

**„Charakterisierung der Interaktion des  
Accumulation associated Proteins (Aap)  
mit dem Autolysin E im Yeast Two Hybrid System“**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Michael Busch  
aus Hamburg

Hamburg im Januar 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. W. Streit  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Priv.-Doz. Dr. H. Rohde  
Tag der Disputation: 31. August 2012

Hamburg, den 07. August 2012



Professor Dr. J. Fromm  
Vorsitzender des Promotionsausschusses  
Biologie

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2009 bis Juni 2012 unter Anleitung von Prof. Dr. Wolfgang Streit und PD Dr. Holger Rohde im Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg, vorgelegt von Diplom-Biologe Michael Busch aus Hamburg.

Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Streit

PD Dr. Holger Rohde

Disputationsgutachter: PD Dr. Eva Spieck

PD Dr. Moritz Hentschke

---

Gewidmet meinen Eltern. Danke für alles.

---

1. Abkürzungsverzeichnis.....	9
2. Zusammenfassung.....	12
3. Einleitung.....	13
3.1 Das Genus <i>Staphylococcus</i> .....	13
3.2 Die Phasen der allgemeinen Biofilmbildung.....	15
3.3 Biofilmbildung bei <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	18
3.4 Das Autolysin AtlE.....	20
3.5 SarA und SepA.....	22
3.6 Untersuchung von Interaktionen im Yeast-Two-Hybrid-System.....	23
3.7 Die Funktion des Yeast-Two-Hybrid-System.....	23
3.8 Ziele dieser Arbeit.....	25
4. Material.....	26
4.1 Verwendete Stämme.....	27
4.1.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 5179.....	27
4.1.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 5179-R1.....	27
4.1.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1585.....	27
4.1.4 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1585-RA.....	27
4.1.5 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457.....	27
4.1.6 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457-M10.....	27
4.1.7 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457-M10ΔSarA.....	28
4.1.8 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457-M10ΔSepA.....	28
4.1.9 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457-M10ΔSarAΔSepA.....	28
4.1.10 <i>Micrococcus luteus</i> .....	28
4.1.11 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MaV203.....	28
4.1.12 <i>Escherichia coli</i> DB3.1.....	29
4.1.13 <i>Escherichia coli</i> Top10.....	29
4.1.14 <i>Escherichia coli</i> BL21AITM.....	29
4.2 Nährmedien fest und flüssig.....	29
4.2.1 Blutagar.....	29
4.2.2 TSB.....	29
4.2.3 LB-Medium (nach Miller, zur Proteinexpression).....	30
4.2.4 Selektivagar für Bakterien.....	30
4.2.5 Selektivagar für Hefen (SC-Medium).....	30
4.2.6 YPAD-Medium.....	30
4.2.7 Sabouraudagar.....	31
4.3 Puffer, Lösungen und sonstige Chemikalien (in alphabetischer Reihenfolge).....	31
4.3.1 Aminosäurepulver.....	31
4.3.2 APS-Lösung.....	31
4.3.3 Bindepuffer.....	31
4.3.4 Blockinglösung (Westernblot).....	31
4.3.5 Calciumpuffer.....	31
4.3.6 Coomassie-Entfärbelösung.....	31
4.3.7 Coomassie-Färbelösung.....	32
4.3.8 EDTA-, bzw. EGTA-Lösung.....	32
4.3.9 Elektrophoresegel (Agarose).....	32
4.3.10 Elektrophoresepuffer (TBE 0,5 x).....	32
4.3.11 Elektrophoresepufferkonzentrat (TBE 5 x).....	32
4.3.12 Elutionspuffer.....	32

---

4.3.13	Glucoselösung.....	32
4.3.14	Glycerinpuffer.....	33
4.3.15	Histidinlösung.....	33
4.3.16	Leucinlösung.....	33
4.3.17	Lithiumacetatpufferkonzentrat (10 x).....	33
4.3.18	Lithiumacetat/PEG-Puffer.....	33
4.3.19	Lithiumacetat/Tris-EDTA-Puffer.....	33
4.3.20	Micrococcus-Suspension.....	33
4.3.21	PBS (1 x).....	33
4.3.22	PBS (20 x).....	33
4.3.23	PBST.....	34
4.3.24	Renaturierungspuffer.....	34
4.3.25	Resuspensionspuffer.....	34
4.3.26	SDS-Lösung.....	34
4.3.27	SDS-PAGE Laufpuffer.....	34
4.3.28	SDS-PAGE Sammelgel.....	34
4.3.29	SDS-PAGE Sammelgelpuffer.....	34
4.3.30	SDS-PAGE Trenngel.....	35
4.3.31	SDS-PAGE Trenngelpuffer.....	35
4.3.32	Transferpuffer.....	35
4.3.33	Transferpufferkonzentrat (20 x).....	35
4.3.34	Tris-EDTA-Puffer (1 x).....	35
4.3.35	Tris-EDTA-Pufferkonzentrat (10 x).....	35
4.3.36	Tryptophanlösung.....	36
4.3.37	Uracillösung.....	36
4.3.38	Westernblot Blockinglösung.....	36
4.3.39	X-gal-Nachweisreagenz.....	36
4.3.40	Z-Puffer.....	36
4.3.41	Zymographie Färbelösung.....	36
4.3.42	Zymographie Sammelgel.....	36
4.3.43	Zymographie Sammelgelpuffer.....	37
4.3.44	Zymographie Trenngel.....	37
4.3.45	Zymographie Trenngelpuffer.....	37
4.4	Primer.....	37
4.5	Vektoren.....	38
5.	Methoden.....	40
5.1	Kulturbedingungen .....	40
5.1.1	Anzucht von Bakterien.....	40
5.1.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen für Bakterien.....	40
5.1.1.2	Verdünnungsreihen.....	40
5.1.1.3	Micrococcus-Suspension.....	40
5.1.1.4	Herstellung chemisch kompetenter Escherichia coli.....	41
5.1.1.5	Biofilm Assay.....	41
5.1.1.6	Biofilminhibitions Assay.....	41
5.1.1.7	Herstellung von Kulturüberständen zur Prozessierung rekombinanter Proteine.....	41
5.1.2	Anzucht von Hefen.....	42
5.1.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen für Hefen.....	42

---

5.1.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Hefen.....	42
5.2 Nukleinsäure basierte Methoden.....	42
5.2.1 Präparation genomischer DNA.....	42
5.2.2 Präparation extrachromosomaler DNA (Plasmidpräparationen).....	42
5.2.3 PCR.....	43
5.2.4 Elektrophorese und Dokumentation von Nukleinsäuren.....	43
5.2.5 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	44
5.2.6 Klonierung im Gateway® Vektorsystem.....	44
5.2.7 Transformation chemisch kompetenter Escherichia coli.....	45
5.2.8 Transformation chemisch kompetenter Hefen.....	45
5.2.9 Nukleinsäuresequenzierung.....	45
5.3 Proteinbasierte Methoden.....	46
5.3.1 Proteinpräparation und Dokumentation durch SDS-PAGE.....	46
5.3.2 Westernblot.....	46
5.3.2.1 Transfer der Proteine.....	46
5.3.2.2 Detektion mit Anti-Histidin Antikörpern.....	47
5.3.3 Zymographie.....	47
5.3.4 Oberflächenproteinpräparation.....	48
5.3.5 Proteinexpression.....	48
5.3.6 Proteinaufreinigung.....	49
5.3.7 Prozessierung von rekombinanten Proteinen durch Zellüberstände.....	49
5.3.8 Prozessierung von rekombinanten Proteinen durch kommerzielle Protease SepA.....	49
5.4 Untersuchung von Proteininteraktionen im Yeast-Two-Hybrid-System.....	50
5.4.1 Kontrollvektoren.....	50
5.4.2 Auxotrophieuntersuchung.....	50
5.4.3 Blue-White-Screening.....	50
6. Ergebnisse.....	51
6.1 Untersuchung der Interaktionen der Domäne B des Accumulation associated proteins (Aap) mit den Autolysin E im Yeast-Two-Hybrid-System.....	51
6.2 Die Rolle von AtlE bei der Staphylococcus epidermidis Biofilmbildung.....	52
6.2.1 DNA-Freisetzung.....	52
6.2.2 Einfluss von Chelatbildnern.....	54
6.3 Prozessierung von AtlE.....	58
6.3.1 Prozessierung der repetitiven Sequenzen.....	58
6.3.2 Prozessierung des Propeptids.....	64
7. Diskussion.....	66
7.1 Untersuchung der Interaktionen der Domäne B des Accumulation associated proteins (Aap) mit den Autolysin E im Yeast-Two-Hybrid-System.....	66
7.1.1 Betrachtung der Kontrollen.....	66
7.1.2 Betrachtung der Untersuchungsergebnisse.....	66
7.1.3 Ausblick.....	68
7.2 Die Rolle von AtlE bei der Staphylococcus epidermidis Biofilmbildung.....	69
7.2.1 DNA-Freisetzung.....	69
7.2.1 Die Prozessierung von AtlE.....	70
7.3.2 Modell der Prozessierung.....	73
8. Danksagung.....	74
9. Literaturverzeichnis.....	75



## 1. Abkürzungsverzeichnis

A	<u>A</u> denin
Aap	<u>A</u> ccumulation associated protein (engl. für Akkumulationsassoziiertes Protein)
AEBSF	4-(2- <u>A</u> minoethyl)- <u>b</u> enzensulfonylfluorid
AM	<u>A</u> midase (Bezeichnung einer Domäne des Autolysins AtlE)
APS	<u>A</u> mmoniumpersulfat
AtlE	Autolysin E von <i>S. epidermidis</i>
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
C	<u>C</u> ytosin
°C	Grad Celsius
DMF	<u>D</u> imethylformamid
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<u>D</u> esoxyribonucleic acid (engl. für Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
ECL	<u>E</u> nhanced <u>c</u> hemiluminescence (engl. für verbesserte Chemilumineszenz)
eDNA	extrazelluläre DNA
EDTA	<u>E</u> thylendiamin- <u>t</u> etraessigsäure
EGTA	<u>E</u> thylenglycol-bis(2-aminoethyl)- <u>t</u> etraessigsäure
g	Einheitssymbol der Fallbeschleunigung
g	Gramm
G	<u>G</u> uanin
GL	<u>G</u> lucosaminidase (Bezeichnung einer Domäne des Autolysins AtlE)
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser ( <i>bidest.</i> aus der Milliporeanlage)
His	Histidin
<i>icaADBC</i>	<i>intercellular adhesion AD</i> BC (Operon zur PIA-Synthese)
IPTG	<u>I</u> sopropyl- $\beta$ -D- <u>t</u> hiogalactopyranosid
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid

---

kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KNS	<u>k</u> oagulasen <u>e</u> negative <u>S</u> taphylokokken
L	Liter
LB	<u>L</u> ysogeny <u>B</u> roth (engl. für Lysogene Brühe. Vollmedium zur <i>E. coli</i> Anzucht)
LDS	<u>L</u> ithium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat
Leu	Leucin
m	Präfix „milli“ = 10 <sup>-3</sup>
μ	Präfix „mikro“ = 10 <sup>-6</sup>
M	mol pro Liter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
n	Präfix „nano“ = 10 <sup>-9</sup>
nM	Nanomol pro Liter
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaC <sub>i</sub>	<u>N</u> arium <u>c</u> itrat
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaIO <sub>4</sub>	Natriummetaperiodat
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	<u>N</u> - <u>H</u> ydroxysuccinimid
nm	Nanometer
OD	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte
p	Präfix „pico“ = 10 <sup>-12</sup>
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>G</u> ele <u>e</u> ktrophorese
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (engl. für Phosphatgepufferte Salzlösung)

---

PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (engl. für Polymerase Kettenreaktion)
PEG	<u>P</u> oly <u>e</u> thylenglycol
pH	Pondus hydrogenii
PIA	<u>P</u> olysaccharide <u>i</u> ntercellular <u>a</u> dhesin (engl. für Polysaccharides iterzelluläres Adhäsion)
pM	Picomol pro Liter
PVDF	<u>P</u> oly <u>v</u> inyl- <u>d</u> ifluorid
s	Sekunde
SC	" <u>S</u> ynthetic <u>C</u> ompound" (engl. für synthetische Zusammensetzung. definiertes Medium zur Anzucht von Hefezellen)
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate (engl. für Natriumdodecylsulfat)
T	<u>T</u> hymine
TEMED	<u>T</u> etra <u>m</u> ethylethylendi <u>a</u> min
TI	<u>T</u> rypsin <u>i</u> nhibitor
Trp	Tryptophan
TSB	<u>T</u> rypticase <u>s</u> oy <u>b</u> roth (engl. für Trypsinverdaute Sojabohne)
UpM	Umdrehungen pro Minute
Ura	Uracil
v	volume (engl. für Volumen)
V	Volt
w	weight (engl. für Gewicht)
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
YPAD	<u>Y</u> eastextract, <u>P</u> eptone, <u>A</u> denin and <u>D</u> extrose (engl. für Hefeextrakt, Pepton Adenin und Glucose. Vollmedium zur Hefeanzucht)

## 2. Zusammenfassung

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist ein wesentlicher Faktor für die Pathogenität von Staphylokokken. Insbesondere die Besiedlung von Fremdkörpern wie Kathetern, künstlichen Gelenken, Herzschrittmachern und anderen medizinischen Materialien machen Staphylokokken zu einem ernstem Problem im klinischen Alltag.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Prozessierung von Autolysin E, dem wichtigsten Autolysin von *Staphylococcus epidermidis*, das neben seiner Bedeutung für die Zellwandsynthese auch eine entscheidende Rolle in der primären Adhärenz an Plastikoberflächen und damit der Besiedlung von medizinischen Materialien spielt.

Diese Arbeit zeigt, dass die Freisetzung von DNA offenbar ausschlaggebend für die proteinbasierte Biofilmbildung ist. Außerdem wird gezeigt, dass der Phänotyp der verwendeten Referenzstämme durch spezielle Inhibitoren beeinflusst werden kann. So führt die Addition von Trypsininhibitor zu einem biofilmnegativen, die Addition von EDTA zu einem biofilmpositiven Phänotyp.

Im letzten Teil wird gezeigt, dass die in der Literatur beschriebene, im Detail jedoch unbekannte Prozessierung des Autolysin E zumindest zum Teil durch die Protease SepA vollzogen wird.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Das Genus *Staphylococcus*

Bei Staphylokokken handelt es sich um rund-ovale Kokken, die phylogenetisch den grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt zuzuordnen sind (Kloos *et al.*, 1997).

Ursprünglich wurden die Staphylokokken zusammen mit den Gattungen *Micrococcus*, *Planococcus* und *Stomatococcus* der Familie der Micrococcaceae zugeordnet, neuere phylogenetische Untersuchungen haben jedoch dazu geführt, die Staphylokokken einer eigenen Familie zuzuordnen, der Familie Staphylococcaceae.

Der Gattungsname *Staphylococcus* leitet sich vom griechischen „staphyle“ (die Weintraube) ab, da sich die runden, im Durchmesser etwa 1 µm großen Bakterien bei ihrer Zellteilung besonders im flüssigen Medium in alle Richtungen ausbreiten und dadurch ihre Kolonien unter dem Mikroskop als Haufen oder Trauben beschrieben werden (Otto, 2004).

Die Gattung *Staphylococcus* bildet auf festen Nährmedien porzellanweiße oder gelbliche Kolonien. Sie sind fakultativ anaerob und zeichnen sich biochemisch durch den Besitz des Enzyms Katalase aus, im Routinelabor lassen sie sich dadurch von den katalasenegativen Streptokokken abgrenzen. Eine weitere Besonderheit ist die glycinhaltige Pentapeptidbrücke, die in der Peptidoglykanschicht die Quervernetzung der Mureinstränge bildet (Navarre & Schneewind, 1999). Dies macht Staphylokokken empfindlich für das Enzym Lysostaphin, das speziell Glycin-Glycin-Bindungen angreift (Schindler & Schuhardt, 1964).

Derzeit sind 50 Staphylokokken Taxa bekannt (Kloos *et al.*, 1997) (Kloos *et al.*, 1998) (Lambert *et al.*, 1998) (Place *et al.*, 2003) (Probst *et al.*, 1998) (Spergser *et al.*, 2003) (Takahashi *et al.*, 1999) (Trulzsch *et al.*, 2002) (Vernozy-Rozand *et al.*, 2000). Man unterscheidet diese Taxa der Staphylokokken anhand des Nachweises einer prothrombinaktivierenden Koagulase in koagulasepositive und koagulasenegative Staphylokokken (KNS) (Sperber & Tatini, 1975). Die einzige humanpathogene koagulasepositive Spezies, und vermutlich eine der bestuntersuchten Staphylokokkenspezies, ist *Staphylococcus aureus* (Kloos & Bannerman, 1994) (Waldvogel 1989). *S. aureus* lässt sich bei 20 – 40 % der Bevölkerung als Bestandteil der kommensalen Flora zum Beispiel im Bereich der Nasenschleimhaut nachweisen. Dagegen gehören mindestens 19 KNS-Spezies zur regulären Flora aller Menschen. Der wichtigste und bekannteste Vertreter unter den KNS

ist *Staphylococcus epidermidis*, der fast auf der gesamten Epidermis und zum Teil auch auf mukösen Körperoberflächen vertreten ist. Sehr hohe Zelldichten von  $10^3$  bis  $10^6$  koloniebildenden Einheiten werden in der Regel rund um Poren von Talg- und Schweißdrüsen, sowie auf den Schleimhäuten erreicht (Kloos & Bannerman, 1994) (Nobel, 1997). Aus diesem Grund verwundert es nicht, dass *S. epidermidis* die am häufigsten von der Haut des Menschen isolierten Staphylokokken-Spezies ist (Kloos & Bannerman, 1994) (Kloos *et al.*, 1997) (Nobel, 1997).

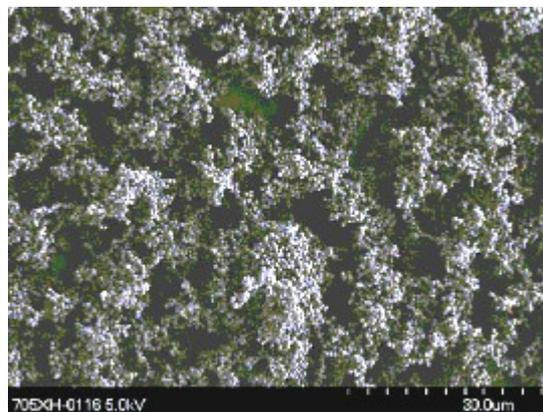
Da koagulasenegative Staphylokokken, speziell *S. epidermidis*, zur Normalflora des Menschen gehören (Kloos & Bannerman, 1994) (Kloos *et al.*, 1997), ging man lange davon aus, dass ihr Nachweis in einem klinischen Untersuchungsmaterial als unbedeutende Kontamination angesehen werden kann. Vor etwa 30 Jahren erkannte man allerdings, dass KNS bei nosokomialen Infektionen, also solchen Infektionen, die im Kontext einer stationären Behandlung im Krankenhaus entstehen, eine bedeutende Rolle spielen (Banerjee *et al.*, 1991) (Schaberg *et al.*, 1991). Daten des National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS) zeigen, dass KNS zu den fünf häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen gehören (U.S. Department of Health and Human Services, 1996). Etwa 40 % der nosokomialen Septikämien werden durch KNS verursacht. In 75 % der Fälle treten diese Infektionen im Zusammenhang mit implantierten Fremdmaterialien auf (Fidalgo *et al.*, 1990). Bei diesen Materialien handelt es sich um Implantate wie künstliche Gelenke, zentrale Venenkatheter, künstliche Herzklappen oder Liquorableitungen, sogenannte Shunts, die zum temporären oder dauerhaften Ersatz von Organfunktionen oder der notwendigen klinischen Versorgung des Patienten dienen (Archer, 2000) (Boyce, 1997) (Emori and Gaynes, 1993) (Kloos *et al.*, 1997) (Kloos & Bannerman, 1994) (Rupp & Archer, 1994).

Christensen *et al.* konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass Mäuse, denen man *S. epidermidis* subkutan injizierte, keine Infektion erlitten. Von Mäusen, denen man Katheter subkutan applizierte, erlitten jedoch ein Drittel der Tiere eine Infektion (Christensen *et al.*, 1983). Diese Studie zeigt beispielhaft die herausragende pathogene Bedeutung und den Zusammenhang von Fremdmaterialimplantation und *S. epidermidis* Infektionen.

Betrachtet man alleine die Anwendung zentraler Venenkatheter, so resultiert einer von 20 Fällen in einer Sepsis, jährlich werden weltweit 400.000 katheterassoziierte Fälle gezählt (Raad *et al.*, 2008).

Allein in Deutschland werden jährlich etwa 2,5 Millionen Fremdkörper implantiert, man rechnet dabei mit ca. 100.000 Infektionen (Mack *et al.*, 2004). Aufgrund der stetig steigenden Menge an verwendeten Materialien ist mit einem weiteren Anstieg der Infektionen zu rechnen, auch wenn die behandelnden Mediziner um die Gefahren, die von den verwendeten Materialien ausgehen, wissen und darum betroffene Patienten unter genauer Beobachtung halten.

Bei den Infektionen sind vor allem Kunststoffoberflächen von der Besiedelung durch KNS gefährdet, aber auch Material wie Edelstahl, dem eine bewuchshemmende Wirkung nachgesagt wird, ist betroffen. Abbildung 3.1.1 zeigt hierzu die Besiedelung von Edelstahl durch biofilmpositive KNS.



**Abbildung 3.1.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Biofilms auf Edelstahl.** Durch *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA-) positiven *S. epidermidis* Stamm 1457 gebildeter Biofilm auf Edelstahl nach 18 h Inkubation (Harrison *et al.*, 2004).

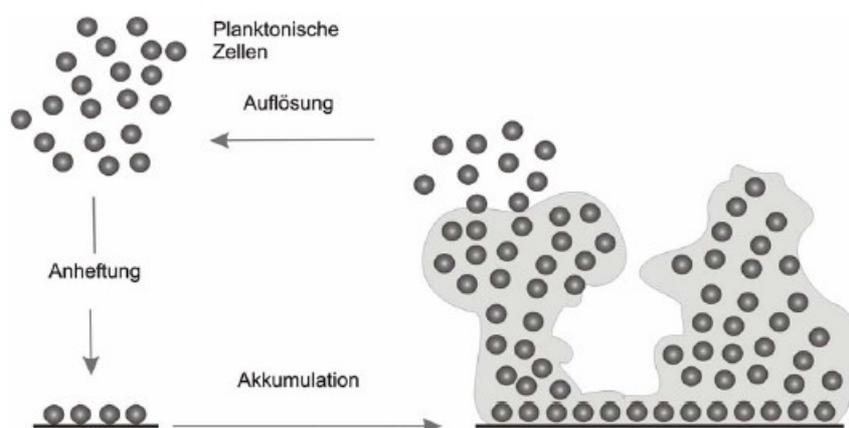
### 3.2 Die Phasen der allgemeinen Biofilmbildung

Von vielen unterschiedlichen Bakterienarten ist die Fähigkeit zur Biofilmbildung bekannt, und die entwickelten Mechanismen sind dabei vielfältig (Costerton *et al.*, 1999) (O'Toole *et al.*, 2000), folgen jedoch dem folgenden Schema:

Allgemein entstehen Biofilme in mehreren Schritten, die formell in zwei Phasen zusammengefasst werden können. In der ersten Phase, der sogenannten primären Adhärenz, kommen planktonische Zellen mit einer geeigneten Oberfläche in Kontakt und haften

reversibel daran. Diese primäre Adhärenz wird sowohl durch spezifische als auch durch unspezifische Faktoren der bakteriellen Zellwand und der zu besiedelnden Oberfläche beeinflusst (Hogt *et al.*, 1986) (Ludwicka *et al.*, 1984). In der Regel erfolgt die primäre Anheftung über hydrophobe Wechselwirkungen, sowie Van-der-Waals Kräfte (Hogt *et al.*, 1985) (Ludwicka *et al.*, 1984).

Es beginnt durch initiales Wachstum die Bildung irreversibel haftender Mikrokolonien in Form eines sogenannten Monolayers, also eines einschichtigen Bakterienfilms. Für *Pseudomonas* wurde bereits bestätigt, dass sich die Mikrokolonien zu Makrokolonien ausweiten. Es wird vermutet, dass sich Staphylokokken analog verhalten (s.a. Abbildung 3.2.1).



