeiten zu aktiven Zentren von Serinproteasen der Familien S12 und S13. Charakterisierende Proteaseinhibitorstudien zeigten *in vitro* einen stabilisierender Effekt von spezifischen Serin-Protease-Inhibitoren auf rAap_{DomA}. Daraus ergibt sich der Verdacht, dass Aap_{Domäne-A} tatsächlich eine Serinproteaseaktivität besitzt. Dies erscheint besonders interessant vor dem

Hintergrund, dass durch eine spezifische Hemmung von Serinproteasen die Überführung von Aap in seine adhäsive Isoform inhibiert werden kann.

Die weitergehende Strukturanalyse der Aap_{Domäne-A} erbrachte zusätzliche Hinweise für das Vorliegen einer inhärenten Proteasefunktion. Im Aminosäuren-Sequenzvergleich der Aap-Isoformen von *S. epidermidis* 5179 und 5179-R1 fällt eine 30 AS-Deletion bei *S. epidermidis* 5179-R1 auf, welche vor dem Hintergrund einer möglichen Protease-Domäne, den biofilmmnegativen Phänotyp von *S. epidermidis* 5179 erklären könnte. Erste bioinformatische Analysen haben Hinweise darauf ergeben, dass auch bei SasG homologe Proteasestrukturen, wie bei Aap, identifiziert werden können. (Daten nicht gezeigt).

Durch eine solche Adhäsionsmolekül-endogene Protease würde dem bakteriellen Biofilm eine noch größere Komplexität vermittelt werden. Falls sich die Strukturhomologien zu Proteasen auch in der Funktion ausdrücken sollten, wäre die Kombination aus Protease in der Aap_{Domäne-A} und Adhäsine in der Aap_{Domäne-B} eine neue Kombination aus Fähigkeiten in einem Molekül, welche tatsächlich eine erhebliche Plastizitätssteigerung des proteinabhängigen Biofilms bedeutet würde.

Zusätzliche Bedeutung erhält der Nachweis einer Aap-endogenen Protease durch Biofilmplastizitätsuntersuchungen bei *S. aureus*. Untersucht wurde dabei das *agr* (accessory gene regulator gene) quorum sensing System. Dabei handelt es sich um einen Expressionsregulator von verschiedenen Virulenzfaktoren wie Hämolytinen, Toxinen und Proteasen. Getriggert wird dieses System durch Autoinducing Peptides (AIP). Dabei handelt es sich um ein Octapeptid, dessen letzten fünf Aminosäurereste zu einem Thiolacton-Ring angeordnet sind. AIPs werden während des bakteriellen Wachstums synthetisiert und über einen bisher nur oberflächlich verstandenen Exportmechanismus sekretiert. Sobald die AIPs eine kritische Konzentration erreicht haben, binden diese an einen Histidin-Kinase-Rezeptor welcher dann die Expression der o.g. Virulenzfaktoren hoch reguliert.

Die Inhibition des quorum-sensing-Systems ist bei *S.aureus* Bedingung zur Entwicklung eines Biofilms. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass zum Detachment der Bakterien, also der Auslösung einzelner Bakterien aus dem Biofilm, die verstärkte Expression von unspezifischen Proteasen notwendig ist. Dabei handelt es sich vermehrt um Serinproteasen. Diese Proteasen lösen dann die proteinabhängigen Adhäsionsstrukturen auf und entlassen die Bakterien aus diesem stabilen Zellverband. Hierdurch wird deutlich dass ein Biofilm einem ständigen Auf- und Abbauprozess

unterworfen ist, welcher wesentlich von der bakteriellen Dichte in Zellverband gesteuert und durch Proteasen vermittelt wird (Boles and Horswill, 2008).

5 Zusammenfassung

Fremdkörperassoziierte Infektionen sind ein größer werdendes Problem der modernen Medizin. Der häufigste Erreger ist *S. epidermidis*, welcher die Fremdkörper in Form eines Biofilmes besiedelt. Zunächst wurden Polysaccharide in Form des Polysaccharid interzellulär Adhäsins (PIA), als entscheidende Virulenzfaktoren dafür angesehen. Jüngere Forschungsergebnisse zeigten jedoch, dass auch Proteine die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* vermitteln können. Eines dieser Proteine ist das Accumulation associated protein (Aap), welches in der Lage ist PIA-unabhängig die Biofilmbildung zu vermitteln. Durch rekombinante Expression von Aap und seinen Subdomänen Aap_{Domäne-A} und Aap_{Domäne-B} aus dem klinischen *S. epidermidis* Isolat 5179 sollte die Funktion dieses Proteins, beziehungsweise seiner Subdomänen evaluiert und eventuelle Bindungspartner identifiziert werden. Dafür wurden zunächst die geeigneten genetischen Konstrukte zur Expression eines poly-Histidin Fusionsprotein erstellt. Anschließend wurde eine Nickel-basierte Affinitätschromatographie zur Aufreinigung der poly-Histidin-Proteine etabliert. Sodann erfolgte die molekularbiologische Charakterisierung der rekombinanten Proteine. Durch Verwendung unterschiedlicher molekularbiologischer Verfahren gelang es heterotype Protein-Bindungspartner der Aap_{Domäne-B} zu identifizieren und diese Ergebnisse zu verifizieren. Dabei handelte es sich zum einen um das bekannte *S. epidermidis* Protein Autolysin E (AtlE) und zum anderen um ein bis dato unbekanntes 18 kDa Protein, welches als Aap-assoziiertes *S. epidermidis* extrazellulär Adhäsins (AaStrA) bezeichnet wurde. Eine vermutete homotype Interaktion der Aap_{Domäne-B} als Mechanismus der adhäsiven Funktion konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Die Charakterisierung von AaStrA wurde durch die rekombinante Expression als poly-Histidin-Fusionsprotein ermöglicht. Es zeigte sich, dass AaStrA unabhängig von Aap die Biofilmbildung induzieren kann und darüber hinaus über Bindungsfähigkeiten an Wirtsproteine verfügt, welches eine Einordnung in die Gruppe der SERAM's (Secretable extended repertoire adhesive molecules) nahelegt. Für die Aap_{Domäne-A} konnte mit den angewandten Methoden keine unmittelbare adhäsive Funktion gezeigt werden. Jedoch ergaben sich Hinweise auf die Präsenz eines proteolytischen Zentrums innerhalb der Aap_{Domäne-A}, was vor dem Hintergrund einer notwendigen proteolytischen Prozessierung von Aap zur Entfaltung der adhäsiven Funktion besonders interessant erscheint. Eine präliminäre Charakterisierung ergab relevante Struktur- und Funktionshomologien zu Serinproteasen. Die hier erhobenen