**Abbildung 3.2.1: Schematische Darstellung der Phasen der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* (Mack *et al.*, 2005).**

In der zweiten, der akkumulativen Phase der Biofilmbildung, kommt es zum Einsetzen eines Höhenwachstums, wodurch ein mehrschichtiger Biofilm entsteht. Die Mehrzahl der Bakterien hat dabei keinen Kontakt mehr zur besiedelten Oberfläche. Ihr Zusammenhalt wird ausschließlich durch die Funktion interzellulärer adhäsiver Mechanismen gewährleistet. Im Anschluss an das akkumulative Wachstum erfolgt die Seneszenz, das Auflösen des Biofilms, wodurch einzelne Zellen oder Zellverbände wieder in die planktonische Phase übergehen um neue Oberflächen besiedeln zu können (Fitzpatrick *et al.*, 2005).

Die Vorteile für Bakterien, die sich in Biofilmen organisieren, sind vielfältig. So lassen sich Biofilme wohl am besten als eine gegenüber äußeren Einflüssen extrem persistente Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen beschreiben (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Einerseits bieten Biofilme eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen oder hydrodynamischen Belastungen, zum Beispiel bei Besiedelung von Steinen und anderen Oberflächen in schnell fließenden Gewässern. Außerdem stellt die Biofilmmatrix offenbar einen Schutzmechanismus gegen negative Auswirkung von chemischen Substanzen wie Antibiotika oder Photosensitizer (Sharma *et al.*, 2008). Ursprünglich wurde die Biofilmmatrix als Diffusionsbarriere interpretiert, das wurde für Biofilme von z.B. *Pseudomonas aeruginosa* auch bestätigt (Hoyle *et al.*, 1992) allerdings zeigten die Ergebnisse von Dunne *et al.*, dass dies für Staphylokokken nicht generell gelten kann, da bestimmte Antibiotika durch den Biofilm zumindest unter *in vitro* Bedingungen diffundieren können (Dunne *et al.*, 1993). Der Biofilm stellt demnach keine absolute Diffusionsbarriere dar und wirft damit weitere Fragen nach dem Wirkmechanismus der Resistenz gegenüber vieler Antibiotika auf.

Auf den klinischen Alltag bezogen ist die Anwendung von Desinfektionsmittel enorm erschwert. Und nicht nur das, zum Teil wird durch einige Bestandteile von Desinfektions- und Reinigungsmitteln, zum Beispiel Ethanol oder Benzylalkohol, das pathogene Potential von Bakterien erhöht, da durch diese chemischen Substanzen die Biofilmbildung induziert werden kann (Fitzpatrick *et al.*, 2002) (Milisavljevic *et al.*, 2008). Die Zellen im Biofilm sind des Weiteren vor dem Angriff des Immunsystems des Patienten geschützt. Bei einer fremdkörperassoziierten Infektion bedeutet das in der Regel das Versagen sowohl der Immunabwehr als auch der antibiotischen Therapie und macht die Entnahme und einen Austausch des implantierten Materials notwendig, was besonders bei Prothesen oder Herzklappen für den Patienten mit einer zusätzlichen Zunahme der Morbidität und Mortalität verbunden ist (Fitzpatrick *et al.*, 2005).

Die Matrix, die die Bakterien umgibt, kann bis zu 90 % der Biomasse im Biofilm ausmachen und hat neben der bereits erwähnten Stabilität und dem Schutz gegenüber äußeren Einflüssen noch weitere Funktionen: Ihr Wasseranteil liegt bei bis zu 97 %, was den Transport von gelösten Stoffen wie Nährstoffen oder Stoffwechselprodukten ermöglicht (Fitzpatrick *et al.*, 2005) (Sutherland, 2001).

Man findet in der Matrix im Wesentlichen drei Klassen biochemischer Substanzen, die das Rückgrat der Matrix bilden und den Zusammenhalt der Bakterien gewährleisten: Polysaccharide, Proteine und DNA (Vilain *et al.*, 2009).

Während Biofilme in der Umwelt in der Regel polymikrobiell sind, also aus unterschiedlichen

symbiotisch zusammenlebenden Spezies besteht, ging man lange davon aus, dass Biofilme bei fremdkörperassoziierten Infektionen monomikrobiell sind. Die Ergebnisse von Harriott & Noverr zeigen jedoch, dass zumindest bimikrobielle Symbiosen im klinischen Kontext existieren (Harriott & Noverr, 2009).

### 3.3 Biofilmbildung bei *Staphylococcus epidermidis*

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist der entscheidende Pathogenitätsmechanismus bei *S. epidermidis* (Drewry *et al.*, 1990) (Götz, 2002) (Mack, 2006) (Rohde *et al.*, 2006) (Rupp & Archer, 1994). Generell wurden zwei Wege der Biofilmbildung bei Staphylokokken beschrieben: Über Polysaccharide, sowie über Proteinstrukturen.

Die Biofilmbildung über Polysaccharide erfolgt über das polysaccharide intercellular adhesin (PIA). PIA ist ein lineares Homoglykan, welches aus durchschnittlich 130  $\alpha$ -(1,6)-verknüpften N-Acetylglucosaminyleinheiten besteht (Mack *et al.*, 1996).

Die Synthese von PIA und damit die Biofilmbildung wird durch die Produkte des *icaADBC* (*intercellular adhesion ADBC*) Locus vermittelt (Heilmann *et al.*, 1996 b). Dem *icaADBC*-Operon ist das Gen *icaR* vorgelagert, das für einen Repressor codiert. Bakterien, die das *icaADBC*-Operon besitzen und biofilmpositiv sind werden im Folgenden als PIA-positiv bezeichnet. PIA-positive Biofilme zeichnen sich dadurch aus, dass man sie durch Zugabe von Natriummetaperiodat ( $\text{NaIO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ), wie andere Polysaccharide auch, oxidativ spalten kann (Malaprade-Reaktion).

Neben den PIA-positiven Stämmen wurden auch solche Stämme isoliert, die zwar durch PCR-Studien als *icaADBC*-negativ identifiziert wurden und somit nicht in der Lage waren PIA zu bilden. Dennoch zeigten einige diese Stämme einen biofilmpositiven Phänotyp. Daher lag die Annahme nahe, dass das *icaADBC*-Operon kein verlässliches Merkmal zur Unterscheidung von apathogenen kommensalen und pathogenen Stämmen ist und dass es folglich alternative Mechanismen der Adhärenz und der Biofilmbildung geben muss (Rohde *et al.*, 2004a) (Rohde *et al.*, 2005). Da die Biofilme zwar unempfindlich gegenüber der Malaprade-Reaktion, jedoch nicht gegenüber Inkubation mit Proteinase K waren, waren Proteinstrukturen als zweiter, PIA-unabhängiger Adhärenzmechanismus erkannt. Hier sind mittlerweile eine Reihe unterschiedlicher, zum Teil noch nicht näher charakterisierter

Proteine, bekannt, die Adhärenz an zum Teil sehr unterschiedliche Oberflächen oder Strukturen vermitteln (siehe auch Tabelle 3.3.1).

**Tabelle 3.3.1: Orientierende Übersicht über adhärenzvermittelnde Oberflächenproteine von *S. epidermidis* und ihre Bindungsorte**

<b>Protein</b>		<b>Bindungsort(e)</b>
Accumulation associated protein	Aap	interzelluläre Bindung
Autolysin	Aae	Fibrinogen, Fibronectin
Autolysin E	AtLE	Polystyrol, Vitronectin
Biofilm assoziiertes Protein	Bap	Polystyrol
Extracellular Matrix Binding Protein	EMBP	Fibronectin
Fibrinogen-bindendes Protein	Fbe/SdrG	Fibrinogen, Kollagen

Die Vielfalt der Bindungsmöglichkeiten der Adhäsine ließ auch den Versuch, die Biofilmbildung an medizinisches Material durch anti-adhäsive Oberflächen zu unterbinden, scheitern, weil Implantate in kurzer Zeit durch körpereigene extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin und Kollagen umhüllt werden (Fuller und Rosen, 1986) (Gristina, 1987) (Hartford *et al.*, 2001) (Rohde *et al.*, 2004b) (Rohde *et al.*, 2007) (Waldvogel, 1989). Auch an diesen Wirtsproteinstrukturen können Bakterien durch das umfangreiche Arsenal ihrer Oberflächenproteine zum Teil sehr spezifisch adhäreren (Heilmann *et al.*, 1997) (Pourmand *et al.*, 2006) (Timmermann *et al.*, 1991) (Vaudaux *et al.*, 1989) (Waldvogel, 1989) (Wang *et al.*, 1993). Erschwerend kommt hinzu, dass der Genotyp der Bakterien nicht zwangsweise mit ihrem Phänotyp korrelieren muss (Sauer, 2003), so dass durch fehlende induzierende Reize die Oberflächenzusammensetzung *in vitro* sich von der *in vivo*-Situation unterscheidet (Sellman *et al.*, 2008).

Ein derzeit viel beachtetes Thema ist die Rolle von DNA bei der Biofilmbildung. Ging man bisher davon aus, dass die im Biofilm enthaltene DNA aus lysierten Zellen innerhalb der interzellulären Matrix stammt und somit als im Biofilm verbleibender „Abfall“ zu betrachten ist, so gibt es nun Hinweise darauf, dass DNA als sogenannte extrazelluläre DNA (eDNA) eine wichtige Rolle sowohl bei der primären Adhärenz an die zu besiedelnde Oberfläche, als auch als Grundgerüst zur weiteren Biofilmbildung spielt (Qin *et al.*, 2006) (Qin *et al.*, 2007) (Vilain *et al.*, 2009).

Neben der strukturellen Funktion der eDNA bei der Biofilmbildung gibt es außerdem Hinweise darauf, dass eDNA eine Funktion bei der oben bereits beschriebenen erhöhten Antibiotikaresistenz der Bakterien im Biofilm hat (Vilain *et al.*, 2009).

Da für die Rolle der eDNA in der Frühphase der Biofilmbildung eine gezielte Freisetzung der DNA wichtig ist, ist in diesem Zusammenhang eine genauere Beobachtung von Autolysinen zur diskutierten möglichen Einleitung der Biofilmbildung interessant.

### 3.4 Das Autolysin AtlE

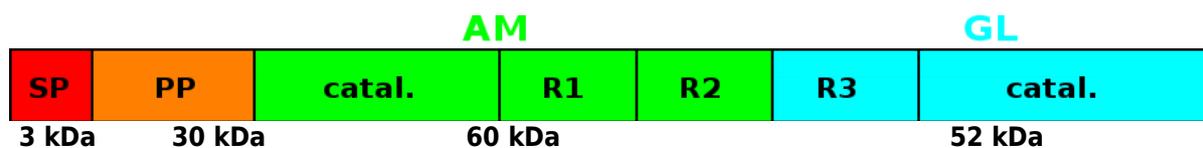
Bakterien benötigen für die Zellteilung und das dafür notwendige Längenwachstum Enzyme, die die Zellwand im Bereich der Wachstumszone des Bakteriums spalten, damit neue Monomere in die Zellwand eingefügt werden können (Baba & Schneewind, 1998). Diese Aufgabe wird durch Autolysine erfüllt. Fehlen sie, neigen die betroffenen Bakterien zum Ausbilden großer Zellklumpen oder zeigen eine verminderte Biofilmbildung (Lützner & Pätzold 2009).

Biofilmbegative Stämme von *S. epidermidis* lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Solche, die die Fähigkeit zur primären Adhärenz nicht besitzen (Gruppe A), und solche, die zwar primäre Adhärenz zeigen, jedoch keine interzelluläre Adhäsion ausbilden und somit keinen "echten" mehrschichtigen Biofilm aufbauen (Gruppe B) (Heilmann *et al.*, 1997).

Bei vergleichenden Untersuchungen von *S. epidermidis* Oberflächenproteinen zeigte sich, dass den untersuchten Bakterien der A-Gruppe fünf Proteine fehlten, die allesamt auf einen offenen Leserahmen zurückzuführen waren, dessen Sequenz eine starke Homologie zur der des Autolysins Atl von *S. aureus* zeigte. Daher wurde der offene Leserahmen für die gefundenen Proteine als *atlE* bezeichnet (Heilmann *et al.*, 1997).

Das Autolysin E wird zur Atl-Familie gezählt, das sind Autolysine des Typs II, die bei vielen Staphylokokkenspezies vorkommen und Homologe auch in anderen grampositiven Bakterien besitzen, die allesamt neben ihrer eigentlichen Funktion als Enzym auch adhäsive Eigenschaften besitzen (Allignet *et al.*, 2001) (Hell *et al.*, 1998) (Hell *et al.*, 2003) (Milohanic *et al.*, 2001) (Milohanic *et al.*, 2004) (Oshida *et al.*, 1995) (Sivadon *et al.*, 2006) (Smith *et al.*, 2000).

AtlE ist ein 1335 Aminosäuren langes Protein, aufgebaut beginnend am N-Terminus aus einer 3 kDa großen Signalsequenz, gefolgt von einem Propeptid von 30 kDa ohne bekannte Funktion, sowie zwei enzymatischen Domänen, einer 60 kDa großen Amidase und einer 52 kDa großen Glucosaminidase (Heilmann *et al.*, 1997) (siehe hierzu auch Abbildung 3.3.1).



**Abb. 3.3.1: Schematische Darstellung des Autolysins AtIE.**

Gezeigt werden die Domänen SP (Signalpeptid), PP (Propeptid), AM (Amidase) und GL (Glucosaminidase). R1-R3 sind repetitive Sequenzen, catal. ist die Abkürzung für katalytische Zentren. (Nach Heilmann *et al.*, 1997)

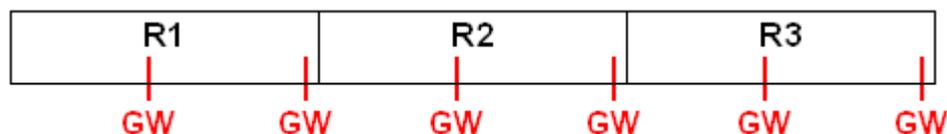
Die Amidase-Domäne setzt sich zusammen aus einem katalytischen Zentrum und zwei repetitiven Sequenzen (R1 und R2) (Milohanic *et al.*, 2001). Ihre enzymatische Funktion ist das Hydrolysieren einer Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe der N-acetylmuraminsäure und des L-Alaninrestes der Pentapeptidbrücke. Dafür wird  $Zn^{2+}$  als Kofaktor benötigt (Lützner & Pätzold 2009). Wegen des Bedarfs an  $Zn^{2+}$  führt die Gabe von Chelatbildnern wie EDTA in mM Konzentrationen folglich zum Blocken der Aktivität der Amidase. Die Zugabe von Zink in geringen Konzentrationen (10 mM) aktiviert hingegen das Enzym, allerdings führen höhere Konzentrationen wiederum zu einer Inaktivierung (Lützner & Pätzold 2009).

Die Glucosaminidase, oder vollständig  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, besitzt an ihrem N-Terminus eine weitere repetitive Sequenz (R3) (Milohanic *et al.*, 2001), gefolgt vom aktiven Zentrum. Die Glucosaminidase trennt die Bindung zwischen dem N-acetylglucosamin und der Acetylmuraminsäure des Mureinstranges.

Die repetitiven Sequenzen sind jeweils 165 Aminosäuren lang und weisen eine sehr geringe Divergenz im Sequenzvergleich verschiedener *S. epidermidis* Stämme auf (Sivadon *et al.*, 2006). Die Funktion der repetitiven Elemente wird diskutiert, ist jedoch bislang nicht abschließend restlos geklärt. Generell besitzt AtIE kein LPXTG-Motiv, das bei grampositiven Bakterien häufig als Zellwandanker vorkommt (Bolken *et al.*, 2001) (Mazmanian *et al.*, 1999) (Roche *et al.*, 2003) (Schneewind *et al.*, 1993). Dabei wird das Protein über das LPXTG-Motiv nach Abspalten des Glycins kovalent und damit irreversibel an die Zellwand gekoppelt (Navarre & Schneewind, 1994). Dieser Vorgang wird durch das Enzym Sortase katalysiert (Navarre & Schneewind, 1994) (Mazmanian *et al.*, 2002).

Das Autolysin E besitzt hingegen innerhalb jedes der repetitiven Elemente zwei sich

wiederholende Bereiche, die jeweils C-terminal sogenannte GW-Module besitzen (siehe auch Abbildung 3.3.2). Der Name leitet sich von den Aminosäuren Glycerin (G) und Tryptophan (W) ab, die konserviert nicht nur in Autolysinen, sondern auch in anderen Oberflächenproteinen mehrere Gattungen grampositiver Bakterien zu finden sind (Báth *et al.*, 2005) (Wren, 1991).



**Abbildung 3.3.2: GW-Module innerhalb der repetitiven Elemente.**

Für das Autolysin Ami aus *Listeria monocytogenes* konnte gezeigt werden, dass diese GW-Module die reversible Bindung des Autolysins an Lipoteichonsäuren vermitteln und damit offenbar eine Alternative zu Zellwandankern auf Sortase- und LPXTG-Motiv-Basis darstellen (Milohanic *et al.*, 2004). Und auch für mehrere Autolysine der Atl-Familie aus Staphylokokken wurde gezeigt, dass die repetitiven Elemente, und hier speziell die C-terminalen Bereiche, in denen die GW-Module lokalisiert sind, für die korrekte Anheftung der Domänen an die Zellwand im Bereich des äquatorialen Wachstumsring notwendig sind (Allignet *et al.*, 2001) (Baba & Schneewind, 1998) (Hell *et al.*, 2003) (Takano *et al.*, 2000).

### 3.5 SarA und SepA

Innerhalb der Arbeitsgruppe Rohde wurde durch Constanze Heinze eine Transposonmutagenese an *Staphylococcus epidermidis* 1585 durchgeführt. Die gewonnenen Mutanten sollten auf veränderte Phänotypen im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung untersucht werden. Es zeigte sich, dass ein Klon zu einem biofilmpositiven Phänotyp wechselte und dabei gesteigerte proteolytische Aktivität zeigte. Bei einer näheren Untersuchung des Insertionsort des Transposon zeigte sich, dass das Gen des als Regulator bekannten *sarA* durch das Transposon unbrauchbar wurde. Zeitgleich konnten Lei *et al.* zeigen, dass die Protease SepA durch SarA reguliert wird und SarA-Mutanten höhere Proteolyse auf Skim Milk Agar zeigen als Wildtypbakterien (Lai *et al.* 2007). Da die

gefundene Mutante nicht nur höhere Proteolyse zeigte, sondern, wie beschrieben, ebenfalls biofilmpositiv wuchs, entstand die Idee, dass der Verlust von SarA möglicherweise die Expression von SepA steigert und dadurch die für die Biofilmbildung notwendigen Oberflächenproteine verstärkt prozessiert werden.

### **3.6 Untersuchung von Interaktionen im Yeast-Two-Hybrid-System**

Das Autolysin AtIE wurde bereits als wichtiger Faktor in der Biofilmbildung bei Staphylokokken beschrieben. Trotzdem ist wenig bekannt über Interaktionspartner des Autolysins E. Geben muss es sie, das legt alleine schon das Wissen um die Prozessierung des AtIE bereits während des Exports aus der Zelle und später an der Zelloberfläche nahe. Im Vorwege zur vorliegenden Dissertation wurden in der Arbeitsgruppe Rohde bereits einige Experimente durchgeführt mit dem Ziel, mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. So stellte Christoph Burdelski bei seinen Experimenten mit dem Accumulation Associated Protein (Aap) fest, dass das Autolysin E an Aap, das an einer Matrix immobilisiert wurde, bindet. Weitere Untersuchungen wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt. Dabei wurde der Ansatz verfolgt, die jeweiligen Domänen des AtIE rekombinant zu exprimieren, um dann Far-Westernblots anzufertigen. Auf diese Weise sollte nicht nur ein etwaiger Interaktionspartner identifiziert werden, sondern auch gleich die entsprechende Bindedomäne innerhalb des AtIE benannt werden. Allein, diese Versuche scheiterten teilweise an den Problemen, die die Expression und Aufreinigung der Amidase bereitete. Für die vorliegende Arbeit sollte nun der Versuch unternommen werden, die Interaktionen ohne rekombinate Expression und Aufreinigung in einem Alternativen System zu untersuchen. Dabei viel die Entscheidung auf das Yeast-Two-Hybrid-System.

### **3.7 Die Funktion des Yeast-Two-Hybrid-System**

Das Yeast-Two-Hybrid-System ist ein sehr interessantes System, um Interaktionen von Proteinen auf sehr elegante Weise auf molekularbiologischem Weg in Hefezellen nachzuweisen. Dabei bedient man sich einer Besonderheit der Promotion zur RNA-Transkription innerhalb der eukaryotischen Zelle. Um die Transkription zu starten bedarf es, wie bei Prokaryoten auch, der Aktivierung durch Proteine. Zunächst muss ein Protein, das als

DNA-Bindedomäne, kurz DBD bezeichnet wird, an die DNA oberhalb der zu transkribierenden DNA binden. Diese Stelle wird als Upstream Activating Sequence bezeichnet. An die DNA-Bindedomäne lagert sich die Aktivator-domäne, AD, an. Dieser Aktivierungskomplex ermöglicht die Anheftung der RNA-Polymerase und ist damit für den Start der Transkription essentiell.

Das Besondere an diesem Aktivierungskomplex ist, dass die Aktivator-domäne nicht unmittelbar an die DNA-Bindedomäne anhaften, wohl aber nahe der Aktivatorsequenz sein muss, damit die RNA-Polymerase sich an die DNA anlagern kann. Es ist daher möglich, an jede Domäne ein Protein zu fusionieren. Das Fusionsprotein aus DNA-Bindedomäne und Protein I wird als "Bait", also Köder bezeichnet, das Fusionsprotein aus Aktivierungsdomäne und Protein II als "Prey", Beute. Kommt es zur Interaktion zwischen Bait und Prey, bildet sich der Aktivierungskomplex und die RNA-Polymerase kann an die DNA binden.

Verwendet wird für dieses System das *lac*-Operon mit seiner *GAL4* Aktivatorsequenz. Über das Operon werden Reportergene reguliert, im vorliegenden System sind dies *lacZ* für das sogenannte Blue-White-Screening, sowie *HIS3* und *URA3* als Auxotrophiemarker.

Das Blue-White-Screening ist eine weitverbreitete und beliebte Methode unter den Reportergenen. Es basiert auf dem *lac*-Operon, genauer auf dem *lacZ*-Gen des Operons. Das Gen codiert für  $\beta$ -Galactosidase, ein Enzym, das  $\beta$ -Galactoside spaltet, dazu gehört die namensgebende Lactose, die in Galactose und Glucose hydrolysiert wird. Das Enzym erkennt darüber hinaus auch X-gal, der Handelsname für 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid, als Substrat. X-gal wird durch die  $\beta$ -Galactosidase hydrolysiert in Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl. Letztere Substanz wiederum wird durch Luftsauerstoff oxidiert zu 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, einem tiefblauen Farbstoff, der als positives Ergebnis der Interaktion von Bait und Prey die Hefen nach deren Aufschluss färbt.

Die verwendeten Hefezellen der Art *Saccharomyces cerevisiae* MaV203 wurden des weiteren genetisch derart manipuliert, dass die auxotroph wachsen, Addition von Tryptophan, Leucin, Histidin und Uracil ins Medium sind zwingend erforderlich. Die Transformation der Bait- und Prey-Vektoren hebt als Selektionsmarker die Leucin- und Tryptophanauxotrophie auf, und bei einer Aktivierung der Reportergene durch Interaktion von Bait und Prey werden *URA3* und *HIS3* exprimiert, so dass die Stoffwechselleistung der Hefen wieder komplettiert wird.

### **3.8 Ziele dieser Arbeit**

Diese Arbeit soll drei Ziele verfolgen. Die erste Aufgabe sollte die Untersuchung der Interaktionen des Autolysins E mit der Domäne B des Accumulation associated proteins (Aap) im Yeast-Two-Hybrid-System behandeln.

Der Zweite Aufgabe diene der näheren Charakterisierung des AtIE selbst und seine Rolle bei der Biofilmbildung, insbesondere im Hinblick auf DNA-Freisetzung während der initialen Besiedlung von Oberflächen und die Wirkung von Inhibitoren auf die Biofilmbildung.

Der Letzte Teil dieser Arbeit dient der Untersuchung der Prozessierung von AtIE. Besondere Beachtung sollte dabei die bei der Prozessierung des Proproteins in die einzelnen funktionalen Domänen beteiligten Proteasen und die Definition der exakten Schnittstelle, also der Aminosäuresequenz, finden.

## 4. Material

Zum Einstellen der pH-Werte von Lösungen und Medien wurde das inoLab pH Level 1 von WTW (Weilheim) verwendet. Chemikalien wurden mit der Laborwaage S72 (Kern & Sohn, Balingen-Frommern) eingewogen. Für alle Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, H<sub>2</sub>O (Millipore) als Lösungsmittel verwendet. Die Herstellernachweise für Chemikalien sind der folgenden Übersicht zu entnehmen:

AppliChem	AppliChem GmbH, Darmstadt
BBL	Becton Dickinson, Cockseyville, USA
Calbiochem	Calbiochem <sup>®</sup> , Merck KGaA, Darmstadt
Chembio	Chembio Diagnostic Systems, Inc., Medford, NY, USA
Finnzymes	Thermo Fisher Scientific Inc., Vantaa, Finnland
Fluka	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
Invitrogen	Life Technologies GmbH, Darmstadt
J.T. Baker	Mallinckrodt Baker Deutschland, Griesheim
Lonza	Lonza Inc., Allendale, NJ, USA
Merck	Merck KGaA, Darmstadt
Millipore	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Roth	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München

## **4.1 Verwendete Stämme**

### **4.1.1 *Staphylococcus epidermidis* 5179**

*Staphylococcus epidermidis* 5179 ist ein klinisches Isolat aus dem Universitätsklinikum Eppendorf. Der Stamm ist biofilm- und PIA-negativ durch ein Insertionselement (IS257) im *icaADBC* Genlokus (Rohde *et al.*, 2001).

### **4.1.2 *Staphylococcus epidermidis* 5179-R1**

*S. epidermidis* 5179-R1 ist biofilmpositiv und PIA-negativ und entstand aus dem Stamm 5179 durch ein Experiment, bei dem durch Kultivierungsversuche überprüft werden sollte, ob das Insertionselement IS257 innerhalb einer gewissen Generationsfolge wieder aus dem *icaADBC* Genlokus herauspringt. Die erzeugte Revertante besitzt allerdings immer noch ein IS-Element im *icaADBC* Genlokus, so dass die Fähigkeit zur Biofilmbildung aufgrund einer anderen Veränderung zustande gekommen sein muss. Versuche an diesem Stamm zeigten, dass sich der Biofilm durch Proteasen sezernieren lässt, daher wird er als Referenzstamm für proteinbasierten Biofilm verwendet.

### **4.1.3 *Staphylococcus epidermidis* 1585**

Bei diesem Stamm handelt es sich um ein klinisches Isolat aus dem Universitätsklinikum Eppendorf. Der Stamm ist ebenso wie *S. epidermidis* 5179 biofilm- und PIA-negativ.

### **4.1.4 *Staphylococcus epidermidis* 1585-RA**

*S. epidermidis* 1585-RA ist eine Mutante des Stammes 1585, der allerdings biofilmpositiv ist, da er EMBP, das "Extracellular Matrix Binding Protein", überexprimiert.

### **4.1.5 *Staphylococcus epidermidis* 1457**

*S. epidermidis* 1457, biofilm- und PIA-positiv (Mack *et al.*, 1992). Dieser Stamm bildet einen proteasebeständigen auf Polysaccharidbasis strukturierten Biofilm. Da Proteasen den Phänotyp von *S. epidermidis* 1457 in Bezug auf die Biofilmbildung nicht verändern diente der Stamm als Positivkontrolle bei Biofilm-Assays.

### **4.1.6 *Staphylococcus epidermidis* 1457-M10**

*S. epidermidis* 1457-M10 ist eine biofilmnegative Mutante des Stammes 1457. Sie trägt das Transposon Tn917 im *icaA*-Gen (Mack *et al.* 1994).

#### **4.1.7 *Staphylococcus epidermidis* 1457-M10 $\Delta$ SarA**

*S. epidermidis* 1457-M10 $\Delta$ SarA wurde freundlicherweise durch Paul Fey zur Verfügung gestellt und ist eine Mutante des Stammes 1457-M10, bei der das Gen *sarA*, das für das Regulatorprotein SarA kodiert, deletiert ist (Handke *et al.* 2007). SarA ist ein negativer Regulator der Metalloprotease SepA, so dass dieser Stamm eine erhöhte Expression von SepA und damit erhöhte proteolytische Aktivität aufweist. Diese erhöhte proteolytische Aktivität verleiht diesen Stamm einen biofilmpositiven Phänotyp.

#### **4.1.8 *Staphylococcus epidermidis* 1457-M10 $\Delta$ SepA**

*S. epidermidis* 1457-M10 $\Delta$ SepA wurde zur Verfügung gestellt durch Michael Otto. Es handelt sich um eine Mutante des Stammes 1457-M10, bei der das Gen *sepA*, das für die Metalloprotease SepA kodiert, deletiert ist (Lai *et al.* 2007). SepA gilt als wichtiger Kandidat für Prozessierungen von Proteinen, die bei der Biofilmbildung eine Rolle spielen. Entsprechend ist dieser Stamm biofilmnegativ.

#### **4.1.9 *Staphylococcus epidermidis* 1457-M10 $\Delta$ SarA $\Delta$ SepA**

*S. epidermidis* 1457-M10 $\Delta$ SarA $\Delta$ SepA ist eine Doppelmutante mit Deletionen der Gene *sarA* und *sepA*. Sie entstand durch Transduktion der *sarA* Mutation (*sarA::tet*) in den Stamm 1457-M10 $\Delta$ SepA. Zwar würde die Deletion des Regulatorgens auch hier eine Hochregulation der Proteaseaktivität bewirken, da jedoch auch die Protease SepA deletiert ist weist dieser Stamm einen biofilmnegativen Phänotyp auf.

#### **4.1.10 *Micrococcus luteus***

*Micrococcus luteus* wurde zur Bereitstellung von grampositiver Zellwand als Substrat für die Zymographie verwendet, da seine Zellwand gegenüber Autolysinen sensibler ist als die von Staphylokokken (Schleifer und Steber, 1974) (Heilmann *et al.*, 1997). Gewonnen wurde der Stamm aus lyophilisierten Zellen (Sigma, St. Louis, MI, USA), die über Nacht zur Regeneration in TSB kultiviert und anschließend auf Blutagar überimpft wurden.

#### **4.1.11 *Saccharomyces cerevisiae* MaV203**

*Saccharomyces cerevisiae* MaV203 ist eine Hefe, die für das Yeast-Two-Hybrid-System verwendet wurde und von Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bezogen wurde. Der Stamm wurde genetisch derart manipuliert, dass er eine Auxotrophie auf Tryptophan, Leucin, Histidin und Uracil aufweist. Die Vektoren zur Interaktionsanalyse verfügen über die

konstitutiv exprimierten Gene *TRP1* (pDEST22) und *LEU2* (pDEST32) als Selektionsmarker. Die Gene *HIS3* und *URA3* zur Vervollständigung der Stoffwechselleistung befinden sich auf den Vektoren unter Kontrolle des *lac-Operon* als Reportergene. Darüber hinaus reguliert dieses Operon das Gen *lacZ*, das ebenfalls als Reportergen für das Blue-White-Screening genutzt werden kann.

#### **4.1.12 *Escherichia coli* DB3.1**

Für alle Klonierungen wurde das Gateway-System<sup>®</sup> verwendet (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Die benötigten Zielvektoren wurden in *E. coli* DB3.1 kloniert, da dieser Stamm in der Lage ist, das letale Gen *ccdB* zu neutralisieren. Dieses codiert für das cytotoxische Protein CcdB, auch Protein G genannt, und dient den Vektoren des Gateway-Systems als negativer Selektionsmarker, indem Zellen, die mit leeren Vektoren transformiert wurden, getötet werden.

#### **4.1.13 *Escherichia coli* Top10**

Chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen wurden für alle Transformationen zur Klonierung der benötigten Vektoren genutzt, da sie eine besonders gute Transformationseffizienz besitzen.

#### **4.1.14 *Escherichia coli* BL21AI<sup>TM</sup>**

Chemisch kompetente *E. coli* BL21AI<sup>TM</sup> dienen als Expressionsstamm für arabinose-induzierbare Vektoren. Der Stamm eignet sich durch seine Effizienz besonders gut für Proteinexpressionen.

## **4.2 Nährmedien fest und flüssig**

Wenn nicht anders angegeben wurden alle Medien mit H<sub>2</sub>O (Millipore) gelöst und 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Feste Medien wurden auf 50 °C herab gekühlt, benötigte Zusätze wurden zugegeben und Medien in Petrischalen zu je ca. 20 mL abgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

### **4.2.1 Blutagar**

Gebrauchsfertig geliefert von Oxoid (Basingstoke, UK).

### **4.2.2 TSB**

TSB (BBL) 30 g/L

#### 4.2.3 LB-Medium (nach Miller, zur Proteinexpression)

Bacto Tryptone (BBL) 10 g/L

Bacto Yeast (BBL) 5 g/L

NaCl (J.T.Baker) 10 g/L

pH-Wert auf 7,4 einstellen.

#### 4.2.4 Selektivagar für Bakterien

LB-Medium nach Lennox 20 g/L

Agar (BBL) 15 g/L

Autoklavieren, auf 50 °C abkühlen und Zusätze zugeben: Kanamycin (50 µg/mL), Ampicillin (100 µg/mL).

#### 4.2.5 Selektivagar für Hefen (SC-Medium)

1. In einer 2 L Schottflasche mit Magnetrührer 2,7 g Aminosäurepulver und 13,4 g Yeast nitrogen base ohne Aminosäuren (Invitrogen) in 1 L H<sub>2</sub>O (Millipore) lösen, den pH-Wert mit NaOH auf 5,9 einstellen und autoklavieren.
2. In einer zweiten Flasche 40 g Agar (BBL) in 900 mL H<sub>2</sub>O (Millipore) lösen und autoklavieren.
3. Nach dem Autoklavieren beide Lösungen auf 60 °C abkühlen und die Agarlösung sowie 100 mL Glucoselösung zur Yeast base geben. Je nach Bedarf 16 mL Auxotrophiezusätze zugeben.

SC-Trp = Addition von Uracil-, Histidin- und Leucinlösung

SC-Leu = Addition von Uracil-, Histidin- und Tryptophanlösung

SC-Trp/Leu = Addition von Uracil- und Histidinlösung

SC-Trp/Leu/Ura = Addition von Histidinlösung

SC-Trp/Leu/His = Addition von Uracillösung

#### 4.2.6 YPAD-Medium

Bacto Peptone (BBL) 20 g/L

Bacto Yeast (BBL) 10 g/L

Glucose (Merck) 10 g/L

Adeninsulfat (Fluka) 100 mg/L

pH-Wert auf 6,0 einstellen.

#### 4.2.7 Sabouraudagar

Gebrauchsfertig geliefert von Oxoid (Basingstoke, UK).

### 4.3 Puffer, Lösungen und sonstige Chemikalien (in alphabetischer Reihenfolge)

#### 4.3.1 Aminosäurepulver

Mischung von je 2 g der folgenden Substanzen: Adeninsulfat (Fluka), Alanin (Roth), Arginin (Roth), Asparagin (Roth), Asparaginsäure (Sigma), Cystein (Roth), Glutamin (Roth), Glutaminsäure (Roth), Glycin (Roth), Isoleucin (Roth), Lysin (AppliChem), Methionin (Sigma), Phenylalanin (Sigma), Prolin (Roth), Serin (Roth), Threonin (Sigma), Tyrosin (Sigma) und Valin (Roth). Pulver gründlich mischen und dunkel lagern.

#### 4.3.2 APS-Lösung

100 mg Ammoniumpersulfat (Roth) pro 1 mL H<sub>2</sub>O (Millipore) lösen. In Eppendorfgefäße à 110 µL aliquotieren und bei -20 °C einfrieren. Jeweils direkt vor Gebrauch auftauen.

#### 4.3.3 Bindepuffer

NaPO <sub>4</sub> * (Merck)	20 mM
NaCl (J.T. Baker)	500 mM
Imidazol (Merck)	40 mM

pH-Wert auf 7,4 einstellen und mit 0,2 µ-Filter (Merck Millipore) sterilfiltrieren.

#### 4.3.4 Blockinglösung (Westernblot)

2 % (w/v) Bovines Serumalbumin (Serva) in H<sub>2</sub>O (Millipore) lösen und mit 0,2 µ-Filter (Merck Millipore) sterilfiltrieren. Lösung bei 4°C lagern.

#### 4.3.5 Calciumpuffer

0,1 M CaCl<sub>2</sub> (Merck)

in H<sub>2</sub>O (Millipore) lösen und autoklavieren.

#### 4.3.6 Coomassie-Entfärbelösung

50 % (v/v) H<sub>2</sub>O (Millipore)

40 % (v/v) Methanol (Roth)

10 % (v/v) Essigsäure (Roth)

#### 4.3.7 Coomassie-Färbelösung

50 % (v/v) H<sub>2</sub>O (Millipore)

40 % (v/v) Methanol (Roth)

10 % (v/v) Essigsäure (Roth)

0,025 % (w/v) Coomassie Brillant Blau R250 (Roth)

gründlich auf dem Magnetrührer mischen bis Coomassie R250 vollständig gelöst ist, Lösung dann filtrieren, um unlösliche Partikel zu entfernen.

#### 4.3.8 EDTA-, bzw. EGTA-Lösung

200 mM EDTA (Sigma), bzw. EGTA (Roth)

pH-Wert auf 7,6 einstellen und mit 0,2 µ-Filter sterilfiltrieren.

#### 4.3.9 Elektrophoresegel (Agarose)

100 mL Elektrophoresepuffer (TBE 0,5 x)

1,2 g Agarose (Lonza)

5 µL Redsafe® (Chembio)

#### 4.3.10 Elektrophoresepuffer (TBE 0,5 x)

TBE (=Tris-Borat-EDTA) 5 x Konzentrat 1:10 mit H<sub>2</sub>O (Millipore) verdünnen

#### 4.3.11 Elektrophoresepufferkonzentrat (TBE 5 x)

60,57 g Trizma (Sigma)

30,92 g Borsäure (Merck)

7,44 g EDTA (Sigma)

mit H<sub>2</sub>O (Millipore) auf 2 L auffüllen.

#### 4.3.12 Elutionspuffer

NaPO<sub>4</sub>\* (Merck) 20 mM

NaCl (J.T. Baker) 500 mM

Imidazol (Merck) 250 mM

pH-Wert auf 7,4 einstellen und mit 0,2 µ-Filter sterilfiltrieren

\* = pro Liter 200 mL eines NaPO<sub>4</sub>-Puffers (77,4 mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, 1 M) und 22,6 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, 1 M), ad 1 L mit H<sub>2</sub>O (Millipore)).

#### 4.3.13 Glucoselösung

40 % (w/v) Glucose (Merck) in H<sub>2</sub>O (Millipore) lösen und autoklavieren.

**4.3.14 Glycerinpuffer**

0,1 M CaCl<sub>2</sub> (Merck)

20% (v/v) Glycerin (Merck)

mit H<sub>2</sub>O (Millipore) auffüllen, anschließend mit 0,2 µ-Filter sterilfiltrieren.

**4.3.15 Histidinlösung**

100 mM Histidin-HCl (Sigma)

lösen und mit 0,2 µ-Filter sterilfiltrieren. Dunkel lagern.

**4.3.16 Leucinlösung**

100 mM Leucin (Sigma)

lösen und mit 0,2 µ-Filter sterilfiltrieren. Dunkel lagern.

**4.3.17 Lithiumacetatpufferkonzentrat (10 x)**

1 M Lithiumacetat (Sigma)

lösen und mit 0,2 µ-Filter sterilfiltrieren.

**4.3.18 Lithiumacetat/PEG-Puffer**

10 mL Lithiumacetatpufferkonzentrat

5 mL Tris-EDTA-Pufferkonzentrat

40 g PEG-3350 (Sigma)

mit H<sub>2</sub>O (Millipore) auf 100 mL auffüllen und mit 0,2 µ-Filter sterilfiltrieren.

**4.3.19 Lithiumacetat/Tris-EDTA-Puffer**

10 mL Lithiumacetatpufferkonzentrat

10 mL Tris-EDTA-Pufferkonzentrat

mit H<sub>2</sub>O (Millipore) auf 100 mL auffüllen und mit 0,2 µ-Filter sterilfiltrieren.

**4.3.20 *Micrococcus*-Suspension**

In Resuspensionspuffer auf eine OD<sub>600</sub> von 40 eingestellte *M. luteus* Zellen (s.a. 5.1.1.3 im Methodenteil).

**4.3.21 PBS (1 x)**

50 mL PBS (20 x) Konzentrat wird auf 1000 mL mit H<sub>2</sub>O (Millipore) aufgefüllt.

**4.3.22 PBS (20 x)**

2,73 M NaCl (J.T.Baker)

53 mM KCl (Merck)

166 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)

53 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)

Salze in H<sub>2</sub>O (Millipore) lösen und pH-Wert auf 7,4 einstellen, anschließend autoklavieren.

#### **4.3.23 PBST**

1 L PBS wird 0,05 % (= 500 µL) Tween20<sup>®</sup> (Merck) zugegeben, gründlich mit Magnetprüher mischen, Schaumbildung vermeiden.

#### **4.3.24 Renaturierungspuffer**

25 mM Trizma (Sigma)

10 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck)

in H<sub>2</sub>O (Millipore) lösen und 0,1 % (v/v) Triton X-100 (Serva) auf dem Magnetprüher gründlich untermischen, dabei Schaumbildung vermeiden.

#### **4.3.25 Resuspensionspuffer**

2 M Bis-Tris (Fluka)

pH-Wert auf 6,8 einstellen.

#### **4.3.26 SDS-Lösung**

10 % (w/v) SDS (Roth) in H<sub>2</sub>O (Millipore) lösen.

#### **4.3.27 SDS-PAGE Laufpuffer**

50 mL NuPAGE<sup>®</sup> Pufferkonzentrat (Invitrogen) auf 1000 mL mit H<sub>2</sub>O (Millipore) auffüllen

#### **4.3.28 SDS-PAGE Sammelgel**

(Für bis zu 4 Sammelgele)

6,1 mL H<sub>2</sub>O (Millipore)

2,5 mL SDS-PAGE Sammelgelpuffer

1,3 mL Acrylamid (Roth)

100 µL SDS-Lösung (10 %)

10 µL TEMED (Roth)

50 µL APS-Lösung

#### **4.3.29 SDS-PAGE Sammelgelpuffer**

0,375 M Trizma-HCl (Sigma)

---

pH-Wert auf 6,8 einstellen.

#### **4.3.30 SDS-PAGE Trenngel**

(Für 2 Trenngele)

4,1 mL mL H<sub>2</sub>O (Millipore)

2,5 mL SDS-PAGE Trenngelpuffer

3,3 mL Acrylamid (Roth)

100 µL SDS-Lösung (10 %)

5 µL TEMED (Roth)

50 µL APS-Lösung

#### **4.3.31 SDS-PAGE Trenngelpuffer**

1 M Trizma-HCl (Sigma)

pH-Wert auf 8,8 einstellen.

#### **4.3.32 Transferpuffer**

25 mL Transferpufferkonzentrat (20 x), 50 mL Methanol (Roth), mit H<sub>2</sub>O (Millipore) auf 500 mL auffüllen.

#### **4.3.33 Transferpufferkonzentrat (20 x)**

10,2 g Bicine (Sigma)

13,1 g Bis-Tris (Fluka)

0,75 g EDTA (Sigma)

0,025 g Chlorobutanol (Merck)

Auf 125 mL mit H<sub>2</sub>O (Millipore) auffüllen, pH-Wert auf 7,2. 6 Monate bei Raumtemperatur haltbar.

#### **4.3.34 Tris-EDTA-Puffer (1 x)**

100 mL Tris-EDTA-Pufferkonzentrat auf 1000 mL mit H<sub>2</sub>O (Millipore) auffüllen und autoklavieren.

#### **4.3.35 Tris-EDTA-Pufferkonzentrat (10 x)**

100 mM Trizma-HCl (Sigma)

10 mM EDTA (Sigma)

pH-Wert auf 7,5 einstellen, anschließend autoklavieren.

**4.3.36 Tryptophanlösung**

40 mM Tryptophan (Sigma)

lösen und mit 0,2 µ-Filter sterilfiltrieren. Dunkel lagern.

**4.3.37 Uracillösung**

20 mM Uracil (Calbiochem)

lösen und mit 0,2 µ-Filter sterilfiltrieren. Dunkel lagern.

**4.3.38 Westernblot Blockinglösung**

3 % (w/v) BSA in H<sub>2</sub>O (Millipore) lösen und mit 0,2 µ-Filter sterilfiltrieren. Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C.

**4.3.39 X-gal-Nachweisreagenz**

10 mg X-gal in 100 µL DMF (Merck) lösen, 60 µL Mercaptoethanol (Roth) und 10 mL Z-Puffer zugeben. Lösung vor Gebrauch frisch unter dem Abzug ansetzen und vor Licht schützen.

**4.3.40 Z-Puffer**

16,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O (Merck)

5,5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (Merck)

0,75 g KCl (Merck)

0,246 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O (Merck)

Mit H<sub>2</sub>O (Millipore) auf 1000 ml auffüllen, pH-Wert auf 7,0 einstellen und mit 0,2 µ-Filter sterilfiltrieren.

**4.3.41 Zymographie Färbelösung**

0,01 % (w/v) Methylenblau (Merck) in 0,1 % (w/v) KOH (Merck) lösen. Färbelösung vor jedem Gebrauch frisch ansetzen.

**4.3.42 Zymographie Sammelgel**

(Für bis zu 4 Sammelgele)

6,1 mL H<sub>2</sub>O (Millipore)

2,5 mL Zymographie Sammelgelpuffer

1,3 mL Acrylamid (Roth)

100 µL SDS-Lösung (10 %)

---

10 µL TEMED (Roth)

50 µL APS-Lösung

#### 4.3.43 Zymographie Sammelgelpuffer

0,2 M Bis-Tris (Fluka)

pH-Wert auf 6,3 einstellen.

#### 4.3.44 Zymographie Trenngel

(Für 2 Trenngele)

3,1 mL mL H<sub>2</sub>O (Millipore)

2,5 mL Zymographie Trenngelpuffer

3,3 mL Acrylamid (Roth)

100 µL SDS-Lösung (10 %)

1 mL *Micrococcus*-Suspension

5 µL TEMED (Roth)

50 µL APS-Lösung

Achtung: *Micrococcus*-Suspension direkt vor TEMED und APS hinzu pipettieren und Gel zügig gießen, da die bakteriellen Zelloberflächen die Polymerisation auch ohne TEMED und APS starten.

#### 4.3.45 Zymographie Trenngelpuffer

0,4 M Bis-Tris (Fluka)

pH-Wert auf 6,8 einstellen.

### 4.4 Primer

Die Primer wurden mit Hilfe der Vector NTI Software (Invitrogen) erstellt (Tabelle 4.4.1) und von der Firma Eurofins MWG GmbH, Martinsried, synthetisiert. Mit den Primerpaaren wurden die entsprechenden Gene aus der genomischen DNA von *S. epidermidis* 5179 amplifiziert. Da das Gateway<sup>®</sup> System (Invitrogen) verwendet werden sollte mussten die Forward Primer an ihrem 5'-Ende mit CACC beginnen, der Erkennungssequenz für die zur Ligation verwendete Topoisomerase (s.a. „Klonierung“).

**Tabelle 4.4.1: Verwendete Primer für die PCR.**

<b>Name:</b>	<b>Sequenz Forward</b>	<b>Sequenz Reverse</b>
Amidase	5'-CAC CGT ATC TAG TCA AAA AAC ATC ATC ATT A-3'	5'-CTA TAA ATA GTA TTT ACT AAT CCA ACC AGA TTT AC-3'
Glucosaminidase	5'-CAC CAC TGC ACC ATC AAA AGT TCA AGC-3'	5'-TTA TTT GTA TGT TGG AAT TTC GAA G-3'
Repetitive Sequenzen 1-3	5'-CAC CAT GTC TAC AAA ACC GTC ACA ACC TTC TA -3'	5'-TAA ATC CTT AGC AGC AAT CCA TCC-3'
Propeptid + Beginn Amidase	5'-CAC CGA ACA ACC CAC AGA ATC AGT CTA ATC-3'	5'-TTA TGT CGG AGC TGT TTC TAT AAT TC-3'
Domäne B	5'-CAC CAT TCC ATT CGA CAA GAA ACG TGA G-3'	5'-TTA CGT TGA TGT GAT TGG ATT ACC AAC TTT C-3'

#### 4.5 Vektoren

Verwendet wurden die in Tabelle 4.5.1 aufgeführten Ausgangsvektoren des Gateway® Systems (Invitrogen). Aus diesen wurde mittels der TOPO-Klonierung, bzw. der LR-Clonase™ II Reaktion (siehe Methoden) die in Tabelle 4.5.2 aufgeführten Gebrauchsvektoren hergestellt.