Daten geben erstmals Hinweise auf komplexe Wechselwirkungen zwischen *S. epidermidis* Oberflächenproteinen, welche zur Entstehung von Biofilmen auf Implantaten beitragen können. Die weitergehenden Untersuchungen der an der Aap-abhängigen Biofilmbildung beteiligten Faktoren, sowie deren spezifische Bedeutung für die Entstehung für *S. epidermidis* Fremdmaterialinfektionen ist von wesentlicher Bedeutung für die Formulierung und Evaluation neuer präventiver oder therapeutischer Strategien für deren Bekämpfung.

6 Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren (engl. <i>Amino acids</i>)
A ₄₀₅	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 405 nm
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (englisch: <i>bovine serum albumin</i>)
cm	Zentimeter
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
Da	Dalton
DomA	Domäne A
DomB	Domäne B
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	<u>D</u> esoxy- <u>N</u> ukleotidyl- <u>T</u> riphosphat
EDTA	<u>E</u> thylend <u>a</u> mintetra <u>a</u> acetat
ELISA	englisch <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ica	interzelluläre Adhäsion (<i>intercellular adhesion</i>)
kV	Kilovolt
LB	Luria-Bertani
M	Mol
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
ms	Millisekunden
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte bestimmt bei einer Wellenlänge von 600 nm
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: <i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: <i>polymerase chain reaction</i>)
PIA	interzelluläres Polysaccharid Adhäsion (englisch: <i>polysaccharide intercellular adhesin</i>)
pI	isoelektrischer Punkt
rAaStrA	rekombinant exprimiertes AaStrA
rAap _{DomA}	rekombinant exprimierte Aap Domäne-A

rAap _{DomB} -	rekombinant exprimierte Aap Domäne-B
rAap _{komplett}	rekombinant exprimiertes Aap komplett
SOC	super optimal broth (SOB) mit 20 mmol Glucose versetzt
<i>spec.</i>	Species
TSB BBL	Trypton Soja Brühe (englisch: <i>trypticase soy broth</i>) der Firma Becton Dickinson, Cockseyville, MD, USA
U	enzymatische Einheit (englisch: <i>unit</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: <i>rounds per minute</i>)
s	Sekunde
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

6.1 Prä- und Suffixe

dd	doppelt destilliert
r-	rekombinant
-t	trunkiert

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 REM Aufnahme eines Biofilms	8
Abbildung 1-2 Biofilmbildung	10
Abbildung 1-4 Aap Isoformen	15
Abbildung 1-6 Einfluss der Aap-Isoformen auf die Biofilmbildung	17
Abbildung 3-1 Übersicht Aap	56
Abbildung 3-3 Affinitätschromatographie von rAap _{komplett}	58
Abbildung 3-5 Analyse der rekombinanten Expression und affinitäts- chromatographischen Aufreinigung von Aap und seinen Subdomänen mittels SDS- PAGE	58
Abbildung 3-7 Biofilminhibitions-Assay	60
Abbildung 3-9 Analyse von rAap _{DomB} - mittels Gelchromatographie	61
Abbildung 3-11: Far-Western-Blot mit biotinylierter rAap-DomB	62
Abbildung 3-12 NHS-basierte Affinitätschromatographie zur Ligandenidentifikation	65
Abbildung 3-14 Far-Western-Blot rAap _{Dom B}	66
Abbildung 3-15 Schematische Darstellung von AaStrA	67
Abbildung 3-10 Affinitätschromatographische Aufreinigung von rAaStrA	69
Abbildung 3-18 SDS-PAGE rAaStrA	70
Abbildung 3-13 Biofilm-Assay zur Biofilminduktion durch rAaStrA	71
Abbildung 3-15. Grampräparat zur Visualisierung des Einflusses von rAaStrA auf die Biofilmbildung	72
Abbildung 3-17 Immunfluoreszenztest zum rAaStrA-Nachweis auf der Bakterienoberfläche	73
Abbildung 3-19 reverse Zymographie der rAap _{DomA}	74
Abbildung 3-21: Analyse der proteolytischen Aktivität von Aap	77
Abbildung 3-23. Strukturdarstellung der Aap _{Domäne-A}	78
Abbildung 3-25: Spezifische Proteasen-Inhibitionsstudie	79
Abbildung 4-1 Übersicht Oberflächenproteine	83
Abbildung 4-2 Schematische Darstellung AtLE	86
Abbildung 4-3 Zell-Zell-Adhäsion	86