**Tabelle 4.5.1: Ausgangsvektoren des Gateway® Systems.**

<b>Name:</b>	<b>Beschreibung:</b>	<b>Resistenz/Auxotrophiemarker:</b>
pENTR/D-TOPO	Eingangsvektor	Kanamycin
pDEST17	Expressionsvektor	Ampicillin
pDEST22	Prey-Vektor	Ampicillin/ <i>TRP1</i>
pDEST32	Bait-Vektor	Gentamicin/ <i>LEU2</i>

**Tabelle 4.5.2: Klionierte Vektoren in alphabetischer Reihenfolge.**

<b>Name:</b>	<b>Zweck:</b>	<b>Beschreibung:</b>
pDEST17-PPAM <sub>kurz</sub>	Expressionsvektor	Codiert für das Propeptid und den Beginn der Amidase von AtIE, besitzt N-terminalen Polyhistidinanhang
pDEST17-R1-3	Expressionsvektor	Codiert für die repetitiven Sequenzen 1 bis 3 des AtIE, besitzt N-terminalen Polyhistidinanhang.
pDEST32-AM	Bait-Vektor	Codiert für die Amidase des AtIE
pDEST32-DomB	Bait-Vektor	Codiert für Domäne B des Aap
pDEST32-GL	Bait-Vektor	Codiert für die Glucosaminidase des AtIE

**Tabelle 4.5.2 (Fortsetzung)**

<b>Name:</b>	<b>Zweck:</b>	<b>Beschreibung:</b>
pDEST22-AM	Prey-Vektor	Codiert für die Amidase des AtIE
pDEST22-DomB	Prey-Vektor	Codiert für Domäne B des Aap
pDEST22-GL	Prey-Vektor	Codiert für die Glucosaminidase des AtIE
pENTR-AM	Eingangsvektor	Codiert für die Amidase des AtIE
pENTR-DomB	Eingangsvektor	Codiert für Domäne B des Aap
pENTR-GL	Eingangsvektor	Codiert für die Glucosaminidase des AtIE
pENTR-PPAM <sub>kurz</sub>	Eingangsvektor	Codiert für das Propeptid und den Beginn der Amidase von AtIE
pENTR-R1-3	Eingangsvektor	Codiert für die repetitiven Sequenzen 1 bis 3 des AtIE
pEXP <sup>TM</sup> 22-RalGDS- <i>wt</i>	Prey Kontrollvektor	Codiert Wildtypprotein RalGDS, das stark mit KrevI interagiert
pEXP <sup>TM</sup> 22-RalGDS-m1	Prey Kontrollvektor	Codiert für Mutante 1 von RalGDS, die nur eine schwache Affinität zu KrevI aufweist
pEXP <sup>TM</sup> 22-RalGDS-m2	Prey Kontrollvektor	Codiert für Mutante 2 von RalGDS, die keine Affinität zu KrevI aufweist
pEXP <sup>TM</sup> 32-KrevI	Bait Kontrollvektor	Codiert das Protein KrevI, das mit RalGDS interagiert

## 5. Methoden

### 5.1 Kulturbedingungen

#### 5.1.1 Anzucht von Bakterien

##### 5.1.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen für Bakterien

Die Referenzstämme wuchsen auf Blutagar (gebrauchsfertig von Oxoid, Basingstoke, UK) und wurden jede zweite Woche überimpft. Dazu wurden die Platten über den „drei Ösen Ausstrich“ inokuliert, 24 h bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus, Osterode) ohne Schütteln inkubiert und anschließend im Kühlschrank (Liebherr, Kirchdorf an der Iller) bei 4 °C gelagert. Transformierte Stämme wurden unter den selben Bedingungen kultiviert, allerdings wurde auf Selektivmedien inkubiert.

Alle Flüssigmedien wurden im Schüttelinkubator (Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, USA) bei 37 °C und 200 UpM inkubiert.

##### 5.1.1.2 Verdünnungsreihen

Für Verdünnungsreihen wurde PBS-Puffer steril in Reagenzgläser à 4,5 mL abgefüllt. Es wurden 0,5 mL Medium hinzugegeben (entspricht einer Verdünnung von 1:10), gründlich gemischt und für die nächste Verdünnungsstufe wieder 0,5 mL entnommen.

Von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden jeweils 100 µL auf Müller-Hinton Agar (gebrauchsfertig von Oxoid, Basingstoke, UK) pipettiert und mit einem sterilen Glasstab verteilt. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37 °C.

##### 5.1.1.3 *Micrococcus*-Suspension

Mit der Impföse wurde eine Kolonie von *M. luteus* von der Blutagarplatte entnommen und 500 mL TSB inokuliert. Das Medium wurde über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert, die Zellen anschließend in 50 mL Reaktionsgefäßen (Greiner, Kremsmünster, Österreich) bei 6000 UpM für jeweils 10 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert (Multifuge 1s-r, Heraeus, Hanau). Die Überstände wurden verworfen, die Gefäße mit Kultur neu befüllt und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert, bis alle Suspension aufgebraucht war. Die geernteten Zellen wurden in Resuspensionspuffer aufgenommen und auf eine OD<sub>600</sub> von 40 eingestellt (SmartSpec<sup>tm</sup> 3000, Bio-Rad, München), in Eppendorfgefäße à 1 mL aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### 5.1.1.4 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*

5 mL einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden auf 100 mL mit frischem LB-Medium aufgefüllt und weiter kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht war. Die Kultur wurde mit 5500 UpM bei 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 25 mL auf 4 °C herab gekühlter Calciumlösung resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit 3200 g bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in 5 mL eiskaltem Glycerinpuffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in Eppendorfgefäße à 100 µL aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### 5.1.1.5 Biofilm Assay

Die Biofilmbildung wurde *in vitro* nach der Methode von Christensen *et al.* (1985) durchgeführt. Dazu wurden 2 mL TSB (BBL) im Reagenzglas mit einer Kolonie des zu untersuchenden Stamm beimpft und 6 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. 200 µL der Vorkultur wurden in 20 mL frisches Medium gegeben (1:100). Aus dieser Verdünnung wurden jeweils 200 µL in 4 Näpfe einer Mikrotiterplatte (Nunclon Δ-Surface®, Nunc, Roskilde, Dänemark) pipettiert und 24 h bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgegossen, die Platte 3 x mit jeweils 200 µL PBS-Puffer gewaschen, und bei 37 °C getrocknet. Die Platten wurden für 5 Minuten mit Gentianaviolett gefärbt und unter langsam fließendem Wasser gespült, bis sich keine Farbwolken mehr lösten. Die Auswertung erfolgte im Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 570 nm.

#### 5.1.1.6 Biofilminhibitions Assay

Viele Oberflächenproteine von Staphylokokken, zum Beispiel Aap oder AtlE, müssen für einen biofilmpositiven Phänotyp proteolytisch gespalten und dadurch aktiviert werden. Durch Zugabe verschiedener Proteaseinhibitoren sollte die Biofilminhibition getestet werden.

Dazu wurden Biofilm Assays wie unter 5.1.1.5 beschrieben durchgeführt. Den 200 µL Kulturmedium wurden 20 µL verschieden konzentrierter Inhibitorlösungen hinzu pipettiert. Als Mockkontrolle wurde 20 µL H<sub>2</sub>O benutzt.

#### 5.1.1.7 Herstellung von Kulturüberständen zur Prozessierung rekombinanter Proteine

Für die Versuche zur Prozessierung des AtlE wurden die Laborstämme 1457-M10, 1457-M10ΔSarA, 1457-M10ΔSepA und 1457-M10ΔSarAΔSepA verwendet. Es wurden Kulturen zu je 50 mL TSB 1:100 aus einer Vorkultur inokuliert und schüttelnd über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden bei 6000 UpM 10 Minuten lang abzentrifugiert, die Überstände anschließend in einem Amicon® Ultra Zentrifugenfilter (Merck-Millipore, Billerica, MA,

USA) mit einer Porengröße von 10.000 kDa auf ca. 5 mL aufkonzentriert. Die Konzentrate wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

## **5.1.2 Anzucht von Hefen**

### **5.1.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen für Hefen**

Hefen wurden wie Bakterien nach dem "drei Ösen Ausstrich" angeimpft, abweichend jedoch für 48 h bei 30 °C im Brutschrank (Heraeus, Osterode) ohne Schütteln inkubiert.

### **5.1.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Hefen**

10 mL YPAD-Medium wurden mit einer Öse *S. cerevisiae* MaV203 inokuliert und über Nacht bei 30 °C schüttelnd inkubiert. 50 mL frisches Medium wurde mit der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4 eingestellt und weitere 4 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden bei 2500 UpM abzentrifugiert, in 40 mL Tris-EDTA-Puffer resuspendiert und erneut pelletiert. Die Zellen wurden nun in 2 mL Lithiumacetat/Tris-EDTA-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend sofort für eine Transformation eingesetzt.

## **5.2 Nukleinsäure basierte Methoden**

### **5.2.1 Präparation genomischer DNA**

Genomische DNA wurde unter Verwendung der InstaGene Matrix (Bio-Rad, München) präpariert. Das beigefügte Protokoll für DNA-Isolation aus Bakterien von einer Agarplatte (Blutagar nach 24 h Inkubation bei 37 °C) wurde dahingehend abgewandelt, dass den resuspendierten Bakterien 5 µL Lysostaphin zugegeben wurde und der Reaktionsansatz vor der eigentlichen Lyse zusätzlich für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert wurde, um einen effizienteren Zellaufschluss der grampositiven Bakterien zu erreichen.

### **5.2.2 Präparation extrachromosomaler DNA (Plasmidpräparationen)**

Plasmidpräparationen erfolgten unter Verwendung des Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) gemäß der Angaben des Herstellers. Für alle Zentrifugationen wurde eine "Centrifuge 5415D" (Eppendorf, Hamburg) verwendet, die Elution erfolgte unter Einsatz von 40 µL des im Kit enthaltenen Elutionspuffers. Die präparierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 5.2.3 PCR

Für jede PCR wurde der Ansatz in Tabelle 5.2.1 verwendet. Das genutzte PCR-Programm ist in Tabelle 5.2.2 aufgeführt. Benutzt wurde für jede PCR der Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg).

**Tabelle 5.2.1: PCR-Reaktionsansatz**

Schema der Komponenten und Mengen, die für die PCR verwendet wurden

Komponente:	Volumen:
Primer forw. (0,1 mM)	1,5 µL
Primer rev. (0,1 mM)	1,5 µL
Polymerase (Phusion, Finnzymes)	0,5 µL
Reaktionspuffer 5x (1,5 mM Mg <sup>2+</sup> )	10 µL
dNTP's (je 20 µM, Finnzymes)	1,0 mL
DNA	X µL
H <sub>2</sub> O (Aqua ad injectabilia)	35,5 – X µL
Endvolumen	50 µL

**Tabelle 5.2.2: PCR-Programm**

Für normale PCR und Gradienten-PCR wurde das aufgeführte Programm genutzt:

Funktion:	Zeit:	Temperatur:	Zyklen:
Inaktivierung	30 s	98 °C	30
Denaturierung	5 s	98 °C	
Primer Annealing	20 s	Normal: 50,1 °C Gradient: 50,1 – 70,1 °C	
Elongation	X* Min	72 °C	
Reparaturfunktion	3 Min	72 °C	
Warten	∞	4 °C	

\* = pro 1000 Basenpaaren benötigt die Polymerase 30 s.

Für die Gradienten-PCR wurden die Temperaturen 50,1 °C, 52,3 °C, 56,8 °C, 62,2 °C, 67,1 °C und 70,1 °C verwendet.

### 5.2.4 Elektrophorese und Dokumentation von Nukleinsäuren

Wenn nicht anders angegeben wurde für die Elektrophorese von DNA 1,2 % Agarosegele verwendet. Der Lauf erfolgte bei 120 V in einer Elektrophoresekammer (Owl Seperagtion Systems, Asheville, NC, USA). Die Kammer ermöglicht den Einsatz zweier Kämmen zu je 20 Taschen, ein Kamm an der Oberkante des Gels, der Zweite mittig. Mitgeführt wurde bei jedem Lauf jeweils als Größenstandard ein Mix aus *Hind*III gespaltener λ-DNA und *Hae*III gespaltener φX174-DNA (Finnzymes).

Die Dokumentation erfolgte durch das in das Gel eingefügte RedSafe<sup>®</sup> (5 µL auf 100 mL Gel) (Chembio) im Chemi Dox XRS (BIO-RAD, München).

### 5.2.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurden diese in einem Agarosegel (1,2 %, 100 V) aufgetrennt. Dabei wurde in die untere Hälfte der Gelkammer kein Kamm eingesetzt, der Lauf erfolgte über die komplette Länge des Gels. Um die DNA nicht übermäßig durch die UV-Strahlung zu beschädigen wurden diese Gele nicht dokumentiert. Die Banden wurden auf dem UV-Tisch (Phase, Lübeck) bei minimaler Strahlung (70 %) mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel extrahiert. Das im Herstellerprotokoll angegebene Trockenzentrifugieren wurde auf 5 Minuten verlängert und der Elutionspuffer wurde im Wasserbad auf 50 °C vorgewärmt, um die Verschleppung von Ethanol während der Elution zu verhindern und die DNA-Ausbeute zu optimieren.

### 5.2.6 Klonierung im Gateway<sup>®</sup> Vektorsystem

Die PCR-Produkte wurden durch TOPO-Klonierung in die pENTR<sup>™</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> Vektoren (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) gebracht. Dabei verbindet die am linearisierten Vektor hängende Topoisomerase Vektor und PCR-Produkt unidirektional über die Erkennungssequenz CACC des *Forward*-Primer, die beim Primerdesign vor die eigentliche Primersequenz angebracht werden muss.

Für die TOPO-Klonierung wurde das Herstellerprotokoll angewandt. Es wurden 3 µL der zu klonierenden PCR-Produkte verwendet, für die Ligation wurden 30 Minuten angesetzt. Die Transformationen erfolgten in chemisch kompetente *E. coli* OneShot<sup>®</sup> TOP10 Zellen. Vom Protokoll abweichend wurden 4 µL des Klonierungsansatzes eingesetzt, es wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert. Auf die Selektivplatten (Kanamycin 50 µg/mL) wurden jeweils 100 µL pipettiert und mittels eines Drigalskispatels ausplattiert.

Aus dem Eingangsvektor pENTR<sup>™</sup> wurden die Sequenzen in die Zielvektoren durch die LR-Clonase<sup>™</sup> II Reaktion subkloniert. Das System nutzt dabei die Fähigkeit der seitenspezifischen Rekombination des Phagen Lambda durch die sogenannten *att*-Sites, diese Erkennungssequenzen sind im Eingangsvektor und im Vektorvektor enthalten.

Die Reaktionen wurden mit 7 µL des Eingangsvektors durchgeführt. Die Transformationen erfolgten unter den unter 5.2.7 beschriebenen Bedingungen, zur Selektion wurde Ampicillin

---

(100 µg/mL) verwendet.

### **5.2.7 Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli***

Wenn nicht anders angegeben wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 1 µL DNA (z.B. aus Plasmidpräparationen) hinzu pipettiert. Der Ansatz inkubierte 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Zellen für 30 Sekunden einen Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt. Nach 2 Minuten Abkühlung auf Eis wurde 250 µL SOC-Medium (Invitrogen) zugegeben und der Ansatz schüttelnd bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf entsprechendem Selektivmedium ausplattiert.

### **5.2.8 Transformation chemisch kompetenter Hefen**

Zu 100 µl kompetenter Hefen wurden 100 µg Lachssperma-DNA und 1 µg Plasmid-DNA pipettiert. Es wurden 700 µL Lithiumacetat/PEG-Puffer zugegeben, gut gemischt und 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 88 µL DMSO erfolgte ein Hitzeschock des Ansatzes für 7 Minuten bei 42 °C. Der Ansatz wurde in einer Tischzentrifuge für 10 Sekunden abzentrifugiert, der Überstand abpipettieren und verworfen. Die Zellen wurden in 1 mL Tris-EDTA-Puffer resuspendiert, erneut pelletiert und in 50 µL Tris-EDTA-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde auf Selektionsmedien (SC-Medium ohne Tryptophan, bzw. Leucin) mit einem Drigalskispatel ausplattiert und für 48 h bei 30 °C inkubiert. Die Vektoren (pDEST22 = Prey und pDEST32 = Bait) wurden, anders als im Herstellerhandbuch angegeben, nicht zeitgleich in chemisch kompetente Hefezellen transformiert, sondern aufgrund negativer Bilanz nacheinander. Dazu wurde erst der Vektor pDEST32 transformiert. Positive Klone, zu erkennen an ihrer Fähigkeit zum Wachstum auf leucinfreiem SC-Medium, wurden erneut chemisch kompetent gemacht und mit pDEST22 transformiert, wodurch sie nun auf leucin- und tryptophanfreien Medium wachsen konnten.

### **5.2.9 Nukleinsäuresequenzierung**

Für die Sequenzierung wurden die Zielvektoren isoliert und verschickt an die Firma MWG Operon (Martinsried). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte über Sequencher 4.5 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

## 5.3 Proteinbasierte Methoden

### 5.3.1 Proteinpräparation und Dokumentation durch SDS-PAGE

Für Polyacrylamidgelelektrophoresen wurde das Kammersystem Mini-PROTEAN Tetra Cell von Bio-Rad (Bio-Rad, München) mit maximal zwei Gelen nach der diskontinuierlichen Methode von Laemmli verwendet. Verwendet wurden ausschließlich Glasplatten für Gele von 1 mm Dicke. Es wurden zunächst 5,6 mL des Trenngels gemäß Rezept pro Glasplatte eingefüllt, mit Wasser beschichtet und für 20 Minuten auspolymerisiert. Anschließend wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel aufgegossen, sowie ein Kamm für 10 bzw. 15 Taschen eingesetzt. Nach erneuten 20 Minuten der Polymerisation waren Gele gebrauchsfertig, nicht genutzte Gele wurden in feuchte Papierhandtücher gewickelt und in einer Plastiktüte bei 4 °C gelagert.

Von den zu untersuchenden Proben wurden 18 µL in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und 6 µL Laufpuffer (NuPAGE LDS Sample Buffer (4x), Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) hinzugegeben. Die Gefäße wurden im Heizblock für 10 Minuten bei 72 °C denaturiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Die Proben und 6 µL Größenmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot) wurden in die Geltaschen pipettiert, der Lauf erfolgte bei 200 V für 45 Minuten. Die Gele wurden 20 Minuten mit Coomassie Brilliantblau gefärbt und anschließend über Nacht mit Entfärbelösung entfärbt. Gegebenenfalls wurde die Entfärbelösung noch einmal erneuert, dann wurden die Gele nach kurzen spülen in H<sub>2</sub>O auf ein Whatman-Papier gelegt und im Gelrockner (Gel Dryer, Model 543, Bio-Rad, München) unter Vakuum für 45 Minuten bei 80 °C getrocknet.

### 5.3.2 Westernblot

#### 5.3.2.1 Transfer der Proteine

Zunächst wurde eine SDS-PAGE wie unter 5.3.1 beschrieben durchgeführt, allerdings erfolgte abschließend keine Coomassiefärbung. Das Gel wurde auf eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran gebettet und anschließend auf beiden Seiten ein mit Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt. Dieser Blot-Stapel wurde in die untere Hälfte des Blot-Halters einer Blotkammer (X-Cell II™ BlotModule, Invitrogen) auf drei in Transferpuffer getränkte Blot-Schwämme (Invitrogen) mit der Membran nach oben gelegt und mit weiteren drei getränkten Schwämmen bedeckt. Der Blot-Halter wurde mit der Deckplatte verschlossen, in die Kammer eingehängt und mit der Klemme fixiert. Nun wurde der Halter bis zur Oberkante mit

Transferpuffer befüllt, der verbleibende Rest des Puffers wurde in die Kammer gegossen. Der Transfer der Proteine erfolgte für 60 Minuten bei 25 V und 160 mA. Nach erfolgtem Transfer wurde der Blot über Nacht bei 4 °C in Westernblot Blockinglösung inkubiert, um freie Bindungskapazitäten der Membran zu sättigen.

### 5.3.2.2 Detektion mit Anti-Histidin Antikörpern

Es folgten 3 Waschschrte mit PBST zu je 15 Minuten. Der primäre Antikörper (Sigma) wurde 1:10.000 in 10 mL PBST verdünnt und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Es folgten drei Waschschrte wie oben beschrieben. Da der Antikörper mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist konnte ohne Verwendung eines sekundären Antikörper direkt mit Western Blue® (Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase, Promega, Madison, WI, USA) detektiert werden. Waren die Banden deutlich zu erkennen wurde die Reaktion gestoppt, indem der Blot mit Wasser gespült wurde. Anschließend erfolgte die Dokumentation durch Einscannen des Blots.

### 5.3.3 Zymographie

Wenn man Proteine bei pH-Werten unter 7 in einer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) auftrennt und anschließend das SDS durch verschiedene Waschschrte aus dem Gel entfernt, so kann das Protein renaturiert werden und wieder enzymatische Aktivität erlangen (Oshida *et al.*, 1995) (Heilmann *et al.*, 1997) (Strating & Clarke, 2001). Um diese Aktivität nachzuweisen wird ein geeignetes Substrat in das Gel eingebettet. Nach der Renaturierung des Enzyms und einer Inkubationszeit wird das Substrat angefärbt. Ergeben sich nach dem Färbvorgang klare Banden, so ist das der Nachweis für enzymatische Aktivität.

Autolysine dienen dazu, Peptidoglykan zu spalten, folglich müssen für den Nachweis autolytischer Aktivität Zellwandfragmente, bzw. ganze Zellen als Substrat in das Gel eingebettet werden. Verwendet wurde hier die Zellwand nativer *M. luteus Zellen*, da diese gegenüber Autolysinen sensibler reagiert und das Ergebnis des Zymogramms deutlicher ausfällt (Schleifer und Steber, 1974) (Heilmann *et al.*, 1997).

Die Zusammensetzung der Zymographie-Gele ist den Kapiteln 4.3.41, bzw. 4.3.43 zu entnehmen. Die Fertigstellung der Gele und die Probenvorbereitung erfolgte wie für die SDS-PAGE beschrieben. Der Lauf erfolgte für 80 Minuten bei 150 V. Das Gel wurde für jeweils 30 Minuten zweimal in H<sub>2</sub>O (Millipore) und einmal in Renaturierungspuffer gewaschen. Danach wurde das Gel in Renaturierungspuffer für 72 h bei 37 °C ohne Schütteln im

Brutschrank renaturiert und anschließend kurz mit H<sub>2</sub>O abgespült und mit Methylblau für 3 h gefärbt. Das Entfärben erfolgte in H<sub>2</sub>O, bis sich Lysezonen abgezeichnet haben. Das Zymogramm wurde in einem Scanner (HP Scanjet) dokumentiert.

#### **5.3.4 Oberflächenproteinpräparation**

Es wurden Reagenzgläser mit 3 mL TSB (BBL) mit den zu untersuchenden Stämmen beimpft und 6 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 18 mL frisches Medium mit 180 µL Vorkultur inokuliert (1:100). Das Medium wurde in Nunclon Δ-Surface<sup>®</sup> Petrischalen gefüllt und 24 h ohne Schütteln bei 37 °C inkubiert.

Der Inhalt wurde in Zentrifugenbecher überführt (Biofilm wurde mit Hilfe eines Zellkulturschabers passagiert) und für 15 Minuten bei 4 °C mit 6000 UpM abzentrifugiert. Zum Waschen wurden die Biofilme in PBS resuspendiert und unter identischen Bedingungen zentrifugiert.

Die Niederschläge wurden in mit PBS 4:1 verdünnten 4 x LDS-Puffer (Invitrogen) resuspendiert und für 10 Minuten bei 90 °C zum Ablösen nicht kovalent gebundener Proteine inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C mit 6000 UpM. Die Überstände wurden als Oberflächenproteinpräparationen verwendet und ohne weitere Behandlung für SDS-PAGE, Zymographie oder Westernblotting verwendet.

#### **5.3.5 Proteinexpression**

Für die Expression wurden die Expressionsvektoren in den Hochleistungsstamm *E. coli* BL21AI<sup>™</sup> wie unter 5.2.7 beschriebenen transformiert. Von den Expressionsstämmen wurden Über-Nacht-Kulturen (10 mL LB-Medium) inokuliert, aus denen für eine Pilotexpression zur Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen 100 mL LB-Medium auf OD<sub>600</sub> 0,05 eingestellt und im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert wurden. Der im Expressionsvektor enthaltene T7-Promotor ist durch Arabinose induzierbar, darum wurde nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 den Kulturen 0,02 % (w/v) Arabinose zum Medium hinzugefügt. Als Kontrolle wurden Extrakte identischer Kulturen ohne Induktion mitgeführt. Es wurden stündlich Proben zu je 1 mL entnommen, nach 4 h wurde die Expression beendet. Der Zellaufschluss der Proben erfolgte durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben, aus den Lysaten wurde eine Proteinpräparation gemäß Beschreibung in Kapitel 5.3.1 angefertigt, die dann im SDS-PAGE dokumentiert wurde.