8 Literaturverzeichnis

- ARCIOLA, C. R., BALDASSARRI, L. & MONTANARO, L. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J.Clin.Microbiol.*, 39, 2151-2156.
- ARCIOLA, C. R., CAMPOCCIA, D. & MONTANARO, L. 2002. Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. *Expert.Rev.Mol.Diagn.*, 2, 478-484.
- BABA, T. & SCHNEEWIND, O. 1998. Targeting of muralytic enzymes to the cell division site of Gram-positive bacteria: repeat domains direct autolysin to the equatorial surface ring of *Staphylococcus aureus*. *EMBO J*, 17, 4639-46.
- BANNER, M. A., CUNNIFFE, J. G., MACINTOSH, R. L., FOSTER, T. J., ROHDE, H., MACK, D., HOYES, E., DERRICK, J., UPTON, M. & HANDLEY, P. S. 2007. Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J Bacteriol*, 189, 2793-804.
- BATEMAN, A., HOLDEN, M. T. & YEATS, C. 2005. The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics.*, 21, 1301-1303.
- BEGUN, J., GAIANI, J. M., ROHDE, H., MACK, D., CALDERWOOD, S. B., AUSUBEL, F. M. & SIFRI, C. D. 2007. *Staphylococcal* biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog*, 3, e57.
- BENDTSEN, J. D., NIELSEN, H., VON HEIJNE, G. & BRUNAK, S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 340, 783-95.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.*, 7, 1513-1523.
- BISWAS, R., VOGGU, L., SIMON, U. K., HENTSCHEL, P., THUMM, G. & GÖTZ, F. 2006. Activity of the major *staphylococcal* autolysin Atl. *FEMS Microbiol Lett*, 259, 260-8.
- BOLES, B. R. & HORSWILL, A. R. 2008. *Agr*-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*, 4, e1000052.

- BOWDEN, M. G., VISAI, L., LONGSHAW, C. M., HOLLAND, K. T., SPEZIALE, P. & HOOK, M. 2002. Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? *J Biol Chem*, 277, 43017-23.
- CABANES, D., DEHOUX, P., DUSSURGET, O., FRANGEUL, L. & COSSART, P. 2002. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol*, 10, 238-45.
- CHAIEB, K., MAHDOUANI, K. & BAKHROUF, A. 2005. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *J Hosp Infect*, 61, 225-30.
- CHAVAKIS, T., HUSSAIN, M., KANSE, S. M., PETERS, G., BRETZEL, R. G., FLOCK, J. I., HERRMANN, M. & PREISSNER, K. T. 2002. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med*, 8, 687-93.
- CHAVAKIS, T., WIECHMANN, K., PREISSNER, K. T. & HERRMANN, M. 2005. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost*, 94, 278-85.
- CHRISTNER, M., FRANKE, G. C., SCHOMMER, N. N., WENDT, U., WEGERT, K., PEHLE, P., KROLL, G., SCHULZE, C., BUCK, F., MACK, D., AEPFELBACHER, M. & ROHDE, H. 2010. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol Microbiol*, 75, 187-207.
- CONLON, K. M., HUMPHREYS, H. & O'GARA, J. P. 2002. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* *J.Bacteriol.*, 184, 4400-4408.
- CONRADY, D. G., BRESCIA, C. C., HORII, K., WEISS, A. A., HASSETT, D. J. & HERR, A. B. 2008. A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in *staphylococcal* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 19456-61.
- CORRIGAN, R. M., RIGBY, D., HANDLEY, P. & FOSTER, T. J. 2007. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology*, 153, 2435-46.

- COTTER, J. J., O'GARA, J. P., MACK, D. & CASEY, E. 2009. Oxygen-mediated regulation of biofilm development is controlled by the alternative sigma factor *sigma(B)* in *Staphylococcus epidermidis*. *Appl Environ Microbiol*, 75, 261-4.
- CRAMTON, S. E., GERKE, C., SCHNELL, N. F., NICHOLS, W. W. & GÖTZ, F. 1999. The Intercellular Adhesion (*ica*) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and is Required for Biofilm Formation. *Infect.Immun.*, 67, 5427-5433.
- CUCARELLA, C., SOLANO, C., VALLE, J., AMORENA, B., LASA, I. & PENADES, J. R. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*, 183, 2888-96.
- CUCARELLA, C., TORMO, M. A., KNECHT, E., AMORENA, B., LASA, I., FOSTER, T. J. & PENADES, J. R. 2002. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect Immun*, 70, 3180-6.
- CUCARELLA, C., TORMO, M. A., UBEDA, C., TROTONDA, M. P., MONZON, M., PERIS, C., AMORENA, B., LASA, I. & PENADES, J. R. 2004. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 72, 2177-85.
- DAROUICHE, R. O. 2004. Treatment of infections associated with surgical implants. *N.Engl.J.Med.*, 350, 1422-1429.
- DAVENPORT, D. S., MASSANARI, R. M., PFALLER, M. A., BALE, M. J., STREED, S. A. & HIERHOLZER, W. J., JR. 1986. Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative *staphylococci*. *J.Infect.Dis.*, 153, 332-339.
- DE SILVA, G. D., KANTZANOU, M., JUSTICE, A., MASSEY, R. C., WILKINSON, A. R., DAY, N. P. & PEACOCK, S. J. 2002. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative *Staphylococci* associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J.Clin.Microbiol.*, 40, 382-388.
- DIAZ-MITOMA, F., HARDING, G. K., HOBAN, D. J., ROBERTS, R. S. & LOW, D. E. 1987. Clinical significance of a test for slime production in ventriculoperitoneal shunt infections caused by coagulase-negative *staphylococci*. *J.Infect.Dis.*, 156, 555-560.
- DOUGLAS, L. J. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.*, 11, 30-36.