Die Hauptexpression erfolgte in Schottflaschen mit einem Volumen von 2 L, die mit 1 L LB-Medium befüllt wurden. Die Kulturen wurden aus einer Übernachtskultur inokuliert und im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert, bis nach dem Erreichen der OD<sub>600</sub> von 0,4 mit Arabinose die Expression induziert wurde. Nach 4 Stunden wurden die Kulturen mit 6000 UpM bei 4 °C für 15 Minuten abzentrifugiert und die Zellen bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

### **5.3.6 Proteinaufreinigung**

Zur Aufreinigung wurden die Zellen in Bindepuffer resuspendiert (50 µL Puffer pro 1 mL Kultur) und 100 s per Ultraschall (Branson 250D, Danbury, USA, mit Mikrotip, 70 % Leistung) im Eisbad aufgeschlossen (jeweils 10 s Schall, 10 s Pause). Zellwandbestandteile wurden bei 4 °C und 6000 UpM abzentrifugiert, der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm), um ein Verstopfen des Äkta Purifier (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) zu verhindern.

Die Proben wurden nach dem Äquilibrieren des Gerätes mit Bindepuffer in das Probenaufnahmegefäß injiziert. Die verwendete Nickelsäule (GE Healthcare, 5 mL Volumen) gehört zum Typ "Fast Flow" und wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 4 mL pro Minute verwendet. Es wurde mit Elutionspuffer eluiert und in Eppendorfgefäße à 1 mL fraktioniert. Die Fraktionen wurden bei -20 °C eingefroren.

### **5.3.7 Prozessierung von rekombinanten Proteinen durch Zellüberstände**

Es wurden jeweils 10 µL der rekombinanten repetitiven Proteine R1-3, 5 µL PBS und 5 µL Bakterienüberstände in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Bei Addition von Inhibitoren wurde entsprechend weniger PBS verwendet. Eingesetzt wurden 1 µL EDTA Stocklösung, bzw. 2 µL Trypsininhibitor oder 2 µL E64. Die Ansätze wurden anschließend 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Den Ansätzen wurde jeweils 6 µL 4x LDS-Puffer zugefügt, danach wurden die Reaktionsansätze 10 Minuten bei 72 °C denaturiert und für eine Gelelektrophorese verwendet.

### **5.3.8 Prozessierung von rekombinanten Proteinen durch kommerzielle Protease SepA**

Es wurden jeweils 10 µL der rekombinanten repetitiven Proteine R1-3, 9,5 µL PBS und 0,5 µL kommerzielle Protease in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Bei Addition von Inhibitoren wurde entsprechend weniger PBS verwendet. Eingesetzt wurden 1 µL EDTA Stocklösung, bzw. 2 µL Trypsininhibitor oder 2 µL E64. Die Ansätze wurden anschließend, sofern nicht anders angegeben, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Den Ansätzen wurde jeweils 6 µL 4x LDS-Puffer zugefügt, danach wurden die Reaktionsansätze 10 Minuten bei 72 °C

denaturiert und für eine Gelelektrophorese verwendet.

## 5.4 Untersuchung von Proteininteraktionen im Yeast-Two-Hybrid-System

### 5.4.1 Kontrollvektoren

Als Kontrollen dienten die vom Hersteller bereitgestellten Vektoren pEXP<sup>TM</sup>32-KrevI, pEXP<sup>TM</sup>22-RalGDS-*wt*, pEXP<sup>TM</sup>22-RalGDS-m1 und pEXP<sup>TM</sup>22-RalGDS-m2. Die Vektoren wurden dem Handbuch entsprechend wie folgt kombiniert und ergaben die aufgeführten Interaktionen:

Bait:	Prey:	Interaktion:
pEXP <sup>TM</sup> 32-KrevI	pEXP <sup>TM</sup> 22-RalGDS- <i>wt</i>	deutlich positiv
pEXP <sup>TM</sup> 32-KrevI	pEXP <sup>TM</sup> 22-RalGDS-m1	schwach positiv
pEXP <sup>TM</sup> 32-KrevI	pEXP <sup>TM</sup> 22-RalGDS-m2	negativ

### 5.4.2 Auxotrophieuntersuchung

Die zu untersuchenden Stämme wurden nebeneinander auf SC-Medium ohne Tryptophan und Leucin überimpft und die Platten für 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen mit einem sterilen Samttuch auf Selektivmedien (SC-Medien) ohne Uracil, bzw. ohne Histidin überstempelt. Die Platten wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. Wachstum auf den Medien bedeutet ein positives Ergebnis, also eine Interaktion zwischen den auf Bait- und Prey-Vektor codierten Proteinen.

### 5.4.3 Blue-White-Screening

Die zu untersuchenden Stämme wurden nebeneinander auf ein Vollmedium (Sabouraudagar), auf dem ein steriles Filterpapier aufgelegt wurde, überimpft und die Platte für 24 h bei 30 °C inkubiert. Das Filter mit den Hefezellen wurde mit flüssigem Stickstoff übergossen, um die Zellen zu zerstören. In eine frische Petrischale wurden zwei Filterpapiere gelegt und mit X-gal-Nachweisreagenz getränkt. Darauf wurde mit einer Pinzette die Membran mit den Hefen aufgelegt. Die Petrischalen wurden anschließend für 24 h bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert, dabei wurde regelmäßig nach einer Blauverfärbung der Kolonien gesehen. Die endgültigen Ergebnisse wurden nach Ablauf der 24 h dokumentiert.

## 6. Ergebnisse

### 6.1 Untersuchung der Interaktionen der Domäne B des Accumulation associated proteins (Aap) mit den Autolysin E im Yeast-Two-Hybrid-System

Die Untersuchung der Proteininteraktionen im Yeast-Two-Hybrid-System erbrachte die in Tabelle 6.1.1 zusammengefassten Ergebnisse: Die Kontrollproteine KrevI und RalGDS (Wildtyp) zeigten deutliches Wachstum auf uracil-, bzw. histidinfreiem Medium. Im Blue-White-Screening fiel das Resultat etwas schwächer aus, konnte aber immer noch eindeutig als positiv gewertet werden. Die Kombination der Kontrollen aus KrevI und RalGDS (Mutante 1) wuchsen, wenn auch verzögert, auf den Auxotrophiemedien. Das Ergebnis im Blue-White-Screening viel sehr schwach, fast negativ aus. Die zu untersuchenden Domänen des AtlE, Amidase und Glucosaminidase, sowie die Domäne B aus Aap zeigten weder mit sich selbst, noch in Kombination mit den jeweils anderen Proteinen in keiner Versuchsanordnung ein positives Ergebnis.

**Tabelle 6.1.1: Übersicht der untersuchten Vektorkombinationen und ihrer Phänotype in Hinblick auf untersuchte Reportergene.**

Vektorkombinationen: (Kontrollen)		Reportergene:		
Bait:	Prey:	<i>lacZ</i> :	<i>URA3</i> :	<i>HIS3</i> :
pEXP <sup>TM</sup> 32-KrevI	pEXP <sup>TM</sup> 22-RalGDS- <i>wt</i>	+	++	++
pEXP <sup>TM</sup> 32-KrevI	pEXP <sup>TM</sup> 22-RalGDS-m1	(+)	+	+
pEXP <sup>TM</sup> 32-KrevI	pEXP <sup>TM</sup> 22-RalGDS-m2	—	—	—
pDEST32-AM	pDEST22	—	—	—
pDEST32	pDEST22-AM	—	—	—
pDEST32-AM	pDEST22-AM	—	—	—
pDEST32-DomB	pDEST22	—	—	—
pDEST32	pDEST22-DomB	—	—	—
pDEST32-DomB	pDEST22-DomB	—	—	—
pDEST32-GL	pDEST22	—	—	—
pDEST32	pDEST22-GL	—	—	—
pDEST32-GL	pDEST22-GL	—	—	—

**Erklärung:** ++ = stark positiv, + = positiv, (+) = schwach positiv, — = negativ

Tabelle 6.1.1 (Fortsetzung)

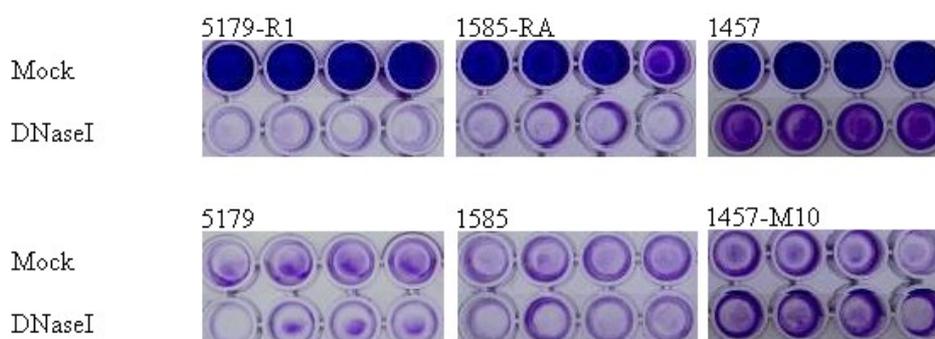
Vektorkombinationen:		Reportergene:		
Bait:	Prey:	<i>lacZ</i> :	<i>URA3</i> :	<i>HIS3</i> :
pDEST32-AM	pDEST22-DomB	—	—	—
pDEST32-DomB	pDEST22-AM	—	—	—
pDEST32-GL	pDEST22-DomB	—	—	—
pDEST32-DomB	pDEST22-GL	—	—	—
pDEST32-AM	pDEST22-GL	—	—	—
pDEST32-GL	pDEST22-AM	—	—	—

Erklärung: ++ = stark positiv, + = positiv, (+) = schwach positiv, — = negativ

## 6.2 Die Rolle von AtIE bei der *Staphylococcus epidermidis* Biofilmbildung

### 6.2.1 DNA-Freisetzung

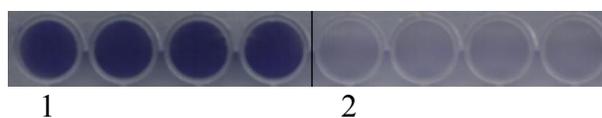
In der Literatur wird die Bedeutung von DNA als Bestandteil des Biofilms diskutiert. Ging man früher davon aus, dass DNA sozusagen als „Abfallprodukt“ durch lysierte Zellen aus der Gemeinschaft im Biofilm zurückblieb, so wird der DNA heute eine wichtigere Rolle zugesprochen (Qin *et al.*, 2006) (Qin *et al.*, 2007) (Vilain *et al.*, 2009). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, die Bedeutung von DNA für die Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis* zu charakterisieren. Es wurden hierzu die *S. epidermidis* Stämme 1457, 1457-M10, 1585, 1585-RA, 5179 und 5179-R1 in Anwesenheit von 1 mg/mL DNaseI kultiviert (s.a. Abbildung 6.2.1.).



**Abbildung 6.2.1: Wachstum von *S. epidermidis* in Anwesenheit von DNaseI.** Gentianaviolettgefärbter Biofilm-Assay verschiedener *S. epidermidis* Referenzstämmen in An- und Abwesenheit von DNaseI (1 mg/mL).

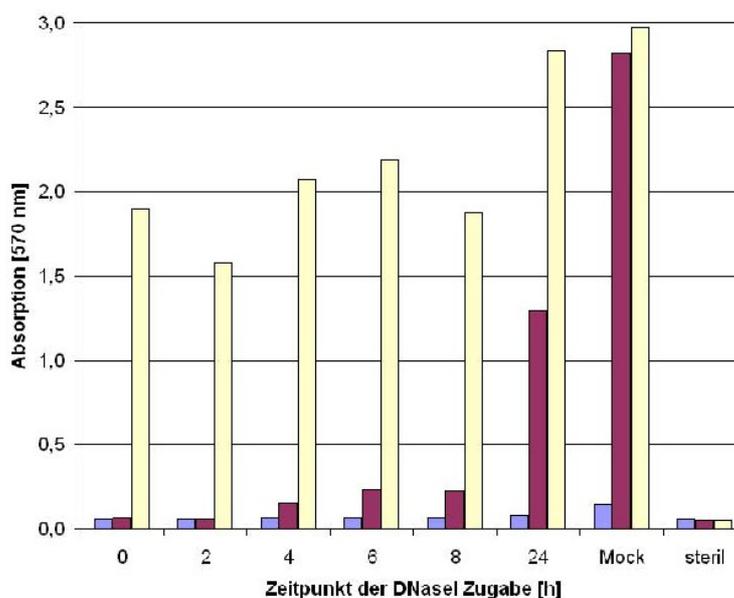
Dabei war zu beobachten, dass die Stämme 1585-RA und 5179-R1, die normalerweise *in vitro* einen proteinbasierenden Biofilm produzieren, in Anwesenheit von DNaseI einen biofilmmnegativen Phänotyp zeigten. Einzig der polysaccharidbasierende Biofilm des Stammes 1457 wies weiterhin einen biofilmpositiven Phänotyp auf.

Um auszuschließen, dass DNase die Oberfläche der Mikrotiterplatte beschichtet und damit die primäre Adhärenz unterbindet wurde der Biofilm-Assay mit den Referenzstämmen 5179 und 5179-R1 wiederholt in einer Platte, die zuvor mit DNase inkubiert wurde (Abbildung 6.2.2). Hier zeigten beide Stämme den normalen Phänotyp, 5179-R1 war biofilmpositiv, 5179 biofilmmnegativ.



**Abbildung 6.2.2: Gentianaviolettgefärbter Biofilm-Assay nach vorheriger Beschichtung mit DNaseI.**  
Belegung: 1 = *S. epidermidis* 5179-R1, 2 = 5179.

Um zu überprüfen, in welcher Phase der Biofilmbildung DNA von Bedeutung ist wurden nun zu verschiedenen Zeitpunkten DNaseI zu den Kulturen gegeben (Abbildung 6.2.3). Hierbei zeigte *S. epidermidis* 5179-R1 einen biofilmpositiven Phänotyp nur dann, wenn der Stamm vor Zugabe der DNaseI mindestens 8 h Inkubationszeit zur Verfügung hatte. Bei allen früheren Gaben präsentierte sich ein biofilmmnegativer Phänotyp. Bei *S. epidermidis* 1457, dem PIA-Referenzstamm, zeigte sich in keinem der Versuche ein biofilmmnegativer Phänotyp.



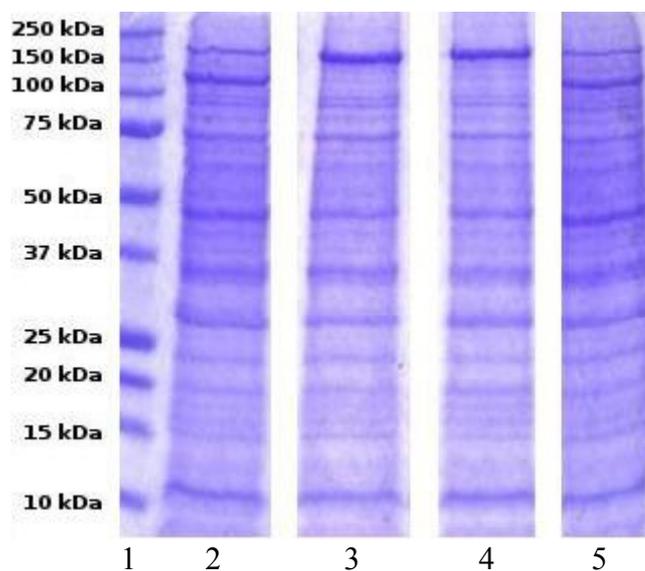
**Abbildung 6.2.3: DNaseI-Addition zu unterschiedlichen Zeitpunkten.** Absorptionen eines repräsentativen gentianaviolettgefärbten Biofilm-Assays der *S. epidermidis* Stämme 5179 (blau), 5179-R1 (rot) und 1457 (gelb) nach DNaseI-Addition.

### 6.2.2 Einfluss von Chelatbildnern

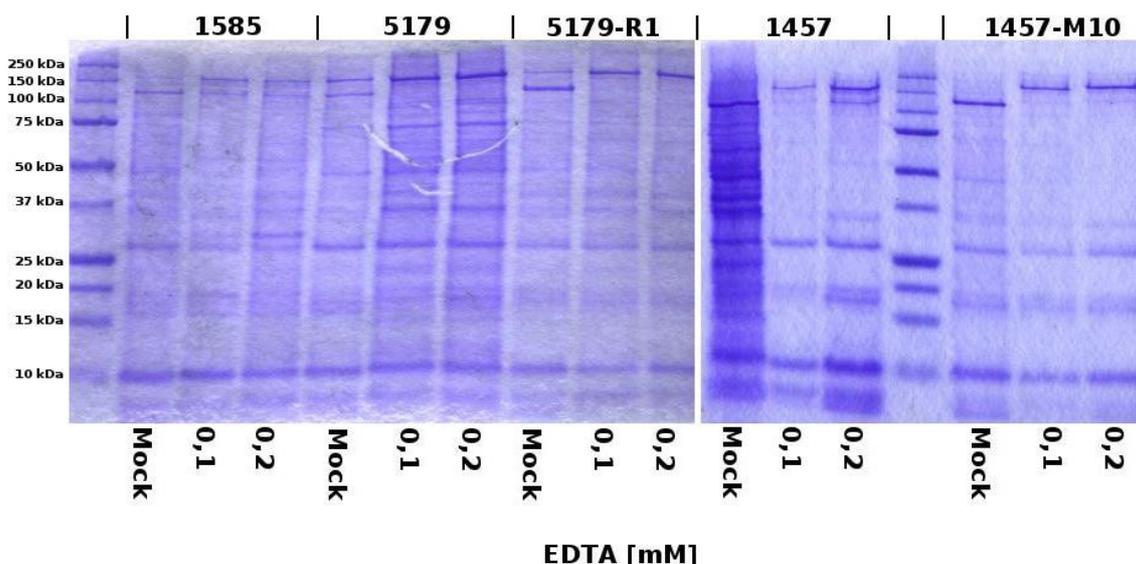
Um eine unspezifische Wechselwirkung bei der Zugabe von DNaseI auszuschließen sollte hitzeinaktivierte DNaseI als Negativkontrolle eingesetzt werden. Einfaches Aufkochen führte jedoch nicht zu einer Inaktivierung des Enzyms. Auf der Suche nach einer möglichen Abhilfe findet sich in der Literatur den Hinweis, die DNase mit EDTA aufzukochen. Dabei zeigte sich, dass der Referenzstamm 5179 in Gegenwart des EDTA-Additives zu einem biofilmpositiven Phänotyp wechselte. Dieser Effekt wurde der Anwesenheit des EDTA zugeschrieben. Zunächst sollte untersucht werden, ob EDTA die Oberfläche der Mikrotiterplatten beschichtet und dadurch zu einer unspezifischen Anheftung der Bakterien an die Polystyroloberfläche führt. Dazu wurde eine EDTA-Lösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, über Nacht inkubiert und dann vorsichtig ohne weiteres Auswaschen abgegossen. Der in den so präparierten Mikrotiterplatten inkubierte Stamm *S. epidermidis* 5179 zeigte keinen biofilmpositiven Phänotyp.

Der Stamm 5179 hat ein Insertionselement im *ICA*-Operon, weshalb dieser Stamm PIA-negativ ist. Ein biofilmpositiver Phänotyp sollte demzufolge proteinbasiert sein. Daher wurden Oberflächenproteinpräparationen nach Addition unterschiedlicher EDTA-Konzentrationen durchgeführt (Abbildung 6.2.4). Dabei zeigte sich, dass es zu einer

Veränderung der Proteinzusammensetzung kam. In der Kontrolle finden sich Banden bei 120 und 150 kDa (Bande 2), von denen nur die 150 kDa Bande in Gegenwart von EDTA nachweisbar ist (Banden 3 und 4). Sehr geringe Konzentrationen von EDTA führt zum normalen Muster (Bande 5).



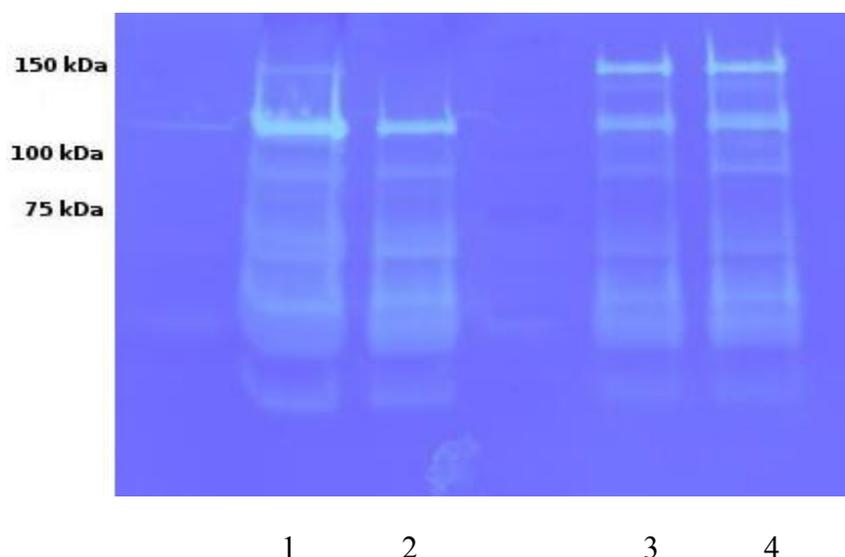
**Abbildung 6.2.4: Coomassiegefärbte SDS-PAGE von Oberflächenproteinpräparationen des Stammes 5179 nach Inkubation in Anwesenheit unterschiedlicher EDTA-Konzentrationen.** Belegung: Bande 1 = Marker, 2 = Mock, 3 = 0,1 mM EDTA, 4 = 0,05 mM EDTA, 5 = 0,001 mM EDTA.



**Abbildung 6.2.5: Coomassiegefärbte SDS-PAGE von Oberflächenproteinpräparationen mehrerer Referenzstämme nach EDTA-Zugabe.**

Der Versuch wurde mit den EDTA-Konzentrationen 0,1 mM und 0,2 mM unter Verwendung der Referenzstämmen 1457, 1457-M10, 1585, 5179 und 5179-R1 wiederholt (Abbildung 6.2.5). Dabei zeigte sich, dass unter Addition von EDTA bei allen Stämmen die Banden bei 150 kDa, bzw. 120 kDa Veränderungen unterworfen sind. Bei den Stämmen 1457 und 1457-M10 findet sich in der Kontrollpräparation ausschließlich das 120 kDa Protein, während eine EDTA-Zugabe dieses gänzlich verschwinden lässt. Stattdessen findet sich ein Protein von 150 kDa. Bei den Stämmen 5179 und 5179-R1 finden sich in der Kontrolle beide Proteine, unter Verwendung von EDTA verschwindet, wie auch bei den zuvor genannten Stämmen, das 120 kDa Protein. Einzig beim Referenzstamm 1585 sind nach EDTA-Zugabe Banden beider Proteine zu finden.

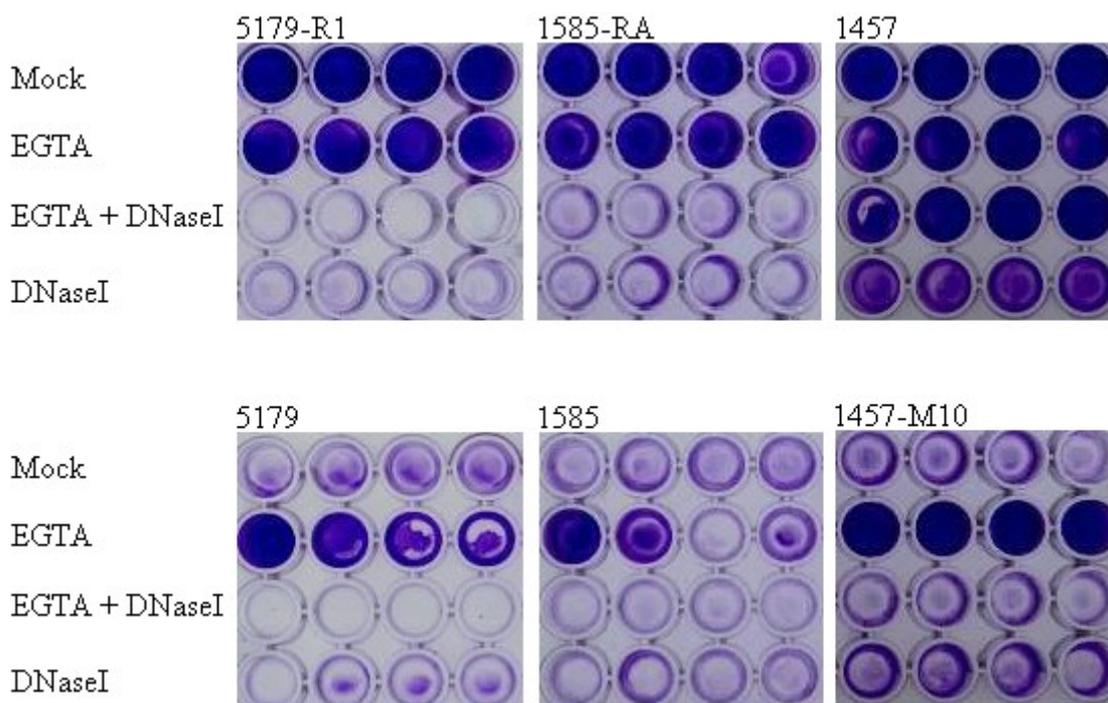
Die Banden entsprechen in ihrer Größe denen des AtlE. Aufgrund der Vermutung, bei der 150 kDa Bande würde es sich um eine unprozessierte Form des AtlE handeln, wurde die enzymatische Aktivität der Proteine durch ein Zymogramm untersucht (Abbildung 6.2.6). Verwendet wurden Oberflächenproteinpräparationen der Stämme 5179 und 5179-R1 mit Zusatz von H<sub>2</sub>O als Kontrolle, bzw. EGTA als Chelatbildner. Da sich herausstellte, dass die Bakterien in Gegenwart von EGTA besser wachsen als in Gegenwart von EDTA, die oben beschriebenen Effekte jedoch identisch sind, wurde fortan EGTA als Chelator verwendet.



**Abbildung 6.2.5: Zymogramm der Kulturüberstände der Stammes 5179 und 5179-R1 mit und ohne EGTA.** Bahn 1: *S. epidermidis* 5179 Mock, Bahn 2: *S. epidermidis* 5179-R1 Mock, 3: 5179 + EGTA [1 mM], Bahn 4: 5179-R1 + EGTA [1 mM].

In der Kontrolle zeigt sich eine kräftige Lysbande bei 120 kDa, das 150 kDa Protein ist nur beim Stamm 5179 sehr schwach zu erkennen. Die Präparationen der in EGTA angezogenen Stämme zeigt in der Höhe von 120 kDa etwas schwächere Lyse des Substrates, hinzu kommt jeweils eine starke Lysebande bei 150 kDa.

Es ergab sich nun eine spannende Frage: Wenn biofilmpositive Stämme durch Zugabe von DNase I zu einem biofilmbnegativen Phänotyp und biofilmbnegative Stämme durch Addition eines Chelators wie EDTA oder EGTA zu einem biofilmpositiven Phänotyp überführt werden können, welchen Effekt hat die gleichzeitige Addition von Chelator und DNaseI? Zur Beantwortung dieser Frage wurden Biofilm-Assays der Referenzstämme mit Addition von EGTA, DNaseI, sowie EGTA mit DNaseI angefertigt (Abbildung 6.2.7).



**Abbildung 6.2.7: Gentianaviolettgefärbte Biofilm-Assays mehrerer Referenzstämme nach Addition von EGTA, EGTA+DNaseI und DNaseI.**

Wie erwartet zeigen biofilmpositive Stämme mit proteinbasierendem Biofilm durch Addition von DNaseI einen biofilmbnegativen Phänotyp (5179-R1, 1585-RA). Die Addition von EGTA oder H<sub>2</sub>O in der Kontrolle führen zu keinen Veränderungen. In der Kombination von DNase und EGTA zeigen diese Stämme, wie auch bei DNase I allein, einen biofilmbnegativen

Phänotyp. Einzig der PIA-Referenzstamm 1457 ist in allen Versuchsanordnungen stets biofilmpositiv.

Die normalerweise biofilmb negativen Stämme 1457-M10, 1585 und 5179 werden durch EGTA-Addition wie erwartet biofilmpositiv. Die zeitgleiche Exposition von DNaseI und EGTA führt, wie auch bei den biofilmpositiven Referenzstämmen 1585-RA und 5179-R1, zu einem biofilmb negativen Phänotyp.

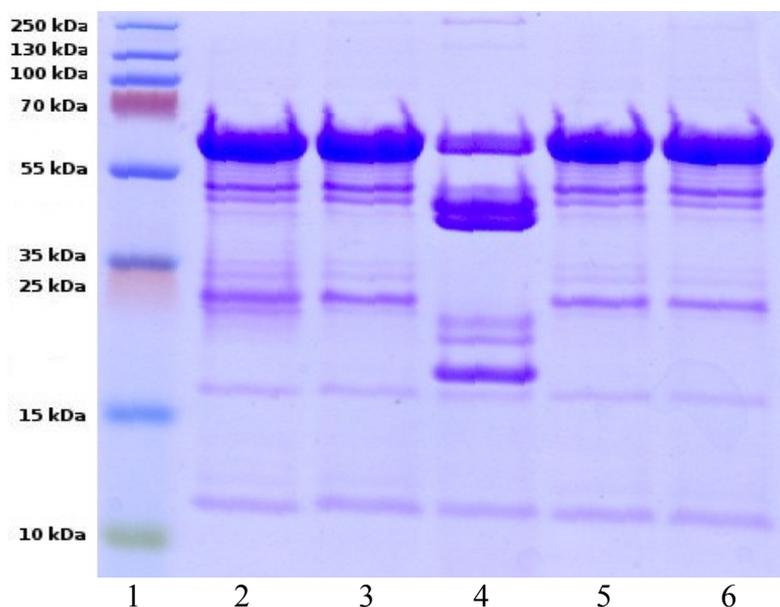
## 6.3 Prozessierung von AtlE

### 6.3.1 Prozessierung der repetitiven Sequenzen

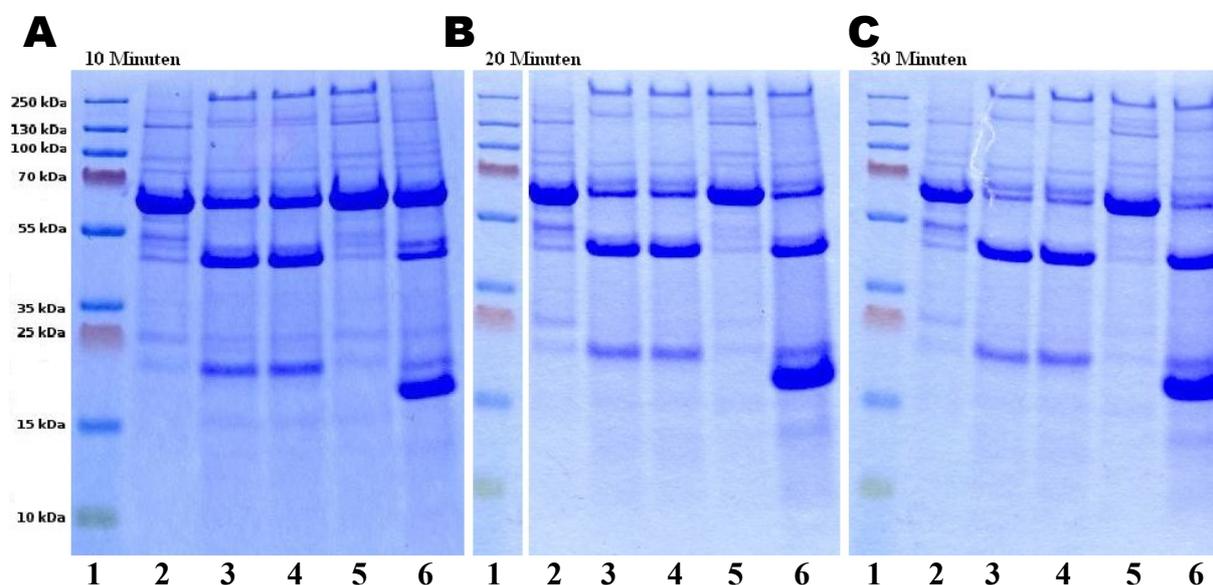
Das Autolysin AtlE besitzt, wie bereits beschrieben, drei Prozessierungsstellen, von denen zwei an der Zelloberfläche durch Proteasen prozessiert werden müssen. Eine Kandidatin für diese Prozessierung ist die Protease SepA. SepA wird durch SarA reguliert. SarA ist dabei ein negativer Regulator, das heißt, dass die Gegenwart von SarA die Expression von SepA herunterreguliert. Der Stamm 1457-M10 $\Delta$ *sarA* weist eine Deletion des *sarA*-Gens auf (Handke *et al.* 2007), wodurch es zu einer Überexpression der Protease SepA kommt. Diese wird von den Bakterien exportiert und findet sich im Kulturüberstand, ideal für Prozessierungsexperimente. Die Schnittstellen der Protease liegen zwischen dem Propeptid (PP) und der Amidase (AM), bzw. zwischen Amidase und Glucosaminidase (GL) (Heilmann *et al.*, 1997), (Milohanic *et al.*, 2001). Es wurden darum zwei Proteine rekombinant hergestellt: Das Propeptid mit dem Anfang der Amidase (PPAM<sub>kurz</sub>), sowie die drei repetitiven Sequenzen (R1-3), die das Ende der Amidase und den Anfang der Glucosaminidase bilden.

Nachdem der Expressionsvektor für die Sequenzen R1-3 fertiggestellt war wurde per PCR die Spezifität und die Größe des Inserts bestätigt. Außerdem wurde durch Sequenzierung sichergestellt, dass keine Mutationen während der Klonierung aufgetreten sind. Anschließend erfolgte die Expression und die Aufreinigung der Proteine durch Affinitätschromatographie.

Mit den rekombinanten Proteinen wurden nun die Experimente zur Prozessierung gemäß der Beschreibung im Methodenteil zunächst mit dem rekombinanten Protein R1-3 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bei Verwendung der Kulturüberstände des Stammes 1457-M10 $\Delta$ SarA das rekombinante R1-3 im SDS-PAGE nicht mehr wie in der Kontrolle in seiner ursprünglichen Größe von 60 kDa nachweisbar war, sondern zwei neue Banden von 40 kDa,



**Abbildung 6.3.1: Coomassiegefärbte SDS-PAGE der Inkubation des rekombinanten Proteins R1-3 mit Kulturüberständen.** Belegung: Bahn 1 = Marker, 2 = Mock, 3 = 1457-M10, 4 = 1457-M10 $\Delta$ SarA, 5 = 1457-M10 $\Delta$ SepA, 6 = 1457-M10 $\Delta$ SarA $\Delta$ SepA.



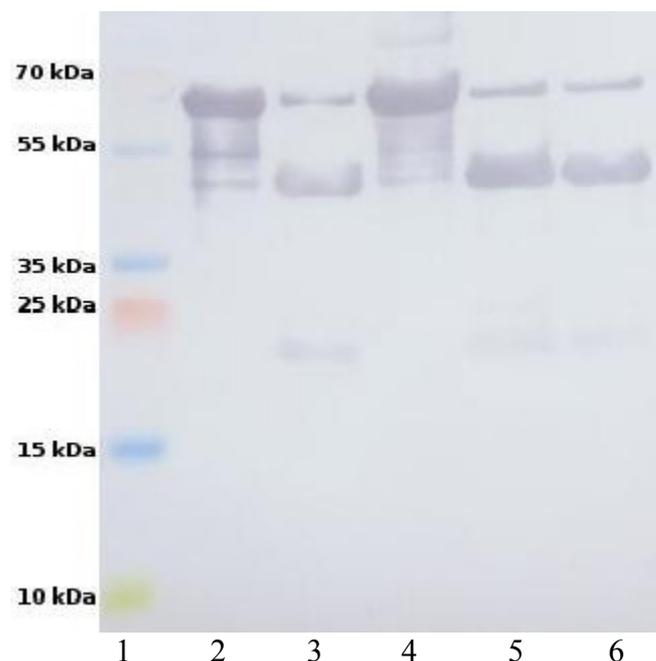
**Abbildung 6.3.2: Coomassiegefärbte SDS-PAGEs der Inkubationen des rekombinanten Proteins R1-3 mit Kulturüberständen des Stammes 1457-M10 $\Delta$ SarA für 10 Minuten (Abbildung A), 20 Minuten (Abbildung B) und 30 Minuten (Abbildung C) unter Verwendung unterschiedlicher Inhibitoren.** Bahnen: 1 = Marker, 2 = Mock, 3 = Überstand  $\Delta$ SarA, 4 = Überstand  $\Delta$ SarA + E64, 5 = Überstand  $\Delta$ SarA + EDTA, 6 = Überstand  $\Delta$ SarA + Trypsininhibitor.

bzw. 20 kDa auftauchten (Abbildung 6.3.1, Bahnen 2 und 5). Die Kulturüberstände der

Stämme 1457-M10 $\Delta$ SepA und 1457-M10 $\Delta$ SarA $\Delta$ SepA zeigten diese Veränderungen nicht (Bahnen 3 und 4).

Um zu demonstrieren, dass eine Prozessierung durch Proteasen vorliegt wurde der Versuch unter Verwendung verschiedener Proteaseinhibitoren mit den Inkubationszeiten 10, 20 und 30 Minuten wiederholt (siehe Abbildung 6.3.2). Die Addition von E64, einem Cysteinproteaseinhibitor (Bahnen 4, 10 und 16), zeigte genauso wie die Zugabe von Trypsininhibitor, einem Serinproteaseinhibitor (Bahnen 6, 12 und 18), keine Inhibition der Prozessierung. Die Addition von EDTA allerdings unterband die Prozessierung von R1-3 zu allen Zeitpunkten (Bahnen 5, 11 und 17).

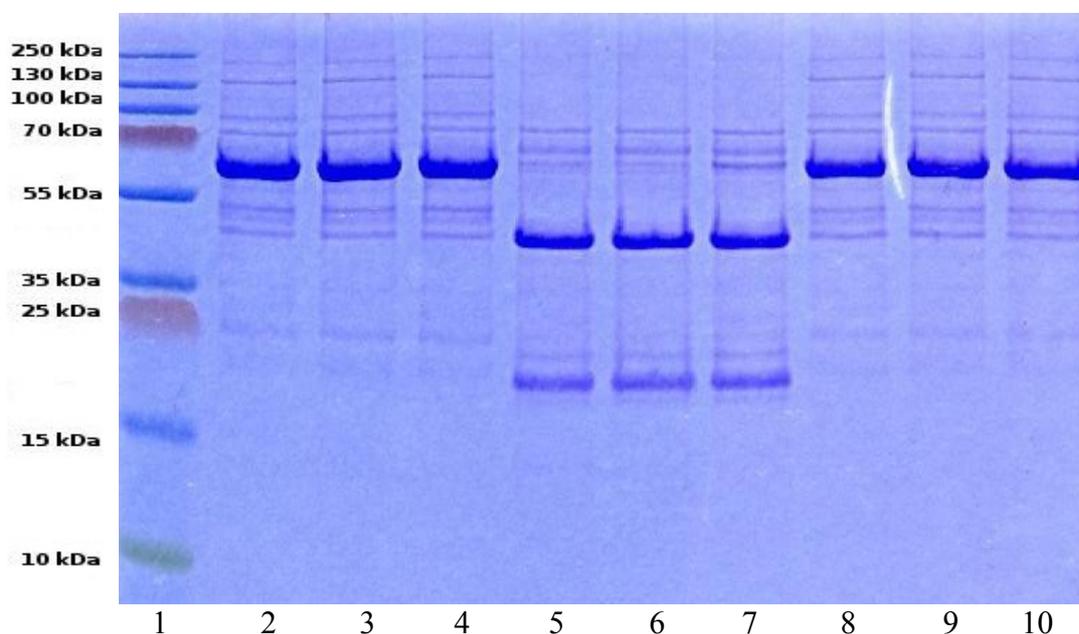
Es sollte nun sichergestellt werden, dass tatsächlich das rekombinante Protein prozessiert wird und nicht unspezifische Banden z.B. aus Bestandteilen des Mediums dargestellt werden. Dazu wurde aus einem SDS-PAGE ein Westernblot angefertigt und mittels eines Anti-Polyhistidin-Antikörper der Polyhistidinanhang am N-terminalen Ende des rekombinanten Protein R1-3 nachgewiesen (siehe Abbildung 6.3.3).



**Abbildung 6.3.3: Mit Western Blue<sup>®</sup> detektierter Westernblot von mit Kulturüberständen inkubiertem rekombinanten Protein R1-3.**  
 Belegung: 1 = Marker, 2 = Mock, 3 = Überstand  $\Delta$ SarA, 4 = Überstand  $\Delta$ SarA + EGTA, 5 = Überstand  $\Delta$ SarA + E64, 6 = Überstand  $\Delta$ SarA + Trypsininhibitor.

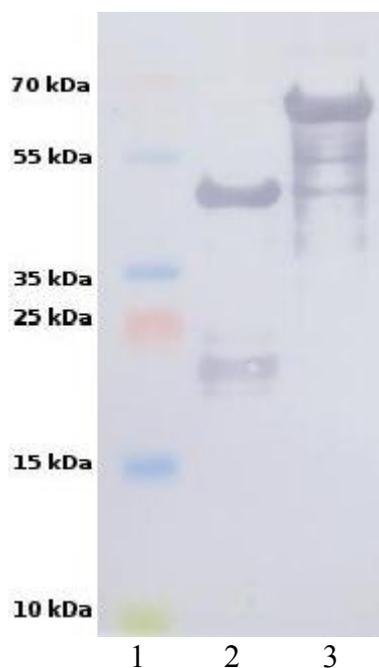
Es präsentierte sich das selbe Ergebnis wie zuvor im SDS-PAGE. In der Kontrolle war keine Prozessierung zu erkennen (Bahn 2). Auch die Zugabe von EDTA zum Kulturüberstand des Stammes 1457-M10 $\Delta$ SarA führte nicht zu einer Prozessierung. Durch den Kulturüberstand ohne EDTA wurde das rekombinante Protein R1-3 wieder in Proteine zu 40 kDa und 20 kDa gespalten, auch die Zugabe von E64 oder Trypsininhibitor änderten daran nichts (Bahnen 3, 5 und 6). Der Antikörper detektiert in dieser Versuchsanordnung nur die Bande der Repeats 1 und 2 bei 40 kDa, da der Repeat 3 (zu erwarten bei 20 kDa) nicht über einen Polyhistidinanhang verfügt.

Wie bereits beschrieben ist die Expression von SepA im Stamm 1457-M10 $\Delta$ SarA erhöht. Um zu überprüfen, ob die beschriebene Prozessierung des Proteins R1-3 tatsächlich durch diese Protease durchgeführt wird, wurden in den folgenden Versuchen anstelle der bakteriellen Kulturüberstände kommerziell produzierte Protease SepA (Serva, Heidelberg) aus *Staphylococcus aureus* verwendet (siehe Abbildung 6.3.4). Auch hier erzielte die Inkubation wie bei Gebrauch der Überstände von 1457-M10 $\Delta$ SarA eine Spaltung in die Banden zu 40 kDa und 20 kDa (Spuren 5 bis 7). Addition von EDTA führte wiederum zu einer Inhibition der Prozessierung (Spuren 8 bis 10). Auch von diesem Versuchsaufbau wurde ein Westernblot



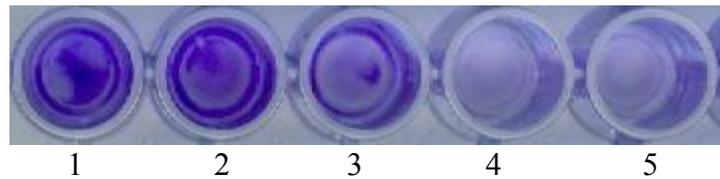
**Abbildung 6.3.4: Coomassiegefärbte SDS-PAGE der Prozessierung des rekombinanten Proteins R1-3 durch SepA innerhalb 3, 4 und 5 Minuten Inkubationszeit.** Belegung: 1 = Marker, 2 = Mock (3 Minuten), 3 = Mock (4 Minuten), 4 = Mock (5 Minuten), 5 = R1-3 + SepA (3 Minuten), 6 = R1-3 + SepA (4 Minuten), 7 = R1-3 + SepA (5 Minuten), 8 = R1-3 + SepA + EDTA (3 Minuten), 9 = R1-3 + SepA + EDTA (4 Minuten), 10 = R1-3 + SepA + EDTA (5 Minuten).

angefertigt und selbiger mit dem Anti-Polyhistidin-Antikörper detektiert (Abbildung 6.3.5). Wie zuvor im SDS-PAGE konnte die Prozessierung durch SepA beobachtet werden (Bahn 2), der Einsatz von EGTA (Bahn 3) unterband die Prozessierung.



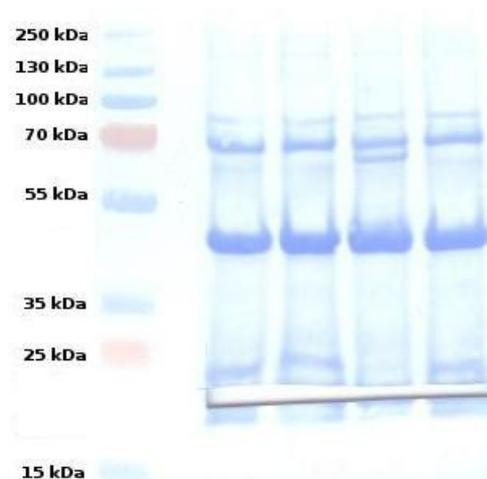
**Abbildung 6.3.5: Mit Western Blue<sup>®</sup> detektierter Westernblot von mit SepA inkubiertem rekombinanten Protein R1-3.** Belegung: 1 = Marker, 2 = SepA, 3 = SepA + EGTA.

Anschließend wurde nun ein Biofilm-Assay mit dem Stamm 1457-M10 $\Delta$ SepA durchgeführt um zu überprüfen, ob Zugabe der kommerzielle Protease SepA zu den Kulturen zu einem biofilmpositiven Phänotyp führt, so, wie es auch beim Stamm 1457-M10 $\Delta$ SarA, bei dem die Protease SepA hoch reguliert ist, der Fall ist. Diese Überlegung bestätigte sich (siehe Abbildung 6.3.6). Die Stärke der Biofilmbildung war dabei konzentrationsabhängig. Nach 24 h Inkubationszeit zeigten Konzentrationen von 500 und 50 nM SepA eine deutliche Biofilmbildung (Näpfe 1 + 2). Eine SepA-Konzentration von 5 nM führte zu einem sehr schwachen Biofilm (Napf 3), 0,5 nM und 50 pM waren annähernd als biofilmnegativ zu beschreiben (Näpfe 4 + 5).



**Abbildung 6.3.6: Gentianaviolettgefärbter Biofilm-Assay des Stammes 1457-M10 $\Delta$ SepA unter Zugabe verschiedener Konzentrationen von SepA.** Napf: 1 = 500 nM SepA, 2 = 50 nM SepA, 3 = 5 nM SepA, 4 = 0,5 nM SepA, 5 = 50 pM SepA.

Entsprechend der Literatur ist eine Spaltung von R1-3 zwischen den Repeats 2 und 3 zu erwarten (Milohanic *et al.*, 2001). Um die genaue Sequenz der Schnittstelle zu ermitteln sollte eine N-terminale Sequenzierung des Repeat 3 durchgeführt werden. Zunächst wurde das rekombinante Protein R1-3 für 30 Minuten bei 37 °C mit der Protease SepA prozessiert; es wurden für eine höhere Ausbeute 4 Ansätze parallel bearbeitet. Die prozessierten Proteine wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und daraus ein Westernblot angefertigt (siehe auch Abbildung 6.3.7). Anstelle einer Detektion mit Antikörpern wurde dieser Blot ohne vorheriges



**Abbildung 6.3.7: Coomassiegefärbter Westernblot des durch SepA prozessierten rekombinanten Proteins R1-3.** Die Bande bei 20 kDa wurde zur N-terminalen Sequenzierung ausgeschnitten. Die kräftige Bande bei ca. 40 kDa entspricht den Repeats 1-2.