- DRENKARD, E. & AUSUBEL, F. M. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 416, 740-743.
- FIDALGO, S., VAZQUEZ, F., MENDOZA, M. C., PEREZ, F. & MENDEZ, F. J. 1990. Bacteremia due to *Staphylococcus epidermidis*: microbiologic, epidemiologic, clinical, and prognostic features. *Rev.Infect.Dis.*, 12, 520-528.
- FITZPATRICK, F., HUMPHREYS, H. & O'GARA, J. P. 2005a. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J.Clin.Microbiol.*, 43, 1973-1976.
- FITZPATRICK, F., HUMPHREYS, H. & O'GARA, J. P. 2005b. The genetics of *staphylococcal* biofilm formation--will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clin.Microbiol.Infect.*, 11, 967-973.
- FOSTER, T. J. 2005. Immune evasion by *staphylococci*. *Nat.Rev.Microbiol.*, 3, 948-958.
- FREBOURG, N. B., LEFEBVRE, S., BAERT, S. & LEMELAND, J. F. 2000. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J.Clin.Microbiol.*, 38, 877-880.
- FRICK, I. M., MORGELIN, M. & BJORCK, L. 2000. Virulent aggregates of *Streptococcus pyogenes* are generated by homophilic protein-protein interactions. *Mol Microbiol*, 37, 1232-47.
- GALDBART, J. O., ALLIGNET, J., TUNG, H. S., RYDEN, C. & EL SOLH, N. 2000. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J.Infect.Dis.*, 182, 351-355.
- GEIPEL, U. & HERRMANN, M. 2005. [The infected implant: bacteriology]. *Unfallchirurg*, 108, 961-975.
- GELOSIA, A., BALDASSARRI, L., DEIGHTON, M. & VAN NGUYEN, T. 2001. Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. *Clin Microbiol Infect*, 7, 193-9.
- GERKE, C., KRAFT, A., SUSSMUTH, R., SCHWEITZER, O. & GÖTZ, F. 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem*, 273, 18586-93.

- GOLDMANN, D. A. & PIER, G. B. 1993. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin.Microbiol.Rev.*, 6, 176-192.
- GÖTZ, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*, 43, 1367-78.
- GRISTINA, A. G., HOBGOOD, C. D., WEBB, L. X. & MYRVIK, Q. N. 1987. Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. *Biomaterials*, 8, 423-426.
- GU, J., LI, H., LI, M., VUONG, C., OTTO, M., WEN, Y. & GAO, Q. 2005. Bacterial insertion sequence IS 256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis* *J.Hosp.Infect.*, 61, 342-348.
- HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J. W. & STOODLEY, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat.Rev.Microbiol.*, 2, 95-108.
- HANBERGER, H., DIEKEMA, D., FLUIT, A., JONES, R., STRUELENS, M., SPENCER, R. & WOLFF, M. 2001. Surveillance of antibiotic resistance in European ICUs. *J Hosp Infect*, 48, 161-76.
- HANDKE, L. D., SLATER, S. R., CONLON, K. M., O'DONNELL, S. T., OLSON, M. E., BRYANT, K. A., RUPP, M. E., O'GARA, J. P. & FEY, P. D. 2007. *SigmaB* and *SarA* independently regulate polysaccharide intercellular adhesin production in *Staphylococcus epidermidis*. *Can J Microbiol*, 53, 82-91.
- HARRIS, J. M. & MARTIN, L. F. 1987. An in vitro study of the properties influencing *Staphylococcus epidermidis* adhesion to prosthetic vascular graft materials. *Ann.Surg.*, 206, 612-620.
- HEILMANN, C., GERKE, C., PERDREAU-REMGTON, F. & GÖTZ, F. 1996a. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect Immun*, 64, 277-82.
- HEILMANN, C., HUSSAIN, M., PETERS, G. & GÖTZ, F. 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol.Microbiol.*, 24, 1013-1024.
- HEILMANN, C., SCHWEITZER, O., GERKE, C., VANITTANAKOM, N., MACK, D. & GÖTZ, F. 1996b. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* *Mol.Microbiol.*, 20, 1083-1091.
- HEILMANN, C., THUMM, G., CHHATWAL, G. S., HARTLEIB, J., UEKOTTER, A. & PETERS, G. 2003. Identification and characterization of a novel autolysin

- (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis* *Microbiology*, 149, 2769-2778.
- HENNIG, S., NYUNT WAI, S. & ZIEBUHR, W. 2007. Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate. *Int J Med Microbiol*, 297, 117-22.
- HOGT, A. H., DANKERT, J. & FEIJEN, J. 1985. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. *J.Gen.Microbiol.*, 131 (Pt 9), 2485-2491.
- HUSSAIN, M., BECKER, K., VON EIFF, C., PETERS, G. & HERRMANN, M. 2001. Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8, 1271-6.
- HUSSAIN, M., COLLINS, C., HASTINGS, J. G. & WHITE, P. J. 1992. Radiochemical assay to measure the biofilm produced by coagulase-negative staphylococci on solid surfaces and its use to quantitate the effects of various antibacterial compounds on the formation of the biofilm. *J Med Microbiol*, 37, 62-9.
- HUSSAIN, M., HERRMANN, M., VON EIFF, C., PERDREAU-REMINGTON, F. & PETERS, G. 1997. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect.Immun.*, 65, 519-524.
- HUSSAIN, M., WILCOX, M. H. & WHITE, P. J. 1993. The slime of coagulase-negative *staphylococci*: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol.Rev.*, 10, 191-207.
- KAPLAN, J. B., VELLIYAGOUNDER, K., RAGUNATH, C., ROHDE, H., MACK, D., KNOBLOCH, J. K. & RAMASUBBU, N. 2004. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J.Bacteriol.*, 186, 8213-8220.
- KARLOWSKY, J. A., JONES, M. E., DRAGHI, D. C., THORNSBERRY, C., SAHM, D. F. & VOLTURO, G. A. 2004. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Ann.Clin.Microbiol.Antimicrob.*, 3, 7.
- KLUG, D., WALLET, F., KACET, S. & COURCOL, R. J. 2003. Involvement of adherence and adhesion *Staphylococcus epidermidis* genes in pacemaker lead-associated infections. *J.Clin.Microbiol.*, 41, 3348-3350.