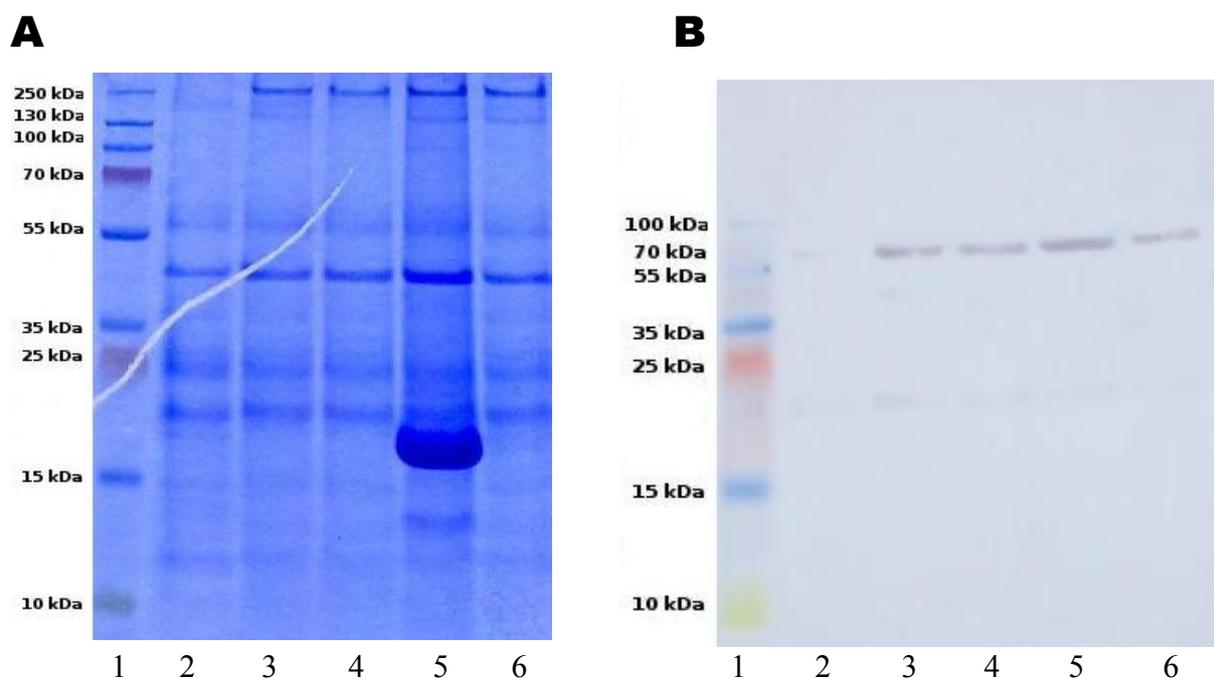
Blocken mit BSA direkt mit Coomassie gefärbt, die 20 kDa Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und zur N-terminalen Sequenzierung abgegeben. Die Sequenzierung ergab die folgende Aminosäuresequenz:

**LSTQSTPAK**

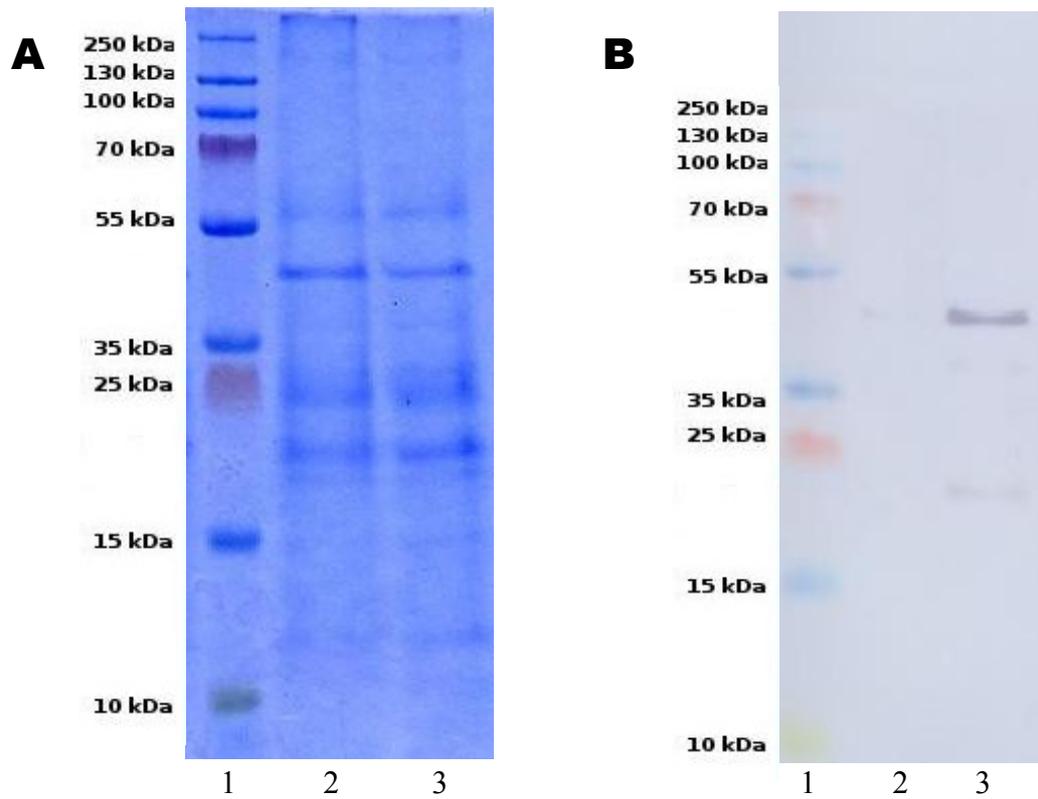
Die Überprüfung dieser Sequenz über die Suchfunktion von BLAST der Proteindatenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit der Sequenz des Autolysins von verschiedenen Stämmen der Gattung *Staphylococcus epidermidis*, darunter der Referenzstamm RP62A.

### 6.3.2 Prozessierung des Propeptids

Es folgte nun die Inkubation des rekombinanten Protein  $\text{PPAM}_{\text{kurz}}$ , also des Propeptids mit dem Beginn der Amidase, mit dem Kulturüberstand des Stammes 1457-M10 $\Delta$ SarA. Allerdings zeigte weder die Inkubation des Proteins mit den Kulturüberständen (Abbildung 6.3.8), noch die Inkubation mit der Protease SepA (Abbildung 6.3.9) eine Prozessierung des Proteins.



**Abbildung 6.3.8: Inkubation des rekombinanten Proteins  $\text{PPAM}_{\text{kurz}}$  mit Kulturüberständen des Stammes 1457-M10 $\Delta$ SarA. A zeigt eine coomassiegefärbte SDS-PAGE, B zeigt einen Westernblot, detektiert mit Anti-Polyhistidin-Antikörper. Belegung ist in beiden Fällen: 1 = Marker, 2 = Mock, 3 = Überstand  $\Delta$ SarA, 4 = Überstand  $\Delta$ SarA + EGTA, 5 = Überstand  $\Delta$ SarA + Trypsininhibitor, 6 = Überstand  $\Delta$ SarA + E64.**



**Abbildung 6.3.9: Inkubation des rekombinanten Proteins PPAM<sub>kurz</sub> durch SepA.** A zeigt eine coomassiegefärbte SDS-PAGE, B zeigt einen Westernblot, detektiert mit Anti-Polyhistidin-Antikörper. Belegung ist in beiden Fällen: 1 = Marker, 2 = SepA, 3 = SepA + EGTA.

## **7. Diskussion**

### **7.1 Untersuchung der Interaktionen der Domäne B des Accumulation associated proteins (Aap) mit den Autolysin E im Yeast-Two-Hybrid-System**

#### **7.1.1 Betrachtung der Kontrollen**

Bei Betrachtung des ersten Teils der Ergebnistabelle (Tabelle 6.1.1) erscheinen alle Ergebnisse wie erwartet. Die Kombinationen aus einem zu untersuchenden Vektor mit einem leeren Vektor zeigen wie erwartet keinerlei Interaktion. Falsch positive Ergebnisse durch Interaktion der Aktivator-domäne mit der DNA-Bindedomäne ohne Einfluss der zu untersuchenden Proteine können demnach ausgeschlossen werden. Die Kontrollvektoren zeigen die vom Hersteller angegebene deutliche, schwache, bzw. nicht erkennbare Interaktion auf den Auxotrophiemedien. Die etwas schwächer ausfallenden Ergebnisse beim Blue-White-Screening lassen sich erklären durch einen nicht optimalen Zellaufschluss bei der Behandlung mit flüssigen Stickstoff. Insgesamt zeigt sich jedoch die erwartete Abstufung der Intensitäten. Die leichte Minderung ließe sich ausgleichen, indem die Kulturen länger als die angegeben 48 h bebrütet werden oder anstelle der Verwendung des Replikationsstempels zur Beimpfung der Platten die Kolonien direkt auf die Membrane aufgetragen werden. Dadurch würde nach der Inkubation mehr Zellmaterial zum Aufschluss zur Verfügung stehen und die Intensität der Ergebnisse vermutlich verstärken. Ein zweimaliges Übergießen mit flüssigen Stickstoff zur Optimierung der Aufschlussrate sollte nicht durchgeführt werden, da die Membranen in der Regel bereits nach der ersten Behandlung Einrisse erleiden. Bei einer weiteren Aussetzung der extremen Temperatur des flüssigen Stickstoffs wäre eine Zerstörung der Membran zu befürchten, wodurch die Auswertung stark erschwert oder gar unmöglich werden würde.

#### **7.1.2 Betrachtung der Untersuchungsergebnisse**

Ein Blick auf den zweiten Teil der Tabelle führt, auch unter Berücksichtigung der den Erwartungen entsprechenden Kontrollen, zunächst wie selbstverständlich zu der Annahme, es würden zwischen den untersuchten Proteinen keine Interaktionen stattfinden. Diskutiert man die vorliegenden Ergebnisse jedoch unter Einbindung früherer Ergebnisse zu diesem Thema ergeben sich Zweifel. Im Vorwege wurden innerhalb der Arbeitsgruppe Rohde durch Christoph Burdelski Versuche zu möglichen Interaktionspartnern von Aap unternommen. Dabei zeigte sich, dass an eine Säulenmatrix gebundenes Aap beim Durchlauf von

Oberflächenproteinpräparationen ein Protein, das als AtlE identifiziert werden konnte, an das gebundene Aap adhären konnte. Eine Interaktion von rekombinanter Domäne GL, also der Glucosaminidase des AtlE, mit rekombinanter Domäne B des Aap konnte bei Versuchen während meiner Diplomarbeit durch einen Far-Westernblot bestätigt werden. Da es nicht möglich war, größere Mengen rekombinant exprimierter Amidase herzustellen, ein Phänomen, von dem auch andere Arbeitsgruppen berichten, sollten die Untersuchungen in einem alternativen System wiederholt werden. Zumindest zwischen Domäne B und GL wäre eine Bestätigung der Ergebnisse wenigstens in Form einer schwachen Interaktion zu erwarten gewesen. Dies war nicht der Fall. Dafür kommen mehrere Punkte als Erklärung in Betracht:

Eine theoretisch mögliche letale Wirkung der untersuchten Proteine auf die Hefe ist auszuschließen, da zum Einen Vektoren verwendet werden, die in äußerst geringer Kopienanzahl vorliegen, wodurch die Anzahl der exprimierten Fusionsproteine des Bait- und Prey-Komplex sehr niedrig ausfällt. Zum Anderen zeigen die Hefen ansonsten ein normales Wachstum, das heißt die Transformanten wuchsen auf vergleichbare Zellzahlen innerhalb des selben Zeitraumes wie die Kontrollstämme. Da die Expression von Bait und Prey konstitutiv erfolgt dürften die Transformanten bei einer Intoxikation folglich generell nicht oder zumindest nur eingeschränkt wachsen.

Auch das Fehlen von für die Interaktion benötigten bakteriellen Kofaktoren scheint unwahrscheinlich, da bei dem ersten chromatographischen Ansatz zwar komplette Oberflächenproteinpräparationen verwendet wurden, bei den Far-Westernblot allerdings aufgereinigte, in *E. coli* rekombinant exprimierte Proteine zum Einsatz kamen, so dass hier keine weiteren Proteine aus Staphylokokken beteiligt gewesen sein können.

Ein weiterer Problemursprung ist die Möglichkeit der Fehlfaltung, wodurch sich eine völlig andere Geometrie eines oder gar beider Proteine ergibt und damit ihre Bindungsfähigkeit verloren geht. Für eine Fehlfaltung kommen drei Umstände in Betracht. Erstens kann es durch die Fusion an die DNA-Bindedomäne, bzw. an die Aktivator-domäne zu einer Beeinflussung des fusionierten Proteins kommen, die in einer Fehlfaltung resultiert. Zweitens ist eine Fehlfaltung der Proteine durch Chaperone der Hefe möglich. Die Dritte Fehlerquelle liegt bei ungünstigen Milieubedingungen, da die Interaktion nur im Zellkern untersucht werden kann, weil nur dort die Transkription durchgeführt wird. Dieses Milieu entspricht unter Umständen nicht den optimalen Bedingungen für bakterielle Proteine.

Die naheliegendste Erklärung aber ist die, dass die Untersuchung von prokaryotischen Proteinen in einem eukaryotischen System nicht problemlos funktioniert. Es kann ohne eingehende Untersuchung der Fusionsproteine nicht ausgeschlossen werden, dass es zu posttranslationalen Modifikationen wie Palmitoylierung, dem Anhängen von Fettsäuren, oder Glykosylierungen, dem Anhängen von Zuckerketten, gekommen ist. In beiden Fällen kann die Interaktion der untersuchten Proteine gestört werden, zum Beispiel weil die an der Bindung beteiligten Epitope durch die Modifikation verändert wurden und dadurch nicht mehr binden können, oder weil durch Modifikationen in der direkten Umgebung der Interaktionsbereich abgeschirmt wird und dadurch nicht mehr zugänglich ist.

### 7.1.3 Ausblick

Soll das Yeast-Two-Hybrid-System zukünftig für die Interaktionsuntersuchung von Oberflächenproteinen aus Staphylokokken verwendet werden ist es unumgänglich, aus den vorliegenden Transformanten eine Präparation von Bait und Prey durchzuführen. Erstens muss überprüft werden, ob Bait und Prey überhaupt exprimiert werden, zum Beispiel durch einen Immunoblot unter Verwendung von spezifischen Antikörpern sowohl gegen die Staphylokokkenproteine als auch gegen die Aktivator-, bzw. die DNA-Bindedomäne, um falsch negative Ergebnisse durch Epitopveränderungen aufgrund von Fehlfaltung oder posttranslationaler Modifikation der zu untersuchenden Proteine auszuschließen. Zweitens müssen die Proteine auf eben jene Modifikationen untersucht werden.

Denkbar wäre es, als ersten Schritt eine SDS-PAGE durchzuführen, da im Falle von posttranslationalen Modifikationen das Protein größer werden sollte. Auch lassen sich auf eine Membran transferierte Glykoproteine anfärben, zum Beispiel durch Periodsäure und Schiff's Reagenz.

Zusätzlich kann ein Trypsinverdau mit anschließender Massenspektrometrie durchgeführt werden. Vergleicht man die aus Hefen präparierten Proteine mit rekombinant exprimierten, so ließen sich Rückschlüsse daraus ziehen, welcher Teil, bzw. welche Teile des Proteins modifiziert wurden. Diese Bereiche wären dann Kandidaten für mögliche Bindungsstellen, da ja die Bindungsfähigkeit scheinbar nach erfolgter Modifikation abgenommen hat.

---

## 7.2 Die Rolle von AtlE bei der *Staphylococcus epidermidis* Biofilmbildung

### 7.2.1 DNA-Freisetzung

Die ursprüngliche Annahme, bei DNA im Biofilm würde es sich um ein Artefakt handeln, dass durch die natürliche Lyse abgestorbener Zellen freigesetzt wird und in der Biofilmmatrix verbleibt, scheint überholt. Neuere Publikationen sprechen der DNA eine entscheidende Rolle im Konzept des Biofilm zu (Qin *et al.*, 2006) (Qin *et al.*, 2007) (Vilain *et al.*, 2009). Dies beinhaltet nicht nur einen Beitrag zur statischen Integrität der Matrix, sondern auch die Antibiotikaresistenz kann durch die Präsenz von eDNA erhöht werden (Tetz *et al.*, 2009) (Vilain *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Addition von DNase zum Biofilm-Assay zu einer deutlichen Veränderung des Phänotyps bei proteinbasierenden Biofilmen führt. Die normalerweise biofilmpositiven Stämme 1585-RA und 5179-R1 lassen sich in einen biofilmm negativen Phänotyp überführen, wobei es nicht zu einer Beschichtung der Mikrotiterplattenoberfläche kommt. Eine Beeinflussung der primären Adhärenz durch veränderte Eigenschaften der Plastikoberfläche kann also ausgeschlossen werden. Nicht auszuschließen ist allerdings eine Interaktion der verwendeten DNase mit Teilen der Zelloberfläche der Bakterien. Dadurch wäre eine Adhärenz an das Kulturgefäß unterbunden, weil die hierfür verantwortlichen Adhäsine nicht mehr direkt mit dem Kunststoff in Wechselwirkung treten können. Für den Stamm 1457, der PIA-positiv ist, kann dies nur eingeschränkt gelten, da diese Polymere recht beachtliche Längen erreichen können und damit eine Möglichkeit bestünde, die durch die fremden Proteine entstandene Distanz zu überbrücken. So zeigt dieser Stamm auch einen biofilmpositiven Phänotyp trotz Addition von DNase, allerdings ist der Biofilm schwächer als in der Kontrolle. Es würde sich also zukünftig empfehlen, die Bindungsfähigkeit der DNase an die Bakterielle Zelloberfläche zu untersuchen, zum Beispiel durch einen Far-Westernblot, bei dem man DNase auf geblottete Oberflächenprotein gibt. Allerdings blieben bei diesem Versuchsaufbau andere Bestandteile wie Lipoteichonsäuren unberücksichtigt.

Die genannten Referenzstämme 1585-RA und 5179-R1 zeigen einen biofilmpositiven Phänotyp, wenn die DNase nach mehr als 8 h Inkubationszeit zugegeben wird. Daraus ließe sich ableiten, dass in der frühen Phase der Biofilmbildung eDNA eine entscheidende Rolle in der primären Anheftung an eine Oberfläche spielt. In diesem Fall wären die Bakterien

aufgrund fehlender eDNA nicht in der Lage, an den Kunststoff zu adhären, eine Biofilmbildung bliebe aus. Der PIA-bildende Stamm 1457 zeigt zwar einen biofilmpositiven Phänotyp, allerdings führt die DNase-Addition zu einer deutlichen Abschwächung der Intensität. Geht man von obiger These aus scheint PIA eventuelle adhäsive Eigenschaften der eDNA zumindest teilweise ausgleichen zu können.

Ebenfalls plausibel erscheint die stabilisierende Funktion der eDNA. DNA ist ein verhältnismäßig großes Molekül. Wird es in die Biofilmmatrix integriert, so kann es, ähnlich wie die Glasfasern in einem verstärkten Kunststoff (GFK) die Statik verbessern. Unterstützt wird dieses durch die Beobachtungen während der Oberflächenproteinpräparationen. Die mit DNase inkubierten Kulturen ließen sich deutlich leichter aus den Kulturgefäßen lösen und besser resuspendieren. Fehlt die eDNA fehlt dem gesamten Biofilm möglicherweise die Stabilität, der Beanspruchung während der Waschschrte bei der Auswertung des Biofilm-Assays zu widerstehen.

Gegen eine Beschichtung der Bakterienoberfläche durch DNase und für eine adhäsive/statische Bedeutung der eDNA spricht auch der Umstand, dass Bakterien wie *S. epidermidis* oder *S. aureus* zu Beginn der Oberflächenbesiedlung eine erhöhte Autolyserate aufweisen (Rice *et al.*, 2007) (Mann *et al.*, 2009) (Thomas *et al.*, 2009), gerade so, als würden gezielt Zellen zur eDNA-Erzeugung lysiert. Eine passende Beobachtung konnte im Vorfeld dieser Arbeit bei vergleichenden Wachstumskurven der Stämme 5179 und 5179-R1 gemacht werden. Hier zeigte sich, dass der Biofilmbildner 5179-R1 eine höhere Zelldichte während der exponentiellen Wachstumsphase erreicht, dann aber sofort, also ohne eine deutliche Plateauphase zu präsentieren, abstirbt. Im Gegensatz zum biofilmmnegativen Stamm 5179, der eine dem Lehrbuch entsprechende Wachstumskurve zeigte, konnten in den Kulturüberständen von 5179-R1 Autolysine zymographisch nachgewiesen werden.

### 7.2.1 Die Prozessierung von AtlE

Das Autolysin AtlE unterliegt einer proteolytischen Prozessierung an der Zelloberfläche, das ist seit einiger Zeit bekannt (Heilmann *et al.* 1997), (Milohanic *et al.* 2001). Bisher war jedoch nicht bekannt, durch welche Protease oder Proteasen die Prozessierung durchgeführt wird, bzw. werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Chelatbildner wie EDTA oder EGTA die Fähigkeit zur Biofilmbildung modifizieren können und sich in der Folge die Oberflächenproteinzusammensetzung verändert, bzw. auf die Prozessierung einiger

Oberflächenproteine Einfluss genommen wird. Es lag also nahe anzunehmen, dass eine oder mehrere Metalloproteasen an der Prozessierung beteiligt sein müssen, da solche Proteasen durch Chelatoren inhibiert werden können. Eine sehr wichtige Metalloprotease aus *S. epidermidis* ist SepA. Diese Protease wurde erstmals von Teufel und Götz beschrieben (Teufel & Götz, 1993). Weiterhin wird diese Protease im Zusammenhang mit Pathogenität erwähnt, sie wird zum Beispiel als Elastase beschrieben (Duggirala *et al.*, 2007). Außerdem steigt bei SepA-Expression die Überlebensfähigkeit von Staphylokokken nach Aufnahme durch neutrophile Leukozyten (Cheung *et al.*, 2010). Interessanterweise unterliegt die Expression von SepA der Regulation von SarA (Lai *et al.*, 2007), einem Regulator für die Biofilmbildung, der neben  $\sigma^B$  auch die Expression von PIA beeinflussen kann (Handke *et al.* 2007). Unterstrichen wurde dies noch durch die Ergebnisse von Constanze Hintze, die bei Transposonmutageneseuntersuchungen feststellte, dass eine Deletion von *sarA* zu einer Überexpression von SepA führt.

Daher schien es naheliegend, einen näheren Blick auf SepA im Zusammenhang mit der Prozessierung von AtlE zu werfen. Und in der Tat deuten die Ergebnisse darauf hin, dass SepA eine der Proteasen ist, die AtlE prozessieren. Der Stamm 1457-M10 $\Delta$ SarA mit seiner SepA Überexpression führte zu einer Prozessierung von rekombinant exprimierten AtlE-Domänen, namentlich den Repetitiven Sequenzen 1-3, die den Übergang der Amidase zur Glucosaminidase bilden (Milohanic *et al.*, 2001). Der Verlust von SepA in der Doppelmutante 1457-M10 $\Delta$ SarA $\Delta$ SepA ließ sich über die Zugabe kommerziell erworbener Protease SepA aus *S. aureus* in einer konzentrationsabhängigen Weise umkehren. Der Einsatz der kommerziellen Protease in Kombination mit den rekombinanten Protein R1-3 führte ebenfalls zur Prozessierung, dies legt nahe, dass SepA AtlE direkt prozessiert, nicht indirekt durch Modifikation einer weiteren Protease oder eines bisher unbekanntes Kofaktors, sowie dass keine Mediumbestandteile der Kultur zu einer unspezifischen Reaktion geführt haben.

Die beobachtete Prozessierung ließ sich sowohl beim SepA überexprimierenden Stamm als auch bei Einsatz kommerzieller Protease gezielt mit EDTA unterbinden, wohingegen Inhibitoren gegen anderen Klassen von Proteasen keine Wirkung zeigten. Daraus ließe sich ableiten, dass weitere Metalloproteasen parallel zu SepA Verwendung finden könnten, andere Proteaseklassen aber, zumindest unter den gewählten Bedingungen, unbeteiligt sind. Ausgeschlossen ist natürlich nicht, dass die Überexpression von SepA die Expression anderer Proteasen negativ reguliert, oder bei einem Fehlen von SepA andere Proteasen hoch reguliert

werden. Da aber die Mutante 1457-M10 $\Delta$ SepA, die keinerlei SepA exprimieren kann, genau so wie die durch EDTA inhibierten Proben keine Prozessierung zeigte und darüber hinaus von einem biofilmpositiven zu einem -negativen Phänotyp wechselte, scheinen andere Proteasen nicht die Funktion von SepA übernehmen zu können. Das trifft zumindest auf den hier verwendeten genetischen Hintergrund zu. Um letzte Zweifel zu beheben sollte dieses Experiment folgerichtig zukünftig auf andere Genotypen übertragen werden.

Eine Prozessierung des vorderen Bereichs des AtlE, also die Abspaltung des Propeptids vom übrigen Autolysin, konnte unter den gewählten Bedingungen nicht gezeigt werden. Daraus lässt sich allerdings nicht sofort ableiten, dass hier eine andere Protease als SepA beteiligt ist. Für die Experimente wurde ein Protein verwendet, bei dem die Amidase verkürzt vorliegt. Der Hintergrund ist, dass sich die Amidase nicht in vernünftigen Dimensionen rekombinant exprimieren und aufreinigen lässt. Offenbar hat die Domäne AM eine letale oder zumindest eine bakteriostatische Wirkung auf den Expressionsstamm *E. coli* BL21AI. Durch die Verkürzung ließ sich zwar die Ausbeute signifikant steigern, allerdings bleibt nun zu befürchten, dass entweder das gekürzte Protein sich nicht wie erfordert faltet und darum der Protease der Zugang zur Spaltstelle gänzlich unterbunden wird, oder im fehlenden Teil eine Erkennungssequenz liegt, die im regulär gefalteten Zustand das Anlagern der Protease ermöglicht. Ein zukünftiges Ziel muss es demnach sein, das Verfahren zur Expression der Amidase zu optimieren, damit die Ergebnisse dieses Prozessierungsversuchs verifiziert werden können.