- KNOBLOCH, J. K., JAGER, S., HORSTKOTTE, M. A., ROHDE, H. & MACK, D. 2004. RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor *sigmaB* by repression of the negative regulator gene *icaR* *Infect.Immun.*, 72, 3838-3848.
- KNOBLOCH, J. K. M., BARTSCHT, K., SABOTTKE, A., ROHDE, H., FEUCHT, H. & MACK, D. 2001. Biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* depends on *RsbU*, a functional activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress *J.Bacteriol.*, 183, 2624-2633.
- KOKAI-KUN, J. F., CHANTURIYA, T. & MOND, J. J. 2009. Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice. *J Antimicrob Chemother*, 64, 94-100.
- KONG, K. F., VUONG, C. & OTTO, M. 2006. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int.J.Med.Microbiol.*, 296, 133-139.
- KOZITSKAYA, S., OLSON, M. E., FEY, P. D., WITTE, W., OHLSEN, K. & ZIEBUHR, W. 2005. Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *J.Clin.Microbiol.*, 43, 4751-4757.
- KRISTIAN, S. A., BIRKENSTOCK, T. A., SAUDER, U., MACK, D., GOTZ, F. & LANDMANN, R. 2008. Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *J Infect Dis*, 197, 1028-35.
- KROPEC, A., MAIRA-LITRAN, T., JEFFERSON, K. K., GROUT, M., CRAMTON, S. E., GOTZ, F., GOLDMANN, D. A. & PIER, G. B. 2005. Poly-N-acetylglucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. *Infect.Immun.*, 73, 6868-6876.
- LATASA, C., ROUX, A., TOLEDO-ARANA, A., GHIGO, J. M., GAMAZO, C., PENADES, J. R. & LASA, I. 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol.Microbiol.*, 58, 1322-1339.
- LENTINO, J. R. 2003. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin.Infect.Dis.*, 36, 1157-1161.
- LI, H., XU, L., WANG, J., WEN, Y., VUONG, C., OTTO, M. & GAO, Q. 2005. Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive

- by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infect.Immun.*, 73, 3188-3191.
- LI, Y. H., HANNA, M. N., SVENSATER, G., ELLEN, R. P. & CVITKOVITCH, D. G. 2001. Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *J Bacteriol*, 183, 6875-84.
- LUDWICKA, A., JANSEN, B., WADSTROM, T. & PULVERER, G. 1984. Attachment of *staphylococci* to various synthetic polymers. *Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol.Hyg.[A]*, 256, 479-489.
- MACINTOSH, R. L., BRITTAN, J. L., BHATTACHARYA, R., JENKINSON, H. F., DERRICK, J., UPTON, M. & HANDLEY, P. S. 2009. The terminal A domain of the fibrillar accumulation-associated protein (Aap) of *Staphylococcus epidermidis* mediates adhesion to human corneocytes. *J Bacteriol*, 191, 7007-16.
- MACK, D. 1999. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J Hosp Infect*, 43 Suppl, S113-25.
- MACK, D., BARTSCHT, K., FISCHER, C., ROHDE, H., DE GRAHL, C., DOBINSKY, S., HORSTKOTTE, M. A., KIEL, K. & KNOBLOCH, J. K. M. 2001. Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Meth.Enzymol.*, 336, 215-239.
- MACK, D., BECKER, P., CHATTERJEE, I., KNOBLOCH, J. K. M., PETERS, G., ROHDE, H. & HERRMANN, M. 2004. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* : functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *International Journal of Medical Microbiology*, 294, 203-212.
- MACK, D., DAVIES, A. P., HARRIS, L. G., ROHDE, H., HORSTKOTTE, M. A. & KNOBLOCH, J. K. 2007. Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Anal Bioanal Chem*, 387, 399-408.
- MACK, D., FISCHER, W., KROKOTSCH, A., LEOPOLD, K., HARTMANN, R., EGGE, H. & LAUFS, R. 1996a. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J.Bacteriol.*, 178, 175-183.
- MACK, D., HAEDER, M., SIEMSEN, N. & LAUFS, R. 1996b. Association of biofilm production of coagulase-negative *staphylococci* with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J.Infect.Dis.*, 174, 881-884.

- MACK, D., ROHDE, H., HARRIS, L. G., DAVIES, A. P., HORSTKOTTE, M. A. & KNOBLOCH, J. K. 2006. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs*, 29, 343-59.
- MACK, D., SIEMSEN, N. & LAUFS, R. 1992. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis* : evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect.Immun.*, 60, 2048-2057.
- MAIRA-LITRAN, T., KROPEC, A., GOLDMANN, D. & PIER, G. B. 2004. Biologic properties and vaccine potential of the *staphylococcal* poly-N-acetyl glucosamine surface polysaccharide. *Vaccine*, 22, 872-879.
- MAIRA-LITRAN, T., KROPEC, A., GOLDMANN, D. A. & PIER, G. B. 2005. Comparative opsonic and protective activities of *Staphylococcus aureus* conjugate vaccines containing native or deacetylated *Staphylococcal* Poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. *Infect.Immun.*, 73, 6752-6762.
- MAZMANIAN, S. K., LIU, G., TON-THAT, H. & SCHNEEWIND, O. 1999. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, 285, 760-763.
- MCKENNEY, D., POULIOT, K., WANG, Y., MURTHY, V., ULRICH, M., DORING, G., LEE, J. C., GOLDMANN, D. A. & PIER, G. B. 2000. Vaccine potential of poly-1-6 beta-D-N-succinylglucosamine, an immunoprotective surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J.Biotechnol.*, 83, 37-44.
- MONK, A. B. & ARCHER, G. L. 2007. Use of outer surface protein repeat regions for improved genotyping of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol*, 45, 730-5.
- MORETRO, T., HERMANSEN, L., HOLCK, A. L., SIDHU, M. S., RUDI, K. & LANGSRUD, S. 2003. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *staphylococci* from food and food processing environments. *Appl.Environ.Microbiol.*, 69, 5648-5655.
- NAVARRE, W. W. & SCHNEEWIND, O. 1994. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol.Microbiol.*, 14, 115-121.

- NAVARRE, W. W. & SCHNEEWIND, O. 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 63, 174-229.
- NILSDOTTER-AUGUSTINSSON, A., KOSKELA, A., OHMAN, L. & SODERQUIST, B. 2007. Characterization of coagulase-negative *staphylococci* isolated from patients with infected hip prostheses: use of phenotypic and genotypic analyses, including tests for the presence of the *ica* operon. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26, 255-65.
- NILSSON, M., FRYKBERG, L., FLOCK, J. I., PEI, L., LINDBERG, M. & GUSS, B. 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* *Infect.Immun.*, 66, 2666-2673.
- NININ, E., CAROFF, N., ESPAZE, E., MARAILLAC, J., LEPELLETIER, D., MILPIED, N. & RICHET, H. 2006. Assessment of *ica* operon carriage and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing bacteraemia in bone marrow transplant recipients. *Clin Microbiol Infect*, 12, 446-52.
- O'GARA, J. P. 2007. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 270, 179-88.
- O'NEILL, E., POZZI, C., HOUSTON, P., SMYTH, D., HUMPHREYS, H., ROBINSON, D. A. & O'GARA, J. P. 2007. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol*, 45, 1379-88.
- OLIVER, G. W., LEFERSON, J. D., STETLER-STEVENSON, W. G. & KLEINER, D. E. 1997. Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms. *Anal.Biochem.*, 244, 161-166.
- PALMA, M., HAGGAR, A. & FLOCK, J. I. 1999. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol*, 181, 2840-5.
- PEI, L. & FLOCK, J. I. 2001. Lack of fbe, the gene for a fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*, reduces its adherence to fibrinogen coated surfaces. *Microb Pathog*, 31, 185-93.

- PEI, L., PALMA, M., NILSSON, M., GUSS, B. & FLOCK, J. I. 1999. Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis* *Infect.Immun.*, 67, 4525-4530.
- PETERS, G., LOCCI, R. & PULVERER, G. 1982. Adherence and growth of coagulase-negative *staphylococci* on surfaces of intravenous catheters. *J.Infect.Dis.*, 146, 479-482.
- PETRELLI, D., ZAMPALONI, C., D'ERCOLE, S., PRENNA, M., BALLARINI, P., RIPA, S. & VITALI, L. A. 2006. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 25, 773-81.
- QIN, Z., OU, Y., YANG, L., ZHU, Y., TOLKER-NIELSEN, T., MOLIN, S. & QU, D. 2007. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 153, 2083-92.
- RAWLINGS, N. D., MORTON, F. R., KOK, C. Y., KONG, J. & BARRETT, A. J. 2008. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, 36, D320-D325.
- RICE, K. C., MANN, E. E., ENDRES, J. L., WEISS, E. C., CASSAT, J. E., SMELTZER, M. S. & BAYLES, K. W. 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.
- ROCHE, F. M., MEEHAN, M. & FOSTER, T. J. 2003. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology*, 149, 2759-67.
- ROHDE, H., BURANDT, E. C., SIEMSEN, N., FROMMELT, L., BURDELSKI, C., WURSTER, S., SCHERPE, S., DAVIES, A. P., HARRIS, L. G., HORSTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, J. K., RAGUNATH, C., KAPLAN, J. B. & MACK, D. 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, 1711-20.
- ROHDE, H., BURDELSKI, C., BARTSCHT, K., HUSSAIN, M., BUCK, F., HORSTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, J. K., HEILMANN, C., HERRMANN, M. & MACK, D. 2005. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by *staphylococcal* and host proteases. *Mol.Microbiol.*, 55, 1883-1895.