Für eine weitere Beteiligung alternativer Proteasen spricht allerdings, dass die Addition von Trypsininhibitor zum Medium den Phänotyp der Referenzstämme verändert. Trypsininhibitor, ein Serinproteaseinhibitor, bewirkt einen biofilmmnegativen Phänotyp bei 1585-RA und 5179-R1. Heilmann *et al* beschrieben, dass die enzymatische Wirkung des AtlE erst durch proteolytische Prozessierung gegeben ist (Heilmann *et al.*, 1996). Eine mögliche Erklärung für die Änderung des Phänotyps und der ausbleibenden Spaltung des Propeptids durch SepA ist, dass das Propeptid durch eine Serinprotease vom Rest des AtlE abgetrennt wird. Trypsininhibitoraddition bewirkt eine Inaktivierung dieser Protease, wodurch die enzymatische Aktivität derart stark gesenkt ist, dass keine ausreichende Menge an eDNA zum biofilmpositiven Phänotyp zur Verfügung steht.

Auch hier ist es unbedingt notwendig, zukünftig die Expression der Amidase, bzw des

---

kompletten AtlE zu optimieren, um die Prozessierung näher zu untersuchen und die beschriebene verminderte enzymatische Aktivität zu bestätigen.

### 7.3.2 Modell der Prozessierung

Aus den Ergebnissen kann man folgendes Hypothetisches Modell ableiten:

Um die primäre Adhärenz zu gewährleisten wird SarA herunterreguliert, wodurch es zu einer verstärkten Expression von SepA kommt. Dadurch wird die Prozessierung von AtlE beschleunigt und eine verstärkte Autolyse erreicht. Die freigesetzte DNA, jetzt eDNA, verbessert die Adhärenz an die zu besiedelnde Oberfläche und stabilisiert den jungen Biofilm.

Wird EDTA zugegeben wird die Spaltung der Amidase und der Glucosaminidase unterbunden. Die enzymatische Aktivität bleibt, wie Zymogramme belegen, jedoch erhalten, die Freisetzung von eDNA ist gewährleistet. Da die Repeats, die für die Bindung an die Bakterienoberfläche verantwortlich sind, nun nicht getrennt sind kommt es zu einer verbesserten Haftung. Die Adhärenz der Zellen an Polystyrole wird optimiert, wodurch auch unter normalen Bedingungen biofilmnegative Stämme einen leicht biofilmpositiven Phänotyp aufweisen können.

Wird die eDNA durch DNase abgebaut kommt es zu einer verminderten Adhärenz der Zellen an die Plastikoberfläche und die Integrität des Biofilms wird herabgesetzt. Der Stamm wechselt zu einem biofilmnegativen Phänotyp.

## **8. Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Wolfgang Streit für die Betreuung der vorliegenden Doktorarbeit, bedanken.

Für die praktische Betreuung im UKE und seine Hilfestellung bedanke ich mich bei PD Dr. Holger Rohde

Bei Dr. Melanie Michel möchte ich mich sehr herzlich bedanken für die vielen sehr ergiebigen, mal mehr mal weniger fachlichen Gespräche, die anfängliche Unterstützung im Umgang mit dem Äkta-Purifier und ihrer Hilfe bei der Etablierung des Yeast-Two-Hybrid-Systems trotz gemeinsamer Unkenntnis der Materie. Hoffentlich finden wir noch einen Termin für das gemeinsame Bügeln unter Ausschluss der Öffentlichkeit.

Gesche Kroll möchte ich neben der Bereitstellung der Kulturüberstände für die Untersuchung der Prozessierung der rekombinanten Proteine vor allem danken für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Funktion als "guter Geist", wodurch der reibungslose Laboralltag überhaupt erst ermöglicht wird.

Dr. Marta Kotasinska möchte ich für die N-terminale Sequenzierung danken, sowie die hilfreichen Informationen über den Umgang mit SepA.

Für die Hilfestellung im Themenbereich der Nukleinsäuren, sowie die unglaubliche persönliche Unterstützung und Motivation stehe ich tief in der Schuld von Dipl. Ing. Ulrike Baade.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei den Gutachtern und Mitgliedern des Prüfungsausschusses dafür, dass sie mir ein wenig ihrer kostbaren Zeit geopfert haben.

## 9. Literaturverzeichnis

- Allignete, J., Aubert, S., Dyke, K.G.H. and EL Sol, N. (2001). *Staphylococcus caprae* Strains Carry Determinants Known To Be Involved in Pathogenicity: a Gene Encoding an Autolysin-Binding Fibronectin and the *ica* Operon Involved in Biofilm Formation. *Infection and Immunity* **69**: 712-718.
- Archer, G.L. (2000). *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R. (eds) p. 2092-2100 (2000). Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Baba, T. & Schneewind, O. (1998). Targeting muralytic enzymes to the cell division site of Gram-positive bacteria: repeat domains direct autolysin to the equatorial surface ring of *Staphylococcus aureus*. *EMBO Journal* **17**: 4639-4646.
- Banerjee, S.N., Emori, T.G., Culver, D.H.; Gaynes, R.P., Jarvis, W.R., Horan, T., Edwards, J.R., Tolson, J., Henderson, T. and Martone, W.J. (1991). Secular Trends in Nosocomial Primary Blood-Stream Infections in the United-States, 1980-1989. *American Journal of Medicine* **91**: 86-89.
- Båth, K., Roos, S., Wall, T. and Jonsson, H. (2005). The cell surface of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 highlighted by identification of 126 extracellular proteins from genome sequence. *FEMS Microbiology Letters* **253**: 75-82.
- Berry, A.M., Lock, R.A., Hansman, D. and Paton, J.C. (1989). Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **57**: 2324-2330.
- Bolkem, T.C., Franke, C.A., Jones, K.F., Zeller, G.O., Hal Jones, C., Dutton, E.K. and Hruby, D.E. (2001). Inactivation of the *srtA* Gene in *Streptococcus gordonii* Inhibits Cell Wall Anchoring of Surface Proteins and Decreases In Vitro and In Vivo Adhesion. *Infection and Immunity* **69**: 75-80.
- Boyce, J.M. (1997). Epidemiology and Prevention of Nosocomial Infections. In *Crossley K.B. and Archer G.L. The staphylococci in human disease*. p. 401-412 (1997) New York: Churchill Livingstone.
- Cheung, G.Y.C., Rigby, K., Wang, R., Queck, S.Y., Braughton, K.R., Whitnes, A.R., Teintze, M., DeLeo, F.R. and Otto, M. (2010). *Staphylococcus epidermidis* Strategies to Avoid Killing by Human Neutrophils. *PLoS Pathogens* **6**: e1001133
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L. and Beachey, E.H. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* **37**: 318-326.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L. and Beachey, E.H. (1983). Experimental foreign body infections in mice challenged with slime-producing *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **40**: 407-410.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younge, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M. and Beachey, E.H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* **22**: 996-1006.

- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Drewry, D.T., Galbraith, L., Wilkinson, B.J. and Wilkinson, S.G. (1990). Staphylococcal Slime: a Cautionary Tale. *Journal of Clinical Microbiology* **28**: 1292-1296.
- Duggirala, A., Kenchappa, P., Sharma, S., Peeters, J.K., Ahmed, N., Garg, P., Das, T. and Hasnain, S.E. (2007). High-Resolution Genome Profiling Differentiated *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Patients with Ocular Infections and Normal Individuals. *IOVS* **48**: 3239-3245.
- Dunne Jr., W.M., Mason Jr., E.O. and Kaplan, S.L. (1993). Diffusion of Rifampin and Vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* Biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**: 2522-2526.
- Emori, T.G. & Gaynes, R.P. (1993). An Overview of Nosocomial Infections, Including the Role of the Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews* **6**: 428-442.
- Fidalgo, S., Vazquez, F., Mendoza, M.C., Perez, F. and Mendez, F.J. (1990). Bacteremia Due to *Staphylococcus epidermidis* – Microbiologic, Epidemiologic, Clinical and Prognostic Features. *Reviews of Infectious Diseases* **12**: 520-528.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H., Smyth, E., Kennedy, C.A. And O'Gara, J.P. (2002). Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Hospital Infection* **42**: 212-218.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H. and O'Gara, J.P. (2005). 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.
- Fuller, R.A. and Rosen, J.J. (1986). Materials for medicine. *Sci. Am.* 255:118-125.
- Götz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 43: 1367-1378.
- Gristina, A. G. (1987). Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237:1588-1595.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilm: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 95-208.
- 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. and Fey, P.D. (2007).  $\sigma^B$  and SarA independently regulate polysaccharide intercellular adhesion production in *Staphylococcus epidermidis*. *Can. J. Microbiol.* **53**: 82-91.
- Harriott, M.M. & Noverr, M.C. (2009). *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial Biofilms: Effects on Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 3914-3922.
- Harrison, J. J., Ceri, H., Stremick, C. and Turner, R.J. (2004). Differences in biofilm and planktonic cell mediated reduction of metalloid oxyanions. *FEMS Microbiol Lett* 235:357-362.
- Hartford, O., O'Brian, L., Schofield, K., Wells, J. and Foster, T.J. (2001). The Fbe (SdrG) Protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology-Sgm* **147**: 2545-2552.

- Heilmann, C., Gerke, C., Perdreau-Remington, F. and Götz, F. (1996 a). Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect Immun* **64**: 277-282.
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D. and Götz, F. (1996 b). Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* **20**: 1083-1091.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G. and Götz, F. (1997). Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* **24**: 1013-1024.
- Hell, W., Meyer, H.-G. W. and Gatermann, S.G. (1998). Cloning of *ass*, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. *Molecular Microbiology* **29**: 871-881.
- Hell, W., Reichl, S., Anders, A. and Gatermann, S. (2003). The autolytic activity of the recombinant amidase of *Staphylococcus saprophyticus* is inhibited by its own recombinant GW repeats. *FEMS Microbiology Letters* **227**: 47-51.
- Hogt, A.H., Dankert, J. and Feijen, J. (1985). Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to A Hydrophobic Biomaterial. *Journal of General Microbiology* **131**: 2485-2491.
- Hogt, A.H., Dankert, J., Hulstaert, C.E. and Feijen, J. (1986). Cell surface characteristics of coagulase-negative staphylococci and their adherence to fluorinated poly(ethylenepropylene). *Infect. Immun.* **51**: 294-301.
- Hoyle, B.D., Alcantara, J. and Costerton, J.W. (1992). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm as a Diffusion Barrier to Piperacillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**: 2054-2056.
- Joris, B., Engelbert, S., Chu, C.-P., Kariyama, R., Daneo-Moore, L., Shockman, G.D. and Ghuysen, J.-M. (1992). Modular design of the *Enterococcus hirae* muramidase-2 and *Streptococcus faecalis* autolysin. *FEMS Microbiology Letters* **91**: 257-264.
- Kloos, W.E. & Bannerman, T.L. (1994). Update on Clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 117-140.
- Kloos, W.E., Ballard, D.N., Webster, J.A., Hubner, R.J., Tomasz, A., Couto, I., Sloan, G.L., Dehart, H.P., Fiedler, F., Schubert, K., de Lencastre, H., Sanches, I.S., Heath, H.E., Leblanc, P.A. and Ljungh, A. (1997). Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 313-323.
- Kloos, W.E., George, C.G., Olgiate, J.S., Van Pelt, L. McKinnon, M.L., Zimmer, B.L., Muller, E., Weinstein, M.P. and Mirrett, S. (1998). *Staphylococcus hominis* subsp. novobiosepticus subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 799-812.
- Lai, Y., Villaruz, A.E., Li, M., Cha, D.J., Sturdevant, D.E. and Otto, M. (2007). The human anionic antimicrobial peptide dermicidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol. Microbiol.* **63**: 497-506.
- Lampert, L.H., Cox, T., Mitchell, K., Rosello-Mora, R.A., Del Cueto, C., Dodge, D.E., Orkand, P. and Cano, R.J. (1998). *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from

- Dominican amber. *International Journal of Systematic Microbiology* **48**: 511-518.
- Ludwicka, A., Uhlenbruck, G., Peters, G., Seng, P.N., Gray, E.D., Jeljaszewicz, J. and Pulverer, G. (1984). Investigation on extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. [A]* **258**: 256-267.
- Lützner, N., Pätzold, B., Zoll, S., Stehle, T. and Kalbacher, H. (2009). Development of a novel fluorescent substrate for Autolysin E, a bacterial type II amidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **380**: 554-558
- Mack, D., Siemssen, N. and Laufs, R. (1992). Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun* **60**: 2048-2057.
- Mack, D., Nedelmann, M., Krokotsch, A., Schwarzkopf, A., Heesemann, J. and Laufs, R. (1994). Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect. Immun.* **62**: 3244-3253.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., *et al.* (1996). The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* **178**: 175-183.
- Mack, D., Becker, P., Chatterjee, I., Dobinsky, S., Knobloch, J.K.M., Peters, G., Rohde, H. and Herrmann, M. (2004). Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *International Journal of Medical Microbiology* **294**: 203-212.
- Mack, D., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Knobloch, J.K. (2006). Coagulase-negative staphylococci. In *Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy*. Pace, J.L., Rupp, M.E. and Finch, G. (eds). London UK: CRC Press, pp. 109-153.
- Mani, N., Baddour, L.M., Offut, D.Q., Vijaranakul, U., Nadakavukaren, M.J. and Jayaswami, R.K. (1994). Autolysis-Defective mutant of *Staphylococcus aureus*: Pathological considerations, genetic mapping, and electron microscopic studies. *Infect Immun* **62**: 1406-1409.
- Mann, E.E., Rice, K.C., Boles, B.R., Endres, J.L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L.H., Smeltzer, M.S., Horswill, A.R. and Bayles, K.W. (2009). Modulation of eDNA Release and Degradation Affects *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation. *PLoS ONE* **4**: e5822
- Mazmanian, S.K., Liu, G., Ton-That, H. and Schneewind, O. (1999). *Staphylococcus aureus* Sortase, an Enzyme that anchors Surface Proteins to the Cell Wall. *Science* **285**: 760 – 762.
- Mazmanian, S.K., Ton-That, H., Su, K. and Schneewind, O. (2002). An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *PNAS* **99**: 2293-2298.
- Milisavljevic, V., Tran, L.P., Batmalle, C. and Bootsma, H.J. (2008). Benzyl alcohol and ethanol can enhance the pathogenic potential of clinical *Staphylococcus epidermidis* strains. *American Journal of Infection Control* **36**: 552-558.
- Milohanic, E., Jonquière, P., Berche, P. and Gaillard, J.-L. (2001). The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell

- wall anchor. *Molecular Microbiology* **39**: 1212-1224.
- Milohanic, E., Jonquières, R., Glaser, P., Dehoux, P., Jacquet, C., Berche, P., Cossart, P. and Gaillard, J.-L. (2004). Sequence and Binding Activity of the Autolysin-Adhesin Ami from Epidemic *Listeria monocytogenes* 4b. *Infection and Immunity* **72**: 4401-4409.
- Navarre, W.W. and Schneewind, O. (1994). Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* **14**: 115-121.
- Navarre, W.W. and Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 174-+.
- Nobel, W.C. (1997). Staphylococci carriage and skin and soft tissue infection. In Crossley K.B. and Archer G.L. *The staphylococci in human disease*. p. 401-412 (1997) New York: Churchill Livingstone.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* **54**: 49-79.
- Oshida, T., Sugai, M., Kamatsuzawa, H., Hong, Y.-M., Suginaki, H. and Tomasz, A. (1995). A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase domain and an endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase domain: Cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 285-289.
- Otto, M. (2004). Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front Biosci.* **9**: 841-863.
- Place, R.B., Hiestand, D., Gallmann, H.R. and Teuber, M. (2003). *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* **26**: 30-37.
- Pourmand, M.R., Clarke, S., Schuman, R.F., Mond, J.J. and Foster, S.J. (2006). Identification of Antigenic Components of *Staphylococcus epidermidis* Expressed during Human Infection. *Infection and Immunity* **74**: 4644-4654.
- Probst, A.J., Hertel, C., Richter, L., Wassill, L., Ludwig, W. and Hammes, W.P. (1998). *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from say sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. utilis subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 651-658.
- Qin, Z., Yang, X., Yang, L., Jiang J., Ou, Y., Molin, S. and Qu, D. (2007). Formation and properties of in vitro biofilms of *ica*-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J Med Microbiol* **56**: 83-93.
- Qin, Z., Ou, Y., Yang, L., Zhu, Y., Tolker-Nielsen, T., Molin, S. and Qu, D. (2007). Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **153**: 2083-2092.
- Raad, I., Fang, X., Keutgen, X.M., Jiang, Y., Sherertz, R. and Hachem, R. (2008). The role of chelators in preventing biofilm formation and catheter-related bloodstream infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* **21**: 385-392.
- Rice, K.C., Mann, E.E., Endres, J.L., Weiss, E.C., Cassat, J.E., Smeltzer, M.S. and Bayles, K.W. (2007). The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm

- development in *Staphylococcus aureus*. *PNAS* **194**: 8113-8118.
- Roche, F.M., Massey, R., Peacock, S.J., Day, N.P.J., Visali, L., Speziale, P., Lam, A., Pallen, M. and Foster, T.J. (2003). Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology* **149**: 643-654.
- Rohde, H., Knobloch, J.K., Horstkotte, M.A. and Mack, D. (2001). Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *ica* ADBC genotype-independent factors. *Med Immunol* **190**: 105-112
- Rohde, H., Kalitzky, M., Kroger, N., Scherpe, S., Horstkotte, M. A., Knobloch J.K.-M., Zander, A. R. and D. Mack. (2004a). 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., Bartsch, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.M., Heilmann, C., Herrmann, M. and Mack, D. (2004b). The repetitive domain B of the accumulation associated protein Aap mediates intercellular adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Medical Microbiology* **294**: 128.
- Rohde, H., Burdelski, C., Bartsch, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.-M., Heilmann, C., Herrmann, M. and 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., Mack, D., Christner, M., Burdelski, C., Franke, G. und Knobloch, J.K.M. (2006). Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Reviews in Medical Microbiology* **17**: 45-54.
- 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.-M., Rangunath, C., Kaplan, J.B. and 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* (2007), doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.046
- Rupp, M.E. & Archer, G.L. (1994). Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin. Infect. Dis.* **19**: 231-243.
- Rupp, M.E., Ulphani, J.S., Fey P.D., K. Bartscht and D. Mack (1999a). Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun* **67**: 2627-2632.
- Rupp, M.E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, and D. Mack (1999b). Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun* **67**: 2656-2659.
- Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology* **4**: 219.
- Schaberg, D.R., Culver, D.H. and Gaynes, R.P. (1991). Major Trends in the Microbial

- Etiology of Nosocomial Infections. *American Journal of Medicine* **91**: 72-75.
- Schindler, C.A. & Schuhardt, V.T. (1964). Lysostaphin: A new bacteriolytic Agent for the Staphylococcus. *Proc Natl Acad Sci USA* **51**: 414-421.
- Schleifer, K.H. and Steber, J. (1974). Chemische Untersuchungen am Phagenrezeptor von *Staphylococcus epidermidis*. *Arch Microbiol* **98**: 251-270.
- Schneewind, O., Mihaylova-Petkov, D. and Model, P. (1993). Cell wall sorting signals in surface proteins of Gram-positive bacteria. *EMBO Journal* **12**: 4803-4811.
- Sellman, B.R., Timofeyeva, Y., Nanra, J., Scott, A., Fulginiti, J.P., Matsuka, Y.V. and Baker, S.M. (2008). Expression of *Staphylococcus epidermidis* SdrG Increases Following Exposure to an In Vivo Environment. *Infection and Immunity* **76**: 2950-2957.
- Sharma, M., Visai, L., Bragheri, F., Christiani, I., Gupta, P.K. and Speziale, P. (2008). Toluidine Blue-Mediated Photodynamic effects on Staphylococcal Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 299-305.
- Sivadon, V., Rottmann, M., Quincampoix, J.-C., Prunier, E., de Mazancourt, P., Bernard, L., Lortat-Jacob, A., Piriou, P., Judet, T. and Gaillard, J.-L. (2006). Polymorphism of the Cell Wall-Anchoring Domain of the Autolysin-Adhesin AtlE and Its Relationship to Sequence Type, as Revealed by Multilocus Sequence Typing of Invasive and Commensal *Staphylococcus epidermidis* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 1839-1843.
- Smith, T.J., Blackman, S.A. and Foster, S.J. (2000). Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* **146**: 249-262.
- Sperber, W.H. & Tatini, S.R. (1975). Interpretation of Tube CCoagulase Test for Identification of *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology* **29**: 502-505.
- Spergser, J., Wieser, M., Taubel, M., Rossello-Mora, R.A., Rosengarten, R. and Busse, H.J. (2003). *Staphylococcus nepalensis* sp nov., isolated from goats of the Himalayan region. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 2007-2011.
- Strating, H. and Clark, A.J. (2001). Differentiation of bacterial autolysins by zymogram analysis. *Anal Biochem* **291**: 149-154.
- Sugai, M., Komatsuzawa, H., Akiyama, T., Hong, Y.-M., Oshida, T., Miyake, Y., Yamaguchi, T. and Suginaka, H. (1995). Identification of endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase as cluster-dispersing enzymes in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **177**: 1491-1496.
- Sutherland, I.W. (2001). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* **9**: 222-227.
- Takahashi, T., Satoh, I. and Kikuchi, N. (1999). Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 725-728.
- Takano, M., Oshida, T., Yasojima, A., Yamada, M., Okagaki, C., Sugai, M., Suginaka, H. and Matsushita, T. (2000). Modification of Autolysis by Synthetic Peptides Derived from the Presumptive Binding Domain of *Staphylococcus aureus* Autolysin. *Microbiol. Immunol.* **44**: 463-472.
- Tetz, G.C., Artemenko, N.K. and Tetz, V.V. (2009) Effect of DNase and Antibiotics on Biofilm Characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 1204-1209.

- Teufel, P. and Götz, F. (1993). Characterization of an Extracellular Metalloprotease with Elastase Activity from *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology* **175**: 4218-4224.
- Thomas, V.C., Thurlow, L.R., Boyle, D. and Hancock, L.E. (2008). Regulation of Autolysis-Dependent Extracellular DNA Release by *Enterococcus faecalis* Extracellular Proteases Influences Biofilm Development. *Journal of Bacteriology* **190**: 5690-5698.
- Thomas, V.C., Hiromasa, Y., Harms, N., Thurlow, L., Tomich, J. and Hancock, L.E. (2009). A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology* **72**: 1022-1036.
- Timmerman, C.P., Fleer, A., Besnier, J.M., de Graaf, L., Cremers, F. and Verhoef, J. (1991). Characterization of a Proteinaceous Adhesin of *Staphylococcus epidermidis* Which Mediates Attachment to Polystyrene. *Infection and Immunity* **59**: 4187-4192.
- Trulzsch, K., Rinder, H., Treck, J., Bader, L., Wilhelm, U. and Heesemann, J. (2002). "Staphylococcus pettenkoferi", a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **43**: 175-182.
- U.S. Department of Health and Human Services (1996). Public Health Service: National nosocomial infectious surveillance (NNIS) report. Data summary from October 1986-April 1996, issued May 1996. *Am. J. Infect. Control* **24**: 380-388.
- Vaudaux, P., Pittet, D., Haeberli, A., Huggler, E., Nydegger, U.E., Lew, D.P. and Waldvogel, F.A. (1989). Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J. Infect. Dis.* **160**: 865-875.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Meugnier, H., Bes, M., Lasne, Y., Fiedler, F., Etienne, J. and Freney, J. (1999). *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 1521-1527.
- Vilain, S., Pretorius, J.M., Theron, J. and Brözel, V.S. (2009). DNA as an Adhesin: *Bacillus cereus* Requires Extracellular DNA To Form Biofilms *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 2861-1868.
- Waldvogel, F.A. (1989). Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J. Infect. Dis.* **160**: 865-875.
- Wang, I.W., Anderson, J.M. and Marchant, R.E. (1993). *Staphylococcus epidermidis* adhesion to hydrophobic biomedical polymer is mediated by platelets. *J. Infect. Dis.* **186**: 2724-2734.
- Wisplinghoff, H., Seifert, H., Wenzel, R.P. and Edmond, M.N. (2003). 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**: 1103-1110.
- Wren, B.W. (1991). A family of clostridial and streptococcal ligand-binding proteins with conserved C-terminal repeat sequences. *Molecular Microbiology* **5**: 797-803.
- Wuenschel, M.D., Kohler, S., Bubert, A., Gerike, U. and Goebel, W. (1993). The iap gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J Bacteriol* **175**: 3491-3501.