- ROHDE, H., FRANKENBERGER, S., ZÄHRINGER, U. & MACK, D. 2010. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol*, 89, 103-111.
- ROHDE, H., KALITZKY, M., KROGER, N., SCHERPE, S., HORSTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, J. K., ZANDER, A. R. & MACK, D. 2004. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J.Clin.Microbiol.*, 42, 5614-5619.
- ROHDE, H., KNOBLOCH, J. K., HORSTKOTTE, M. A. & MACK, D. 2001a. Correlation of *Staphylococcus aureus* *icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. *J.Clin.Microbiol.*, 39, 4595-4596.
- ROHDE, H., KNOBLOCH, J. K., HORSTKOTTE, M. A. & MACK, D. 2001b. Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)*, 190, 105-112.
- ROHDE, H., MACK, D., CHRISTNER, M., BURDELSKI, C., FRANKE, G., KNOBLOCH, J. K. 2006. Pathogenesis of *staphylococcal* device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Rev. Med. Microbiol*, 45-54.
- RUGGIERO, A., TIZZANO, B., PEDONE, E., PEDONE, C., WILMANN, M. & BERISIO, R. 2009. Crystal structure of the resuscitation-promoting factor (DeltaDUF)RpfB from *M. tuberculosis*. *J Mol Biol*, 385, 153-62.
- RUPP, M. E. & ARCHER, G. L. 1994. Coagulase-negative *staphylococci*: pathogens associated with medical progress. *Clin.Infect.Dis.*, 19, 231-243.
- RUPP, M. E., FEY, P. D., HEILMANN, C. & GÎTZ, F. 2001. Characterization of the Importance of *Staphylococcus epidermidis* Autolysin and Polysaccharide Intercellular Adhesin in the Pathogenesis of Intravascular Catheter-Associated Infection in a Rat Model. *J.Infect.Dis.*, 183, 1038-1042.
- RUPP, M. E., ULPHANI, J. S., FEY, P. D., BARTSCH, K. & MACK, D. 1999. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of

- biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect.Immun.*, 67, 2627-2632.
- SADOVSKAYA, I., VINOGRADOV, E., FLAHAUT, S., KOGAN, G. & JABBOURI, S. 2005. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect.Immun.*, 73, 3007-3017.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbour, N.Y., Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- SCHINDLER, C. A. 1966. *Staphylococcal* strains with relation to lysostaphin sensitivity. *Nature*, 209, 1368-9.
- STEINBERGER, R. E. & HOLDEN, P. A. 2005. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 71, 5404-10.
- STEINBRINK, K. & FROMMELT, L. 1995. [Treatment of periprosthetic infection of the hip using one-stage exchange surgery]. *Orthopade*, 24, 335-343.
- SUN, D., ACCAVITTI, M. A. & BRYERS, J. D. 2005. Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, 12, 93-100.
- TOLEDO-ARANA, A., MERINO, N., VERGARA-IRIGARAY, M., DEBARBOUILLE, M., PENADES, J. R. & LASA, I. 2005. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica* -independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *J.Bacteriol.*, 187, 5318-5329.
- TORMO, M. A., MARTI, M., VALLE, J., MANNA, A. C., CHEUNG, A. L., LASA, I. & PENADES, J. R. 2005. *SarA* is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J.Bacteriol.*, 187, 2348-2356.
- VANDECASTEELE, S. J., PEETERMANS, W. E., MERCKX, R., RIJNDERS, B. J. & VAN ELDERE, J. 2003a. Reliability of the *ica*, *aap* and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. *Clin.Microbiol.Infect.*, 9, 114-119.
- VANDECASTEELE, S. J., PEETERMANS, W. E., MERCKX, R. & VAN ELDERE, J. 2003b. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. *J.Infect.Dis.*, 188, 730-737.

- VANDECASTEELE, S. J., VAN WIJNGAERDEN, E., VAN ELDERE, J. & PEETERMANS, W. E. 2000. New insights in the pathogenesis of foreign body infections with coagulase negative *staphylococci*. *Acta Clin Belg*, 55, 148-53.
- VEENSTRA, G. J., CREMERS, F. F., VAN DIJK, H. & FLEER, A. 1996. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol*, 178, 537-41.
- VINCENT, J. L., BIHARI, D. J., SUTER, P. M., BRUINING, H. A., WHITE, J., NICOLAS-CHANOIN, M. H., WOLFF, M., SPENCER, R. C. & HEMMER, M. 1995. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee [see comments]. *JAMA*, 274, 639-644.
- VUONG, C., KIDDER, J. B., JACOBSON, E. R., OTTO, M., PROCTOR, R. A. & SOMERVILLE, G. A. 2005. *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin production significantly increases during tricarboxylic acid cycle stress. *J.Bacteriol.*, 187, 2967-2973.
- VUONG, C., KOCIANOVA, S., VOYICH, J. M., YAO, Y., FISCHER, E. R., DELEO, F. R. & OTTO, M. 2004a. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J.Biol.Chem.*, 279, 54881-54886.
- VUONG, C., VOYICH, J. M., FISCHER, E. R., BRAUGHTON, K. R., WHITNEY, A. R., DELEO, F. R. & OTTO, M. 2004b. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.*, 6, 269-275.
- WANG, X., PRESTON, J. F., III & ROMEO, T. 2004. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J.Bacteriol.*, 186, 2724-2734.
- WILLIAMS, R. J., HENDERSON, B., SHARP, L. J. & NAIR, S. P. 2002. Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect.Immun.*, 70, 6805-6810.
- WISPLINGHOFF, H., CORNELLY, O. A., MOSER, S., BETHE, U., STUTZER, H., SALZBERGER, B., FATKENHEUER, G. & SEIFERT, H. 2003a. Outcomes of nosocomial bloodstream infections in adult neutropenic patients: a prospective

- cohort and matched case-control study. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 24, 905-911.
- WISPLINGHOFF, H., SEIFERT, H., WENZEL, R. P. & EDMOND, M. B. 2003b. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Clin Infect Dis*, 36, 1103-10.
- WU, J. A., KUSUMA, C., MOND, J. J. & KOKAI-KUN, J. F. 2003. Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 3407-14.
- XU, L., LI, H., VUONG, C., VADYVALOO, V., WANG, J., YAO, Y., OTTO, M. & GAO, Q. 2006. Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis* *Infect. Immun.*, 74, 488-496.
- YAO, Y., STURDEVANT, D. E., VILLARUZ, A., XU, L., GAO, Q. & OTTO, M. 2005. Factors characterizing *Staphylococcus epidermidis* invasiveness determined by comparative genomics. *Infect. Immun.*, 73, 1856-1860.
- ZHANG, T. & FANG, H. H. 2001. Phylogenetic diversity of a SRB-rich marine biofilm. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57, 437-40.
- ZHANG, Y. Q., REN, S. X., LI, H. L., WANG, Y. X., FU, G., YANG, J., QIN, Z. Q., MIAO, Y. G., WANG, W. Y., CHEN, R. S., SHEN, Y., CHEN, Z., YUAN, Z. H., ZHAO, G. P., QU, D., DANCHIN, A. & WEN, Y. M. 2003. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol. Microbiol.*, 49, 1577-1593.
- ZIEBUHR, W., HEILMANN, C., GÖTZ, F., MEYER, P., WILMS, K., STRAUBE, E. & HACKER, J. 1997. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.*, 65, 890-896.
- ZIEBUHR, W., KRIMMER, V., RACHID, S., LÎNER, I., GÖTZ, F. & HACKER, J. 1999. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis* : evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS 256 *Mol. Microbiol.*, 32, 345-356.

9 Danksagung

Mein Dank gilt dem Institutsleiter Prof. Dr. med Martin Aepfelbacher, welcher mit nach Kräften unterstützte und motivierte, sowie Räumlichkeiten, Gerätschaften und Materialien zur Verfügung stellte. Auch möchte ich mich an dieser Stelle für die bereitwillige Unterstützung durch den ehemaligen Institutsleiter Prof. Dr. med. Rainer Laufs bedanken.

Zu besonderen Dank bin ich meinem anfänglichen Betreuer und aktuellen Doktorvater PD Dr. med. Holger Rohde für seine Unterstützung in allen Belangen, seine Inspiration und insbesondere für sein Vertrauen verpflichtet, welches er in mich gelegt hat. Durch ihn habe ich die entscheidenden Impulse zur Durchführung dieser Dissertation erhalten. Gleiches gilt für Prof. Dr. med Dietrich Mack welcher bis zu seinem Universitätswechsel mein Doktorvater war. Ich bedanke mich ausdrücklich für die großzügige zweijährige Förderung durch die Werner-Otto-Stiftung, durch die mir letztendlich die Umsetzung dieser Dissertation erst ermöglicht wurde. Ein besonderer Dank gilt Dr. F. Buck aus dem Institut für klinische Chemie, für die schnelle, unkomplizierte und stets verlässliche Durchführung von massenspektrometrischen Untersuchungen und Edmann-Sequenzierungen.

Nicht zuletzt möchte ich auch der gesamten Institutsbelegschaft sowie meinen Dissertations-Kollegen für ihre Unterstützung danken.

10 Lebenslauf

Name: Christoph Matthias Burdelski

Geburtsdatum: 16.01.1980

Geburtsort: Hannover

Staatsangehörigkeit: Deutsch, schweizerisch

Familienstand: verheiratet mit Miriam Burdelski, geborene Böttner

Schulischer Werdegang:

Grundschule: 1986-1990 Friesenschule Hannover

Orientierungsstufe: 1990-1992 OS Luerstrasse Hannover

Gymnasium: 1992-1999 Wilhelm-Gymnasium Hamburg

Wehrdienst: 1999-2000 Teilstreitkraft Marine, Sanitätsdienst

Studium: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg im Wintersemester 2000
Physikum im Wintersemester 2002 (Universität Hamburg)

Beginn der Dissertation im Wintersemester 2003 am Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene (Arbeitsgruppe Biofilm)

Stipendium der Werner-Otto-Stiftung zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses vom 01. Oktober 2004 bis 30. September 2006

Staatsexamen der Humanmedizin nach neuer Approbationsordnung im Dezember 2007 an der Universität Hamburg

Erteilung der Approbation als Arzt am 28. Februar 2008

Berufliche Laufbahn: seit 01.04.2008 bis heute Assistenzarzt der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

10.1 Publikationsverzeichnis

- ROHDE, H., **BURDELSKI, C.**, BARTSCHT, K., HUSSAIN, M., BUCK, F., HORSTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, J. K., HEILMANN, C., HERRMANN, M. & MACK, D. 2005. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol*, 55, 1883-95.
- ROHDE, H., BURANDT, E. C., SIEMSEN, N., FROMMELT, L., **BURDELSKI, C.**, WURSTER, S., SCHERPE, S., DAVIES, A. P., HARRIS, L. G., HORSTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, J. K., RAGUNATH, C., KAPLAN, J. B. & MACK, D. 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, 1711-20.
- KOENIG, A. M., QUAAS, A., RIES, T., YEKEBAS, E. F., GAWAD, K. A., VASHIST, Y. K., **BURDELSKI, C.**, MANN, O., IZBICKI, J. R. & ERBERSDOBLER, A. 2009. Perivascular epitheloid cell tumour (PEComa) of the retroperitoneum - a rare tumor with uncertain malignant behaviour: a case report. *J Med Case Reports*, 3, 62.
- BOCKHORN, M., CATALDEGIRMEN, G., KUTUP, A., MARX, A., **BURDELSKI, C.**, VASHIST, J. K., MANN, O., LIEBL, L., KONIG, A., IZBICKI, J. R. & YEKEBAS, E. F. 2009. Crossing the Rubicon: when pancreatic resection with curative intent ends in an R2 status. Impact of "desmoplastic pseudo-pancreatitis" and anatomical site of irresectability. *Ann Surg Oncol*, 16, 1212-21.

11 Eidesstattliche Erklärung

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

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

Unterschrift: