

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrums für Diagnostik

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Direktor Prof. Dr. M. Aepfelbacher

Charakterisierung der Fibronectin-bindenden Funktion des Extracellular matrix binding protein von *Staphylococcus epidermidis*

Dissertation

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

vorgelegt von:

Henning Büttner
aus Hamburg

Hamburg 2016

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

Der Universität Hamburg am 5.7.2016

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Holger Rohde

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. med. Rainer Kiefmann

Ich widme diese Dissertationsschrift meinen Töchtern Laura und Lisa.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 7 |
| 1.1 Medizinische Implantate | 7 |
| 1.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 7 |
| 1.3 Durch <i>Staphylococcus epidermidis</i> hervorgerufene Erkrankungen | 8 |
| 1.4 Mikrobielle Biofilme | 10 |
| 1.4.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> Biofilme | 11 |
| 1.4.2 Primäre Adhärenz | 11 |
| Fibronektin | 11 |
| Extracellular Matrix Binding Protein Embp | 13 |
| 1.4.3 Biofilmmakkumulation | 16 |
| 1.4.4 Disseminierung | 17 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit | 18 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 19 |
| 2.1 Material | 19 |
| 2.1.1 Laborgeräte | 19 |
| 2.1.2 Mikroskop | 20 |
| 2.1.3 Glas- und Plastikwaren, Verbrauchsartikel | 20 |
| 2.1.4 Chemikalien | 21 |
| 2.1.5 Puffer und Lösungen | 23 |
| 2.1.6 Kulturmedien und Zusätze | 24 |
| 2.1.7 Enzyme | 25 |
| 2.1.8 Antikörper | 25 |
| 2.1.9 Kits | 26 |
| 2.1.10 Bakterienstämme, Plasmide und Phagen | 26 |
| 2.1.11 Primer | 28 |
| 2.2 Methoden | 30 |
| 2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Arbeitstechniken | 30 |
| Anzucht von Bakterien | 30 |
| Biofilm-Assay | 30 |
| 2.2.2 Proteinchemische Arbeitstechniken | 31 |
| Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 31 |
| Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine | 32 |
| 2.2.3 Genetische Methoden | 34 |
| Plasmidpräparation | 34 |
| Agarosegelelektrophorese | 35 |
| Restriktionsverdau | 35 |
| 5'-Dephosphorylierung | 36 |
| Polymerasekettenreaktion (PCR) | 36 |
| DNA-Aufreinigung | 37 |
| 2.2.5 Klonierung | 38 |
| Konventionelle Ligation | 38 |
| In-Fusion® Klonierung | 38 |
| 2.2.6 Herstellung und Transformation von kompetenten Zellen | 39 |
| Herstellung von kompetenten Zellen | 39 |
| Transformation von kompetenten Zellen | 39 |
| Genetische Modifikation von Zielstämmen mittels Phagentransduktion mit dem <i>S. epidermidis</i> -Phagen A6C | 40 |
| 2.2.7 Analyse der Transformanden | 42 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| | Empfindlichkeitstestung mithilfe des Agardiffusionstestes | 42 |
| | Genetische Analyse der Transformanden | 42 |
| 2.2.8 | Immunologische Nachweisverfahren | 42 |
| | Dot Blot | 42 |
| | Evaluation der Kreuzreaktivität von Primärantikörpern | 43 |
| | Western Blot | 44 |
| | Immunfluoreszenztest | 44 |
| 2.2.9 | ELISA Bindungsversuche | 45 |
| 2.2.10 | Surface Plasmon Resonance | 47 |
| | Darstellung der Bindung von rEmbp125 an Plasmafibronektin | 47 |
| | Darstellung der Bindung von rEmbp125 an rFN12-14 | 48 |
| 3. | ERGEBNISSE | 49 |
| 3.1 | Herstellung eines Shuttle-Vektors zur <i>in trans</i> Expression definierter Embp-Sequenzabschnitte in einem Embp-negativen Hintergrund | 49 |
| 3.1.1 | Austausch der Resistenzkassette im Ausgangsplasmid pCN57 | 49 |
| 3.1.2 | Insertion der Embp-Fragmente YSIRK FIVAR/GAFIV DUF TM in pCN57_tet(M) mittels In-Fusion®-Klonierung | 50 |
| 3.1.3 | Insertion des Anhydrotetrazyklin-induzierbaren Promoters $P_{xyl/TetO}$ in pCN_FIVAR und pCN_GAFIV | 51 |
| 3.1.4 | Austausch der Resistenzkassette in pCN_ $P_{xyl/TetO}$ -FIVAR und pCN_ $P_{xyl/TetO}$ -GAFIV | 52 |
| 3.2 | Einbringen der Shuttle-Vektoren in die Zielstämme <i>S. epidermidis</i> 1585 und den Surrogatwirt <i>S. carnosus</i> TM300 | 54 |
| 3.2.1 | Transformation der Shuttle-Vektoren in <i>S. aureus</i> RN4220 mittels Elektroporation | 54 |
| 3.2.2 | Transformation der Shuttle-Vektoren in <i>S. epidermidis</i> M12 und <i>S. carnosus</i> TM300 mittels Elektroporation | 55 |
| 3.2.3 | Phagentransduktion der Shuttle-Vektoren in <i>S. epidermidis</i> 1585 | 56 |
| 3.3 | Weitere Charakterisierung der verwendeten anti-Embp2588- und anti-Embp6599-Seren [43] | 59 |
| 3.4 | Charakterisierung der Transformanden | 60 |
| 3.4.1 | Darstellung der <i>in trans</i> Expression von repräsentativen Embp-Abschnitten mithilfe der Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot | 60 |
| 3.4.2 | Darstellung der Induktor-abhängigen <i>in trans</i> Expression von Embp-FIVAR ₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ und Embp-GAFIV ₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ in <i>S. carnosus</i> TM300 und <i>S. epidermidis</i> 1585 | 62 |
| 3.4.3 | Darstellung der <i>in trans</i> Expression von Embp-FIVAR ₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ in der Immunfluoreszenz | 64 |
| 3.4.4 | Biofilmbildung von Embp-FIVAR ₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ oder Embp-GAFIV ₁₃₅₁₅₋₁₇₀₇₉ <i>in trans</i> exprimierenden Staphylokokken | 65 |
| 3.5 | Charakterisierung der Embp-vermittelten Fibronektin-Bindung unter Verwendung rekombinant in <i>E. coli</i> exprimierter Embp-Fragmente und Fibronektin Typ III Subdomänen | 66 |
| 3.5.1 | Rekombinante Expression von rEmbp170 und rEmbp125 | 66 |
| 3.5.2 | Rekombinante Expression der Fibronektin Typ III Subdomänen | 69 |
| 3.6 | Analyse der Fibronektin-bindenden Eigenschaften rekombinant in <i>E. coli</i> exprimierter Embp-Fragmente und der Bedeutung von <i>in trans</i> exprimiertem Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ und -GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ in Staphylokokken für die bakterielle Adhärenz | 72 |
| 3.6.1 | Adhärenz von Staphylokokken an mit Fibronektin beschichteten Oberflächen | 72 |
| 3.6.2 | Inhibitionsstudien | 78 |
| 3.6.3 | Bindung von rekombinant in <i>E. coli</i> exprimierten Embp-Fragmenten an Fibronektin | 80 |
| 4. | DISKUSSION | 82 |
| 4.1 | Charakteristika bakterielle Proteine mit Fibronektin-bindender Aktivität | 82 |

| | |
|--|------------|
| 4.2 Bedeutung der Embp/Fibronectin-Interaktion für die bakterielle Adhärenz an Oberflächenorganisiertes Fibronectin | 84 |
| 4.3 Aufklärung der mechanistischen Grundlage der Embp-vermittelten Fibronectinbindung | 87 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | 91 |
| 6. ABKÜRZUNGEN | 95 |
| 7. LITERATURVERZEICHNIS | 97 |
| 8. DANKSAGUNG | 104 |
| 9. LEBENSLAUF | 106 |
| 10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG | 107 |

1. Einleitung

1.1 Medizinische Implantate

Eine Folge des medizinischen Fortschrittes ist der häufigere Einsatz von implantierbaren medizinischen Materialien. Hierzu zählen, neben zentralvenösen Kathetern, insbesondere und in zunehmenden Maße Gelenkersatzverfahren. Die Endoprothetik von Hüfte und Knie zählt in Deutschland mit zu den häufigsten operativen Eingriffen. Im Jahr 2009 wurden beispielsweise 159.221 künstliche Hüftgelenke und 148.298 künstliche Kniegelenke implantiert. Zudem wurden zusätzlich zusammen etwa 35.000 Hüft- und Kniegelenksendoprothesen ausgetauscht [1]. Hinzu kamen etwa 50.000 weitere Endoprothesen, die infolge von Traumata implantiert werden mussten. Neben Verschleiß und mechanischer Lockerung sind Infektionen häufig Anlass für eine erneute Operation. Die Infektionsrate bei Eingriffen in Deutschland schwankt zwischen 0,6 % bei primärer Hüftendoprothese und 2,9 % bei der Revisions Hüftendoprothese [2]. Im United Kingdom National Joint Register werden unter den 7.833 Revisionseingriffen 13 % auf Infektionen zurückgeführt (National Joint Registry England and Wales. Annual Report 2011. <http://www.njrcentre.org.uk/NjrCentre/Portals/0/Documents/NJR%208th%20Annual%20Report%22011.pdf>). Diese Zahlen machen deutlich, dass Infektionen von Kunstgelenken - sowie im Allgemeinen von medizinischen Implantaten - ein relevantes medizinisches und ökonomisches Problem darstellen. Neben dem volkswirtschaftlichen Schaden (Behandlungskosten, Arbeitsausfall) gefährden diese Infektionen und die daraus resultierenden therapeutischen Maßnahmen die Gesundheit beziehungsweise das Leben der betroffenen Patienten. Zu den am häufigsten isolierten Erregern dieser Infektionen gehören Koagulase-negative Staphylokokken (KNS), von denen *Staphylococcus epidermidis* mit Abstand die am häufigsten isolierte Spezies ist [3, 4].

1.2 *Staphylococcus epidermidis*

Die Familie der *Micrococcaceae* besteht aus vier Genera - *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Planococcus* und *Stomatococcus*. Innerhalb des Genus *Staphylococcus* unterscheidet man Koagulase-positive und -negative

Staphylokokken. Bisher sind mehr als 30 unterschiedliche KNS bekannt. Die Spezies *Staphylococcus epidermidis* wird der Subgruppe der Novobiocinempfindlichen KNS zugerechnet. Es handelt sich um grampositive, fakultativ anaerobe, Katalase-positive, Oxidase-negative Haufenkokken mit einem Durchmesser von 1-2 µm. Diese Spezies ist als Teil des Haut- und Schleimhautmikrobioms bei jedem Menschen zu finden [5] und trägt möglicherweise dort zum Schutz vor der Kolonisation mit potentiell pathogenen Bakterien bei [6].

1.3 Durch *Staphylococcus epidermidis* hervorgerufene Erkrankungen

KNS gehören zu den am häufigsten isolierten Erregern in mikrobiologischem Untersuchungsgut. Die Mehrzahl dieser Proben konnte im Rahmen nosokomialer Infektionen gewonnen werden. *S. epidermidis* ist der häufigste Erreger nosokomialer Infektionen [3, 4, 7] - insbesondere von Fremdmaterial-assoziierten Infektionen [8]. Das Nationale Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen berichtet in den Modul ITS-KISS Referenzdaten unter anderem, dass bei ZVK-assoziiierter Sepsis KNS als alleinige Erreger in 31,39 % der Fälle isoliert werden konnten [9]. Im Vergleich zu *Staphylococcus aureus* ist das Spektrum der durch KNS verursachten Erkrankungen deutlich zu unterscheiden. Während *S. aureus* eine Vielzahl pyogener Infektionen, sowie Superantigen-vermittelte Erkrankungen verursacht, benötigen KNS in der Regel prädisponierende Wirtsfaktoren. Hier wäre unter anderem das Kollektiv der intravenös-Drogenabhängigen zu nennen. Infolge der Suchterkrankung reduzierter Allgemein- und Ernährungszustand können zu einer Schwächung des Immunsystems und damit Infektionen mit opportunistischen Erregern, wie zum Beispiel *S. epidermidis* begünstigen. Die in diesem Kollektiv häufig zu beobachtende Trikuspidalklappenendokarditis wird pathomechanistisch auf durch Heroinmikrokristalle hervorgerufene strukturelle Schädigung der Herzklappen in Kombination mit unsteril durchgeführten Injektionen zurückgeführt [10]. Eine weitere Risikogruppe sind immunsupprimierte Patienten – insbesondere Frühgeborene, deren Mononukleäres-Phagozyten-System (MPS) noch nicht voll ausgereift ist. Aufgrund der verminderten Phagozytosekapazität des Neugeborenen-Immunsystems gelingt es

opportunistischen Erregern trotz niedrigem pathogenen Potenzial zu persistieren [11, 12]. Die dritte und wahrscheinlich bedeutsamste Gruppe sind Patienten mit implantierten medizinischen Geräten. Im Zuge des medizinischen Fortschritts werden zunehmend Fremdmaterialien temporär oder permanent in Patienten eingebracht. Von herausragender Bedeutung sind in diesem Zusammenhang Infektionen zu nennen, die direkt das eingebrachte Material involvieren und als häufige Komplikation das Behandlungsergebnis dieser Patienten maßgeblich beeinflussen (Knie- und Hüftendoprothesen, Herzschrittmacher, ventriculoperitonealer Shunt und viele mehr). Bei Endoprothesen werden mehr als die Hälfte der Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken verursacht. Die am häufigsten isolierte Spezies ist *Staphylococcus epidermidis* [13]. Klinisch präsentieren sich die durch *S. epidermidis* verursachten Fremdmaterial-assoziierten Infektionen stets im Kontrast zu denen durch *S. aureus* verursachten Infektionen. *S. epidermidis*-Infektionen verlaufen in der Regel subakut oder chronisch - zum Teil mit erheblicher klinischer Latenz. Dieser Umstand erschwert häufig eine frühzeitige Diagnose. Verzögerungen bis zur definitiven Diagnose erklären sich zum einen aus Problemen bei der Spezifität der Untersuchungsverfahren. Der Nachweis von *S. epidermidis* im Untersuchungsgut stellt den Mikrobiologen und den Kliniker stets vor die Frage der Abgrenzung zwischen „Hautkontamination bei der Probengewinnung“ und dem Nachweis eines kausalen Infektionserregers aus einem (primär) sterilen Kompartiment. Sehr häufig wird in diesen Situationen eine Behandlung eingeleitet, welche dann einerseits zur Kostensteigerung führt, aber auch durch Erhöhung des Selektionsdrucks der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen Vorschub leistet [14]. Zum anderen kann die Diagnostik durch begleitende antibiotische Behandlung zu falsch negativen Untersuchungsergebnissen führen [15].

Die Therapie dieser Infektionen ist zum einen aufgrund der häufig anzutreffenden Multiresistenzen bei KNS anspruchsvoll und insbesondere bei Fremdmaterial-assoziierten Infektionen häufig frustan. So konnte in den letzten Jahren eine kontinuierliche Abnahme der Antibiotikaempfindlichkeit bei KNS beobachtet werden. Insbesondere nahm die Verbreitung β -Laktamantibiotikaresistenter, *mecA*-positiver KNS in Krankenhäusern zu. Neben der β -Laktamresistenz konnte auch eine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber

verschiedenen anderen Substanzen wie Clindamycin, Erythromycin, Ciprofloxacin und Gentamicin beobachtet werden [16-18]. Neben Antibiotikaresistenzen der Erreger spielt der Biofilm an sich eine entscheidende Rolle. Biofilme schützen Bakterien vor der Wirkung von Antibiotika, deren Aktivität sich vornehmlich gegen sich teilende, stoffwechselaktive Bakterien richtet. Konsequenz ist, dass trotz einer gezielten antiinfektiven Behandlung in der Regel keine Sanierung des Infektionsherdes möglich ist. Zum anderen werden Bakterien innerhalb von Biofilmen vor dem Zugriff des Immunsystems geschützt. Dabei kommt der Biofilmmatrix die Bedeutung als tatsächliche physikalische Barriere zu. Außerdem wird die Phagozytoseaktivität von entsprechenden Immunzellen inhibiert [19, 20]. Schlussendlich ist die Entfernung beziehungsweise der Ersatz des medizinischen Implantates die einzig erfolgversprechende Therapieoption. Dieses Vorgehen verursacht erheblichen ökonomischen Schaden für die Gesellschaft (Arbeitsausfall, Behandlungskosten). So geht man davon aus, dass alleine in den USA jährlich etwa zwei Milliarden US\$ für die Behandlung von durch *S. epidermidis* verursachten Katheter-assoziierten Blutstrominfektionen aufgewendet werden müssen. Neben den ökonomischen Kennzahlen bedeuten diese Infektionen für den Patienten eine erhebliche Gefährdung (Infektion, Blutung, Rezidivgefahr), die sich auch in einer erhöhten Mortalität gegenüber Vergleichsgruppen ausdrückt [21, 22].

1.4 Mikrobielle Biofilme

Der Begriff Biofilm bezieht sich auf eine Ansammlung von Mikroorganismen auf einer Oberfläche – natürlich oder künstlich, die von einer zum Teil selbst produzierten zum anderen aus exogenem Material assemblierten Matrix umgeben sind [23]. Die Entstehung eines Biofilmes erfolgt üblicherweise in einem mehrphasigen Prozess [23, 24]. Dabei sind die Bakterien durch differenziert regulierte Genexpression gekennzeichnet [25]. Verlangsamtes Wachstum und herunterregulierter Stoffwechsel der Bakterien innerhalb eines Biofilms vermindern die Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. Dieser Mechanismus wird als phänotypische Toleranz bezeichnet [26]. Zusätzlich vermittelt die Einbettung von Bakterien in den Biofilm Schutz vor

mechanischen Einflüssen wie Scherkräften [20]. Auch das Immunsystem ist nicht in der Lage einen Biofilm aufzulösen. Dieses Phänomen kann u.a. durch antiphagozytäre Eigenschaften der Biofilmmatrix erklärt werden [19].

1.4.1 *Staphylococcus epidermidis* Biofilme

Biofilme repräsentieren den wesentlichen Virulenzfaktor von *S. epidermidis*. Hier gilt es zu berücksichtigen, dass bisher nur sehr wenig Wissen zum Verständnis des nichtinvasiven Lebensstils von *S. epidermidis* im natürlichen Habitat vorliegt. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Virulenzmechanismus eine „akzidentielle“ Koevolution darstellt [8]. Modelle, die die Biofilmbildung als mehrschrittigen Prozess beschreiben, gelten weithin als akzeptiert [23]. Ihre Gültigkeit erstreckt sich sowohl über die hier im Fokus stehenden Fremdmaterial-assoziierten Infektionen wie auch für Infektionen an nativen Oberflächen. Im Folgenden soll der Ablauf der Biofilmbildung an Fremdmaterialien kurz skizziert werden.

1.4.2 Primäre Adhärenz

Die primäre Adhärenz von *S. epidermidis* an künstlichen Oberflächen (zum Beispiel medizinische Implantate) wird im wesentlichen durch die Oberflächenhydrophobizität der bakteriellen Zellwand vermittelt [27]. Hier nehmen insbesondere das Autolysin/Adhesin AtlE [28] und Teichonsäuren (TA) [29] eine tragende Rolle ein. Des Weiteren werden implantierte Fremdkörper rasch von Komponenten der Extrazellulärmatrix (Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin, Kollagen, u.a.) überzogen [30-32].

Fibronectin

Eine herausragende Stellung als Interaktionspartner für bakterielle Oberflächenproteine nimmt das 250 kDa Fibronectin als ubiquitär vorkommendes Protein der Extrazellulärmatrix ein. Die Tatsache, dass bei Bakterien inzwischen etwa 100 Fibronectin-bindende Proteine identifiziert wurden, unterstreicht die Bedeutung der Interaktion mit diesem Bestandteil der

extrazellulären Matrix [33]. Fibronectin kommt sowohl in gelöster Form im Körperflüssigkeiten, wie auch in immobilisierter Form als Strukturprotein in der Extrazellulärmatrix vor [34]. Das Protein vermittelt eine Vielzahl zellulärer Interaktionen mit anderen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix und spielt eine Rolle bei der Zelladhäsion, -migration, -wachstum sowie der Differenzierung [35]. Fibronectin wird durch einen singulären offenen Leseramen (ORF) kodiert. Durch alternatives Splicing innerhalb der Precursor-mRNA entstehen verschiedene Varianten des Fibronectinmonomeres. Bisher sind im menschlichen Organismus 20 verschiedene Fibronectinsplicevarianten beschrieben worden. Grundsätzlich unterscheidet man Zell-/Extrazellulärmatrix-assoziiertes, organisiertes Fibronectin von löslichem Plasmafibronectin, welches vornehmlich von Hepatozyten gebildet und an das Blut abgegeben wird. Dort kommt es in einer Konzentration von bis zu 300 µg/mL vor. Das lösliche Glykoprotein liegt dort als ~440 kDa großes, globulär gefaltetes Dimer vor, welches durch inter- und intramolekulare Interaktionen stabilisiert wird. Hier spielt insbesondere die Fn Typ III Domäne eine herausragende Rolle. Die Module FN2-3 interagieren mit den Modulen FN12-14 und tragen so zur Ausbildung der dimeren globulären Konformation bei [36]. Jedes Monomer untergliedert sich in drei Domänen, die wiederum eine unterschiedliche Anzahl an repetitiven Modulen enthalten. Die Fn I Domäne besteht aus zwölf Modulen, deren einzelne Subdomänen aus jeweils etwa 40 Aminosäuren zusammengesetzt sind. Die Module 1-9 liegen am N-Terminus, während die Module 10 bis 12 hinter der Fn Typ III Domäne am C-terminalen Ende des Fibronectinmoleküls lokalisiert sind. Die Fn II Domäne enthält zwei Module, bestehend aus jeweils etwa 60 Aminosäuren. Am C-terminalen Ende des Fibronectinmonomeres befindet sich die Fn Typ III Domäne, welche aus 15-17 Modulen (etwa 90 Aminosäuren pro Modul) gebildet wird. Die hier verwendete Nomenklatur der Fn Typ III Domäne bezieht sich auf die Publikation von Leahy et al. Entsprechend werden beispielsweise die Fn Typ III Domäne-Module 12, 13 und 14 mit FN12-14 gekennzeichnet [37]. Die zwei etwa 220 kDa großen Monomere werden über zwei Disulfidbrücken nahe der C-Termini verbunden [35]. Bedeutende Splicevarianten betreffen das EDB-Modul zwischen FN7 und FN8, sowie EDA zwischen FN11 und FN12. Diese beiden Module fehlen in der Regel im Plasmafibronectin. Zusätzlich werden in der sogenannten V- oder

IIIICS-Region am C-Terminus weitere Splicevarianten generiert, deren Expression zum einen differenziell reguliert zum anderen von der synthetisierenden Zellspezies abhängig ist [38].

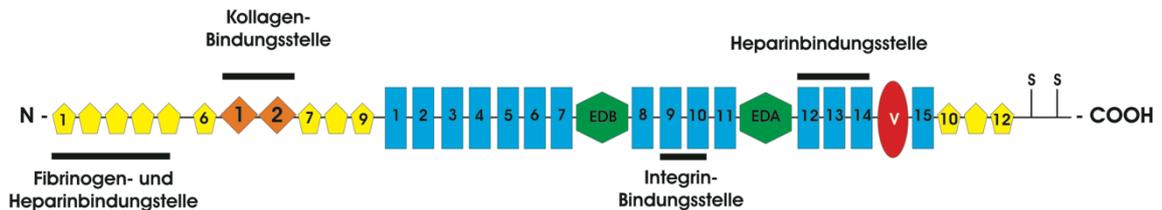


Abb. 1: Schematische Darstellung des Fibronektin-Monomers ohne Berücksichtigung von Splicing-Varianten.

Moleküle der Extrazellulärmatrix wie Fibronektin werden von spezifischen Rezeptoren auf der Bakterienoberfläche gebunden. Hierbei wird unterschieden in solche Proteine, die kovalent an der Zellwand verankert und solche die Zellwand-assoziiert sind. In den letzten Jahren konnten einige dieser Interaktionspartner identifiziert und funktionell charakterisiert werden. Zur ersten Gruppe zählt unter anderem das Fibrinogen-bindende Protein SdrG [39]. Fibronektin-bindende Proteine (FnBP) von *S. epidermidis* sind zum einen das Autolysin Aae [40] aber auch das 1 MDa Extracellular Matrix Binding Protein (Embp) [41]. Beide werden der Gruppe der Zellwand-assoziierten Proteine hinzugerechnet.

Extracellular Matrix Binding Protein Embp

Embp und sein Ortholog in *S. aureus*, genannt Ebh, wurden beinahe zeitgleich bei der Suche nach Staphylokokken-Oberflächenfaktoren mit Fibronektin-bindender Aktivität identifiziert [41, 42]. Während des Screenings einer Phage Display Library konnte ein Phage identifiziert werden, der Fibronektin-bindende Aktivität aufwies. Dieser enthielt ein DNA Fragment aus einem 30.500 Nukleotide großen offenen Leserahmen (ORF), der für das 10.203 Aminosäuren umfassende Extrazelluläre Matrix bindende Protein Embp (siehe Abbildung 2) kodiert. Mithilfe bioinformatischer Programme war es möglich, die Architektur dieses Proteins vorherzusagen. So findet sich gefolgt von einem N-terminalen Exportmotiv (AS 58-84), eine ungeordnete Region von ungefähr

2500 Aminosäuren (AS 85-2586) im vorderen Teil dieses modular aufgebauten Oberflächenproteins. Der zentrale Abschnitt besteht aus 21 repetitiven „Found In Various Architectures“ (FIVAR) Einheiten (AS 2587-4500) und 38 sich abwechselnden „G-related Albumine binding sites“ (GA) und FIVAR Einheiten – zusammengefasst unter dem Begriff GA-Modul – (AS 4501-9443), die zusammen insgesamt etwa 7.000 Aminosäuren umfassen. Abschließend finden sich am C-Terminus vier „Domains of Unknown Function“ (DUF1542) Einheiten (AS 9444-9841) und eine putative Transmembranregion (AS 10070-10088) [43] (siehe Abbildung 2). Obwohl das *S. aureus* Ortholog Ebh wenigstens funktionelle Übereinstimmung mit Bezug auf die Fibronektin-bindende Aktivität aufweist [42], so zeigt sich jedoch, dass einige dieser Vorhersagen aus dem Ebh Protein, zum Beispiel die N-terminale Hyperosmolaritätsresistenz-Domäne [44, 45] in Embp nicht bestätigt werden konnten. Im weitesten Sinne scheint die strukturelle Organisation von Ebh im Wesentlichen der von Embp zu entsprechen, wobei im Detail zumindest eine numerische Varianz der sich wiederholenden Einheiten zu bestehen scheint. Bioinformatisch werden zum Beispiel lediglich sieben FIVAR, jedoch zwölf zusätzliche FIVAR-GA und vier weitere DUF1542 Einheiten im Ebh Protein des *S. aureus*-Stammes MU50, verglichen mit Embp vorhergesagt [45]. In der Tat scheint der strukturelle Aufbau von Ebh in verschiedenen *S. aureus*-Stämmen mit Bezug auf das Vorkommen und die absolute Anzahl der sich wiederholenden Einheiten weit weniger konserviert zu sein, als der Aufbau von Embp in den *S. epidermidis* RP62A und ATCC12228.

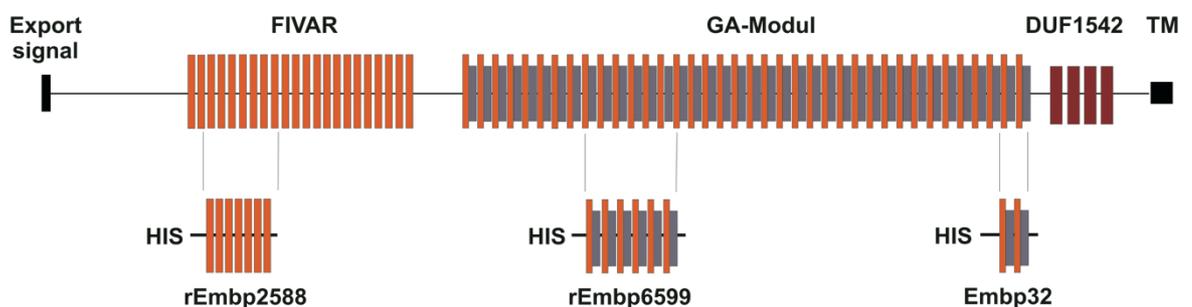


Abb. 2: Schematische Darstellung von Embp entsprechend der bioinformatischen Vorhersage des S.M.A.R.T Tools. Zusätzlich ist das von Williams et al. publizierte Embp32, sowie die, in der Publikation von Christner et al. erwähnten, rekombinanten Proteine (rEmbp2588 und -6599) und ihre Projektion auf das Gesamtprotein, dargestellt.

Zwei 126 Aminosäuren lange FIVAR-GA Einheiten aus EbhA (*S. aureus* MU50), bezeichnet als EbhA-R7-R8, zeigen eine tripel- α -helikale Struktur, wobei eine dieser α -Helices beide Einheiten überspannt und somit für eine in Teilen flexible, elongierte Form verantwortlich ist [45, 46]. In der Tat zeigt die 125 Aminosäuren lange FIVAR-GA Einheit aus Embp eine annähernd identische Struktur (Büttner, Perband, Rohde, nicht veröffentlicht) (siehe Abbildung 37). Zusätzlich weisen zum Teil preliminäre Strukturdaten der FIVAR (Büttner, Perband, Rohde, nicht veröffentlicht) und DUF1542 Einheiten [47] darauf hin, dass mit großer Wahrscheinlichkeit das gesamte Embp Protein als elongierte Struktur vorliegt.

In Sammlungen klinisch signifikanter *S. epidermidis*-Stämme konnte *embp* in mehr als 90 % der getesteten Isolate nachgewiesen werden [48, 49]. Zusätzlich konnte Evidenz für die Bedeutung von Embp *in vivo*, durch den Nachweis von anti-Emb p-Antikörpern in Seren von Patienten mit nachgewiesener *S. epidermidis* Endoprothesen-Infektion (Mack, Büttner, Rohde, nicht publiziert), gefunden werden. Bemerkenswerterweise konnte, unter Einsatz eines Flusskammer-Modells, die inhibitorische Wirkung von anti-Emb p Antikörpern bei der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457 gefunden werden [50], so dass Embp als Komponente einer Vakzine möglicherweise eine Rolle spielen könnte[51].

Ursprünglich suggerierten experimentelle Daten, dass Embp vor allem in der zweiten Phase der Biofilmbildung, der Akkumulationsphase als interzelluläres Adhäsion von Bedeutung ist. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Überexpression von Embp keine veränderte Adhärenz an Polystyrol-, wohl aber eine gesteigerte Bindung an Fibronectin-beschichtete Oberflächen, vermittelt [43]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Embp-Fibronectin-Interaktionen von *S. epidermidis*-Stämmen notwendig für die Akkumulation auf Kunststoffoberflächen sind [52]. FIVAR-GA Einheiten konnten mittels Phage Display als Fibronectin-bindende Elemente des Embp-Proteins identifiziert werden [41]. Diese Resultate konnten später durch die biochemische Analyse von rekombinanten Embp-Fragmenten, die aus FIVAR-GA Einheiten aufgebaut waren, nachvollzogen werden. Zusätzlich lieferten diese Experimente erste Hinweise, dass FIVAR-Einheiten bereits ausreichend für die Bindung an Oberflächen-immobilisiertes Fibronectin sind [43]. Nahezu 100 bakterielle

Oberflächenproteine mit Fibronektin-bindenden Eigenschaften konnten bisher identifiziert werden [33], wenngleich der zugehörige molekulare Mechanismus dieser Interaktion in den meisten Fällen noch aufzuklären ist. Bisherige Analysen zeigen jedoch, dass die Mehrzahl Fibronektin-bindender Proteine aus Bakterien an das N-terminale 29 kDa proteolytische Fragment des Fibronektins binden [53]. Dies gilt insbesondere für das Fibronektin-bindende Protein A (FnBPA) von *Staphylococcus aureus* [54, 55], welches an das zweite bis fünfte Fn Typ I Modul über einen sogenannten Tandem- β -Zipper Mechanismus bindet [54]. Der exakte molekulare Mechanismus der Embp – Fibronektin-Interaktion ist zurzeit noch unbekannt, es gibt jedoch erste Hinweise, dass dieser unabhängig von der Typ I Domäne zustande kommt. Wahrscheinlich sind hier repetitive Einheiten aus der Typ III Domäne beteiligt [56], mit hoher Wahrscheinlichkeit FN12-14 [43].

Neben der Funktion als Adhärenzfaktor während der ersten Phase der Biofilmbildung, konnte Embp auch eine wesentliche Rolle als interzelluläres Adhäsion zugeschrieben werden. Biofilm-induzierende Eigenschaften konnten zuerst im Stamm *S. epidermidis* 1585v beobachtet werden. In diesem Stamm führte eine spontane, chromosomale Veränderung zur Überexpression einer truncierten Isoform von Embp, genannt Embp1 [43]. Im Anschluss an eine Transposon-Mutagenese im Stamm *S. epidermidis* 1585v konnten Mutanten identifiziert werden (M84 und M135), die einen reduzierten beziehungsweise vollständigen Verlust des Biofilmphänotypes aufwiesen. Durch Insertion eines Anhydrotetrazyklin-induzierbaren Promoters vor *embp* konnte die Biofilm-induzierende Wirkung von Embp und die Bedeutung als interzelluläres Adhäsion bestätigt werden [43].

1.4.3 Biofilmmakkumulation

In der zweiten Phase der Biofilmbildung beginnen die adhärennten Staphylokokken zu proliferieren und die Oberfläche zu kolonisieren. Hier spielen insbesondere Faktoren eine Rolle, die interzelluläre Adhärenz vermitteln. So konnte gezeigt werden, dass sowohl Polysaccharide aber auch Proteine in der Akkumulationsphase von großer Bedeutung sind. Ein viel beachtetes Molekül ist das *Polysaccharid intercellular adhesin* (PIA). Es wird

spekuliert, dass die akkumulationsfördernde Aktivität von PIA vor allem auf elektrostatische Interaktion zwischen den deacetylierten, positiv geladenen Glukosamin-Resten des PIA Moleküls und den negativ geladenen Teichonsäuren beruht [57, 58]. Neben der oben genannten Eigenschaft kommt PIA noch eine weitere wesentliche Rolle bei der Etablierung eines Biofilmes zu. So konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von PIA zu einer signifikant geminderten Phagozytose von Bakterien und einer verminderten Aktivierung von J774A.1 Makrophagen führt [19]. Außer dem Polysaccharid PIA können auch Proteinen, bei der Vermittlung von interzellulärer Adhärenz, Funktionen zugeschrieben werden [59]. Hier wären sowohl das Extracellular Matrix Binding Protein Embp [43] wie auch das Accumulation associated Protein Aap [48] zu nennen. Aap ist wie Embp ein Oberflächenprotein, welches sowohl in der primären Adhärenz, vermittelt über die A-Domäne [60, 61], wie auch während der Akkumulation zur Biofilmbildung beiträgt. Die interzelluläre Adhärenz wird dabei nach proteolytischer Prozessierung des Volllängen-Aaps durch die B-Domäne [48], genauer durch die G5-Module vermittelt [62].

1.4.4 Disseminierung

Die Ablösung einzelner Bakterien, aber auch von -aggregaten, aus Biofilmen trägt zur systemischen Dissemination der Erreger im Organismus bei. Die Sekretion von Nukleasen könnte einen Mechanismus zur Ablösung von *S. aureus* aus Biofilmen darstellen. Extrazelluläre DNA (eDNA) spielt eine bedeutende Rolle bei der Biofilmbildung. Dies lässt sich unter anderem durch die Beobachtung untermauern, dass die Zugabe von DNase I die Biofilmbildung inhibiert und bereits bestehende Biofilme aufgelöst werden [63]. Während bei *S. aureus* die Bedeutung von eDNA sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* gut belegt ist, scheint eDNA bei *S. epidermidis* eher eine stabilisierende Funktion zu haben – insbesondere bei *icaADBC*-negativen Stämmen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von DNase I nicht zur Auflösung bereits bestehender Biofilme führte. Diese Beobachtung unterstreicht die redundante Organisation der Biofilmbildung in *S. epidermidis*, die auf einer Vielzahl beteiligter Faktoren beruht [59, 64]. Sekretierte Proteasen von *S. aureus* tragen zur Ablösung von Bakterien aus Biofilmen bei [65]. Jedoch gibt

es bisher keine ausreichende Evidenz dafür, dass eben solche Proteasen von *S. epidermidis* in ähnlicher Weise an der Ablösung von Bakterien aus Biofilmen beteiligt sind. Erste Hinweise, dass auch *S. epidermidis*-Proteasen eine Rolle bei der Degradierung von Biofilmen spielen, verdeutlicht der Effekt der sekretierten Serinprotease Esp. Sie ist in der Lage Biofilme von *S. aureus* zu degradieren [66]. Neben Nukleasen und Proteasen konnte für Moleküle aus der Gruppe der Phenol-soluble Modulins (PSM) eine Beteiligung bei Biofilm-assoziierten Prozessen aufgezeigt werden. PSMs werden in zwei Gruppen eingeteilt - die α - und β -PSMs [67]. Deren Expression steht im wesentlichen unter Kontrolle des *agr*-Lokus [68]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass vor allem β -PSMs an der Strukturierung und der Ablösung von Bakterien aus Biofilmen beteiligt sind [69].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Interaktionsmechanismus des *S. epidermidis*-Oberflächenproteins Embp mit dem Extrazellulärmatrixbestandteils Fibronectin molekular analysiert werden. Dazu sollte mit der Hilfe von rekombinant in *E. coli* exprimierten Embp-Fragmenten und Fibronectin-Subdomänen das Epitop am Fibronectin genauer beschrieben werden. Zum anderen sollte die minimale Fibronectin-bindende Einheit des Embp identifiziert werden.

Schließlich galt es die Bedeutung dieser Interaktion für die bakterielle Adhärenz von Staphylokokken an Oberflächen-immobilisiertes Fibronectin zu klären. Hier sollte auch beantwortet werden, welche Regionen im Embp an der Adhärenz beteiligt sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tab. 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

| Gerät | Hersteller |
|---|---|
| Blotmodul | Invitrogen, Karlsruhe |
| Elektrophorese/ Agarosegelkammer | MWG-Biotech, Ebersberg |
| Elektrophorese-/SDS-PAGE- Kammer | Invitrogen, Karlsruhe |
| Fluorometer / Luminometer (Tecan Infinite M200) | Tecan, Crailsheim |
| Gefrierschränke -20 °C | Liebherr, Biberach an der Riss |
| Gefrierschrank -80 °C | Kryotek, Hamburg |
| Inkubatoren | Heraeus, Tuttlingen |
| Kippschüttler | GFL, Burgwedel |
| Kühlschränke | Liebherr, Biberach an der Riss |
| Mikrowelle | Bosch, Stuttgart |
| Netzgeräte (Invitrogen Power Ease 500, Consort E425) | Invitrogen, Karlsruhe Bachofer, Reutlingen |
| pH-Meter | Mettler-Toledo, Giessen |
| Photometer (SmartSpec 3000) | BioRad, München |
| Pipetten | Gilson, Den Haag, Niederlande |
| DensiCHEK _{plus} | Biomerieux |
| Pipettus (Accu-Jet Pro) | Brand, Wertheim |
| Pinzette | Hartenstein, Würzburg |
| Sonifizierer | Branson, Danbury, USA |
| Scanner | Canon, Amsterdam, Niederlande |
| Sterile Werkbänke | Thermo Scientific |
| Thermoschüttler (Thermomixer 5436, Certomar BS-1) | Eppendorf, Hamburg Sartorius, Göttingen |

| | |
|---|---------------------------------|
| Tischzentrifugen (Centrifuge 5417R, Centrifuge 5415D) | Eppendorf, Hamburg |
| UV-Transilluminator | BioRad, München |
| UV-Dokumentationsstation | Vilber Lourmat, Eberhardzell |
| Vortexer | IKA-Labortechnik, Staufen |
| Waagen | Kern& Sohn GmbH, Balingen |
| | Mettler-Toledo |
| Wasserbad | GFL, Burgwedel |
| Zentrifugen (Centrifuge 5810R) | Eppendorf, Hamburg |
| ÄKTApurifier™ 10 | GE Healthcare, München |
| Biacore™ T100 | GE Healthcare, München |

2.1.2 Mikroskop

Tab. 2: Für alle Aufnahmen wurde das folgende Mikroskop verwendet.

| | |
|-----------------------|---|
| <u>Zeiss Axioplan</u> | <u>Carl Zeiss, Oberkochen</u> |
| Objektiv | Plan-APOCHROMAT 63x/1,4 Öl, Carl Zeiss, Oberkochen |
| Software | Spotsoftware, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA |

2.1.3 Glas- und Plastikwaren, Verbrauchsartikel

Tab. 3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien

| Artikel | Hersteller |
|----------------------------------|---|
| Kanülen | Braun, Melsungen |
| Krykonserven | Mast Diagnostika, Reinfeld |
| Messzylinder | Roth, Karlsruhe |
| Petrischalen | Nunc/Thermo Fisher Scientific, Langenselbold |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Nürnberg |
| Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2,5 mL) | Eppendorf, Hamburg |
| Reaktionsgefäße (15 mL, 50 mL) | GREINER |
| Spritzen (5 mL, 10 mL, 20 mL) | Braun, Melsungen |

| | | |
|--|--|--------------|
| Schottflaschen | Hassa | Laborbedarf, |
| | Hamburg | |
| Sterilfilter | Sarstedt, Nürnberg | |
| PVDS-Membran | Millipore | |
| Filterpapier | | |
| 96-well microtiter plate | GREINER | |
| Ni-Chelat Immobilizer 96-well microtiter plate | Nunc/Thermo Fisher Scientific, Langenselbold | |
| Series S Sensor Chip CM5 | GE Healthcare | |

2.1.4 Chemikalien

Tab. 4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

| Chemikalien | Hersteller |
|---|-----------------------------------|
| 2-Propanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Aceton | Carl Roth, Karlsruhe |
| Agarose | Invitrogen, Karlsruhe |
| Bisacrylamid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Sigma-Aldrich, München |
| DNA-Marker (λ DNA-HindIII/ Φ X-HaeIII) | Finnzymes, Espoo, Finnland |
| EDTA | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethanol absolut | Carl Roth, Karlsruhe |
| Immersionsöl | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Essigsäure (96%) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kristallviolett | Medion Diagnostics, Düdingen |
| Methanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Mowiol | Calbiochem/Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid (NaCl) | J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| Natrium-di-Hydrogenphosphat (NaH_2PO_4) | Merck, Darmstadt |
| Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumcitrat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Protein-Marker (PageRuler) | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Triton X100 | Merck, Darmstadt |

| | |
|---|------------------------|
| Tween20 | Merck, Darmstadt |
| ECL™ Western Blot Developer Solution | GE Healthcare |
| Natrium-Dodecylsulfat (SDS) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Zinkchlorid (ZnCl ₂) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Merck, Darmstadt |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | Merck, Darmstadt |
| Phosphatase Substrat | Sigma-Aldrich, München |
| Glycin | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck, Darmstadt |
| Kalium-di-Hydrogrnphosphat (KH ₂ PO ₄) | Merck, Darmstadt |
| Tris | Merck, Darmstadt |
| HEPES | Merck, Darmstadt |
| MES | Merck, Darmstadt |
| Natriumacetat (NaC ₂ H ₃ O ₂) | Merck, Darmstadt |
| Salzsäure (2N) | Merck, Darmstadt |
| Borsäure | Merck, Darmstadt |
| Glycerol | Carl Roth, Karlsruhe |
| BIA normalizing solution (30 mL) | GE Healthcare, München |
| 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) | GE Healthcare, München |
| N-hydroxysuccinimide (NHS) | GE Healthcare |
| ACS Imidazol | Merck, Darmstadt |
| 1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol Hemihydrat (Chlorobutamol) | Fluka |
| Bicine | Sigma-Aldrich, München |
| Bis-Tris | Sigma-Aldrich, München |
| Arabinose | Carl Roth, Karlsruhe |
| Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Formaldehyd (37 %) | Merck, Darmstadt |
| Surfactant P20 | GE Healthcare |
| Heparin sodium salt | Alfa Aesar, München |

2.1.5 Puffer und Lösungen

Tab. 5: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen.

| Puffer | Zusammensetzung/pH |
|---|---|
| Phosphate buffered saline (PBS), 20-fach | 2,73 M NaCl, 53 mM KCl, 166 mM Na ₂ HPO ₄ , 53 mM KH ₂ PO ₄ , in Millipore™; pH=7,4 |
| PBS/T | 1-fach PBS mit Zusatz von 0,005% Tween-20 |
| NuPAGE® LDS Sample Buffer (4-fach) | Thermo Scientific |
| 0,5fach-TBE-Puffer | 25 mM Tris-HCl; 25 mM Borsäure; 1 mM EDTA; in Millipore™ |
| NiNTA-Bindepuffer | 20 mM NaPO ₄ ; 40 mM Imidazol; 500 mM NaCl; in Millipore™ pH=7,4 |
| NiNTA-Elutionspuffer | 20 mM NaPO ₄ ; 250 mM Imidazol; 500 mM NaCl; in Millipore™ pH=7,4 |
| Anionenaustausch-Bindepuffer | 20 mM Bis-Tris; in Millipore™ pH=7,2 |
| Anionenaustausch-Elutionspuffer | 20 mM Bis-Tris, 1 M NaCl; in Millipore™ pH=7,2 |
| Kationenaustausch-Bindepuffer | 50 mM NaPO ₄ ; in Millipore™ pH=7,0 |
| Kationenaustausch-Elutionspuffer | 50 mM NaPO ₄ , 1 M NaCl; in Millipore™ pH=7,0 |
| NuPAGE® MES SDS Laufpuffer (20-fach) | Thermo Scientific |
| Coomasie-Färbelösung | 0,2 % Kristallviolett, 50 % H ₂ O _{dd} , 40 % Methanol und 10 % Essigsäure(96 %) |
| Destain-Lösung | 50 % H ₂ O _{dd} , 40 % Methanol und 10 % Essigsäure(96 %) |
| Transferpuffer (20-fach) | 500 mM Bicine, 500 mM Bis-Tris, 20 mM EDTA, 1 mM Chlorobutamol; in Millipore™ pH=7,2 |
| Fibronectin from human plasma Abstilllösung | Sigma-Aldrich, München 0,1M Glycin in Millipore™ |

| | |
|------------------------------|--|
| Fixierlösung | 3,7% Formaldehyd in Millipore™ |
| AP-Substratpuffer | 0,1M Glycin, 1mM ZnCl ₂ , 1mM MgCl ₂ in Millipore™ |
| Biacore Laufpuffer | 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0,0005% Surfactant P20 in Millipore™ |
| Protein-free blocking buffer | Thermo Scientific |
| Trenngel-Puffer | 1,5 M Tris; in Millipore™ pH=8,8 |
| Sammelgel-Puffer | 1 M Tris; in Millipore™ pH=6,8 |

2.1.6 Kulturmedien und Zusätze

Tab. 6: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien

| Medium/Zusatz | Anbieter |
|---|--|
| Luria Bertani(LB)-Flüssignährmedium | 10 g/L Tryptone; 5 g/L Hefeextrakt; 10 g/L Natriumchlorid |
| Trypticase Soy Broth(TSB) | BBL |
| Brain Heart Infusion | OXOID |
| B2-Flüssignährmedium | Schenk et al.[70] |
| SOC-Flüssignährmedium | Invitrogen, Karlsruhe |
| NB2+Flüssignährmedium | Mack et al.[71] |
| BHI+Flüssignährmedium | Mack et al.[71] |
| Columbia-Blutagar | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Bacto Agar | |
| LB-Agar | 10 g/L Tryptone; 5 g/L Hefeextrakt; 10 g/L Natriumchlorid; 12 g/L Agar |
| BHI-Agar | OXOID |
| ST-Agar (STA) | Mack et al.[71] |
| Softagar | Kayser et al.[72] |
| Ampicillin-Lösung (100 mg/mL in Methanol) | Sigma-Aldrich, München |
| Chloramphenicol-Lösung (10 mg/mL in Methanol) | Sigma-Aldrich, München |

| | |
|--|------------------------|
| Erythromycin-Lösung (20 mg/mL in Methanol) | Sigma-Aldrich, München |
| Anhydrotetrazyklin-Lösung (1 mg/mL in Aqua ad ini.) | Sigma-Aldrich, München |
| Tetracyclin-Lösung (20 mg/mL in Methanol) | Sigma-Aldrich, München |

2.1.7 Enzyme

Tab. 7: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme. Alle hier benutzten Restriktionsendonukleasen werden bei New England Biolabs erworben.

| Enzym | Hersteller |
|------------------------------|------------------------|
| Lysostaphin | Sigma-Aldrich, München |
| Alkaline Phosphatase, Shrimp | Roche |
| Apal | New England Biolabs |
| XhoI | New England Biolabs |
| EcoRI-High Fidelity (HF) | New England Biolabs |
| Ascl | New England Biolabs |
| KpnI-HF | New England Biolabs |
| PstI-HF | New England Biolabs |
| SacII | New England Biolabs |

2.1.8 Antikörper

Tab. 8: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

| Antikörper | Spezies | Hersteller/Referenz |
|--|----------------|----------------------------|
| Anti-5179-Antikörper | Kanninchen | Mack et al.[73] |
| Anti-rEmbp2588 | Kanninchen | Christner et al.[43] |
| Anti-rEmbp6599 | Kanninchen | Christner et al.[43] |
| Anti-rabbit-IgG Alkaline Phosphatase antibody | Ziege | Sigma-Aldrich, München |
| Anti-FNH3-8 | Maus | TAKARA |
| Anti-c-myc | Maus | Cell Signaling Technology |
| Anti-rabbit-IgG-Peroxidase Konjugat | Maus | Jackson ImmunoResearch |
| ECL Anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase antibody | Schaf | GE Healthcare |

2.1.9 Kits

Tab. 9: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Kits.

| Name | Hersteller |
|------------------------------------|---------------|
| QIAGEN® Plasmid Mini Kit | QIAGEN |
| Phusion™ High-Fidelity PCR Kit | Finnzymes |
| NucleoSpin Gel and PCR Clean-up | Machery&Nagel |
| In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Plus | Clontech |

2.1.10 Bakterienstämme, Plasmide und Phagen

Tab. 10: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterien, Plasmide und Phagen

| Stämme/Plasmide/Phagen | Eigenschaften | Referenz |
|--|---|------------------------|
| Stämme | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> RN4220 | Restriktionsdefiziente Mutante von RN450 | Kreiswirth et al.[74] |
| <i>Staphylococcus aureus</i> RN9588 | Enthält Plasmid pCN36 | Charpentier et al.[75] |
| <i>Staphylococcus aureus</i> RN9612 | Enthält Plasmid pCN50 | Charpentier et al.[75] |
| <i>Staphylococcus aureus</i> RN9623 | Enthält Plasmid pCN57 | Charpentier et al.[75] |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1585 | Isolat einer Port-Katheter-Infektion; Biofilm-, <i>icaADBC</i> -, <i>aap</i> -negativ | Christner et al.[43] |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1585v | Subpopulation von 1585 | Christner et al.[43] |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1585P _{<i>xyI embp</i>} | Insertion eines Anhydrotetrazyklin-induzierbaren Promoters vor <i>embp</i> | Christner et al.[43] |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457-M12 | <i>Tn917</i> -Insertion in <i>purR</i> | Knobloch et al.[76] |
| <i>Staphylococcus carnosus</i> TM300 | | Schleifer et al. [77] |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1585vxpFnBA4 | <i>In trans</i> -Expression von FnBPA | H. Rohde |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1585P _{<i>xyI embp</i>} xpFnBA4 | <i>In trans</i> -Expression von FnBPA | H. Rohde |
| <i>Staphylococcus carnosus</i> TM300xpFNBA4 | <i>In trans</i> -Expression von FnBPA | Sinha et al.[78] |

| | | |
|---|---|-------------------------|
| <i>E. coli</i> TOP10 Chemically competent cells | Klonierungsstamm, Genotyp F- <i>mcrA</i> D (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) F80/ <i>lacZ</i> DM15; <i>DlacX74recA1 deoR araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG</i> | Invitrogen |
| <i>E. coli</i> Stellar™ competent cells | Klonierungsstamm | ClonTech |
| <i>E. coli</i> BL21™ AI | Expressionsstamm; Genotyp F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm araB::T7RNAP-tetA</i> | Invitrogen |
| Plasmide | | |
| pCR™ 4-Embp-FIVAR ₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ | Enthält Found in Various Architecture Repeats | M. Wolters |
| pCR™ 4-Embp-GAFIV ₁₃₅₁₆₋₁₁₀₇₉ | Enthält G-related albumin binding (GA) domain | M. Wolters |
| pALC2073 | <i>TetR</i> und P _{<i>xyl/tetO</i>} -Promoter enthaltendes Plasmid | Bateman et al. [79] |
| pCN57 | <i>gfpmut2</i> wird konstitutiv exprimiert | Charpentier et al. [75] |
| pCN36 | Enthält <i>tet(M)</i> -Resistenzkassette | Charpentier et al. [75] |
| pCN50 | Enthält <i>cat194</i> -Resistenzkassette | Charpentier et al. [75] |
| pCN57_tet(M) | Enthält die <i>tet(M)</i> -Resistenzkassette | Diese Arbeit |
| pCN_FIVAR | Zwischenprodukte | Diese Arbeit |
| pCN_GAFIV | Zwischenprodukte | Diese Arbeit |
| pCN_P _{<i>xyl/tetO</i>} -FIVAR | Zwischenprodukte | Diese Arbeit |
| pCN_P _{<i>xyl/tetO</i>} -GAFIV | Zwischenprodukte | Diese Arbeit |
| pHB2 _C -FIVAR | Erlaubt die Anhydrotetrazyklin-induzierbare Expression von Embp-FIVAR ₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ | Diese Arbeit |
| pHB2 _C -GAFIV | Erlaubt die Anhydrotetrazyklin-induzierbare Expression von Embp-GAFIV ₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ | Diese Arbeit |
| pHB2 _C -n-mycGAFIV | Enthält ein Myc-Tag zwischen YSIRK und Embp-GAFIV ₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ | J. Wilde |

| | | |
|--------------------|--|--------------------------|
| pDEST™ 17/rEmbp170 | Zur rekombinanten Expression der minimalen Baueinheit der FIVAR-Region | H. Rohde |
| pDEST™ 17/rEmbp125 | Zur rekombinanten Expression der minimalen Baueinheit der FIVAR-Region | Rohde (nicht publiziert) |
| Phagen | | |
| φA6C | | Mack et al.[80] |

2.1.11 Primer

Tab. 11: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer. Diese wurden sämtlich bei der Firma MWG Eurofins bestellt und synthetisiert.

| Name | Sequenz | Zielsequenz | F/R ^a | Referenz |
|-----------------|--|---|------------------|------------------------|
| 599 | 5'-GTT TAA GGG CCC ACC TAG GCA AAT ATG CTC TTA CGT GC-3' | <i>tet(M)</i> (M21136) | F | Charpentier et al.[75] |
| 600 | 5'-CTA TGA CTC GAG GCC GCG GAA ATA TTG AAG GCT AGT CAG-3' | <i>tet(M)</i> (M21136) | R | Charpentier et al.[75] |
| pT181-tetM_for | 5'-CAA ACT GGG TAA ACA CTG CAT-3' | Sequenzierprimer | F | Diese Arbeit |
| tetM-ampCol_rev | 5'-GGT GAT GAC GGT GAA AAC CT- 3' | Sequenzierprimer | R | Diese Arbeit |
| YSIRK_inf_1 | 5'-TAC CGA GCT CGA ATT CCC CGG GAT TGT GAT AAA TG-3' | Konstrukt zur <i>in trans</i> Expression von Embp-FIVAR ₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ und -GAFIV ₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ | F | J. Wilde |
| Inf_AscGAF_rev | 5'-TGC ATT TAG AAT AGG CGC GCC ATA TAT TTT ACT TTT TAG AAC- 3' | Konstrukt <i>in trans</i> Expression von Embp-FIVAR ₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ und -GAFIV ₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ | R | Diese Arbeit |
| pCN57_MCS_for | 5'-CCT GAT TCT GTG GAT AAC CGT ATT AC-3' | Sequenzierprimer | F | Diese Arbeit |
| pCNDUF_term | 5'-GCA AAG GCG | Sequenzierprimer | R | Diese Arbeit |

| | | | | |
|--------------|--|--|---|---------------------------|
| <u>_rev</u> | CCT GTC AC-3' | | | |
| Tetprom_for | 5'-AGG CGG TGG TAC CAT CAA GCT TAT TTT AAT TAT ACT CTA-3' | Anhydrotetrazyklin -induzierbares Promoter-Element <i>P_{xyl/TetO}</i> aus pALC2073 [79] | R | Diese Arbeit |
| Tetprom_rev | 5'-ACC GCC TCT GCA GGG TAT CGA TAA CTC GAC ATC TTG GTT AC-3' | Anhydrotetrazyklin -induzierbares Promoter-Element <i>P_{xyl/TetO}</i> aus pALC2073 [79] | F | Diese Arbeit |
| YSIRK_CN_rev | 5'-AAC ACA AGT GTT GCA ATC ACA G-3' | Sequenzierprimer | R | Diese Arbeit |
| 617 | 5'-CTA TGA CTC GAG GCC GCG GCC TTC TTC AAC TAA CGG GG-3' | <i>cat194</i> (NC002013) | F | Charpentier et al.[75] |
| 618 | 5'-GTT TAA GGG CCC ACC TAG GTA TTA TCA AGA TAA GAA AG-3' | <i>cat194</i> (NC002013) | R | Charpentier et al.[75] |

^aF, forward; R, reverse

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Arbeitstechniken

Anzucht von Bakterien

Sofern nicht anders beschrieben wurden alle *Escherichia coli*-Stämme in Luria Bertani (LB)-Medium bzw. auf LB-Agar kultiviert. Sollen Plasmide in diesen Bakterien propagiert werden, wird Ampicillin – sofern nicht anders beschrieben - in einer Konzentration von 100 µg/mL dem Medium zugesetzt. Plattenkulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, Flüssigkulturen zusätzlich bei 200 rpm geschüttelt.

Zur Durchführung von phänotypischen Untersuchungen bei Staphylokokken wurden diese in Trypticase Soy Broth (TSB) angezüchtet. Für genetische Analysen wurden die Staphylokokken in Brain Heart Infusion (BHI) kultiviert. Sofern keine anderen Bedingungen angegeben werden, sind Plattenkulturen im Brutschrank bei 37 °C, Flüssigkulturen zusätzlich bei 200 rpm geschüttelt worden.

Biofilm-Assay

Vorkulturen werden in TSB-Flüssignährmedium angelegt. Bei Bedarf werden entsprechende Selektionsmarker der Kultur hinzugefügt. Diese werden über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag werden aus jeder Vorkultur 20 µL Suspension in 2 mL frischem Medium verdünnt. Bei Verwendung von Stämmen, die Plasmide mit induzierbarer Proteinexpression enthalten, wird eine Endkonzentration von 100 ng/mL Anhydrotetrazyklin eingestellt. Danach werden aus jeder Verdünnung 4x100 µL Suspension in einer 96-well NUNCLON Δ-Mikrotiterplatte aufgetragen und im Brutschrank für weitere 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Platten werden dekantiert und dreimal auf Zellstoff ausgeschlagen. Anschließend wird die Oberfläche dreimal mit 200 µL PBS gespült. Die Platten werden mit 100 µL GentianaViolett pro Well befüllt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend erneut dekantiert und kurz mit Leitungswasser gespült. Zum Schluss werden

die Platten getrocknet. Quantifizierung der Biofilmbildung durch Messung der Absorption ($\lambda_{\text{Messung}}=570 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Referenz}}=405 \text{ nm}$) mit dem InfiniteM200.

2.2.2 Proteinchemische Arbeitstechniken

Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Herstellung von SDS-Gelen werden Trenn- und Sammelgel gegossen. Die entsprechende Zusammensetzung ist der Tabelle 12 zu entnehmen. Zuerst wird das Trenngel angefertigt. Nach dem Einfüllen in die Kammer wird das Gel mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 20 min ist das Trenngel ausgehärtet und wird dann nach dem Abgießen des Isopropanols mit dem Sammelgel überschichtet. Zuletzt wird noch ein Kamm eingesetzt. Nach weiteren 20 min ist das Gel fertig und kann direkt benutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C feucht verpackt im Kühlschrank gelagert werden.

Beladen werden SDS-Gele mit 20 μL Probe in einfach LDS-Puffer. 3,5 μL des Größenstandards werden in der ersten Tasche aufgetragen. Anschließend laufen die Gele bei einer Spannung von 150 Volt für 60 bis 120 min.

Sofern die SDS-Gele nicht für etwaige Folgeversuche (z.B. Western Blot) benötigt werden, werden diese zehn Minuten in einem Coomassie-Bad gefärbt und danach mit Destain-Lösung bis zum gewünschten Grad entfärbt. Fertige Gele werden eingescannt und anschließend getrocknet.

Tab. 12: Tabellarische Übersicht der Zusammensetzung in dieser Arbeit verwendeter verschiedener SDS-Gel-Stärken

| Lösung | Volumen (in mL) | | | |
|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| | 8 % Trenngel | 10 % Trenngel | 15 % Trenngel | 4 % Sammelgel |
| Sammelgelpuffer | | | | 2,5 |
| Trenngelpuffer | 2,5 | 2,5 | 2,5 | |
| Aqua ad ini. | 4,7 | 4,1 | 2,4 | 6,1 |
| Polyacrylamid | 2,7 | 3,3 | 5 | 1,3 |
| 10 % SDS-Lösung | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| APS | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| TEMED | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,005 |

Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für die in dieser Arbeit verwendeten rekombinant in *E. coli* exprimierten Fibronectin-Subdomänen soll die von Leahy et al. [37] vorgeschlagene Nomenklatur Verwendung finden. Beispielsweise werden die Repeats 12-14 der Fn Typ III-Subdomäne hier im Folgenden mit FN12-14 bezeichnet. Die Expression und Aufreinigung von Fibronectinfragmenten erfolgt – sofern nicht abweichend gekennzeichnet - wie in der Publikation von Ohashi und Erickson [81] beschrieben.

Rekombinante Expression

Es wird eine Vorkultur des jeweiligen Expressionsstammes in LB-Flüssignährmedium mit geeignetem Selektionsmarker angelegt. Diese Vorkultur inkubiert über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Inkubator. Unter photometrischer Kontrolle wird die Hauptkultur aus der Vorkultur beimpft und auf eine optische Dichte – gemessen bei 600 nm – von ca. 0,05 eingestellt. Bei 37 °C und 200 rpm wächst diese Kultur dann innerhalb von etwa zwei Stunden bis zu einer optischen Dichte von 0,5. Hier erfolgt die Induktion durch Zugabe eines geeigneten Induktors. Bei dem Expressionsstamm *E.coli* BL21 AI wird durch Zugabe von Arabinose bis zu einer Endkonzentration von 0,02 % (w/v) induziert; der Stamm *E.coli* BL21 star wird durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (Endkonzentration 1 mM) induziert. Nach 3,5 Stunden Wachstum unter induktiven Bedingungen werden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wird verworfen. Ggf. werden die Pellets bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine aus *E.coli*

Die Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine aus *E. coli* erfolgt nach Ultraschalllyse der Bakterien mittels chromatographische Verfahren. In der Regel kommt eine sequenzielle Abfolge verschiedener Verfahren zum Einsatz. Stets beginnt die Aufreinigung mit einer Nickel-Affinitätschromatographie. Diese wird von einer Ionenaustauschchromatographie gefolgt und ggf. durch eine Gelfiltration abgeschlossen. In dieser Arbeit wird das System ÄKTApurifier™ 10 der Firma GE Healthcare verwendet.

Zellyse

Bakterienpellets werden in einem adäquaten Volumen NiNTA-Bindepuffer suspendiert. Dabei werden in der Regel 25 mL Bindepuffer pro Pellet von 1 L Expressionskultur eingesetzt. Anschließend wird die Bakteriensuspension gleichmäßig auf 15 mL Greiner Tubes verteilt. Die Zellyse erfolgt mithilfe von Ultraschall. Dieser wird über einen Zeitraum von 1:40 min mit Intervallen von 10 Sekunden Pulsdauer, gefolgt von zehn Sekunden Pause appliziert. Dabei werden die Proben durch permanente Lagerung auf Eis gekühlt. Anschließend werden Zelltrümmer mittels zweimaliger Zentrifugation bei 20.000 xg für jeweils 20 min entfernt. Der Überstand wird zum Schluss steril filtriert (0,22 µm Porengröße).

IMAC (immobilized metal affinity chromatography)-Methode unter Verwendung von NiNTA (Nickel²⁺-Nitrilotriessigsäure)

Die Aufreinigung rekombinant in *E. coli* exprimierter Proteine aus dem Lysat erfolgt gemäß dem im Labor etablierten Protokoll für die Nickelaffinitätschromatographie [43, 48, 59, 82]. Das Resultat wird durch die Anfertigung eines SDS-PAGE überprüft.

Ionenaustauschchromatographische Verfahren

In dieser Arbeit kommt sowohl der Anionen- wie auch der Kationenaustausch zur Anwendung. Die eingesetzten Säulen enthalten SP Sepharose™ High Performance (Kationen-) und Q Sepharose™ High Performance (Anionenaustausch). Diese beiden Grundsubstanzen fungieren jeweils als starke Ionenaustauscher.

Kationenaustauschchromatographie

Nachdem die Proteinlösung in Kationenaustausch-Bindepuffer umgepuffert wurde, erfolgt die Aufreinigung des Proteins mithilfe eines bereits im Labor etablierten Protokolls. Das Resultat wird durch die Anfertigung eines SDS-PAGE überprüft.

Anionenaustauschchromatographie

Nachdem die Proteinlösung in Anionenaustausch-Bindepuffer umgepuffert wurde, erfolgt die Aufreinigung des Proteins mithilfe eines bereits im Labor etablierten Protokolls. Das Resultat wird durch die Anfertigung eines SDS-PAGE überprüft.

Umpufferung von Proteinlösungen

Vor der Umpufferung von Proteinlösungen werden Fraktionen mittels SDS-PAGE identifiziert, in denen qualitativ und quantitativ ausreichendes Protein vorliegt, zusammengeführt. Diese Proteinlösung wird dann mittels eines AMICON Ultra Filtertubes entsprechend der vom Hersteller angegebenen Spezifikationen zuerst aufkonzentriert und anschließend durch sukzessiven Ersatz des Puffers umgepuffert. Dabei wird der ursprüngliche Puffer nahezu komplett ersetzt.

2.2.3 Genetische Methoden

Plasmidpräparation

Plasmidpräparationen werden mit dem QIAGEN® Plasmid Mini Kit aus Über-Nacht-Schüttelkulturen durchgeführt. Dazu wird die Bakteriensuspension in 2 mL-Eppendorf Tubes überführt. Diese werden dann zwei Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 250 µL P1-Puffer suspendiert. Bei der Präparation von Plasmiden aus Staphylokokken werden nach diesem Schritt 5 µL Lysostaphin zugegeben und diese Suspension bei 37 °C 60 min im Heizblock inkubiert. Nun werden 250 µL Lysis-Puffer (P2) zugegeben und die Tubes mehrfach über Kopf geschwenkt. Jetzt erfolgt die Zugabe von 350 µL P3-Puffer. Nach erneutem mehrfachen über Kopf schwenken werden die Tubes in der Tischzentrifuge für zehn Minuten bei oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand auf eine Säule überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C für eine Minute wird der Durchfluss verworfen und 500 µL PB-Puffer auf die Membran pipettiert. Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) auf der

Membran wird durch Zentrifugation und Zugabe von 750 μL PE-Puffer gewaschen. Der Durchfluss wird stets verworfen. Vor der Elution wird die Säule in ein steriles Eppendorf Tube überführt. Nach Zugabe von 50 μL Aqua ad ini. wird die Membran drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach die DNA durch Zentrifugation für drei Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C eluiert. Das Resultat wird durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Lagerung der Plasmide erfolgt bei -20 °C im Gefrierschrank.

Agarosegelelektrophorese

Für diese Arbeit werden Agarosegele mit 1 %, 2 % oder 3 % Agarose (w/v) benutzt. Zur Herstellung dieser Gele wird die entsprechende Menge Agarose eingewogen und in 100 mL TBE-Puffer kurze Zeit quellen gelassen. Danach wird die Agarose bis zur vollständigen Auflösung gekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 40 °C werden 5 μL RedSafe hinzugegeben und die flüssige Agarose in eine entsprechende Kammer gegossen. Nach dem Einsetzen der Kämme härtet das Gel aus. Nun können die Kämme gezogen und das Gel mit TBE-Puffer überschichtet sowie mit DNA beladen werden. Sofern keine anderen Angaben gemacht werden, sind stets 5 μL DNA mit 2 μL Ladepuffer vermischt und gemeinsam in einer Tasche aufgetragen worden. Regelmäßig werden 5 μL Größenstandard aufgetragen. Das so beladene Gel läuft dann bei einer Spannung von 120 Volt für mindestens 45 min. Das entstandene Bandenmuster wird durch UV-Licht sichtbar gemacht und mithilfe der BioRad-Apparatur dokumentiert.

Restriktionsverdau

Aufgrund unterschiedlicher Mengen an Plasmid, die aus Staphylokokken bzw. *E.coli* isoliert werden, unterscheidet sich das Volumen der eingesetzten Plasmidpräparation. Es werden 2 μL eines geeigneten 10 fach-Puffers vorgelegt, dann werden 10 μL (*E.coli*) bzw. 6 μL (Staphylokokken) Aqua ad ini. hinzugegeben. Nach Zugabe von 6 μL (*E.coli*) bzw. 10 μL (Staphylokokken) Plasmid-DNA werden jeweils 1 μL der benötigten Restriktionsendonukleasen

(RE) in den Ansatz pipettiert. Dieser wird nun gevortext und anschließend für drei Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Ergebnis wird mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

5'-Dephosphorylierung

Bei der Herstellung von Vektor-Fragmenten für die Ligation wird eine 5'-Dephosphorylierung durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit des Restriktionsverdau werden die RE durch 15-minütige Inkubation bei 65 °C hitzeinaktiviert. Danach werden dem Restriktionsverdau 1 µL Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), 3 µL 10fach Phosphatase-Puffer und 6 µL Aqua ad ini. zugesetzt. Dieser Ansatz inkubiert weitere zehn Minuten bei 37 °C bevor auch die SAP 15 min bei 65 °C hitzeinaktiviert wird.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standard-PCR-Ansatz

Die zu untersuchende DNA wird im 50 µL-Ansatz der PCR zugeführt. Dazu wird diese 1:25 in Aqua ad ini verdünnt. Pro Ansatz werden 2 µL DNA-Verdünnung, je 1,5 µL forward- und reverse-Primer mit 1 µL 10 fach-Desoxyribonukleotidtriphosphat-Mix, 10 µL 5-fach-HF-Puffer, 0,5 µL Phusion-DNA-Polymerase sowie 33,5 µL Aqua ad ini pipettiert. Diese Arbeit erfolgt stets auf Eis. Anschließend wird jeder Ansatz kurz gevortext und zentrifugiert.

Gradienten-PCR

Bei der Gradienten-PCR werden sechs Tubes mit dem Standardansatz pipettiert und jede zweite Position im Thermocycler besetzt. Anschließend wird ein Programm mit folgenden Vorgaben verwendet: Initiales Denaturieren über zwei Minuten bei 98 °C. Anschließend werden 30 Zyklen wie folgt durchgeführt. Jeder Zyklus beginnt mit der Denaturierung bei 98 °C für 15 Sekunden. Das Annealing wird dann 15 Sekunden in einem Gradienten von 55 °C ± 10 °C durchgeführt. Die Elongationszeit wird anhand der vom Hersteller angegebenen Geschwindigkeit von 1000 Bapsenpaare pro Minute und der Größe des zu

amplifizierenden DNA-Abschnittes ermittelt. Die Elongationstemperatur liegt bei 72 °C. Nach 30 Zyklen wird noch einmal eine finale Elongation über fünf Minuten bei 72 °C durchgeführt. Das Ergebnis wird mittels Agarosegelelektrophorese ermittelt.

Standard-PCR

In der Regel wird die PCR mit einem Standardprogramm betrieben. Dieses benutzt die folgenden Vorgaben: Initiale Denaturieren über zwei Minuten bei 98 °C. Anschließend werden 30 Zyklen wie folgt durchgeführt. Jeder Zyklus beginnt mit der Denaturierung bei 98 °C für 15 Sekunden. Das Annealing wird dann 15 Sekunden bei der in der Gradienten-PCR ermittelten Annealing-Temperatur durchgeführt. Die Elongationszeit wird anhand der vom Hersteller angegebenen Geschwindigkeit von 1000 Basenpaaren pro Minute und der Größe des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes ermittelt. Die Elongation erfolgt bei 72 °C. Am Ende wird noch einmal eine finale Elongation über fünf Minuten bei 72 °C durchgeführt. Die Produkte werden dann mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Bei Bedarf werden die Tubes bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

DNA-Aufreinigung

Für die Ligation von DNA-Fragmenten oder die Sequenzierung von DNA-Abschnitten ist es notwendig diese DNA vorher aufzureinigen. Hier wird standardmäßig das PCR purification kit (Machery&Nagel) verwendet.

Nach der Auftrennung der aufzureinigenden DNA mithilfe der Agarosegelelektrophorese sollen die gesuchten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Um eine UV-Exposition der DNA-Fragmente zu verhindern, wird das Agarosegel geteilt. In einem kleineren Streifen des Agarosegels, auf dem lediglich der DNA-Größenstandard (F-303 SD) und ein Teil der DNA vorliegt, wird die Position der gesuchten Fragmente markiert. Im Anschluss werden die Agarosegelteile wieder zusammengeführt und ohne UV-Licht die DNA-Fragmente an der markierten Position „blind“ ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Agaroseblöcke werden in 2 mL Eppendorf Tubes überführt und gewogen. Anschließend erfolgt die Zugabe von

Bindepuffer (NT) im Verhältnis 1:3 bis 1:5 (w/v). Die Agaroseblöcke werden nun im Heizblock bei 50 °C bis zur vollständigen Auflösung der Agarose unter gelegentlichem Vortexen inkubiert. Die nun gelöste DNA wird in eine Säule pipettiert und durch Zentrifugation bei 11.000 xg und Raumtemperatur für jeweils eine Minute an die Membran adsorbiert. Der Durchfluss wird verworfen. Anschließend wird die DNA auf der Membran durch Zugabe von 700 µL Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgt durch Zugabe von 50 µL Aqua ad ini., welches auf 70 °C vorgewärmt wird. Das Resultat wird zum einen durch erneute Agarosegelelektrophorese zum anderen durch Konzentrationsbestimmung der DNA-Fragmente im NanoDrop kontrolliert.

2.2.5 Klonierung

Konventionelle Ligation

Bei der Ligation wird der Zielvektor mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geöffnet. Das 5'-Ende des Vektorfragments wird dephosphoriliert und anschließend mittels DNA-Aufreinigung isoliert. Parallel wird das Insert mittels PCR amplifiziert, anschließend mit den selben Restriktionsendonuklease wie der Vektor verdaut und wie oben angegeben aufgereinigt.

Entsprechend den Empfehlungen des Herstellers werden 150 ng Vektor-DNA eingesetzt. Die Ligation der DNA-Fragmente erfolgt gemäß Herstellerangaben mit der T4 DNA-Ligase im molaren Verhältnis von 1:2 (Vektor zu Insert). Dabei wird folgender Reaktionsansatz pipettiert - bestehend aus 1 µL zehnfach-T4-Ligase-Puffer und 1 µL T4 DNA-Ligase. Nach Zugabe der entsprechenden DNA-Mengen wird der Ansatz auf 10 µL Gesamtvolumen mit Aqua ad ini. aufgefüllt. Dieser Ansatz inkubiert über Nacht bei 16 °C im Thermocycler.

In-Fusion® Klonierung

Für die Klonierung mit dem In-Fusion®-Kit wird der Zielvektor mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geöffnet. Das 5'-Ende des

Vektorfragments wird dephosphoryliert und anschließend mittels DNA-Aufreinigung isoliert.

Parallel wird das Insert mittels PCR amplifiziert. Ein Verdau des Inserts ist bei diesem Klonierungsverfahren nicht notwendig, da es auf homologer Rekombination basiert. Die homologen Bereiche am Insert werden durch die Primer bereitgestellt. Auch dieses Fragment wie o.a. aufgereinigt.

Entsprechend den Empfehlungen des Herstellers werden ca. 150 ng Vektor-DNA eingesetzt. Die Edukte der In-Fusion-Reaktion werden ebenfalls im molaren Verhältnis von 1:2 (Vektor zu Insert) in das Reaktionsgefäß pipettiert. Durch Zugabe von TE-Puffer wird das Reaktionsvolumen auf 10 µL aufgefüllt. Dieser Ansatz inkubiert zuerst im Thermocycler - zuerst für 30 min bei 37 °C, dann weitere 30 min bei 50 °C. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden aus diesem Reaktionsansatz direkt 2 µL transformiert. Durch Zugabe von 32 µL TE-Puffer wird der Rest der Reaktion verdünnt und weitere 2 µL transformiert. Für diese Transformation werden die empfohlenen Stellar™ Zellen eingesetzt und diese gemäß den Angaben des Herstellers transformiert.

2.2.6 Herstellung und Transformation von kompetenten Zellen

Herstellung von kompetenten Zellen

Bei der Verwendung von chemisch-kompetenten *E.coli* werden kommerzielle Produkte verwandt (siehe auch Liste).

Die Herstellung elektrokompenter *S. aureus* RN4220- und *S. epidermidis* M12-Aliquots erfolgt gem. dem Protokoll von Schenk et al. [70].

Elektro-kompetente *S. carnosus* wurden nach dem Protokoll von Löfblom et al. [83] hergestellt.

Transformation von kompetenten Zellen

Chemische Transformation von *E.coli*

Die Transformation chemisch-kompetenter *E.coli*-Stämme erfolgt gem. den Angaben der Hersteller. Die Transformationsansätze werden – wenn nicht

anders beschrieben – nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C und 200 rpm auf LB-Agar mit Ampicillin ausplattiert.

Elektroporation der elektro-kompetenten Staphylokokken

Die Elektroporation von *S. aureus* und *S. epidermidis* erfolgt gem. den Vorgaben aus dem Protokoll von Schenk und Laddaga [70].

Die Elektroporation von *S. carnosus* wird entsprechend dem Protokoll von Löfblom et al. [83] vorgenommen.

Die Transformationsansätze werden – wenn nicht anders beschrieben – nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C und 200 rpm auf BHI-Agar mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert.

Genetische Modifikation von Zielstämmen mittels Phagentransduktion mit dem *S. epidermidis*-Phagen A6C

Phagengewinnung

Eine Kolonie des Ausgangsstammes mit dem zu transduzierenden genetischen Element wird in 3 mL NB2+Medium für ca. vier Stunden bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator bebrütet. Anschließend wird diese Kultur unter photometrischer Kontrolle auf eine optische Dichte von ca. 0,1 – gemessen bei 600 nm – eingestellt. Es werden 0,5 mL einer logarithmischen Verdünnungsreihe von 10^{-3} bis 10^{-6} des Phagenlysates in NB2+Medium vorgelegt. Diese Verdünnung wird im Verhältnis 1:1 mit der Bakteriensuspension gemischt und mit 3 mL ST-Softagar überschichtet. Diese Suspension wird nun auf ST-Agar-Platten ausplattiert und nach dem Aushärten des Softagar für 24 Stunden im Inkubator bebrütet.

Am folgenden Tag werden auf jede Agarplatte 5 mL NB2+Medium gegeben. Anschließend wird der Softagar vorsichtig abgenommen und mit dem Medium in einen 50 mL Greiner-Tube überführt. Nach zehnssekündigem Ultraschallpuls (70 % Amplitude) wird die Suspension bei 4 °C und 5.000 rpm für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wird danach steril filtriert. Das so gewonnene Phagenlysat lagert bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank.

Phagentitration

Eine Kolonie *Staphylococcus epidermidis* 1585 wird in 3 mL NB2+Medium für ca. vier Stunden bei 37 °C und 200 rpm. im Schüttelinkubator bebrütet. Anschließend wird diese Kultur unter photometrischer Kontrolle auf eine optische Dichte von 0,1 – gemessen bei 600 nm – eingestellt. Es werden 0,5 mL einer logarithmischen Verdünnungsreihe von 10^{-6} bis 10^{-9} des Phagenlysates in NB2+Medium vorgelegt. Diese Verdünnung wird im Verhältnis 1:1 mit der Bakteriensuspension gemischt und mit 3 mL ST-Softagar überschichtet. Diese Suspension wird nun auf ST-Agar-Platten ausplattiert und nach dem Aushärten des Softagars für 24 Stunden im Inkubator bebrütet. Nach 24 Stunden werden die entstandenen Plaques ausgezählt und so die Aktivität des Phagenlysates bestimmt. Gegebenenfalls wird die Phagengewinnung nochmals wiederholt, um eine höhere Aktivität des Phagen zu erzielen.

Phagentransduktion

In 5 mL NB2+Medium wird eine Suspension des Zielstammes mit einer optischen Dichte von etwa elf - gemessen bei 600 nm - eingestellt. 1 mL dieser Suspension wird im Verhältnis 1:1 mit einem Phagenlysat (Aktivität bis mindestens 10^9 PBE/mL) gemischt und für 30 min bei 37 °C und 200 rpm im Inkubator bebrütet. Die Adsorption des Phagen ϕ A6C wird durch Zugabe von 40 μ L einer 1 M Natriumcitrat-Lösung gestoppt. Die Bakterien werden jetzt durch Zentrifugation bei 5.000 rpm und 4 °C und anschließender Resuspension in BHI+Medium zweimal gewaschen. Das so entstandene Pellet wird nun in 3 mL BHI-Medium unter Zusatz eines entsprechenden Selektionsmarkers aufgenommen und für 60 min bei 37 °C und 200 rpm im Inkubator bebrütet. Zuletzt erfolgt die Zugabe von 3 mL BHI-Softagar und das Ausplattieren auf entsprechenden Selektivnährböden. Diese werden nach dem Aushärten des Softagars für bis zu 48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.7 Analyse der Transformanden

Empfindlichkeitstestung mithilfe des Agardiffusionstestes

Die Empfindlichkeit der Transformanden von *S. aureus*, *S. epidermidis* und *S. carnosus* gegenüber Chloramphenicol (30 µg), Erythromycin (15 µg), Clindamycin (2 µg), Tetracyclin (30 µg) und Gentamicin (10 µg) werden mittels Agardiffusionsverfahren geprüft. Die Testung erfolgt entsprechend der DIN58940. Die Einteilung in „sensibel“ bzw. „resistent“ folgt der ISO20776-1. Als Grenzwerte kommen die aktuellen Empfehlungen der European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) zur Anwendung.

Genetische Analyse der Transformanden

Zur Analyse der Transformanden wird in der Regel eine Plasmidpräparation durchgeführt. Die isolierten Plasmide werden mittels Agarosegelelektrophorese dargestellt. Anschließend wird mittels Restriktionsverdau und PCR der korrekte Einbau des Inserts überprüft. Am Ende werden die Übergänge von Vektor und Insert mittels Sanger-Sequenzierung verifiziert.

2.2.8 Immunologische Nachweisverfahren

Dot Blot

Ermittlung der optimalen Induktorkonzentration

Um die optimale Induktorkonzentration zu ermitteln, werden 2 mL Vorkulturen von den zu testenden Transduktanten und den korrespondierenden Wildtyp-Stämmen in TSB-Flüssignährmedium in autoklavierten 10 mL Reagenzgläsern angelegt. Bei Plasmid-tragenden Stämmen wird ein passender Selektionsmarker der Kultur zugesetzt. Ein Reagenzglas nur mit Medium wird als Kontrolle mitgeführt. Die Vorkulturen werden bei 37 °C und 200 rpm für 16 Stunden im Schüttler inkubiert.

Bei negativer Medium-Sterilkontrolle werden mehrere 20 mL Hauptkulturen in TSB-Flüssignährmedium in autoklavierten 250 mL Erlenmeyer-Kolben

entsprechend den Vorkulturen angelegt. Dabei wird unter photometrischer Kontrolle in allen Hauptkulturen eine Start-OD₆₀₀ von ca. 0,05 eingestellt. Bei Verwendung von Stämmen, die induzierbare genetische Elemente enthalten, wird eine Verdünnungsreihe des Induktors (hier: Anhydrotetrazyklin) eingestellt. Anschließend werden die Ansätze im Schüttler bei 37 °C und 200 rpm für sechs Stunden inkubiert. Schließlich werden alle Proben abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in PBS suspendiert. Unter photometrischer Kontrolle werden alle Proben auf identische Zellzahlen eingestellt. Aus diesen Suspensionen werden nun 18 µL entnommen und mit 6 µL 4fach LDS-Puffer in einem 1,5 mL Eppendorf Tube vermischt. Diese Proben werden für zehn Minuten bei 70 °C im Heizblock aufgeköcht. In dieser Zeit wird eine PVDS-Membran vorbereitet. Dazu wird ein Filterpapier auf einem Raster mit PBS befeuchtet. Die PVDS-Membran wird durch kurzes Schwenken in Methanol aktiviert. Kurz in PBS abgespült und dann auf das Filterpapier aufgelegt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm können 10 µL des Überstandes auf die aktivierte PVDS-Membran aufgetragen werden. Nachdem die Proben in die Membran eingezogen sind, wird diese mit Protein-free blocking buffer überschichtet und über Nacht bei 4 °C auf einem Schwenktisch im Kühlraum blockiert.

Am nächsten Tag wird die Membran für fünf Minuten in PBS/T gewaschen. Die Entwicklung der Membran erfolgt durch Inkubation mit einem spezifischen Erstantikörper (1:10.000 in PBS) für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch. Nach fünfmal fünf Minuten Waschen in PBS/T wird der Zweitantikörper ebenfalls 1:10.000 in PBS verdünnt auf die Membran gegeben. Dort verbleibt die Lösung für 45 min bevor dann erneut fünfmal fünf Minuten in PBS/T gewaschen wird. Zuletzt wird die Membran mit Entwicklersubstrat überschichtet und in Folie eingeschlagen. Es werden dann mehrere Filme in unterschiedlich langen Intervallen belichtet.

Evaluation der Kreuzreaktivität von Primärantikörpern

Um die Eignung eines Antikörpers zur Detektion eines bestimmten Proteins zu überprüfen, wird ebenfalls das Dot Blot-Verfahren angewandt. Entsprechend der Fragestellung werden jeweils 10 µL Probevolumen aus einer geometrischen

Verdünnungsreihe eines Bakterienextraktes oder eines rekombinant exprimierten Proteins auf einer PVDS-Membran aufgetragen. Nachdem die Proben in die Membran eingezogen sind, wird diese mit Protein-free Blocking Buffer überschichtet und über Nacht bei 4 °C im Kühlraum auf dem Schwenktisch blockiert. Die Entwicklung der Membran erfolgt dann wie unter dem Punkt „Ermittlung der optimalen Induktorkonzentration“ beschrieben.

Western Blot

Zur Vorbereitung des Blottens werden Schwämme in Transferpuffer getränkt. Anschließend wird eine PVDS-Membran in Methanol aktiviert und in Transferpuffer abgespült. Nachdem das SDS-PAGE gelaufen ist, wird das Gel auf ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier überführt. Nun wird luftblasenfrei die Membran aufgelegt und erneut mit einem getränkten Filterpapier abgeschlossen. Dieses „Sandwich“ wird nun zwischen den Schwämmen in die Blotkammer gelegt.

Gebロットet wird für 60 min bei 25 Volt. Nach dem Blotten wird die Membran über Nacht bei 4 °C im Kühlraum auf dem Schwenktisch blockiert. Die Entwicklung der Membran erfolgt dann wie unter dem Punkt „Ermittlung der optimalen Induktorkonzentration“ beschrieben.

Immunfluoreszenztest

Der Immunfluoreszenztest wird auch zur phänotypischen Kontrolle von Transformanten eingesetzt. Dazu werden 2 mL Vorkulturen in TSB-Flüssignährmedium in autoklavierten 10 mL Reagenzgläsern angelegt. Bei Plasmid-tragenden Stämmen wird ein passender Selektionsmarker der Kultur zugesetzt. Ein Reagenzglas nur mit Medium wird als Kontrolle mitgeführt. Die Vorkulturen werden bei 37 °C und 200 rpm für 16 Stunden im Schüttler inkubiert.

Bei negativer Sterilkontrolle werden 20mL Hauptkulturen in TSB-Flüssignährmedium in autoklavierten 250 mL-Erlenmeyer-Kolben entsprechend den Vorkulturen angelegt. Dabei wird unter photometrischer Kontrolle eine OD₆₀₀ von ca. 0,05 eingestellt. Bei Verwendung von Stämmen, die Plasmide mit

induzierbarer Proteinexpression enthalten, wird eine Endkonzentration von 100 ng/mL Anhydrotetracyclin eingestellt. Auch hier wird wieder eine Kontrolle mitgeführt. Anschließend werden die Ansätze im Schüttler bei 37 °C und 200 rpm für 6 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Kulturen in 50 mL GREINER Tubes überführt und bei 3.500 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Das Medium wird dekantiert. Jetzt wird das Pellet in 20 mL PBS gewaschen und schließlich in 1 mL PBS aufgenommen. Mithilfe eines Photometers wird die Bakteriensuspension durch Verdünnung mit PBS auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,3 eingestellt. 20 µL dieser Suspension werden jeweils zweifach auf einen gefensterten Objektträger aufgebracht. Nach dem Eintrocknen werden die Bakterien mit 20 µL Protein-free blocking buffer überschichtet und eine Stunde bei 4 °C im Kühlschrank blockiert. Nach zweiminütigem Spülen der Objektträger in PBS/T werden die Bakterien nun mit 20 µL Erstantikörper-Lösung (AK 1:200 in PBS) bedeckt. Die Objektträger inkubieren nun für 45 min bei 37 °C im Brutschrank in einer „feuchten Kammer“. Da von nun an Fluoreszenz-markierte Antikörper, die potentiell lichtempfindlich reagieren, verwendet werden, werden die weiteren Schritte soweit möglich in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Vor der Inkubation mit dem Zweitantikörper (AK 1:500 in PBS) werden wie Objektträger erneut dreimal zwei Minuten in PBS/T gewaschen. Der Zweitantikörper verbleibt für 30 min bei 37 °C in der „feuchten Kammer“ im Brutschrank. Zuletzt werden die Objektträger zweimal zwei Minuten in PBS/T und einmal zwei Minuten in Aqua ad ini. gewaschen. Nach kurzem Trocknen werden die Objektträger mit wenigen Mikrolitern Moviol eingedeckelt. Die Objektträger werden abgedunkelt bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.2.9 ELISA Bindungsversuche

Vorkulturen werden in 2 mL TSB-Flüssignährmedium in autoklavierten Reagenzgläsern angelegt. Bei Plasmid-tragenden Stämmen werden 2 µL eines entsprechenden Selektionsmarkers hinzupipettiert. Ein Reagenzglas ohne Antibiotikum und ohne Bakterien wird als Sterilkontrolle für das verwendete

Medium mitgeführt. Diese Vorkulturen werden bei 37 °C für 16 Stunden im Schüttler bei 200 rpm inkubiert.

Bei negativer Kontrolle werden 20 mL Hauptkulturen in autoklavierten 250 mL Erlenmeyer-Kolben entsprechend den Vorkulturen angelegt. Dabei wird unter photometrischer Kontrolle eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt. Anschließend werden die Ansätze im Schüttler bei 37 °C und 200 rpm für exakt 8 Stunden inkubiert.

96-well Mikrotiterplatten werden in Zeile B bis G mit 100 µL Fibronektin-Lösung (10 µg/mL in PBS) pro Well beschichtet. Die Zeilen A und H wurden mit 100 µL PBS pro Well befüllt. Anschließend wurden die Platten bei 4 °C für 24 Stunden inkubiert, danach viermal mit PBS/T gespült und anschließend mit je 150 µL Protein-free blocking buffer pro Well überschichtet. Die Mikrotiterplatten werden für 1 Stunde bei 4°C geblockt und erneut zweimal mit PBS/T gewaschen.

Nach achtstündiger Inkubation werden die Hauptkulturen in 50 mL-GREINER-Tubes überführt und in einer Zentrifuge bei 3500 rpm, 4 °C für 15 min zentrifugiert. Anschließend wird das Nährmedium dekantiert und die Bakterien in 15 mL PBS gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation werden die Pellets in 5 mL PBS resuspendiert, die OD₆₀₀ photometrisch bestimmt und durch Verdünnung mit PBS auf 0,4 eingestellt.

Ausgehend von der unverdünnten Bakteriensuspension werden geometrische Verdünnungsreihen in PBS mit neun Stufen hergestellt. Die Stufen werden um den Faktor 1:10 verdünnt. Nun werden parallel in den ersten beiden Spalten die unverdünnten Suspensionen aufgetragen. Danach werden mit den nächsten acht Verdünnungen die Spalten 3 bis 10 befüllt und in den letzten beiden Spalten jeweils die 1:10-Verdünnung aufgetragen. Die Platten werden nun bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation werden die Platten viermal mit PBS/T gespült. Die Fixierung der Bakterien an der Oberfläche erfolgt durch Zugabe von 150 µL 3,7 %-iger Formaldehyd-Fixierlösung pro Well gefolgt von zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/T werden die Mikrotiterplatten mit 150 µL Abstilllösung pro Well befüllt und bei 37 °C für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert. Hiernach werden die Platten erneut zweimal mit PBS/T gewaschen und anschließend mit 150 µL Protein-free blocking buffer bei 4 °C für eine Stunde geblockt.

Bevor die Antikörper aufgetragen werden, werden die Platten zweimal mit PBS/T gewaschen. Nun wird jedes Well mit 150 μl α -5179-Lösung (1:10.000 in PBS mit 5 % Protein-free blocking buffer) überschichtet und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss viermal mit PBS/T gewaschen. Danach erfolgt die 45-minütige Inkubation mit dem Zweitantikörper (α -rabbit IgG-AP-Konjugat, 1:10.000 in PBS mit 5 % Protein-free blocking buffer) – jeweils 150 μl pro Well bei Raumtemperatur. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper werden die Platten viermal mit PBS/T gewaschen. Jedes Well wird nun mit 150 μl AP-Substratlösung ($c = 1 \text{ mg/mL}$ in AP-Substratpuffer) befüllt und die Platten bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Das Auslesen der Platten mittels InfiniteM200 (TECAN) erfolgt nach 30 Minuten ($\lambda_{\text{Messung}}=492 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Referenz}}=405 \text{ nm}$).

2.2.10 Surface Plasmon Resonance

Die Messung wird am Biacore® T100 durchgeführt. Dabei wird der Sensor Chip CM5 verwendet.

Darstellung der Bindung von rEmbp125 an Plasmafibronektin

Auf dem Chip wird in der Flusszelle 1 (Fc-1) die Oberfläche zuerst aktiviert, mit Puffer gespült und anschließend inaktiviert. Diese Flusszelle dient für die Messungen als Kontrolloberfläche. In der Flusszelle 2 (Fc-2) werden 350 Response Units (RU) Plasmafibronektin aus einer Lösung (100 $\mu\text{g/mL}$ in 10 mM Acetat-Puffer (pH = 5,0)) immobilisiert. Die Flussgeschwindigkeit beträgt 10 $\mu\text{L/min}$.

Der Analyt rEmbp125 wird in Laufpuffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % Surfactant P20, pH = 7,4) umgepuffert und steril filtriert. Nun werden verschiedene Verdünnungen des Analyten angelegt - diese decken den Bereich von 180 $\mu\text{g/mL}$ bis 7,5 $\mu\text{g/mL}$ ab.

In der Messmethode werden nun die folgenden Parameter hinterlegt. Die Flussgeschwindigkeit wird mit 10 $\mu\text{l/min}$ vorgegeben. Nach drei Startup-Zyklen

wird der Analyt mit 180 Sekunden Kontaktzeit über den Chip geleitet. Für die Dissoziation werden fünf Minuten eingeplant. Die Regeneration der Oberfläche erfolgt durch einen zwölf sekundigen Puls mit 6,5 mM Natronlauge.

Darstellung der Bindung von rEmbp125 an rFN12-14

Auf einem weiteren Sensor Chip wird in der Flusszelle 1 (Fc-1) 2000 Response Units (RU) der rekombinant exprimierte Fibronectin Typ III Subdomäne Repeats 4-7 (rFN4-7) immobilisiert. Diese Flusszelle dient für die Messungen als Kontrolloberfläche. In der Flusszelle 2 (Fc-2) werden ca. 2800 RU rFN12-14 immobilisiert. Die Flussgeschwindigkeit während der Immobilisation beträgt 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ Beide Proteine liegen als Lösung in 10 mM Acetat-Puffer (pH = 5,0) und einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vor.

Der Analyt rEmbp125 wird in Laufpuffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % Surfactant P20, pH = 7,4) umgepuffert und steril filtriert. Nun werden verschiedene Verdünnungen des Analyten angelegt - diese deckt den Bereich von 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis 1,8725 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ab.

In der Messmethode werden nun die folgenden Parameter hinterlegt. Die Flussgeschwindigkeit wird mit 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ vorgegeben. Nach drei Startup-Zyklen wird der Analyt für 180 Sekunden Kontaktzeit über den Chip geleitet. Für die Dissoziation werden zehn Minuten eingeplant. Die Regeneration der Oberfläche erfolgt durch einen 25 sekundigen Puls mit 3,125 mM Natronlauge.

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung eines Shuttle-Vektors zur *in trans* Expression definierter Embp-Sequenzabschnitte in einem Embp-negativen Hintergrund

Ziel der Klonierung war die Herstellung eines Shuttle-Vektors (pHB2_C), der die *in trans* Expression definierter Embp-Abschnitte (Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ und Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉) in Embp-negativen Staphylokokken ermöglicht. Hierdurch sollte es möglich werden die Bedeutung definierter Regionen von Embp bei der Adhärenz von Staphylokokken an immobilisiertes Fibronektin zu untersuchen. Als Ausgangskonstrukt wurde der Vektor pCN57 [75] gewählt. Dieser wurde durch Einbringen einer Chloramphenicol Resistenzkassette und eines Tetrazyklin-induzierbaren Promoters modifiziert.

3.1.1 Austausch der Resistenzkassette im Ausgangsplasmid pCN57

In den Plasmiden, die nach ca. 20 stündiger Inkubation bei 37 °C aus den gepickten Kolonien isoliert wurden, bestätigte sich durch Polymerasekettenreaktion und Restriktionsverdau der korrekte Austausch der Resistenzkassenten (*ermC* gegen *tet(M)*). Dabei resultierte bei der Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der Primer 599 und 600 ein etwa 2,6 kbp großes Amplifikat aus pCN36 (Positivkontrolle) und den Plasmiden pCN57_*tet(M)*. Dieses Amplifikat umfasste die Tetracyclin-Resistenzkassette *tet(M)* (M21136) flankiert von den Restriktionsschnittstellen für die Enzyme Apal und XhoI. Durch Restriktionsverdau mit den oben genannten Enzymen wurde ebenfalls das etwa 2,6 kbp große DNA-Fragment aus den Plasmiden exzidiert und somit auf unabhängige Weise die korrekte Modifikation des Plasmides dargestellt. Die Insertion bestätigte sich zusätzlich in der Sanger-Sequenzierung (unter Verwendung der Primer pT181-*tetM_for* und *tetM-ampCol_rev*). Im Folgenden wird dieses Plasmid als pCN57_*tet(M)* bezeichnet.

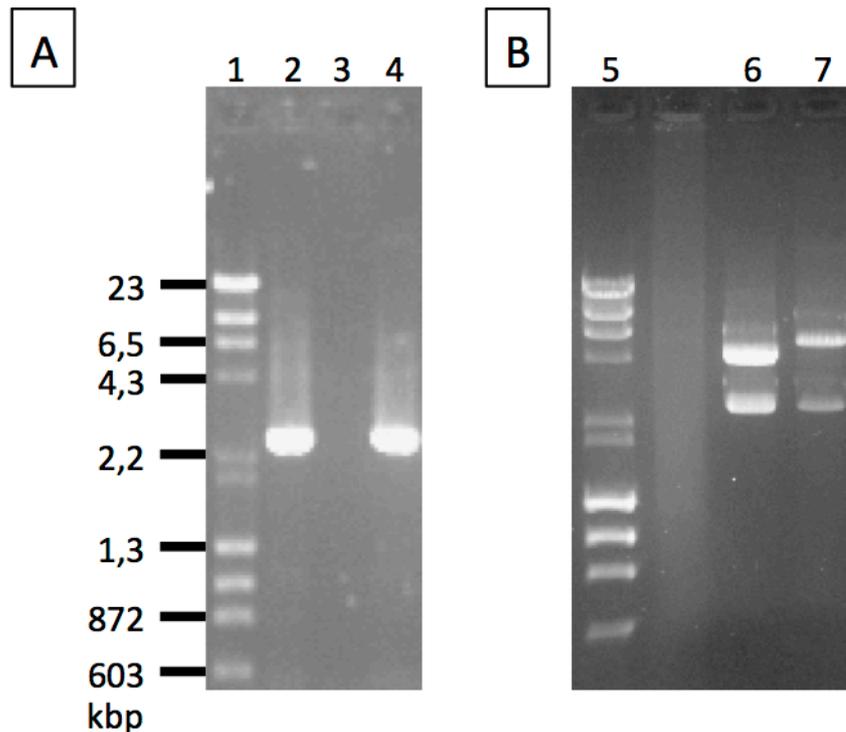


Abb. 3: Überprüfung der Ligation von *tet(M)* in pCN57. (A) Polymerasekettenreaktion mit Nachweis eines etwa 2,6 kbp großen Amplifikats (4); (B) Restriktionsverdau mit *Apal* und *XhoI* erzeugt ebenfalls ein etwa 2,6 kbp großes DNA-Fragment (7). Als Positivkontrolle (2 und 6) wurde stets pCN36 [75] mitgeführt. F-303 SD wurde bei Agarosegelelektrophoresen als Größenstandard mitgeführt (1 und 5).

3.1.2 Insertion der Embp-Fragmente YSIRK FIVAR/GAFIV DUF TM in pCN57_*tet(M)* mittels In-Fusion®-Klonierung

Zur *in trans* Expression definierter Regionen des Embp-Proteins (Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ oder GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉) wurden diese mit dem natürlichen N-Terminus (inklusive des YSIRK-Exportsignals) und den C-terminalen vier DUF-Domänen sowie der putativen Transmembranregion im Plasmid pCR™ 4-TOPO fusioniert (Wolters, nicht publiziert). In dieser Arbeit wurden diese zur *in trans* Expression erstellten Elemente stets als Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ beziehungsweise Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ gekennzeichnet. Durch Polymerasekettenreaktion (Primer YSIRK_inf_1 und inf_AscGAF_rev) ließen sich die jeweils etwa 6 kbp langen Inserts Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ und Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ aus den klonierten Plasmiden pCN_FIVAR und pCN_GAFIV amplifizieren. Die korrekte Insertion wurde zusätzlich mittels Restriktionsverdau durch die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *AscI* validiert. Anschließend konnten

auch in diesen Plasmiden die Übergänge vom Vektor in das Insert mithilfe der Sanger-Sequenzierung (unter Verwendung der Primer pCN57_MCS_for und pCNDUF_term_rev) nachvollzogen werden. Die nun hergestellten Shuttle-Vektoren trugen im Folgenden die Bezeichnung pCN_FIVAR und pCN_GAFIV.

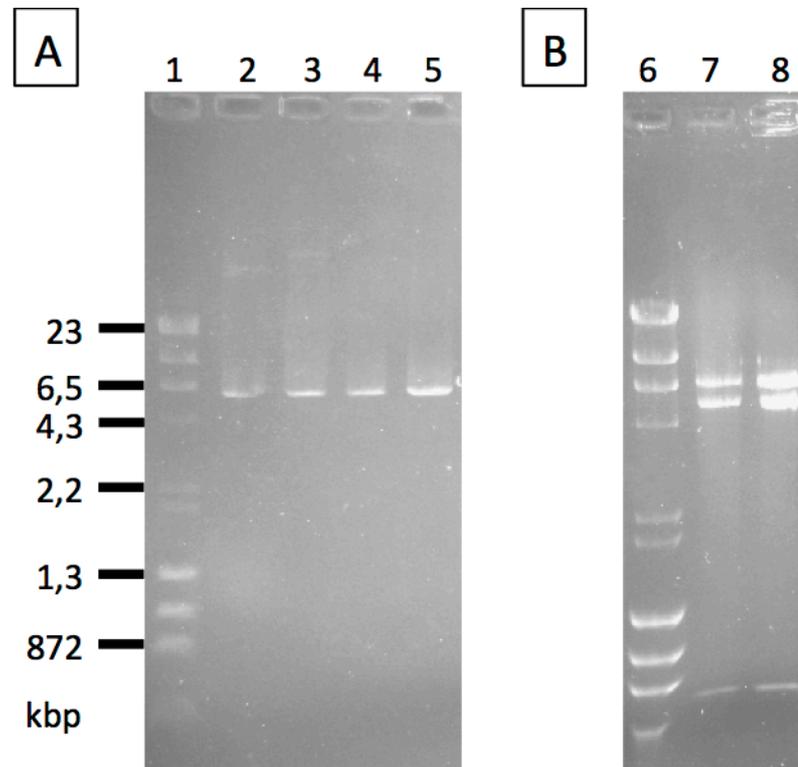


Abb. 4: Einführung der Embp-Fragmente in den Vektor pCN57_tet(M). (A) Polymerasekettenreaktion Positivkontrollen pCR™ 4-Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉(2) beziehungsweise pCR™ 4-Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₁₀₇₉(4); es konnte ein etwa 6 kbp großes Amplifikat erzeugt werden. (B) Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und AscI; Es kommen drei Banden zur Darstellung. Zum einen das etwa 6 kbp große Plasmid-Backbone und zwei Fragmente (etwa 5 kbp und 800 bp), die aufgrund einer im Insert befindlichen internen EcoRI-Schnittstelle entstehen. F-303 SD wurde bei Agarosegelelektrophoresen als Größenstandard mitgeführt (1 und 6).

3.1.3 Insertion des Anhydrotetrazyklin-induzierbaren Promoters $P_{xyl/TetO}$ in pCN_FIVAR und pCN_GAFIV

Zur Überprüfung der entstandenen Plasmide wurde durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der Primer Tetprom_for und Tetprom_rev ein etwa 900bp langes Amplifikat erzeugt, welches den Anhydrotetrazyklin-induzierbaren Promoter $P_{xyl/TetO}$ inklusive seines Steuerungselements *tetR*, flankiert von einer PstI- und KpnI-

Restriktionsschnittstelle enthielt. Auch hier diente ein Restriktionsverdau mit den Enzymen PstI und KpnI als unabhängiges Bestätigungsverfahren. Am Ende konnten die Übergänge von Plasmid in das Promoterfragment und vom Promoterfragment in Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ beziehungsweise Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ per Sanger-Sequenzierung verifiziert werden (Primer: pCN57_MCS_for und YSIRK_CN_rev). Die Benennung nun entstandenen Plasmide lautete pCN_P_{xyl/TetO}-FIVAR und -GAFIV.

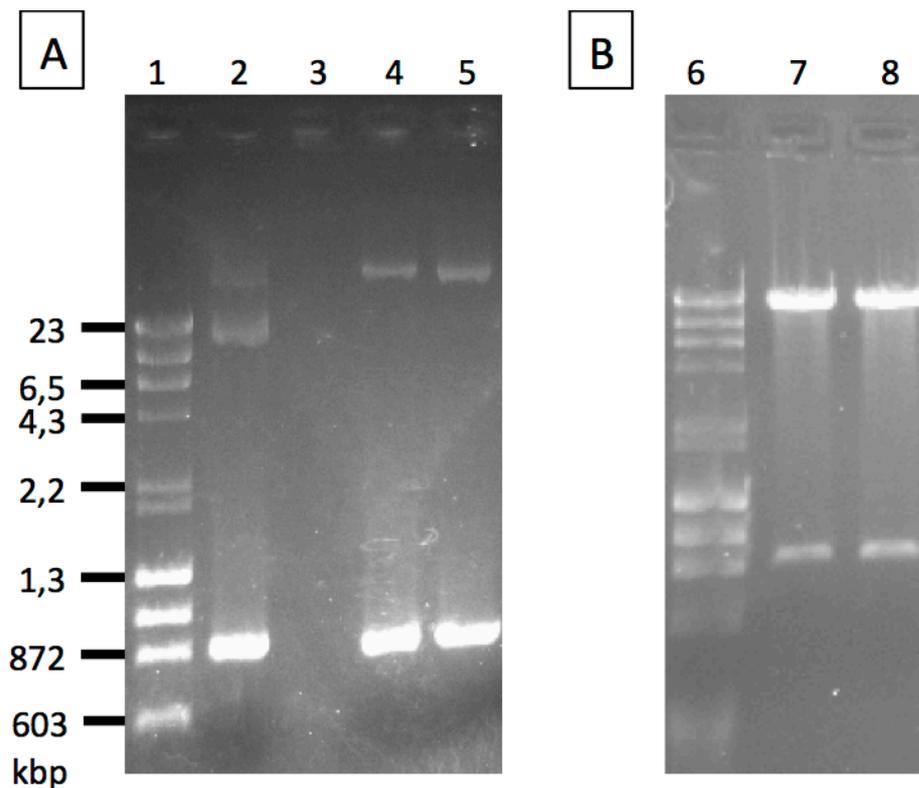


Abb. 5: Darstellung des Promoter-Elements in den Vektoren pCN_P_{xyl/TetO}-FIVAR und pCN_P_{xyl/TetO}-GAFIV. (A) Polymerasekettenreaktion Positivkontrolle pALC2073 (2) [79] Aus beiden Plasmiden konnte ein etwa 900 bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden (4 und 5), welches auf der selben Höhe wie die Positivkontrolle läuft (2); (B) Mittels Restriktionsverdau (Restriktionsendonukleasen: PstI und KpnI) wurden die Zielvektoren pCN_P_{xyl/TetO}-FIVAR und pCN_P_{xyl/TetO}-GAFIV in zwei Fragmente - das etwa 12 kbp große Plasmid-Backbone und das etwa 900 bp lange Promoter-Element (7 und 8) - aus den geschnitten. F-303 SD wurde bei Agarosegelelektrophoresen als Größenstandard mitgeführt (1 und 6).

3.1.4 Austausch der Resistenzkassette in pCN_P_{xyl/TetO}-FIVAR und pCN_P_{xyl/TetO}-GAFIV

Der korrekte Austausch der Tetracyclin- gegen eine Chloramphenicol- Resistenzkassette in den Plasmiden pCN_P_{xyl/TetO}-FIVAR und -GAFIV konnte

experimentell durch Polymerasekettenreaktion (Primer: 517 und 518) und Restriktionsverdau nachvollzogen werden. Sowohl das aus den Plasmiden amplifizierte, wie auch das mittels Restriktionsverdau (Restriktionsendonukleasen: Apal und SacII) erzeugte etwa 1000 bp große DNA-Fragment entsprach der Größe des Fragmentes aus der Positivkontrolle (pCN50). Die finale Bestätigung der korrekten Insertion konnte in der Sanger-Sequenzierung unter Verwendung der Primer pT181-tetM_for und tetM-ampCol_rev nachvollzogen werden. Im Folgenden wurden diese Plasmide als pHB2_C-FIVAR und pHB2_C-GAFIV bezeichnet.

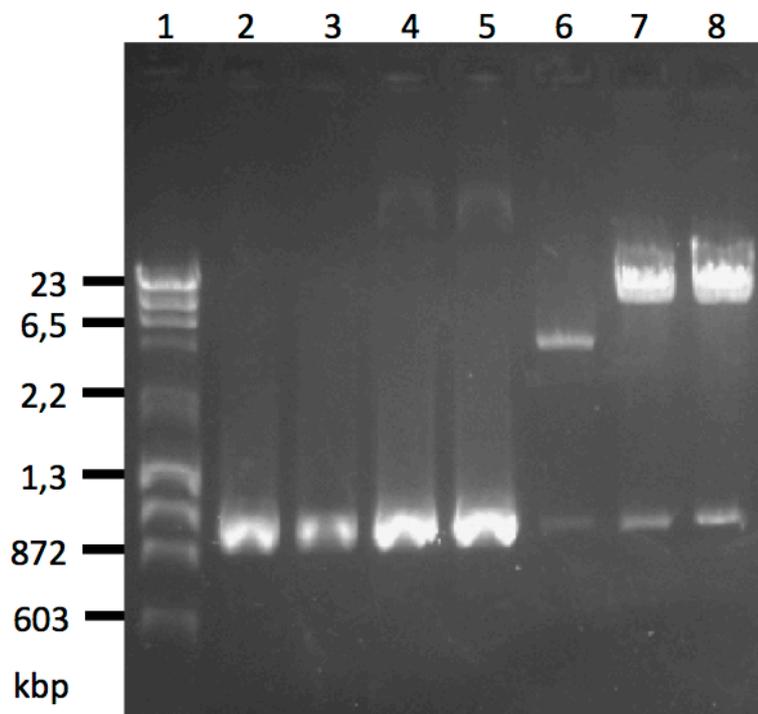


Abb. 6: Darstellung der Chloramphenicol-Resistenzcassette *cat194* in den Zielvektoren pHB2_C-FIVAR und pHB2_C-GAFIV. (2 bis 5) Polymerasekettenreaktion, Positivkontrolle pCN50 (2 und 3) [75]. Sowohl aus pHB2_C-FIVAR(4) wie auch pHB2_C-GAFIV(5) konnte ein etwa 1000 bp großes Amplifikat erzeugt werden; Restriktionsverdau (Endonukleasen: Apal und SacII) Es konnten aus beiden Plasmiden (7 und 8) ein zur Positivkontrolle (6) passendes DNA-Fragment ausgeschnitten werden. F-303 SD wurde bei Agarosegelelektrophoresen als Größenstandard mitgeführt (1).

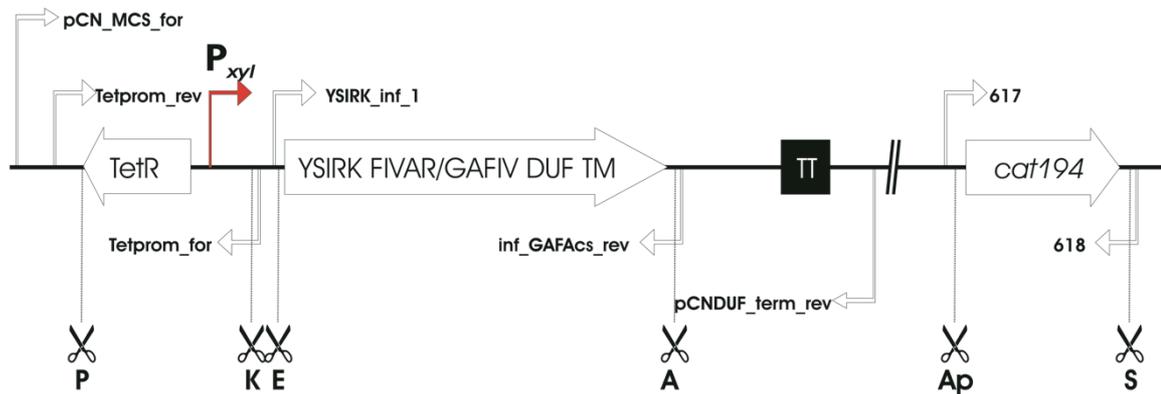


Abb. 7: Schematische Darstellung der Plasmide pHB_{2c}-FIVAR beziehungsweise pHB_{2c}-GAFIV. Der rote Pfeil kennzeichnet die Ableserichtung des Promoters, während die weißen abgewinkelten Pfeile Primerposition und -richtung angeben. Die dicken beschrifteten Pfeile kennzeichnen kodierende Bereiche. TT bezeichnet einen Transkriptionsterminator. P, PstI; K, KpnI; E, EcoRI; A, AscI; Ap, ApaI; S, SacII.

3.2 Einbringen der Shuttle-Vektoren in die Zielstämme *S. epidermidis* 1585 und den Surrogatwirt *S. carnosus* TM300

Das primäre Ziel, die Untersuchung der Embp-vermittelten Adhärenz von *Staphylococcus epidermidis* an Oberflächen-immobilisiertes Fibronektin, konnte in Teilen nur durch Verwendung eines Surrogatwirtes *S. carnosus* TM300 erreicht werden. Dieser Umstand begründete sich durch die zum Teil starke unspezifische Bindungsaktivität von *S. epidermidis* in den verwendeten Testsystemen. Unspezifische Bindungsaktivitäten bei *S. carnosus* fielen in der Regel deutlich schwächer aus, sodass der Einfluss von Embp deutlicher herausgearbeitet werden konnte.

3.2.1 Transformation der Shuttle-Vektoren in *S. aureus* RN4220 mittels Elektroporation

Die Herstellung von elektro-kompetenten *S. aureus* RN4220 Bakterien erfolgte nach dem Protokoll von Schenk und Ladagga [70]. Nach 24 bis 48 Stunden konnten Kolonien gepickt und auf frischen Selektivagar überimpft werden. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden von den gepickten Kolonien Empfindlichkeitstestungen gemäß DIN58940 angelegt. Die

Bewertung der Ergebnisse, entsprechend ISO20776-1 im Vergleich zu den Ausgangsstämmen anhand der von der EUCAST zugrunde gelegten Referenzwerte, erbrachten die in Tabelle 14 dargestellten Resultate.

Tab. 13: Gegenüberstellung der Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung des Ausgangsstammes *S. aureus* RN4220 und den Transformanden. Fettgedruckt ist jeweils die durch die Modifikation entstandene Veränderung der Antibiotikaempfindlichkeit.

| Stamm | Antibiotikum ^a | | | | |
|-----------------------|---------------------------|--------------|-------------|-------------|------------|
| | Chloramphenicol | Erythromycin | Clindamycin | Tetracyclin | Gentamicin |
| RN4220 | S | S | S | S | S |
| Transformanden | R | S | S | S | S |

^aFett: zeigt die Änderung der Empfindlichkeit der getesteten Transformanden im Vergleich zum Ausgangsstamm an.

Plasmidpräparationen der Transformanden, deren Empfindlichkeitstestung das erwartete Resultat erbrachten, wurden anschließend mittels PCR auf das Vorhandensein des Inserts getestet. Dazu wurden die Primer YSIRK_inf_1 und inf_GAFAsc_rev verwendet. Parallel wurden zusätzlich mittels Restriktionsverdau (Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und AscI) die entstandenen Bandenmuster analysiert. Bei beiden Verfahren wurde das jeweilig zu transformierende Plasmid aus *E. coli* als Positivkontrolle mitgeführt. Es zeigte sich, dass die Plasmide erfolgreich in den *S. aureus*-Stamm RN4220 transformiert werden konnten. Die so entstandenen Stämme wurden fortan RN4220xpHB2_C-FIVAR beziehungsweise RN4220xpHB2_C-GAFIV genannt (siehe dazu auch Abbildung 9).

3.2.2 Transformation der Shuttle-Vektoren in *S. epidermidis* M12 und *S. carnosus* TM300 mittels Elektroporation

Die Verwendung des Stammes *S. epidermidis* M12 resultiert aus der Notwendigkeit, dass eine direkte Elektroporation des Zielstammes *S. epidermidis* 1585 technisch nicht möglich ist. Aus dem Stamm M12 lassen sich dann jedoch Plasmide mit Hilfe des Bakteriophage Φ A6C in andere *S. epidermidis*-Stämme (zum Beispiel *S. epidermidis* 1585) transduzieren. Die Elektroporation von Plasmiden, aus den oben genannten *S. aureus* RN4220-

Transformanden, war ohne weitere Zwischenschritte möglich. Die erfolgreiche Transformation erfolgte analog der oben beschriebenen Vorgehensweise. Das Resultat der Empfindlichkeitstestung der Transformanden ist in Tabelle 15 zusammengefasst. Aus diesen Transformationen gingen die Stämme *S. epidermidis* M12 und *S. carnosus* TM300 transformiert mit sowohl pHB2_C-FIVAR und pHB2_C-GAFIV hervor (siehe dazu auch Abbildung 9).

Tab. 14: Gegenüberstellung der Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung von der *S. epidermidis* Mutante M12 und *S. carnosus* TM300 sowie korrespondierender Transformanden.

| Stamm | Antibiotikum ^a | | | | |
|-------------------------------|---------------------------|--------------|-------------|-------------|------------|
| | Chloramphenicol | Erythromycin | Clindamycin | Tetracyclin | Gentamicin |
| M12 | S | R | R | S | S |
| Transformanden (M12) | R | R | R | S | S |
| TM300 | S | S | S | S | S |
| Transformanden (TM300) | R | S | S | S | S |

^aFett: zeigt die Änderung der Empfindlichkeit der getesteten Transformanden im Vergleich zum Ausgangsstamm an.

3.2.3 Phagentransduktion der Shuttle-Vektoren in *S. epidermidis* 1585

Die Phagentransduktion aus dem Stamm *S. epidermidis* M12 in den Zielstamm *S. epidermidis* 1585 wurde entsprechend der im Methodenteil beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Die Überprüfung der Transduktanten wurde zum einen durch die Prüfung der Antibiotikaempfindlichkeit (siehe Tabelle 16 und Abbildung 8) nachvollzogen.

Tab. 15: Gegenüberstellung der Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung von *S. epidermidis* 1585 sowie korrespondierender Transduktanten.

| Stamm | Antibiotikum ^a | | | | |
|-----------------------|---------------------------|--------------|-------------|-------------|------------|
| | Chloramphenicol | Erythromycin | Clindamycin | Tetracyclin | Gentamicin |
| 1585 | S | S | S | S | I |
| Transformanden | R | S | S | S | I |

^aFett: zeigt die Änderung der Empfindlichkeit der getesteten Transformanden im Vergleich zum Ausgangsstamm an.

Des Weiteren konnten durch Analyse mittels Polymerasekettenreaktion (siehe Abbildung 9) die genetischen Modifikationen nachgewiesen werden. Da der Ausgangsstamm 1585 bereits natürlicherweise zwei Plasmide trägt, war die Untersuchung der Transduktanten mittels Restriktionsverdau in diesem Fall nicht eindeutig zu bewerten und wurde in der Zusammenschau der Ergebnisse nicht weiter berücksichtigt. Final ergaben die Analysen, dass der Stamm erfolgreich mit den Plasmiden modifiziert werden konnte. Die nun erzeugten Stämme wurden 1585xpHB2_c-FIVAR und pHB2_c-GAFIV bezeichnet.

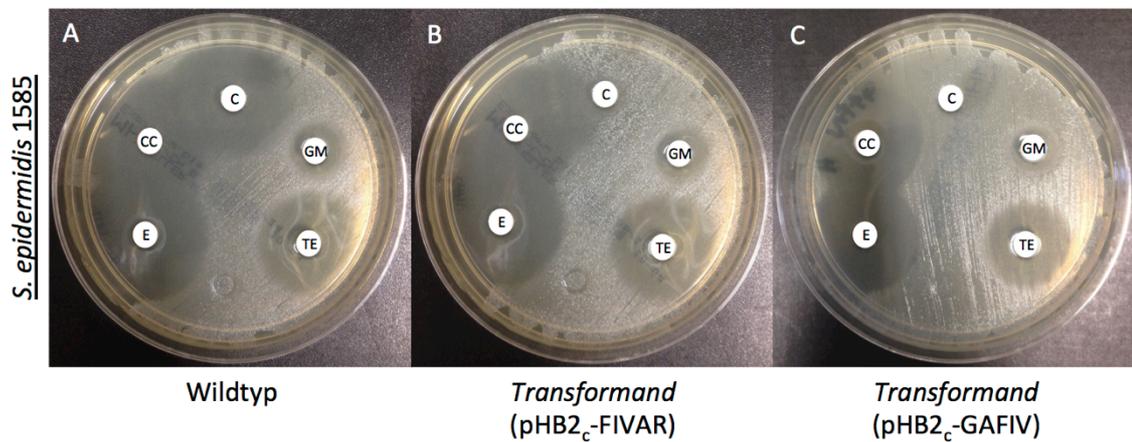


Abb. 8: Exemplarische Darstellung der Antibiotikaempfindlichkeitstestung mittels Agardiffusionstest. Zum Vergleich ist links der Wildtyp *S. epidermidis* 1585 gezeigt. jeweils rechts davon 1585xpHB2_c-FIVAR und pHB2_c-GAFIV. Gegenüber dem Wildtyp kann man hier eine neu hinzugekommene Chloramphenicol-Resistenz beobachten. Die Resistenzdeterminante *cat194* wird auf den transduzierten Plasmiden kodiert.

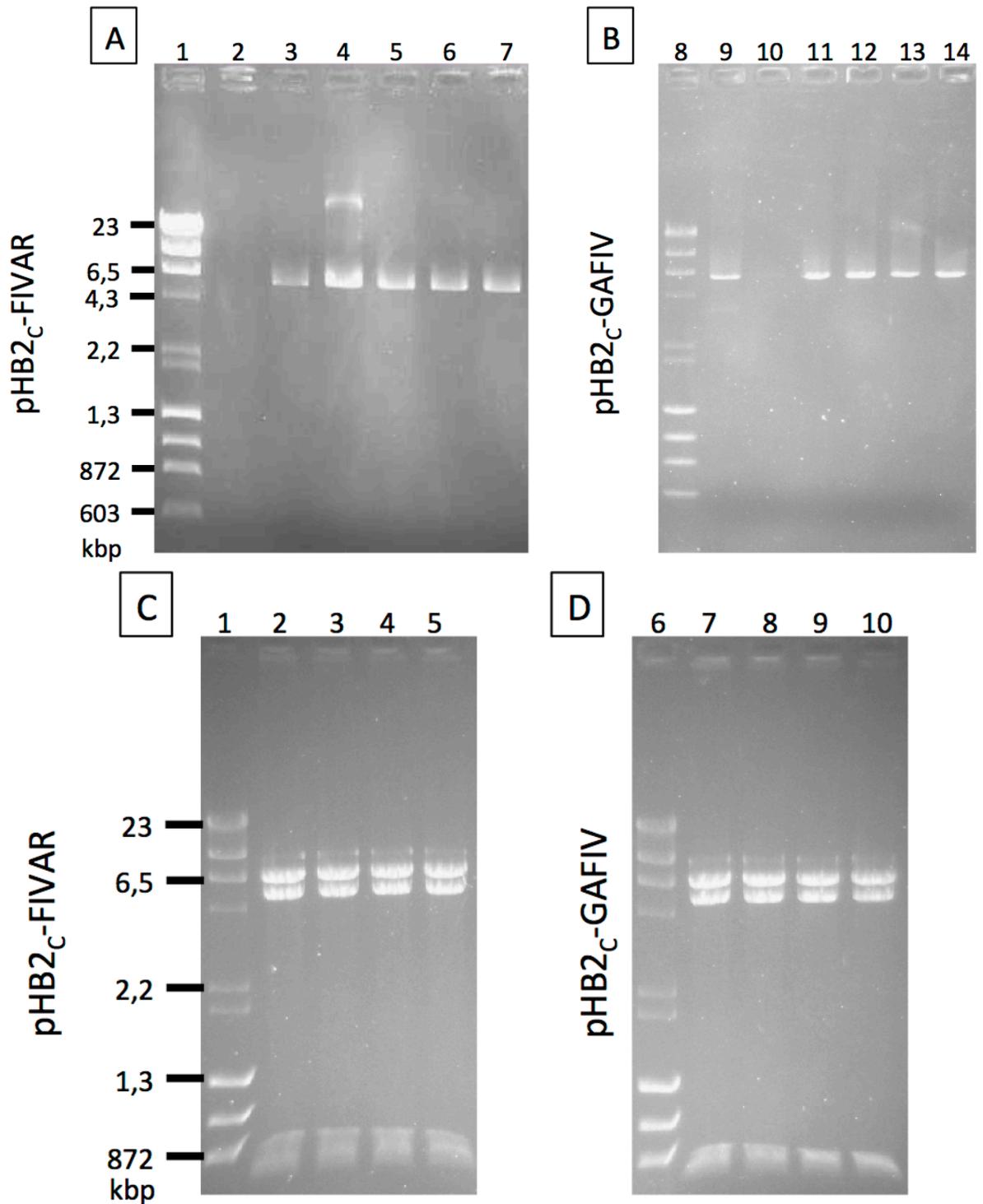


Abb. 9: Genetische Analyse der verschiedenen Transformanten: (A und B) Polymerasekettenreaktion mit den Primern YSIRK_inf_1 und inf_GAFAsc_rev, Wasserkontrolle (2), Positivkontrolle pHB2_c-FIVAR aus *E. coli* (3) gefolgt von den Transformanten in RN4220 (4), TM300 (5), M12 (6) und 1585 (7). Anschließend die selbe Folge mit den pHB2_c-GAFIV-Transformanten – Positivkontrolle (9), Negativkontrolle (10). Es werden jeweils etwa 6 kbp Amplifikate beobachtet; (C und D) Restriktionsverdau von pHB2_c-FIVAR (C) und pHB2_c-GAFIV (D) nach Rücktransduktion in *E. coli* TOP10 (Restriktionsendonukleasen: EcoRI und AscI) Positivkontrolle (2 und 7) gefolgt von den Transformanten in RN4220 (3 und 8), TM300 (4 und 9) und M12 (5 und 10). Beim Restriktionsverdau werden drei Banden beobachtet – das etwa 7 kbp große Plasmid-Backbone und zwei Banden (etwa 5 kbp und 800 bp) aus dem jeweiligen Insert. F-303 SD wurde bei Agarosegelelektrophoresen als Größenstandard mitgeführt (A1, B8, C1 und D6).

3.3 Weitere Charakterisierung der verwendeten anti-Embp2588- und anti-Embp6599-Seren [43]

Zur Charakterisierung der *in trans* Expression von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ beziehungsweise Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ in den Transformanden wurden Seren verwendet, die gegen die rekombinant in *E. coli* exprimierten Embp-Fragmente rEmbp2588 und -6599 erzeugt wurden [43]. In der vorgenannten Arbeit wurde bereits gezeigt, dass diese Seren mit den entsprechenden rekombinant exprimierten Proteinen reagieren, während die jeweiligen Präimmunsereen keine Reaktivität aufwiesen [43]. Im Zuge dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass beide Seren spezifisch mit den entsprechenden Proteinen reagieren und keine Kreuzreaktivität besteht.

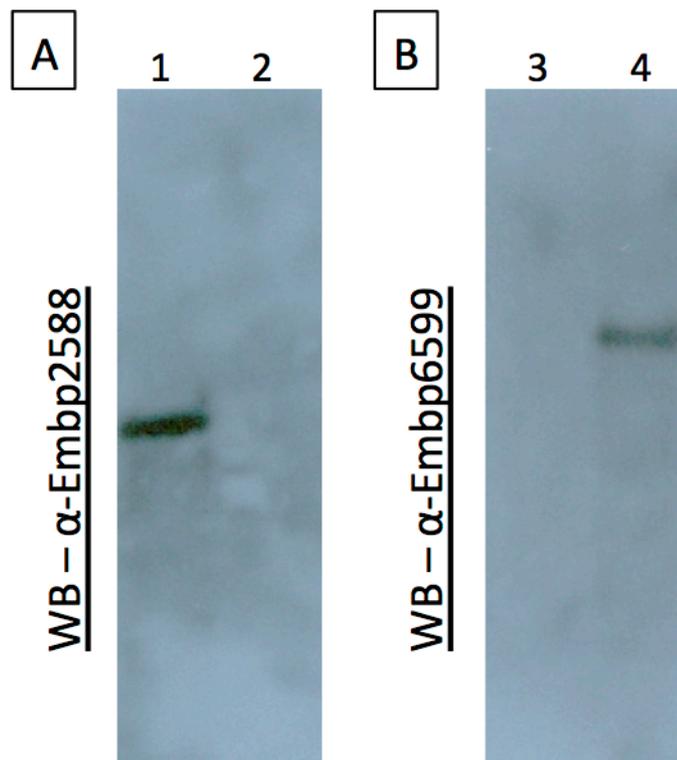


Abb. 10: Kreuzreaktivität von α -Embp2588 und α -Embp6599. (A) Western Blot unter Verwendung des α -Embp2588-Serums mit einer deutlichen Reaktivität gegen das rekombinante Embp-Fragment rEmbp2588 (1), jedoch ohne Reaktivität gegen rEmbp6599 (2). (B) Western Blot unter Verwendung des α -Embp6599-Serums mit einer deutlichen Reaktivität gegen das rekombinante Embp-Fragment rEmbp6599 (4), jedoch ohne Reaktivität gegen rEmbp2588 (3).

3.4 Charakterisierung der Transformanden

3.4.1 Darstellung der *in trans* Expression von repräsentativen Embp-Abschnitten mithilfe der Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Anhand der oben beschriebenen Vorgehensweise konnten Oberflächenproteine der Transformanden von TM300 und 1585 mit pHB2_C-FIVAR und pHB2_C-GAFIV sowohl unter induzierenden wie nicht induzierenden Bedingungen präpariert werden. Dabei zeigten sich in der SDS-PAGE zusätzliche Banden bei circa 220 und 160 kDa in den Oberflächenproteinpräparationen der induzierten Stämme.

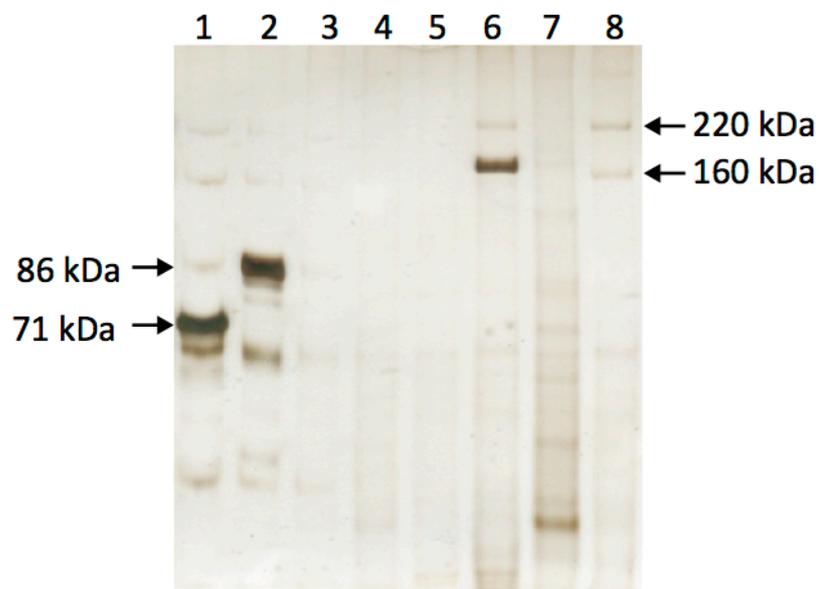


Abb. 11: Oberflächenproteinpräparationen von *S. epidermidis* 1585-Transformanden mittels SDS-PAGE. In trans Expression von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ oder -GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ unter induzierenden (6 und 8) und nicht-induzierenden (5 und 7) Wachstumsbedingungen im Vergleich mit dem Wildtyp (3) und Mutante 1585 Δ embp (4). Unter induzierenden Wachstumsbedingungen kommen zusätzliche Banden bei etwa 220 und 160 kDa zur Darstellung, die jedoch bei den mitgeführten Kontrollen fehlen. (1) und (2) zeigen jeweils die rekombinant in *E. coli* exprimierten Embp-Fragmente rEmbp2588 und -6599.

In der Präparation der Oberflächenproteine von TM300xpHB2_C-FIVAR und 1585xpHB2_C-FIVAR reagierten diese zusätzlichen Banden mit einem gegen das FIVAR-Segment erzeugten Serum (α -Embp2588, [43]) im Western Blot. Ein gegen das GA-Modul gerichteter Antikörper (α -Embp6599, [43]) reagierte jedoch nicht mit den zusätzlichen Banden der unter induzierenden

Bedingungen gewonnenen Oberflächenproteinen. Hier zeigte sich, dass die Darstellung von *in trans* exprimiertem Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₄₉, nicht jedoch die von Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉, mit den verwendeten Antiseren möglich ist. Nach massenspektrometrischer Identifikation der zusätzlichen Banden bei TM300xpHB2_C-GAFIV und 1585xpHB2_C-GAFIV wurde dann auf eine Modifikation des Plasmids pHB2_C-GAFIV zurückgegriffen, in welchem ein N-terminal lokalisiertes Myc-Tag in Frame zwischen dem Exportsignal und dem GAFIV-Anteil des Inserts eingefügt wurde (Wilde, Rohde; nicht publiziert). Anschließend konnte unter Verwendung eines monoklonalen anti-Myc-IgG ein zu den Massenspektrometrieergebnissen passendes Bandenmuster dargestellt werden.

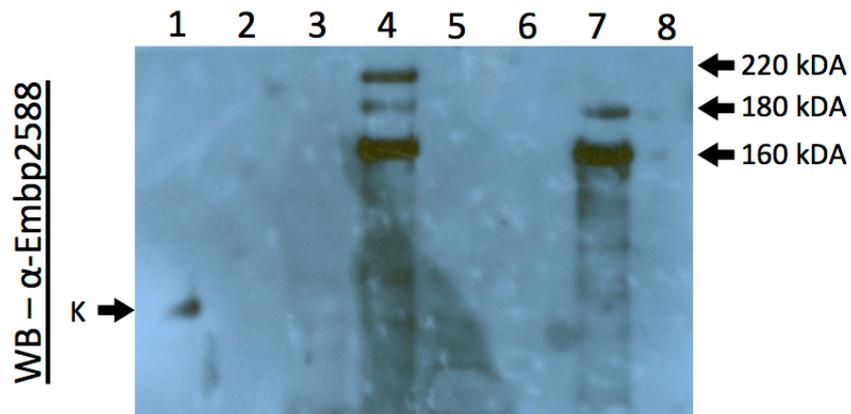


Abb. 12: Darstellung der *in trans* Expression von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ in TM300 und 1585. Zur Detektion wurde das Kaninchen α -Emb2588-Serum und ein monoklonaler Peroxidasegekoppelter α -Kaninchen-IgG Sekundärantikörper jeweils in einer Verdünnung von 1:10.000 in PBS eingesetzt. In (1) rEmb2588 bei etwa 70 kDa. (2) und (5) stellen die Negativkontrollen TM300 und 1585 dar. In (3) und (6) sind die Oberflächenproteinpräparationen der nicht induzierten Stämme, in (4) und (7) die der unter induzierenden Bedingungen gewonnenen Präparationen aufgetragen. Unter induzierenden Bedingungen werden drei Banden detektiert (circa 220, 180 und 160 kDa), die sich massenspektrometrisch dem Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ zuordnen lassen (Heise, Rohde; nicht publiziert). K kennzeichnet die Positivkontrolle.

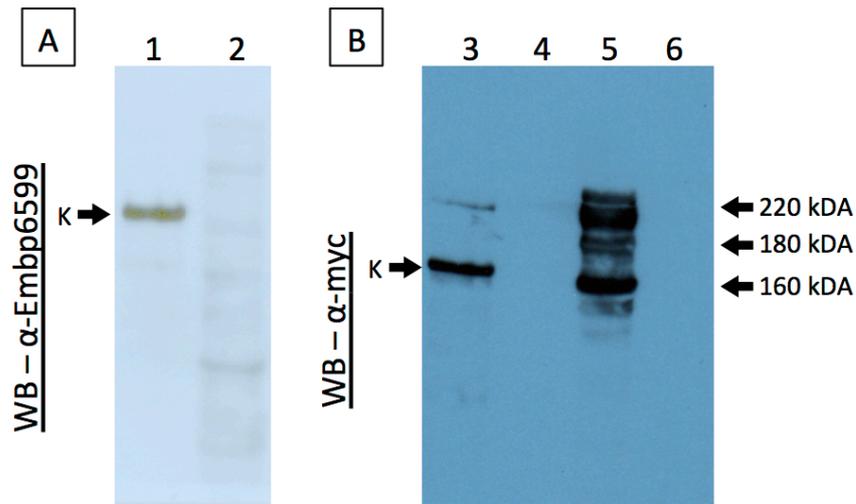


Abb. 13: Western Blot zur Darstellung der in trans Expression von Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉: (A) In TM300xpHB2_C-GAFIV(2) konnte keine Reaktivität mithilfe des rEmbp6599-spezifischen Antiserums gegen die Zellwandpräparation festgestellt werden, wohingegen das rekombinant in *E. coli* hergestellte Protein rEmbp6599(1) so nachgewiesen werden kann. (B) Unter Zuhilfenahme eines monoklonalen Myc-Antikörpers gelang die Darstellung des *in trans* exprimierten myc-markierten Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉(5), nicht jedoch von myc-freiem Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉(6) oder der unter nicht-induzierenden Bedingungen gewonnenen Zellwandpräparation(4). K kennzeichnet die jeweiligen Positivkontrollen.

3.4.2 Darstellung der Induktor-abhängigen *in trans* Expression von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ und Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ in *S. carnosus* TM300 und *S. epidermidis* 1585

In Anlehnung an das Vorgehen in der Publikation von Bateman et al. [79] wurde *in vitro* die Induktor-abhängige Expression von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ mittels DotBlot ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass nach sechs Stunden - bei Wachstum unter induzierenden Bedingungen - sowohl in *S. epidermidis* 1585 wie auch in *S. carnosus* TM300 Zellzahl-adjustiert das intensivste Signal bei einer Induktion durch Zugabe von Anhydrotetracyclin bis zu einer Endkonzentration von 200 ng/ μ L festgestellt werden konnte.

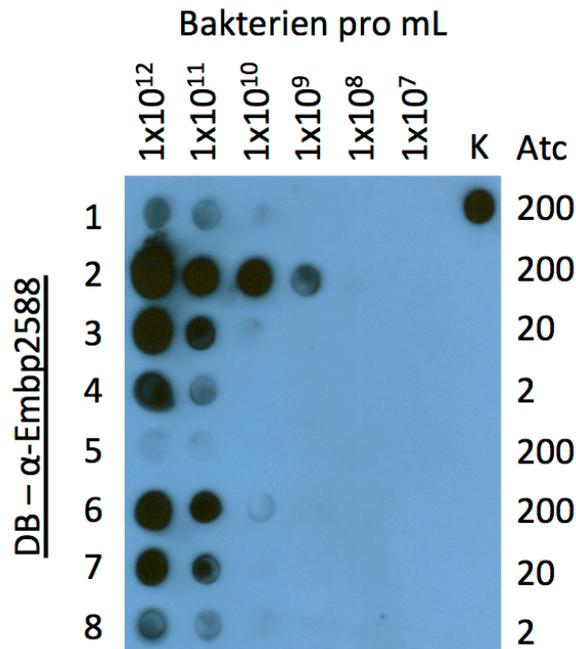


Abb. 14: Induktor-abhängige in trans Expression von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ in TM300 und 1585. Sowohl bei den TM300- (2-4) wie auch bei den 1585-Transformanten (6-8) ist eine Induktor-abhängige in trans Expression von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ im Vergleich zum Wildtyp von TM300 (1) oder dem Wildtyp von 1585 (5) festzustellen. K kennzeichnet die Positivkontrolle, die ATc steht für Anhydrotetracyklin und gibt die Induktorkonzentration in $\mu\text{g/mL}$ an.

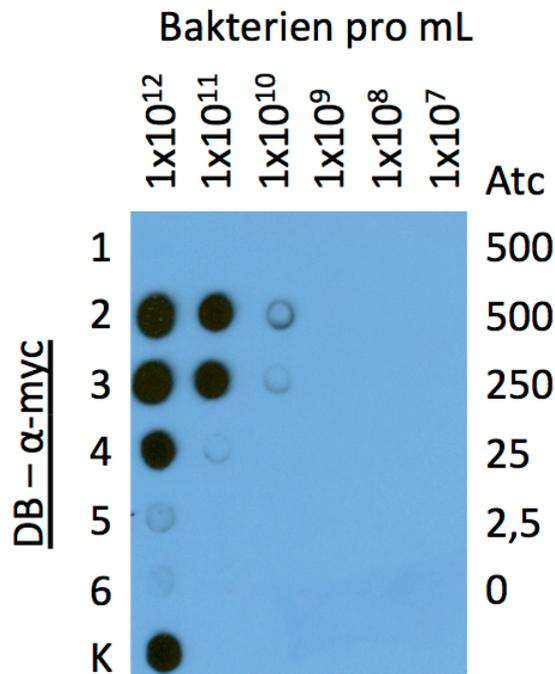


Abb. 15: Induktor-abhängige in trans Expression von Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₁₀₇₉ in TM300. Bei TM300xpHB2_c-n-mycGAFIV ist eine Induktor-abhängige in trans Expression von myc-markiertem Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₁₀₇₉ (2-5) im Vergleich zur Oberflächenproteinpräparation des Wildtyps von TM300 (1) oder der unter nicht-induzierenden Bedingungen gewonnenen Oberflächenproteinpräparation von TM300xpHB2_c-n-mycGAFIV (6) zu beobachten. K kennzeichnet die Positivkontrolle, ATc steht für Anhydrotetracyklin und gibt die Induktorkonzentration in $\mu\text{g/mL}$ an.

3.4.3 Darstellung der *in trans* Expression von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ in der Immunfluoreszenz

Parallel zum SDS-PAGE und dem Western Blot konnte die *in trans* Expression von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ durch Verwendung eines Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper (α -rabbit-Alexa488) fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden. Beobachtungen aus vorangegangenen Western Blot-Experimenten konnten bestätigen, dass mithilfe des α -Embp6599-Serums eine Darstellung des *in trans* exprimierten GA-Modul-Fragments Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ weder im Stamm TM300xpHB2_C-GAFIV noch in 1585xpHB2_C-GAFIV möglich war.

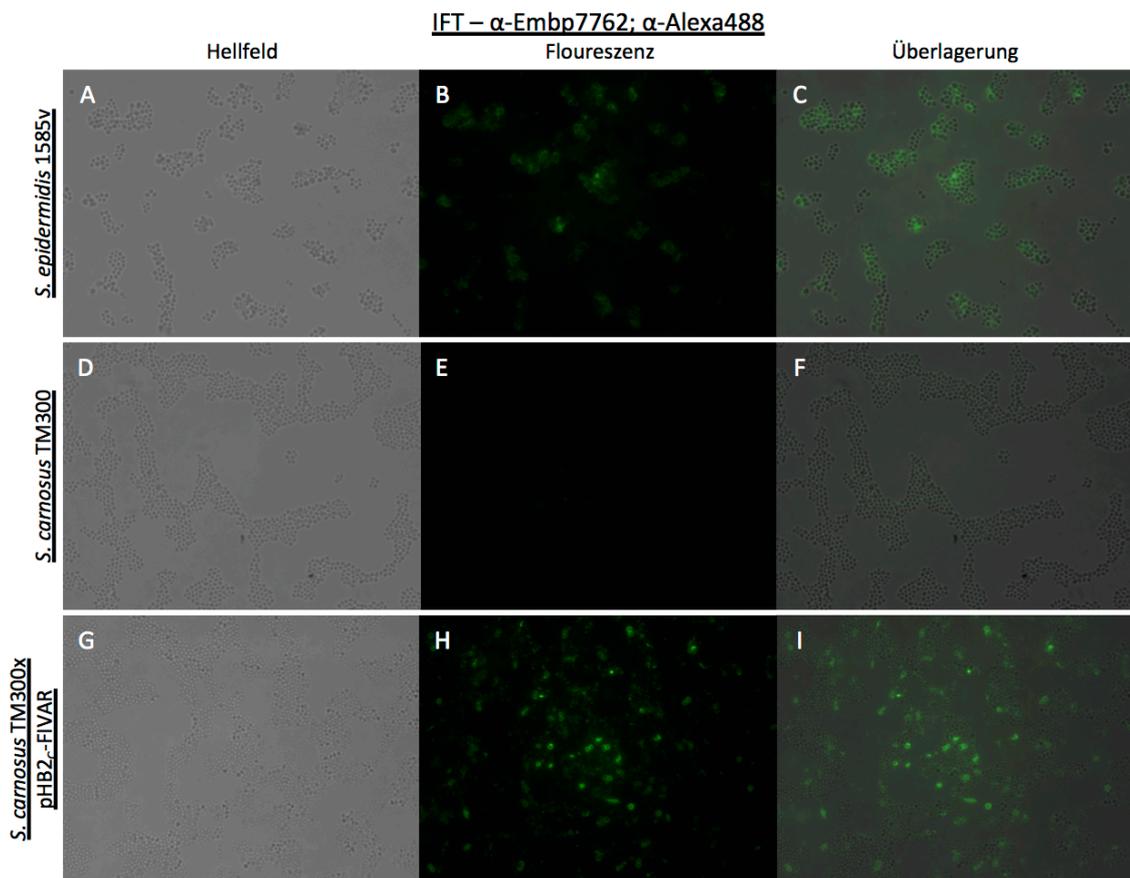


Abb. 16: Darstellung von Zellwand-assoziiertem *in trans* exprimiertem Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉. In (B) sieht man die Positivkontrolle *S. epidermidis* 1585v [43] detektiert mithilfe des Kaninchen α -Embp2588-Serums. Das Fluoreszenzsignal wird durch einen Alexa488-konjugierten α -Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper vermittelt. Während es bei *S. carnosus* TM300 zu keinem Fluoreszenzsignal (E) kommt, kann man in (H) das Fluoreszenzsignal des *in trans* exprimierten Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ beobachten. In den Abbildungen (C, F und I) sieht man jeweils die Überlagerung aus Hellfeld und Fluoreszenz. So lässt sich feststellen, dass das Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ als Zellwand-assoziiertes Protein im Stamm TM300xpHB2_C-FIVAR vorliegt. Alle Aufnahmen wurden in 630-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.4.4 Biofilmbildung von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ oder Embp-GAFIV₁₃₅₁₅₋₁₇₀₇₉ *in trans* exprimierenden Staphylokokken

Im Biofilm-Assay konnten weder unter induzierenden noch unter nicht-induzierenden Wachstumsbedingungen Änderungen der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 1585 oder *S. carnosus* TM300 nach der Transformation mit den Plasmiden pHB2_C-FIVAR oder pHB2_C-GAFIV im Vergleich zu den Wildtyp-Stämmen nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde der Stamm *Staphylococcus epidermidis* 1585P_{xyI embp} unter induzierenden Bedingungen mitgeführt. Die Negativkontrolle entspricht *Staphylococcus epidermidis* 1585P_{xyI embp} unter nicht-induzierenden Bedingungen.

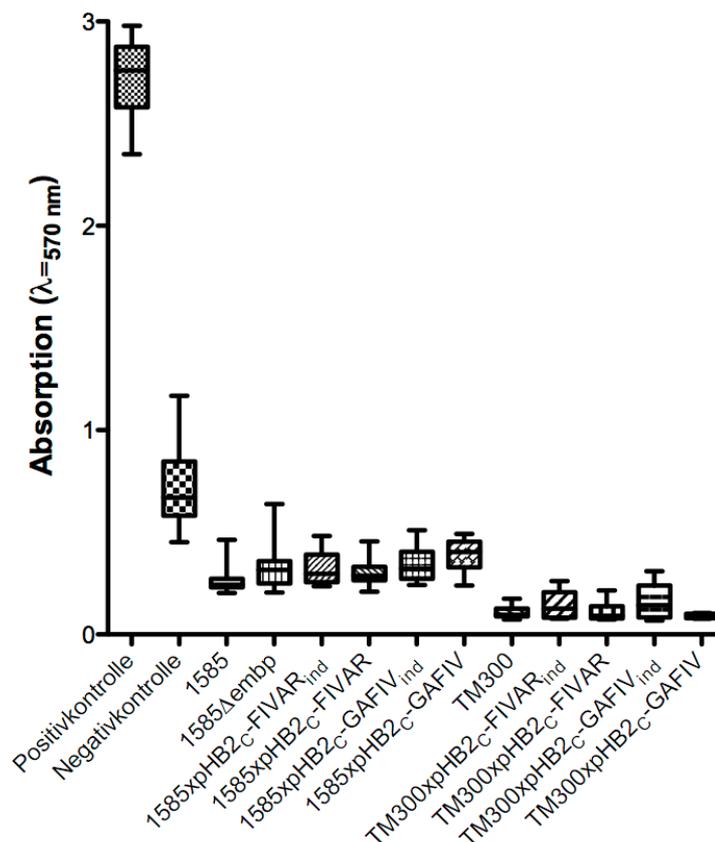


Abb. 17: Untersuchung der Biofilmbildung der Transduktanten von *S. epidermidis* 1585 und *S. carnosus*. Beim Vergleich von induzierenden gegenüber nicht-induzierenden Wachstumsbedingungen kommt es nicht zur Biofilmbildung bei den *S. epidermidis* 1585- oder den *S. carnosus* TM300-Transduktanten. Als Positiv- und Negativkontrolle wurde der Stamm *S. epidermidis* 1585P_{xyI embp} unter induzierenden und nicht induzierenden Bedingungen mitgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss auf die Biofilmbildung der *in trans* Expression der Embp-Fragmente im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Stämmen untersucht. Auch hier zeigte sich keine Veränderung des Biofilmphänotyps. Box-Plot Darstellung mit Minimum und Maximum.

3.5 Charakterisierung der Embp-vermittelten Fibronectin-Bindung unter Verwendung rekombinant in *E. coli* exprimierter Embp-Fragmente und Fibronectin Typ III Subdomänen

3.5.1 Rekombinante Expression von rEmbp170 und rEmbp125

Die rekombinante Expression der Embp-Fragmente erfolgte in *E. coli* BL21 AI-Zellen. Nach erfolgter Lyse und weiterer Aufbereitung des Lysates wurden anschließend mittels Nickel-Affinitätschromatographie die mit einem His-Tag versehene Proteine aus dem Lysat aufgereinigt. Entsprechend dem Absorptions-Peak im Chromatogramm wurden Fraktionen ausgewählt und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

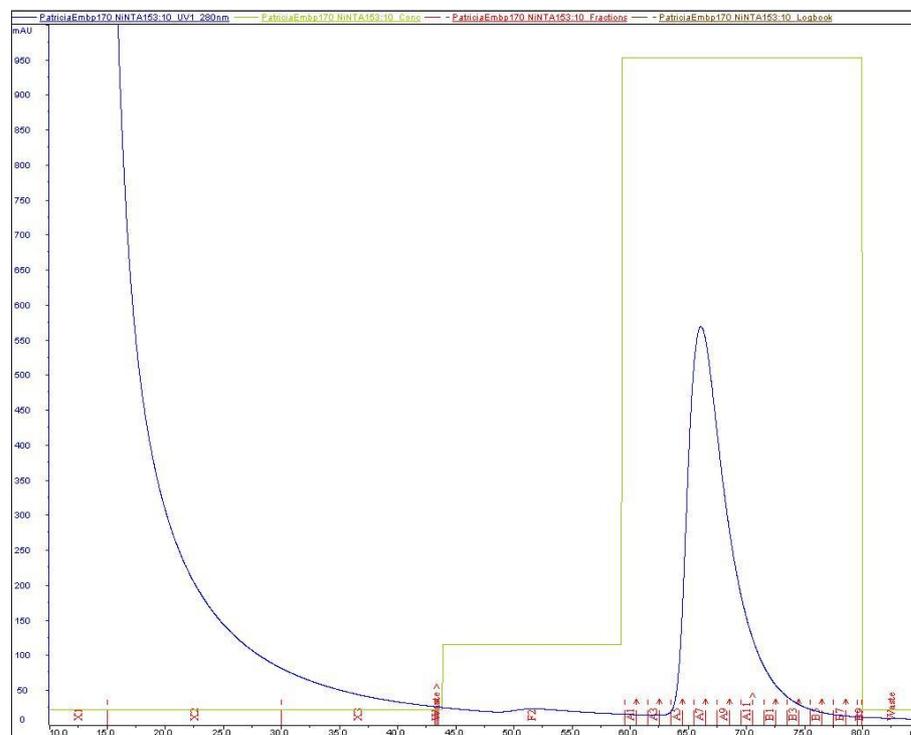


Abb. 18: Aufreinigung von rEmbp170. Beispielhafte Darstellung eines Elutionsprofils bei Nickel-Affinitätschromatographie. Die violette Kurve stellt die UV-Absorption (gemessen bei 280 nm), die grüne Kurve den prozentualen Anteil des Imidazol-haltigen Elutionspuffers dar. Im Folgenden wurden Fraktionen aus dem Bereich des Elutionspeaks (A5 bis B4) mittels SDS-PAGE analysiert.

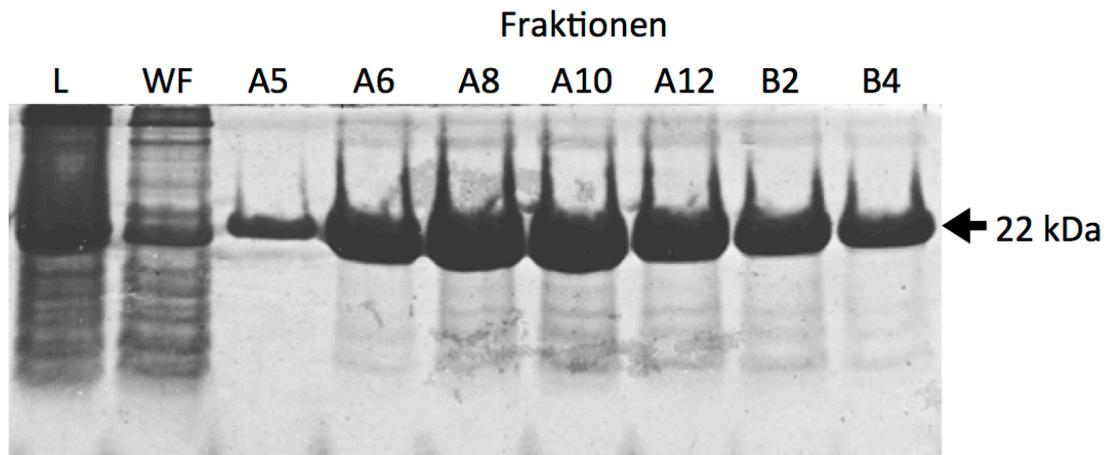


Abb. 19: Analyse des Elutionspeaks mittels SDS-PAGE. Zuerst wurden eine Probe des Zelllysates (L) und der Waschflüssigkeit (WF) aufgetragen. Anschließend ausgewählte Fraktionen aus dem Bereich des Elutionspeaks (A5-B4) rEmbp170 hat eine Masse von 22 kDa. Neben der Hauptbande (Pfeil) kann man jeweils ober- und unterhalb geringfügig Verunreinigungen ausmachen.

Nachdem festgestellt werden konnte, dass durch alleinige Nickel-Affinitätschromatographie kein ausreichender Reinheitsgrad erzielt werden konnte, wurde die Proteinpräparation durch Anschluss einer Ionenaustauschchromatographie weiter gereinigt. Dafür wurden die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen zusammengeführt, aufkonzentriert und annähernd vollständig (etwa 99 %) umgepuffert. Im Fall von rEmbp170 wurde in 50 mM Natriumphosphat-Puffer bei $\text{pH} = 7,0$ umgepuffert, um dann mittels Kationenaustauschchromatographie einen weiteren Reinigungsschritt durchzuführen. Bei rEmbp125 konnte nach Pufferaustausch gegen 20 mM Bis-Tris bei $\text{pH} = 6,0$ eine Anionenaustauschchromatographie angeschlossen werden. Auch hier wurden im Anschluss die Eluate wie oben angegeben mittels SDS-PAGE analysiert.

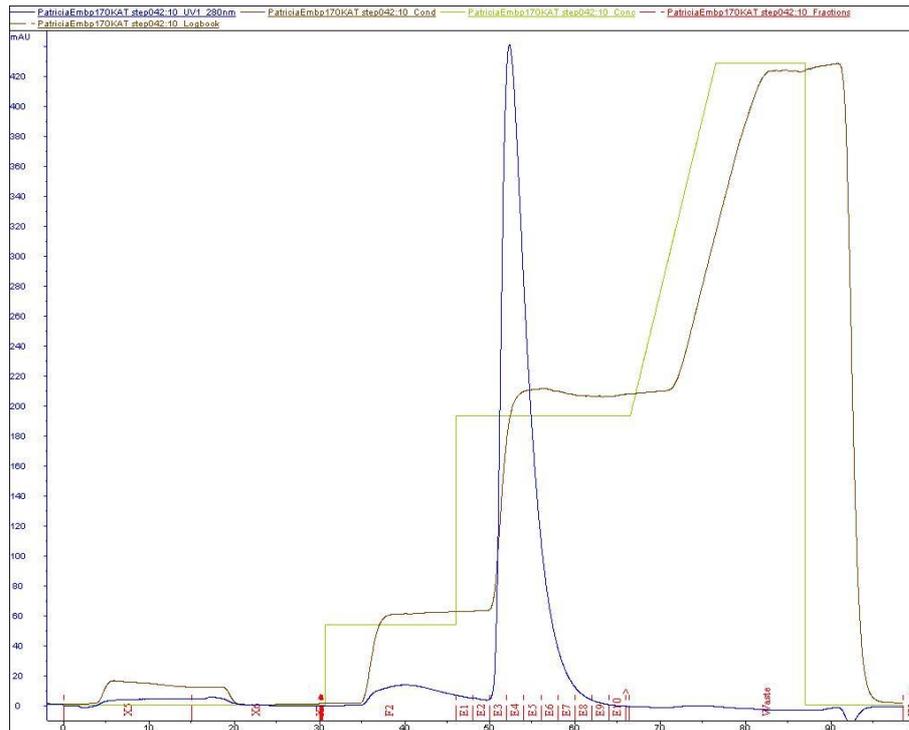


Abb. 20: Kationenaustauschchromatographie vom rEmbp170. Exemplarische Darstellung eines Elutionsprofils bei mehrschrittiger Elution. Die violette Kurve stellt die UV-Absorption (gemessen bei 280 nm), die grüne Kurve den prozentualen Anteil des 1 M Natriumchlorid-haltigen Elutionspuffers und die braune Kurve die absolute Leitfähigkeit (in mS) dar. Hier erfolgte die Elution in mehreren Stufen, die sich durch eine unterschiedliche Natriumionen-Konzentration auszeichnen. rEmbp170 eluiert bei einem 45 %igen Anteil Elutionspuffer.

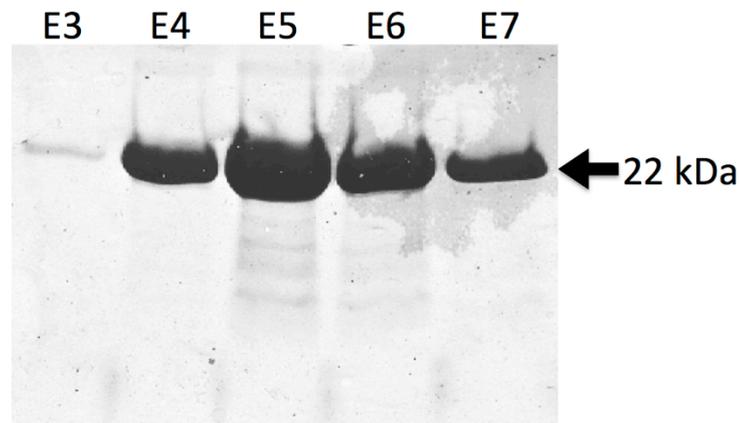


Abb. 21: Analyse des Elutionspeaks mittels SDS-PAGE. Ausgewählte Fraktionen aus dem Bereich des Elutionspeaks wurden auf dem 15 %igen SDS-PAGE aufgetragen. rEmbp170 hat eine Masse von 22 kDa. Neben der Hauptbande (Pfeil) sind im Vergleich zum SDS-PAGE nach Nickel-Affinitätschromatographie (Abbildung 18) weiterhin ober- und unterhalb Verunreinigungen auszumachen, wenngleich die Reinheit insgesamt als höher zu bewerten ist.

Die zusätzliche Kationenaustauschchromatographie konnte den Reinheitsgrad nur geringfügig erhöhen. Im Anschluss wurden die Fraktionen erneut zusammengeführt, aufkonzentriert und in den endgültigen Puffer umgepuffert. Sowohl rEmbp125 wie auch rEmbp170 wurden in 50 mM MES und 150 mM NaCl bei pH = 6,0 umgepuffert. Nach Darstellung der aufkonzentrierten Proteine in der SDS-PAGE wurden diese bei -20 °C eingefroren.

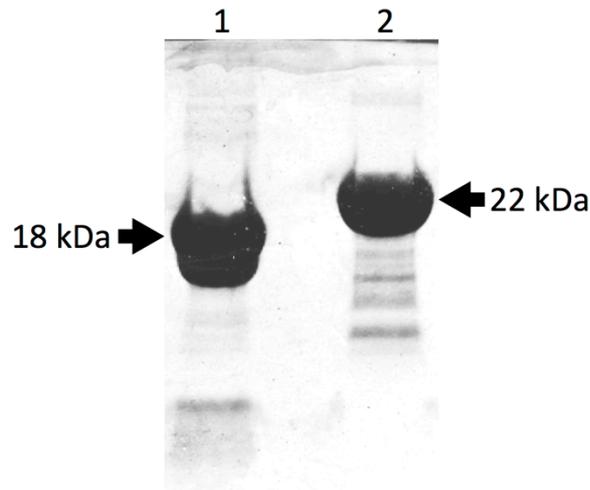


Abb. 22: rEmbp125(1) und rEmbp170(2) in 50 mM MES und 150 mM NaCl bei pH = 6,0. Die bei den 18,2 kDa großen rEmbp125 angedeutete sichtbare Doppelbande kommt durch eine Isoform des Proteins zustande, die in der Anionenaustauschchromatographie erst bei etwa 10 % höherem Elutionspufferanteil von der Austauschmatrix abgelöst wird. Ebenso wie bei rEmbp125 sind auch bei dem 22 kDa großen rEmbp170 neben der Hauptbande weiterhin geringfügige Kontaminationen sichtbar.

3.5.2 Rekombinante Expression der Fibronectin Typ III Subdomänen

Wie auch bei der rekombinanten Expression von rEmbp125 und -170 konnte durch Nickelaffinitätschromatographie der erste Aufreinigungsschritt vollzogen werden. Sowohl für die rekombinant exprimierte Fibronectin Typ III Subdomäne rFN4-7 als auch rFN12-14 ergab sich nach der Analyse der Proteinpräparationen die Notwendigkeit mittels Ionenaustauschchromatographie einen weiteren Reinigungsschritt anzuschließen. Aufgrund des niedrigen isoelektrischen Punktes von 5,6 für das Protein rFN4-7 fiel die Wahl auf die Anionenaustauschchromatographie in 20 mM Bis-Tris (pH = 7,2). Die Elution des Proteins erfolgte unter Zusatz von 1M Natriumchlorid im Elutionspuffer. Der isoelektrische Punkt des rekombinanten Proteins rFN12-14 liegt bei 9,8, weswegen hier die Kationenaustauschchromatographie ausgewählt wurde. Für

den Kationenaustausch war es notwendig, das Protein in 50 mM Natriumphosphatpuffer bei pH = 7,0 umzupuffern. Die Elution erfolgte auch hier unter Zusatz von 1 M Natriumchlorid im Elutionspuffer.

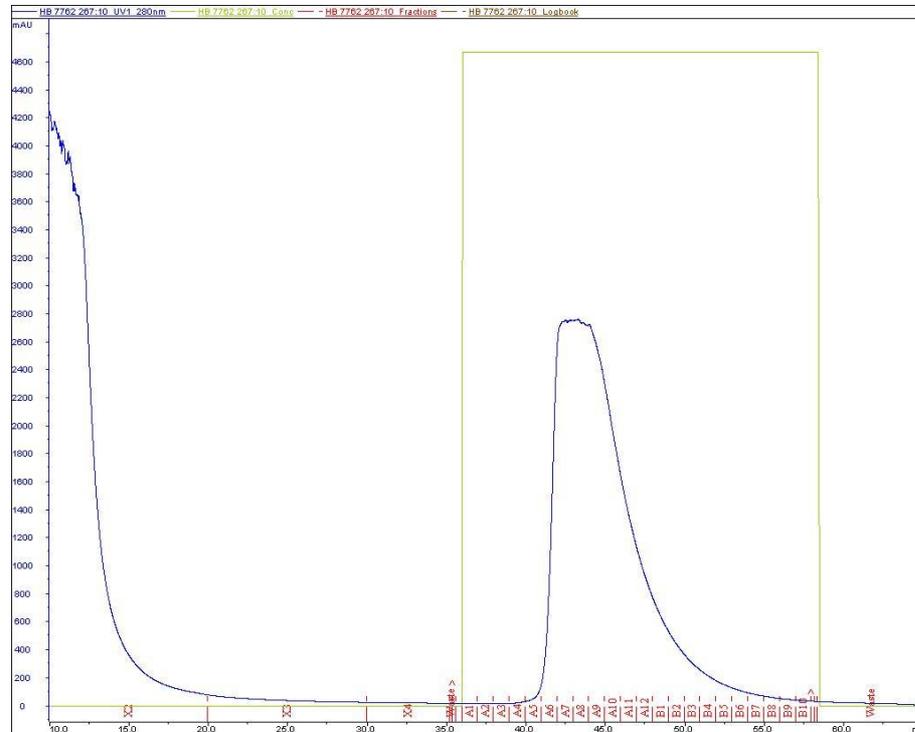


Abb. 23: Aufreinigung von rFN12-14. Beispielhafte Darstellung eines Elutionsprofils bei Nickel-Affinitätschromatographie. Die violette Kurve stellt die UV-Absorption (gemessen bei 280 nm), die grüne Kurve den prozentualen Anteil des Imidazol-haltigen Elutionspuffers dar. Im Folgenden wurden Fraktionen aus dem Bereich des Elutionspeaks (A5 bis B2) mittels SDS-PAGE analysiert.

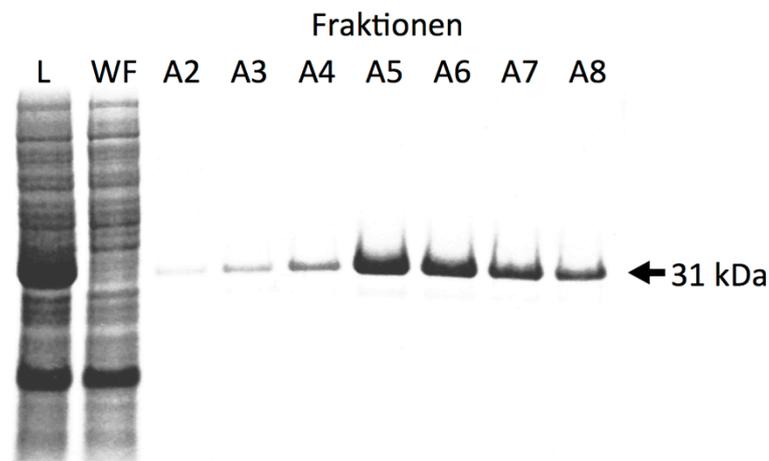


Abb. 24: Analyse des Elutionspeaks mittels SDS-PAGE. Zuerst wurden eine Probe des Zelllysates (L) aufgetragen. Die Waschflüssigkeit zeigt (WF). Anschließend sind ausgewählte Fraktionen aus dem Bereich des Elutionspeaks (A2 bis A8) dargestellt. rFN12-14 hat eine Masse von 31 kDa.

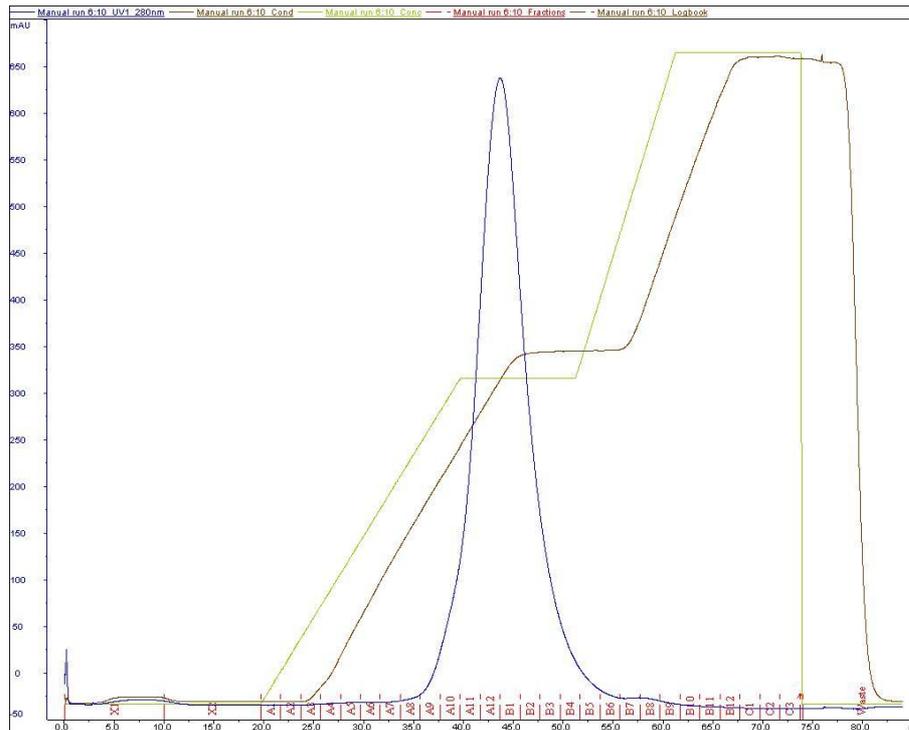


Abb. 25: Kationenaustauschchromatographie vom rFN12-14. Exemplarische Darstellung eines Elutionsprofils bei mehrschrittiger Elution. Die violette Kurve stellt die UV-Absorption (gemessen bei 280 nm), die grüne Kurve den prozentualen Anteil des 1 M Natriumchloridhaltigen Elutionspuffers und die braune Kurve die absolute Leitfähigkeit (in mS) dar. Hier erfolgte die Elution in mehreren Stufen, die sich durch eine unterschiedliche Natriumionenkonzentration auszeichnen. rFN12-14 eluiert vollständig in einem Fenster zwischen 35 und 50 % Anteil Elutionspuffer.

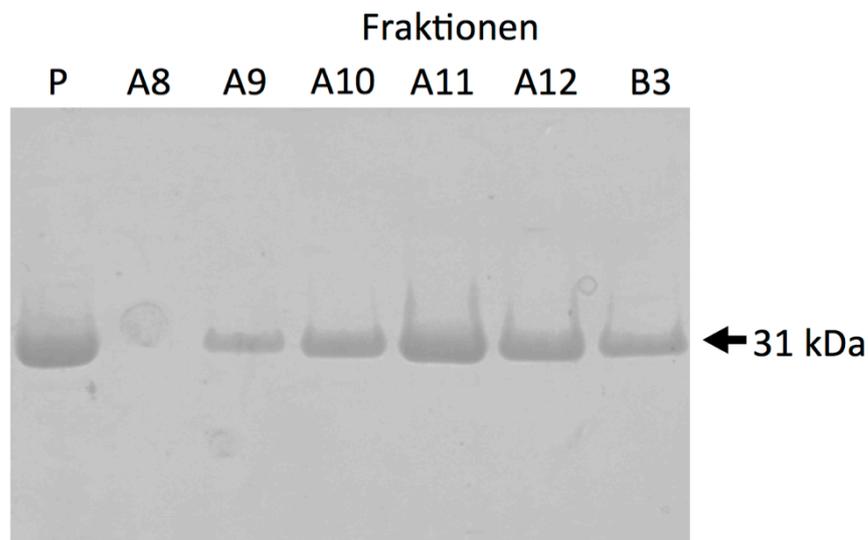


Abb. 26: Analyse des Elutionspeaks mittels SDS-PAGE. (P) bezeichnet die konzentrierten Fraktionen nach Nickel-Affinitätschromatographie in 50 mM NaPO₄-Puffer. (A8 bis B3) zeigen ausgewählte Fraktionen aus dem Bereich des Elutionspeaks. rFN12-14 hat eine Masse von 31 kDa. Nach dem Umpuffern und Konzentrieren war bereits ein Großteil der Kontaminationsbanden entfernt (P) sodass hier ein Reinheitsgewinn durch den zusätzlichen Reinigungsschritt nicht sichtbar wird.

3.6 Analyse der Fibronectin-bindenden Eigenschaften rekombinant in *E. coli* exprimierter Embp-Fragmente und der Bedeutung von *in trans* exprimiertem Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ und –GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ in Staphylokokken für die bakterielle Adhärenz

3.6.1 Adhärenz von Staphylokokken an mit Fibronectin beschichteten Oberflächen

Der Einfluss von Embp auf die Adhärenz von Staphylokokken, an mit humanem Plasmafibronektin beschichteten Oberflächen, konnte durch ELISA-Bindungsexperimente unter Verwendung des *S. epidermidis*-Stammes 1585v gegen den Wildtyp 1585 nachvollzogen werden. Der Stamm 1585v exprimiert konstitutiv eine trunkierte Version von Embp, während der Wildtyp unter Standardlaborbedingungen nur sehr geringe Mengen von Embp bildet [43]. In der Bindungsstudie konnte gezeigt werden, dass 1585v gegenüber dem Wildtyp eine deutlich gesteigerte Bindung an die mit Fibronectin konditionierte Oberfläche aufwies. Durch Insertion eines Anhydrotetrazyklin-induzierbaren Promoters vor das *embp*-Wildtypallel entstand der Stamm 1585 $P_{xyl\ embp}$ [43]. Die Ergebnisse aus den vorhergenannten Bindungsstudien konnten auch durch die regulierte *in trans* Expression von Embp nachvollzogen werden. Die Transformation des Stammes 1585 mit dem Plasmid pFNBA4 [78] erlaubte die *in trans* Expression des Fibronectin-bindenden Proteins FnBPA von *S. aureus*. Auch dieser Stamm zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich gesteigerte Adhärenz an Fibronectin-beschichtete Oberflächen. Bemerkenswerterweise kam es bei dem Stamm 1585 $P_{xyl\ embp}\times pFNBA4$, der unter Induktion durch Anhydrotetrazyklin sowohl Embp wie auch FnBPA parallel *in trans* exprimierte, im Vergleich zu den Stämmen die entweder Embp oder FnBPA exprimierten, zu einer gesteigerten Adhärenz.

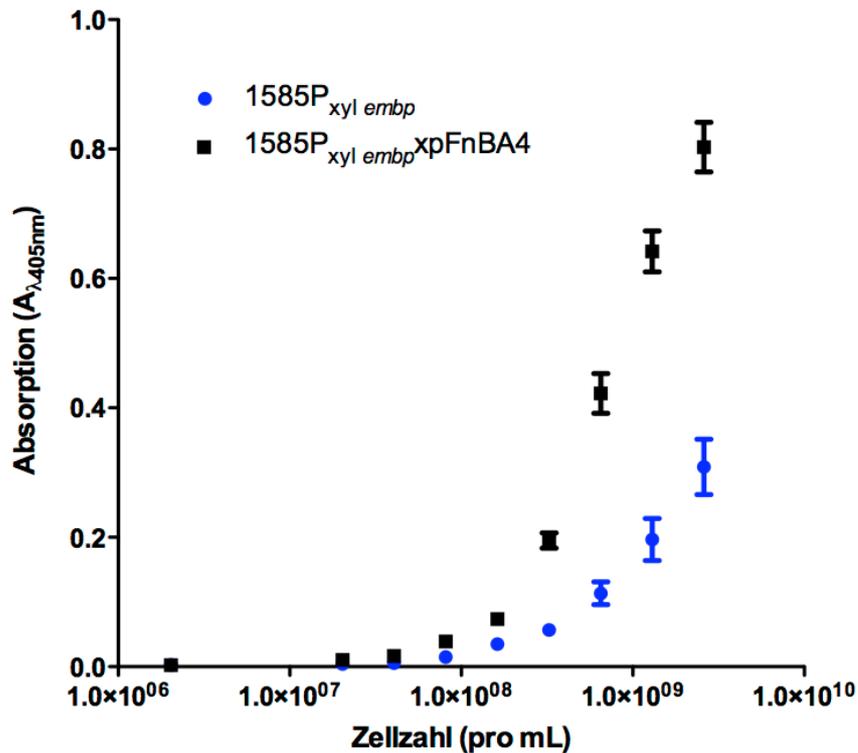


Abb. 27: ELISA Fibronectin-Bindungsmodell. In einer 96-well Mikrotiterplatte wurde **humanes Plasmafibronektin Oberflächen-immobilisiert**. Anschließend wurden für 60 min geometrische Verdünnungsreihen von Bakteriensuspensionen auf der konditionierten Oberfläche inkubiert. In schwarz sieht man eine gesteigerte Adhärenz des Stammes *S. epidermidis* 1585P_{xyl embp xpFnBA4} gegenüber 1585P_{xyl embp} (blau). Beide Stämme sind unter Embp-induzierenden Bedingungen gewachsen.

In der Arbeit von Christner et al. konnte gezeigt werden, dass die rekombinant exprimierten Proteine rEmbp2588 und -6599 beide Fibronectin-bindende Aktivität aufwiesen. Beide Proteine repräsentierten unterschiedliche Bereiche des Embp. rEmbp2588 bezog sich auf die FIVAR-Region, während rEmbp6599 einen Abschnitt aus dem GA-Modul darstellte [43]. Unter Verwendung der Plasmide pHB2_C-FIVAR und pHB2_C-GAFIV war es möglich entsprechende Abschnitte aus der FIVAR-Region beziehungsweise dem GA-Modul in Embp-negativen Stämmen *in trans* zu exprimieren. Sowohl die Expression von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ wie auch von Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ im Stamm 1585 zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine gesteigerte Adhärenz an Oberflächen-immobilisiertes Fibronectin.

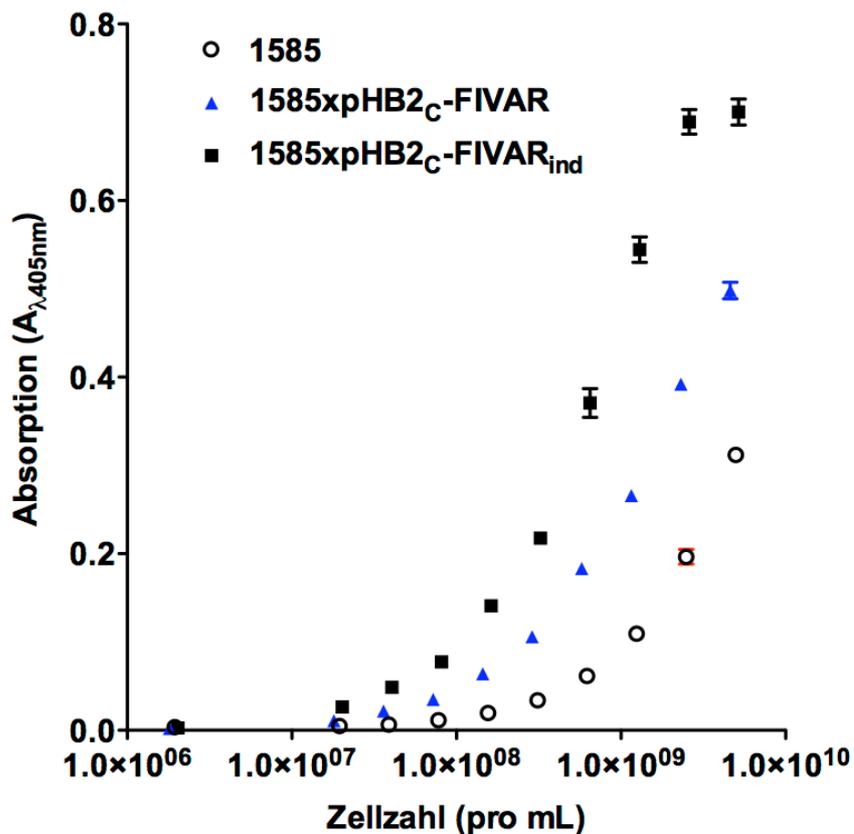


Abb. 28: Adhärenz an Oberflächen-immobilisiertes Fibronectin. In der Grafik ist eine deutlich gesteigerte Adhärenz des Stammes 1585xpHB2_C-FIVAR unter induzierter Expression von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ (schwarz) im Vergleich mit dem nicht-induzierten Stamm (blau) oder dem Wildtyp (rot) festzustellen. Die Adhärenz wird hier in Form einer Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge $\lambda = 405$ nm gemessen.

Biochemische Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die Embp-Bindungsstelle in der Typ III Domäne des Fibronectins lokalisiert ist. So konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass möglicherweise FN12-14 an der Interaktion beteiligt sein könnten [43]. Mithilfe rekombinant in *E. coli* hergestelltem rFN4-7 beziehungsweise rFN12-14 sollte die Adhärenz von Staphylokokken, die Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ oder auch Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ *in trans* exprimieren, untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die rekombinanten Fibronectin-Subdomänen über ihren N-terminalen His-Tag an speziellen Mikrotiterplatten (Immobilizer Ni-Chelate plates; NUNC) immobilisiert. Die Sättigungskonzentration lag jeweils bei 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Aufgrund unspezifischer Interaktionen zwischen *S. epidermidis* und der Kontrolloberfläche der Mikrotiterplatten war es notwendig, diese Untersuchung unter Zuhilfenahme von *S. carnosus* TM300 durchzuführen. Nachdem dieser Stamm erfolgreich mit

den Plasmiden pHB2_C-FIVAR und pHB2_C-GAFIV transformiert sowie deren Funktionalität gezeigt werden konnte, war es möglich die Ergebnisse aus den Vorexperimenten mit *S. epidermidis*-Transformanden an humanem Plasmafibronektin zu bestätigen. Somit war davon auszugehen, dass sich die *S. carnosus*-Transformanden im Bezug auf das verwendete Untersuchungssystem vergleichbar zu den *S. epidermidis*-Transformanden hinsichtlich ihrer Fibronektinbindungseigenschaften verhielten (Daten nicht gezeigt). In den nun durchgeführten Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass sowohl der Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ wie auch der Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ *in trans* exprimierende *S. carnosus* gegenüber dem Wildtyp eine gesteigerte Adhärenz an das rekombinant exprimierte rFN12-14 aufwies.

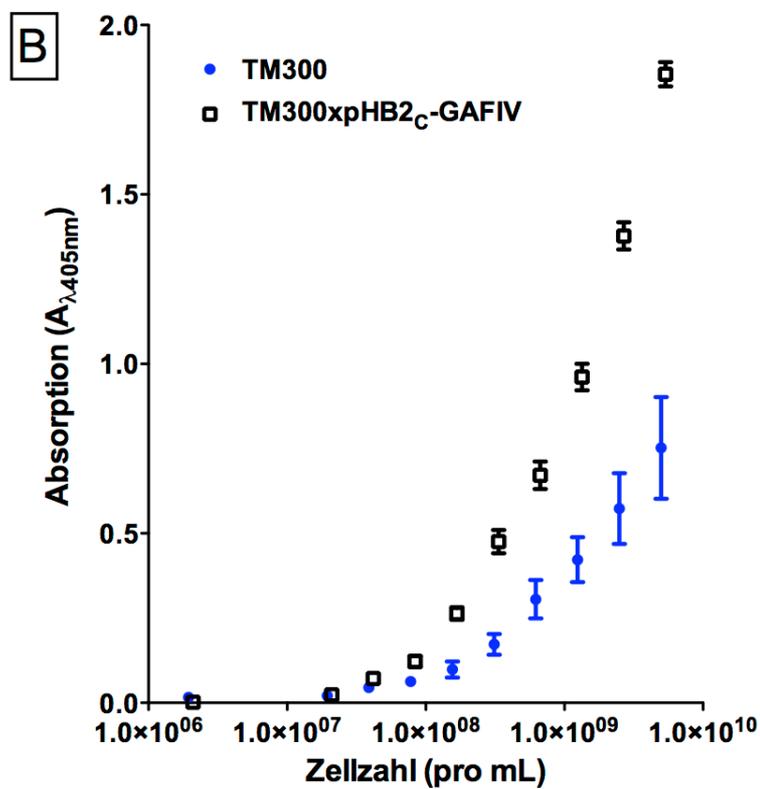
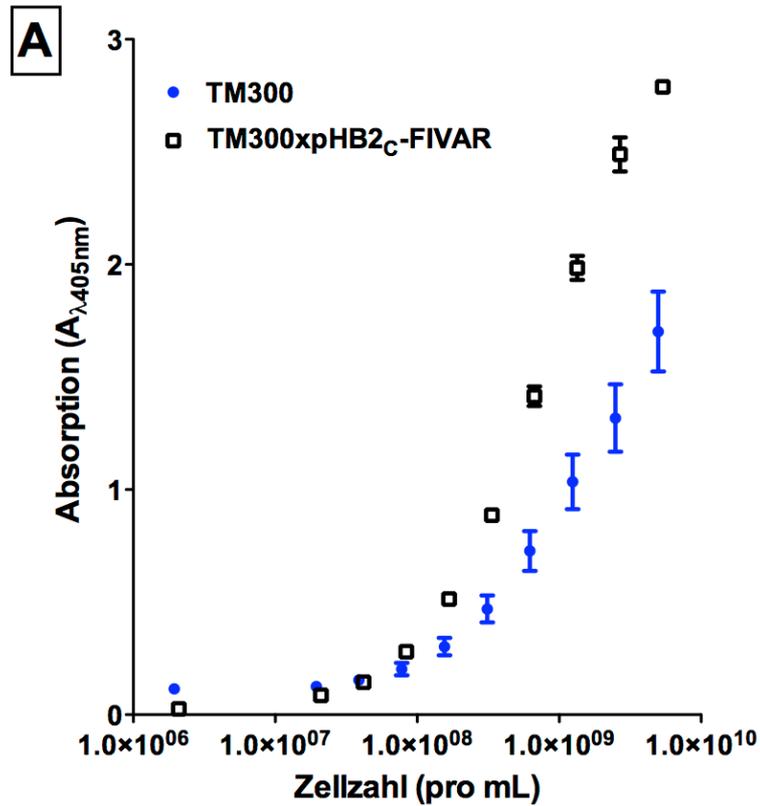


Abb. 29: ELISA-Modell zur Darstellung der bakteriellen Adhärenz an mit 10 µg/mL Plasmafibronektin beschichtete Mikrotiterplatten. *Staphylococcus carnosus* TM300 zeigte bei in trans Expression von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ (A) oder Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ (B; jeweils in blau) im Vergleich zum Wildtyp (jeweils in schwarz) eine gesteigerte Adhärenz an Oberflächen-immobilisiertes Plasmafibronektin.

Nachdem mittels Far Western Blot keine Bindung von rEmbp2588 an rFN4-7 nachgewiesen werden konnte [43], bot sich diese rekombinant exprimierte Subdomäne als Kontrolle für die Bindungsstudien an. Tatsächlich konnte keine Adhärenz, der unter induzierenden Bedingungen gewachsenen *S. carnosus* TM300xpHB2_C-FIVAR an die Fibronektin Subdomäne rFN4-7, jedoch deutliche Bindung an die Subdomäne rFN12-14 gezeigt werden.

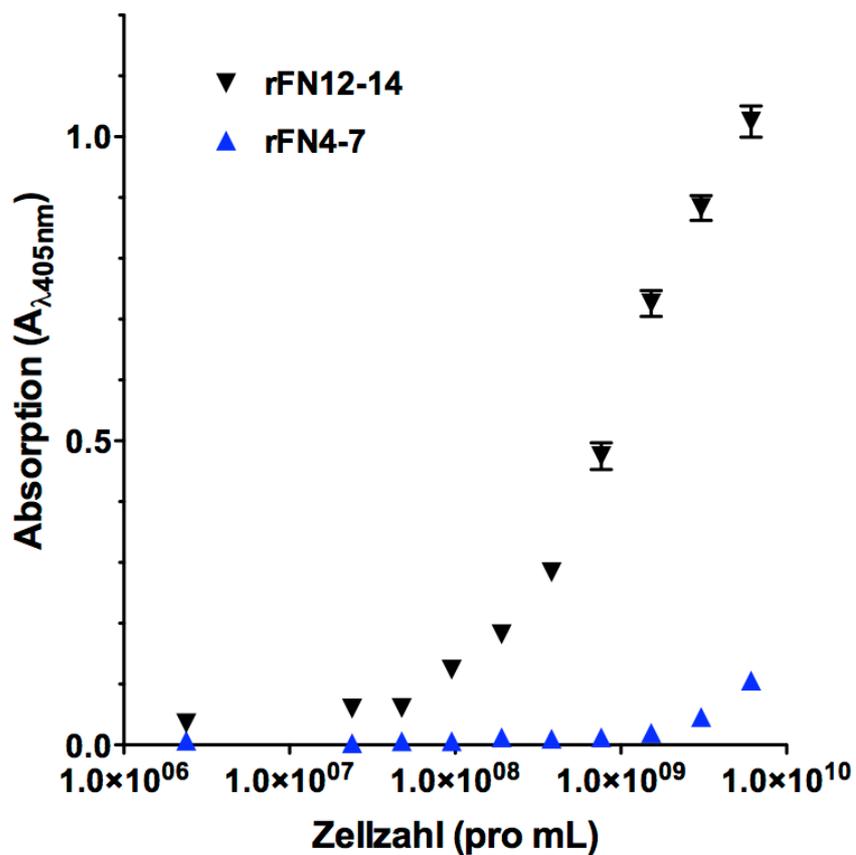


Abb. 30: ELISA-Modell zur Darstellung der bakteriellen Adhärenz an mit 20 µg/mL rekombinant exprimierten Fibronektin Typ III Subdomänen beschichteten Ni-Chelat-Mikrotiterplatten. Deutlich gesteigerte Bindung von TM300xpHB2_C-FIVAR unter induzierenden Wachstumsbedingungen an rFN12-14 (schwarz) im Vergleich zu rFN4-7 (blau).

3.6.2 Inhibitionsstudien

In der Fibronectin Typ III Domäne im Bereich der Repeats 12 bis 14 wird eine Heparinbindungsstelle beschrieben [84]. Bakterielle Bindung an diese Region konnte bereits für das Salmonella-Oberflächenprotein ShdA nachgewiesen werden [85]. Aus den Ergebnissen der oben genannten Bindungsexperimente ergab sich die Hypothese, dass Embp mit der Heparinbindungsstelle in FN12-14 interagiert. Zur Überprüfung wurde die Möglichkeit untersucht, durch Zugabe von Heparin die Bindung von Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ *in trans* exprimierendem *S. carnosus* TM300 oder *S. epidermidis* 1585 an mit Fibronectin beschichtete Oberflächen im ELISA-Bindungsmodell zu inhibieren. Inhibitionsexperimente, in denen versucht wurde die Bindung von *S. epidermidis* 1585v an Oberflächen-immobilisiertes humanes Plasmafibronectin in Anwesenheit von Heparin zu modulieren, zeigten zwar einen Dosis-abhängigen Effekt, jedoch konnte dieser, wenn auch geringer ausgeprägt, bei der Bindung des *in trans* FnBPA exprimierenden Kontrollstammes *S. epidermidis* 1585vxpFNBA4 ebenso beobachtet werden. Somit sollte der Einfluss von Heparin auf die Embp-vermittelte Bindung von Staphylokokken an Oberflächen-immobilisiertes Fibronectin als unspezifisch betrachtet werden.

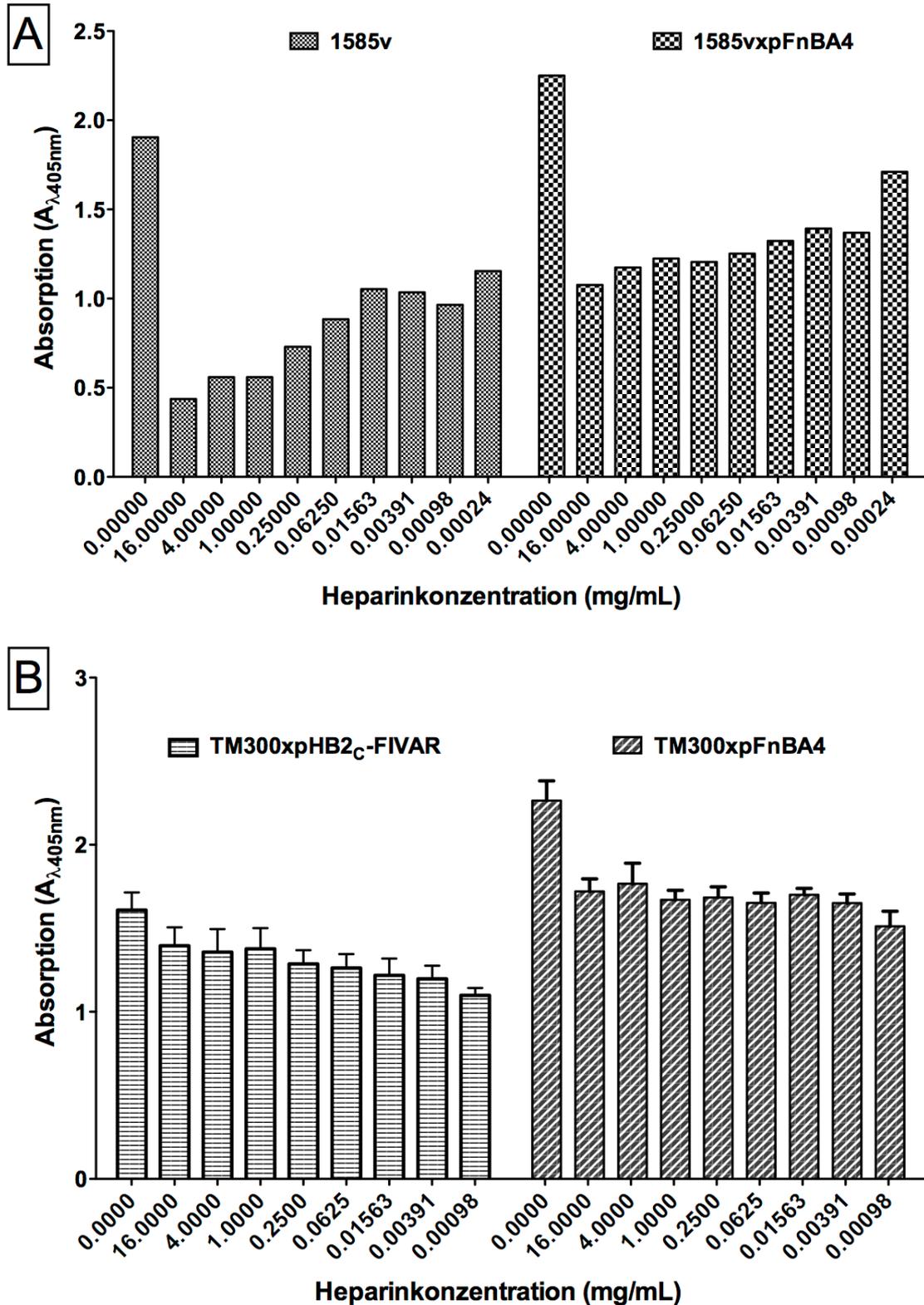


Abb. 31: ELISA-Inhibitionsmodell im Mikrotiterplattenformat. (A) Sowohl beim Stamm *S. epidermidis* 1585v wie auch bei dem Kontrollstamm 1585vxpFnBA4 lässt sich ein Dosis-abhängiger Inhibitionseffekt nachweisen. Da jedoch FnBPA im Bereich der N-terminalen Fibronectin Typ I Domäne sein Bindungsepitop hat, könnte dieses Ergebnis auf eine unspezifische Bindungsmodulation hindeuten. (B) Hier ist der Einfluss von Heparin auf die Interaktion von *S. carnosus* einmal Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ oder FnBPA in trans exprimiert dargestellt. Bei beiden Stämmen kann keine Dosis-abhängige Inhibition festgestellt werden.

Die spezifische Blockade der C-terminalen Heparinbindungsstelle durch einen kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper (α -FNH3-8) konnte keine Änderung des Bindungsverhaltens von *S. carnosus* TM300xpHB2_C-FIVAR weder an Oberflächen-immobilisiertes Plasmafibronektin noch an rFN12-14 bewirken. Die tatsächliche Bindung des Antikörpers an Oberflächen-immobilisiertes Fibronektin erfolgte Dosis-abhängig (Daten nicht gezeigt).

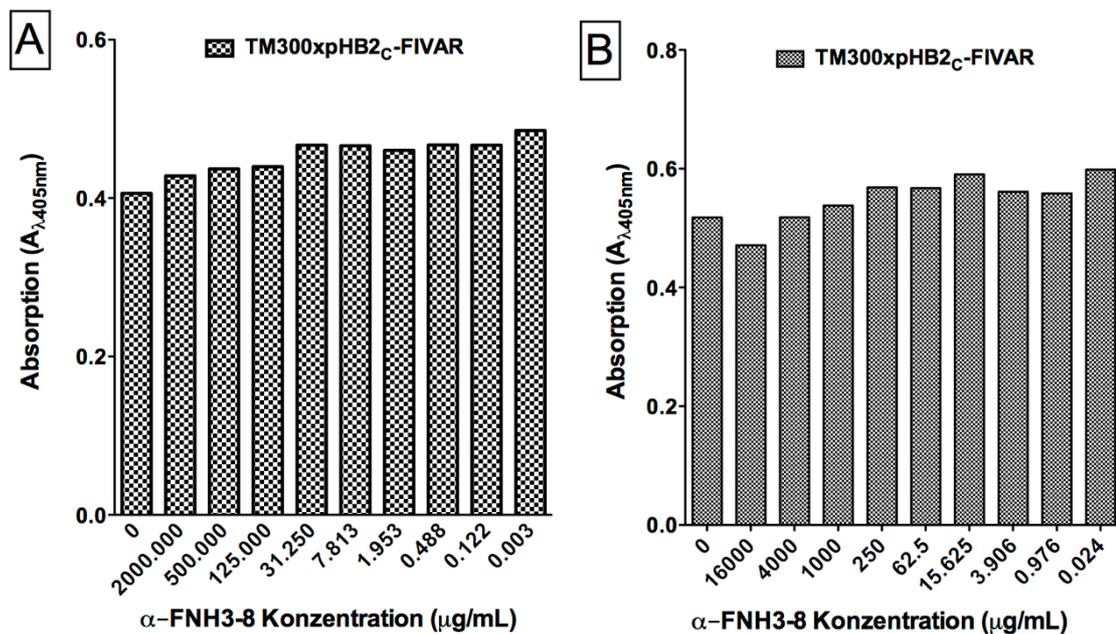


Abb. 32: ELISA-Modell zur Bindungsinhibition in Anwesenheit des monoklonalen Antikörpers α -FNH3-8. Die Blockade der Heparinbindungsstelle, sowohl in Oberflächen-immobilisiertem Plasmafibronektin(A) wie auch bei rekombinant in *E. coli* exprimiertem rFN12-14(B), hatte auf die Bindung von TM300xpHB2_C-FIVAR keinen Effekt.

3.6.3 Bindung von rekombinant in *E. coli* exprimierten Embp-Fragmenten an Fibronektin

Strukturbiologische Untersuchungen zum Embp legten nahe, dass die minimalen strukturgebenden Einheiten des Embp-Proteins 170 Aminosäuren in der FIVAR-Region beziehungsweise 125 Aminosäuren im GA-Modul umfassen (Büttner, Perbandt, Rohde; nicht publiziert). In Analogie zu den von Christner et al. durchgeführten Bindungsstudien, wurde die Fibronektin-bindende Aktivität von rekombinant in *E. coli* exprimiertem rEmbp170 und rEmbp125 untersucht. Beide Embp-Fragmente banden Dosis-abhängig an Oberflächen-

immobilisiertes humanes Plasmafibronektin. Mithilfe der Surface Plasmon Resonanz (SPR) konnte im Folgenden auch die Bindung von rEmbp125 an die Fibronektin-Subdomäne rFN12-14, nicht jedoch an rFN4-7 dargestellt werden.

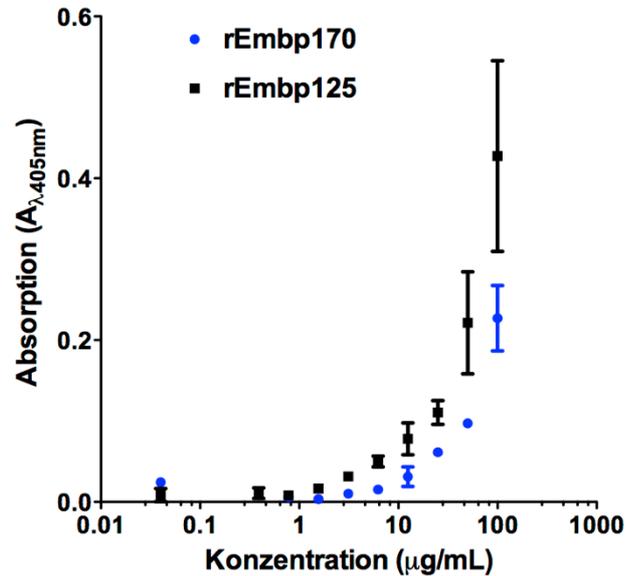


Abb. 33: ELISA-Modell zur Darstellung der Bindung von rEmbp125 und -170 an mit 10 µg/mL Plasmafibronektin-beschichtete Oberflächen. Sowohl rEmbp125 (schwarz) wie auch rEmbp170 (blau) zeigen eine Dosis-abhängige Bindung an Oberflächen-immobilisiertes Plasmafibronektin.

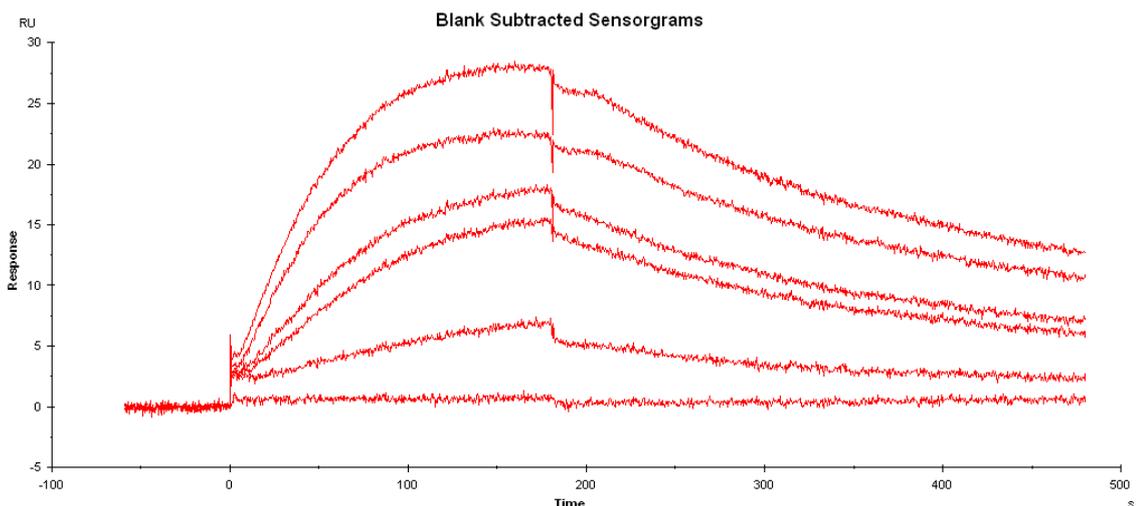


Abb. 34: Sensorgramm der Surface Plasmon Resonanz von rEmbp125 an Fibronektin-Fragmente. Auf einem CM5 Sensor Chip wurden wie folgt Liganden immobilisiert: In der ersten Flusszelle rFN4-7; in der zweiten Flusszelle rFN12-14. Nach Injektion des Analyten für 180 Sekunden lässt sich eine verzögerte Dissoziation des Analyten vom Liganden feststellen. Dieser Effekt findet sich bei Analytenkonzentrationen von 120 (max. RU-Ausschlag) bis 1,8 µg/mL (niedrigster RU-Ausschlag). Somit konnte eine Dosis-abhängige Bindung von rEmbp125 an Oberflächen-immobilisiertes rFN12-14 gezeigt werden.

4. Diskussion

4.1 Charakteristika bakterielle Proteine mit Fibronectin-bindender Aktivität

Bakterien der Spezies *Staphylococcus epidermidis* sind grampositive, fakultativ anaerobe Kokken, die als Kommensalen, sowohl die Haut als auch die Schleimhäute des Menschen kolonisieren [8]. In den letzten drei Jahrzehnten hat die medizinische Bedeutung von *S. epidermidis* deutlich hinzugewonnen. *S. epidermidis* ist inzwischen der führende Erreger nosokomialer Infektionen [7]. Das pathogene Potenzial dieses Erregers begründet sich im Wesentlichen durch seine Fähigkeit Biofilme sowohl auf artifiziellen (z.B. Polymeren), wie auch nativen Oberflächen auszubilden [86]. Ausgangspunkt der Biofilmbildung ist die sogenannte primäre Adhärenz. Während dieser Phase adhären Bakterien über spezifische und unspezifische Mechanismen an Oberflächen. Adhärenz-vermittelnde bakterielle Oberflächenstrukturen werden MSCRAMMs genannt [87], zu denen unter anderem Fibronectin-bindende Proteine gezählt werden. Fibronectinbindung konnte für viele Bakterien demonstriert werden, obwohl das eigentlich Fibronectin-bindende Molekül häufig noch nicht identifiziert werden konnte [53]. Einige Fibronectin-bindende Proteine humanmedizinisch relevanter Erreger wurden jedoch zwischenzeitlich identifiziert und beschrieben [88-91]. Bei Staphylokokken ist das Fibronectin-bindende Protein FnBPA von *S. aureus* [91] ausgiebig charakterisiert [92] und kristallisiert [55] worden. Der Mechanismus der Fibronectinbindung konnte molekular aufgeklärt werden [54, 55]. FnBPA zeigt die typischen Elemente Zellwand-gebundener Oberflächenproteine. So finden sich neben dem N-terminalen Signalpeptid am C-Terminus eine zytoplasmatische Region, die überwiegend positiv geladene Aminosäuren enthält, eine hydrophobe Transmembranregion, das LPETG-Motiv zur kovalenten Verankerung am Peptidoglykan und eine zellwandspannende Prolin-reiche Region. Die zentralen Anteile des Proteins werden durch die am N-Terminus lokalisierte A-Domäne mit Fibrinogen-bindender Aktivität und eine weiter C-terminal gelegene ungeordnete Region, die aus 11 Fibronectin-bindenden Regionen (FnBRs) besteht, gebildet [93].



Abb. 35: Schematische Darstellung des Fibronectin Binding Protein A von *S. aureus*. N-terminal befindet sich ein 36 Aminosäuren langes Signalpeptid (SP), gefolgt von der Fibrinogen-bindenden A-Domäne. Am C-Terminus befinden sich 11 Fibronectin-bindende Regionen (FnBR), die zum Teil in den repetitiven Einheiten D1 bis D4 lokalisiert sind. Direkt angeschlossen ist eine Prolin-reiche Region (PRR), die Verankerungsregion (inklusive des LPETG-Motivs), einer hydrophoben Transmembranregion (TM) und einer zytoplasmatischen Region (ZP) aus überwiegend positiv geladenen Aminosäuren.

Fibronectin/FnBPA-Interaktion findet im N-terminalen Abschnitt des Fibronectinmoleküls im Bereich der Typ I Domäne (²⁻⁵F1-Module) statt. Fibronectin-bindende Aktivität von FnBPA wurde bisher repetitiven Sequenzen der D-Regionen nahe dem C-terminalen Ende zugeschrieben [91]. Aufgrund neuer strukturbasierte Daten konnte die Fibronectinbindung nun in den etwa 40 Aminosäuren langen Fibronectin-bindenden Regionen verortet werden [93]. So konnte gezeigt werden, dass eine FnBR mit vier F1-Modulen interagiert. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde als Tandem- β -Zipper unter anderem bei *Streptococcus agalactiae* beschrieben [93]. Dabei kommt es zur Interaktion einer β -Faltblattstruktur der bakteriellen FnBR in antiparalleler Ausrichtung zur β -Faltblattstruktur der ²⁻⁵F1-Module der Fibronectin Typ I Domäne. Hier wird deutlich, dass ein FnBPA-Molekül mit seinen insgesamt 11 FnBRs mehrere Fibronectinmoleküle gleichzeitig binden kann [55].

Das Extracellular Matrix Binding Protein Embp als Fibronectin-bindendes Protein wird ebenfalls zur Gruppe der MSCRAMMs hinzugerechnet. Neben seiner Funktion als Extrazellulärmatrix bindendes Protein kommt Embp auch Bedeutung in der Akkumulationsphase der Biofilmbildung zu. Insbesondere bei *icaADBC*-negativen Stämmen kann Embp auch eine Rolle in der interzellulären Adhärenz zugesprochen werden [43]. Die Analyse dieser Funktion war jedoch nicht Kernziel der hier vorliegenden Arbeit. Vielmehr sollte bei diesem Projekt die weitere Aufklärung der Interaktion des MSCRAMMs Embp und dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin in den Vordergrund des Interesses gerückt werden. Die Fibronectin-bindende Eigenschaft von Embp wurde bereits nachgewiesen [41]. In der zitierten Arbeit konnten mittels Phage Display Sequenzabschnitte identifiziert werden, deren Transkripte Fibronectin-bindende Aktivität aufwiesen. Diese Sequenzabschnitte lagen innerhalb des *embp*-Gens im Bereich des sogenannten GA-Moduls (etwa nt27.400 bis nt28.300). Unter

Verwendung rekombinanter Embp-Fragmente konnte einerseits eine unabhängigen Bestätigung der Fibronectin-bindenden Aktivität von Embp nachgewiesen und zusätzlich eine Erweiterung der Fibronectin-Bindungsaktivität für die FIVAR-Region bewiesen werden [43].

Trotz funktioneller Gemeinsamkeit unterscheidet sich die molekulare Architektur von Embp im Vergleich zu FnBPA. Embp verfügt ebenfalls über ein N-terminales Signalpeptid, jedoch fehlen die im FnBPA-Molekül gut charakterisierten Fibronectin-bindenden Regionen. Auch die das Peptidoglykan durchspannende Prolin-reiche Region und das LPETG-Motiv zur kovalenten Verankerung an der Zellwand konnten im Embp nicht nachgewiesen werden. Der exakte Mechanismus der Verankerung von Embp an der bakteriellen Oberfläche ist bisher unklar. Strukturell unterscheiden sich die Fibronectin-bindenden Anteile von Embp und FnBPA deutlich. Die FnBRs in FnBPA zeigen überwiegend eine β -Faltblattstruktur [55] während zum Beispiel eine der minimalen Fibronectin-bindende Einheit von Embp das rEmbp125 eine Tripel- α -Helixstruktur aufweist (Büttner, Perbandt, Rohde, nicht publiziert) (siehe Abbildung 37).

4.2 Bedeutung der Embp/Fibronectin-Interaktion für die bakterielle Adhärenz an Oberflächen-organisiertes Fibronectin

Bisher blieb der exakte Mechanismus der Embp/Fibronectin-Interaktion unklar. Erste Hinweise zeigten jedoch, dass die Interaktion von *S. epidermidis* mit Oberflächen-immobilisiertem Fibronectin im Bereich des C-terminalen Endes des Fibronectinmoleküls stattfinden [94, 95]. Nach der Identifikation von Embp als Fibronectin-bindendes Protein von *S. epidermidis* [41], konnte die Bindung von rekombinanten Embp-Fragmenten an C-terminale Fibronectin Typ III Module nachgewiesen werden [43]. Ein Ziel dieser Arbeit sollte klären, ob die Interaktion von Embp mit C-terminalen Fn Typ III Modulen auch für bakterielle Adhärenz von Bedeutung ist. Unter Berücksichtigung des modularen Aufbaus von Embp, um die Bedeutung repräsentativer Abschnitte aus der FIVAR-Region und dem GA-Modul für die bakterielle Adhärenz an Oberflächen-immobilisiertem Fibronectin zu untersuchen, wurden diese *in trans* in verschiedenen Staphylokokkenspezies exprimiert und deren Einfluss auf die

bakterielle Adhärenz an Oberflächen-immobilisiertes Fibronectin untersucht. Bei der phänotypischen Untersuchung der Transformanden zeigte sich, dass das Antiserum α -rEmbp2588 sowohl mit dem in *E. coli* rekombinant exprimierten, wie auch dem *in trans* in Staphylokokken exprimierten Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉, nicht aber mit dem Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ reagiert. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass das α -rEmbp6599-Serum lediglich mit dem rekombinanten Protein rEmbp6599, nicht aber mit den *in trans* exprimierten Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ oder Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ reagiert.

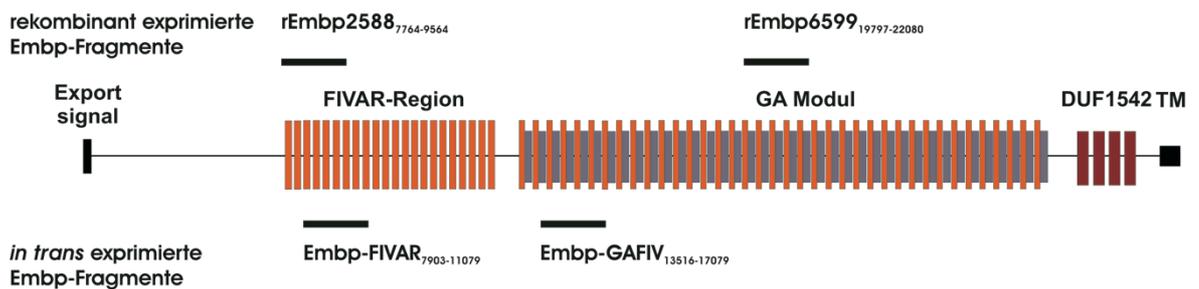


Abb. 36: Schematische Darstellung von Embp. Oberhalb sind die für die Herstellung der rekombinant in *E. coli* exprimierten Embp-Fragmente ausgewählten Regionen dargestellt. Unterhalb sind die Sequenzabschnitte eingezeichnet, die zur *in trans* Expression ausgewählt wurden. Die an den jeweiligen Fragmenten indizierten Nummern geben die exakte Nukleotidposition bezogen auf die Embp-kodierende Sequenz des Stammes *S. epidermidis* 1585 wieder.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es, trotz vermeintlicher struktureller Ähnlichkeit, wahrscheinlich relevante immunogene Unterschiede innerhalb der repetitiven Einheiten gibt. So konnte im GA-Modul eine Homologie von circa 37 % ermittelt werden. Innerhalb der 125 Aminosäure langen Module finden sich lediglich sieben hochkonservierte Aminosäuren (≥ 90 % Homologie) (Büttner, Perbandt, Rohde; nicht publiziert). In wie weit sich diese Unterschiede mit einer biologischen Funktion korrelieren lassen, muss an dieser Stelle offen bleiben. Es kann spekuliert werden, dass zum einen diese differentielle Immunogenität innerhalb definierter Regionen von Embp möglicherweise eine Rolle bei der Immunevasion spielt. Solche Eigenschaften konnten zum Beispiel für das Alpha C Protein von *S. agalactiae* nachgewiesen werden [96]. Zum anderen könnte diese auch als Surrogat unterschiedlicher Substratspezifitäten innerhalb von Embp interpretiert werden. In der initialen Arbeit von Williams et al. wurde die Bindung eines Phagen (pSE109FN) an Fibronectin dargestellt. pSE109FN zeigte keine Bindungsaktivität an Kollagen, Fibrinogen, Laminin oder

Vitronektin, wohl aber – wenn auch in geringerem Ausmaß – Bindung an Heparin, Hyaluronsäure und Plasminogen [41]. Soweit bekannt, wurden bisher keine weiteren Untersuchungen publiziert, die sich mit weiteren möglichen Substraten von Embp befassen. Mithilfe der Modifikation des Plasmides pHB2_C-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ durch Einfügen eines Myc-Tags hinter dem Exportsignal (Wilde, Rohde; nicht publiziert), konnte schließlich auch die korrekte *in trans* Expression von Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ im Western Blot nachvollzogen werden. Zusammenfassend können, die für diese Arbeit erzeugten Transformanten, TM300- und 1585xpHB2_C-Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ und pHB2_C-Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ als funktionell angesehen werden.

Mithilfe etablierter ELISA-Modelle für bakterielle Adhärenz konnte gezeigt werden, dass Embp exprimierende Bakterien im Vergleich zu Embp-negativen Stämmen keinen Unterschied bei der Bindung an Polystyrol-Oberflächen aufweisen. Wird jedoch das extrazelluläre Matrixprotein Fibronektin auf diesen Oberflächen immobilisiert, kommt es zu einer Steigerung der bakteriellen Adhärenz Embp exprimierender Stämme gegenüber Embp-defizienten Vergleichsstämmen an so konditionierten Oberflächen. Interaktion auf Proteinebene zwischen rekombinant in *E. coli* exprimiertem Protein rEmbp2588 aber auch rEmbp6599 mit Oberflächen-immobilisiertem Fibronektin konnte sowohl mittels ELISA wie auch durch Surface Plasmon Resonanz dargestellt werden [43].

In dieser Arbeit konnte erstmals die Bedeutung spezifischer Abschnitte des Embp-Proteins für die bakterielle Adhärenz von Staphylokokken an Oberflächen-immobilisiertes Fibronektin dargestellt werden. Hier zeigte sich, dass sowohl *in trans* exprimiertes Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ wie auch Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ die bakterielle Adhärenz an Oberflächen-immobilisiertes Fibronektin ermöglichen. Eine Quantifizierung der Bindungsstärke der verwendeten Konstrukte konnte durch die verwendeten Untersuchungsmethoden nicht erreicht werden, sodass die Bewertung rein qualitativ vorgenommen wurde. Inwiefern beziehungsweise in welchem Umfang die C-terminalen DUF1542-Domänen an der Fibronektinbindung beteiligt sind, kann hier nur orientierend beantwortet werden. Sowohl *S. carnosus* TM300 wie auch *S. epidermidis* 1585, die *in trans* Embp-DUF1542₂₈₂₃₆₋₃₀₆₁₂ exprimieren, zeigen gegenüber den Embp-negativen Stämmen eine deutlich gesteigerte Bindung an

Oberflächen-immobilisiertes Fibronectin (Büttner, Rohde; nicht publiziert). Ein wesentlicher Unterschied zwischen FnBPA und Embp ist die Verankerung an der Zelloberfläche. Während das FnBPA kovalent über das LPETG-Motiv am Peptidoglykan gebunden ist, ist die Verankerung des Embps unklar. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Art der Verankerung ebenfalls Einfluss auf die bakterielle Adhärenz an Oberflächen-immobilisiertes Fibronectin hat.

4.3 Aufklärung der mechanistischen Grundlage der Embp-vermittelten Fibronectinbindung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass beide der oben genannten *in trans* exprimierten Embp-Fragmente bakterielle Adhärenz an Oberflächen-immobilisiertes Fibronectin ermöglichen, galt es den exakten Mechanismus, der hinter dieser Interaktion steht, aufzuklären. Dabei stellte sich heraus, dass die bisher im Wesentlichen bioinformatische Analyse der Embp-Struktur mittels BLAST (<http://blast.be-md.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) und S.M.A.R.T (<http://smart.embl-heidelberg.de>) ein unvollständiges Bild zeigte. Die aus den Vorhersagen der S.M.A.R.T-Analyse gezogenen Schlussfolgerungen mussten im Zuge der weiteren Strukturanalyse modifiziert werden. So suggeriert das Vorhandensein von „FIVAR“- und „GAFIV“-Domänen die Präsenz strukturell unterschiedlicher Elemente, die, mit Bezug auf die Fibronectinbindung, ähnliche Charakteristika auswiesen. Strukturbiologisch verbergen sich in der FIVAR-Region sich wiederholende Einheiten aus jeweils 170 Aminosäuren, während das GA-Modul aus 125 Aminosäuren langen repetitiven Einheiten zusammengesetzt ist. Die Struktur der minimalen GA-Modul-Baueinheit – hier bezeichnet als rekombinantes Protein rEmbp125 – konnte mit hoher Auflösung aufgeklärt werden (Büttner, Perbandt, Rohde; nicht publiziert). Die Architektur dieser repetitiven Einheiten beruht im Wesentlichen auf einer Tripel- α -Helix. Diese Bauweise findet sich auch in den Baueinheiten des Embp-Homologs Ehb von *S. aureus* [45]. Präliminäre Strukturdaten für die minimale Baueinheit der FIVAR-Region – hier bezeichnet als rekombinantes Protein rEmbp170 – konnten über bioinformatische Modelle (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) generiert werden. Diese suggerieren ebenfalls eine α -helikale Bauweise dieser Module. Sofern die bioinformatischen Vorhersagen sich

experimentell bestätigen lassen, wäre die Konsequenz, dass die FIVAR-Region und das GA-Modul, jeweils basierend auf Tripel- α -Helices, strukturell hohe Ähnlichkeit aufweisen. Somit könnte spekuliert werden, dass die Fibronektin-bindende Aktivität beider Embp-Fragmente eine Konsequenz ihrer strukturellen Ähnlichkeit ist.

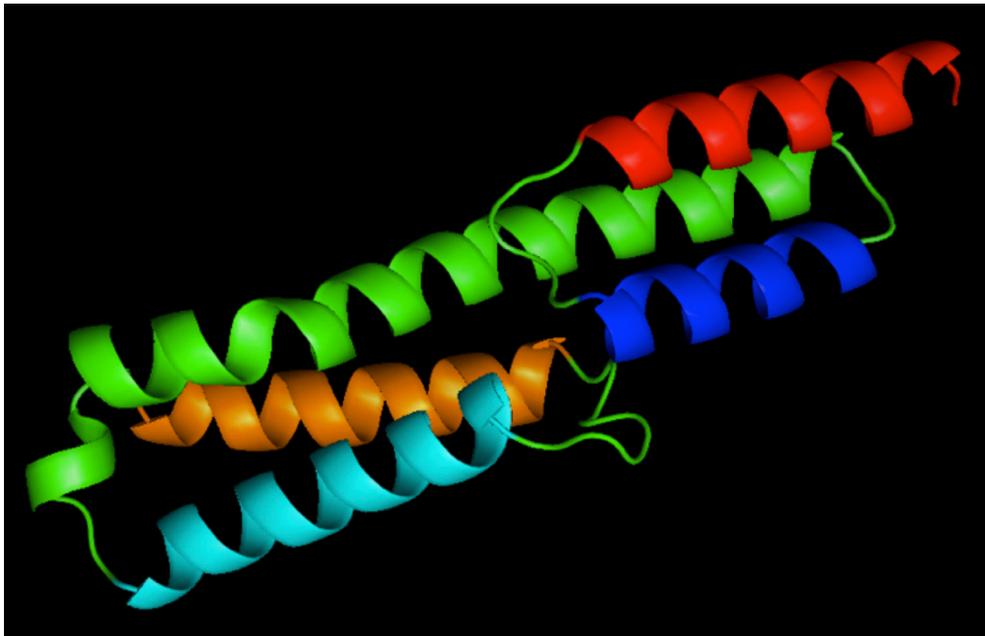


Abb. 37: Röntgen-Kristallstruktur von rEmbp125 (Auflösung 1,2 Å). Die Baueinheit des GA-Moduls zeigt eine durchgehende 33 Aminosäuren lange α -Helix, die jeweils von zwei kürzeren antiparallel verlaufenden α -Helices flankiert ist. Das Glycin an Position 1, Leucin an Position 5, Glutamin an Position 27, Methionin an Position 58, Leucin an Position 61, Asparagin an Position 80 und Leucin an Position 124 sind zu mindestens 90 % konserviert. Insgesamt sind die Aminosäuren im Mittel zu 37 % konserviert in den insgesamt 42 Baueinheiten des GA-Moduls.

Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurden Bindungsversuche mit rekombinanten Proteinen der minimalen Baueinheiten an Oberflächen-immobilisiertes Fibronektin durchgeführt. Sowohl rEmbp125, wie auch rEmbp170 zeigten eine Dosis-abhängige Bindung an humanes Plasmafibronektin im ELISA. Für rEmbp125 konnte mithilfe der Surface Plasmon Resonanz die Bindungsaktivität bestätigt werden.

Die Bedeutung von Komponenten der Extrazellulärmatrix für die Adhärenz von Staphylokokken, explizit die Bedeutung von Fibronektin, konnte bereits Ende der 1980er Jahre postuliert werden [32]. Auf die Beteiligung der C-terminalen Fn Typ III Domäne bei der Interaktion von *S. epidermidis* und Fibronektin konnte bereits vor einigen Jahren geschlossen werden [95]. Allerdings war der

Bindungspartner auf Seiten von *S. epidermidis* damals noch unbekannt. Mit der Beschreibung von Embp als Fibronectin-bindendes Protein [41] und der weiteren Charakterisierung dieser Interaktion [43] konnte ein deutlicher Wissenszuwachs erreicht werden, der hier als Ausgangspunkt für die weitere Charakterisierung benannt wurde. So war aus Voruntersuchungen bekannt, dass die Embp-Fibronectin-Interaktion wahrscheinlich im Bereich der Typ III Domäne des Fibronectinmoleküls am C-Terminus lokalisiert ist. Mithilfe eines Far Western Blots, bei dem das rekombinant exprimierte rEmbp2588 gegen verschiedene rekombinant erzeugte Typ III Subdomänen sowie das N-terminale 70kDa Fragment getestet wurde, konnten Reaktivitäten bei drei Fragmenten (rFN10-12, rFN12-14 und rFN13-15) nachgewiesen werden [43]. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Hypothese generiert, dass möglicherweise die C-terminale Heparinbindungsstelle an dieser Interaktion beteiligt sein könnte. Diese wurde zuerst in den Typ III Subdomänen 13 und 14 lokalisiert [84], später im Wesentlichen in der Subdomäne 13 mit lediglich geringer Beteiligung der Subdomäne 14 beschrieben [97]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden zwei bakterielle Oberflächenproteine beschrieben, die im Bereich der C-terminalen Heparinbindungsstelle ihre Zielsequenz haben. Zum einen ShdA, ein Auto-Transporter in der äußeren Membran von *Salmonella* Typhimurium, welches durch Mimikry eines Heparin-ähnlichen Motivs mit der positiv geladenen Heparinbindungsstelle interagiert [85]. Zum anderen wurde das Protein Pap31 von *Bartonella henselae* als Fibronectin-bindendes Protein dieser Spezies beschrieben. Auch hier konnte die Bindungsstelle in der Typ III Subdomäne 13 des Fibronectins identifiziert werden [98]. Bei Inhibitionsstudien mit *S. epidermidis* 1585v unter Verwendung von Heparin konnte die Reduktion der Bindung an Oberflächen-immobilisiertes Fibronectin dargestellt werden. Ebenso ließ sich die Bindung von *S. carnosus* TM300, der Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ *in trans* exprimierte, in Anwesenheit von Heparin modulieren. Zur Kontrolle wurde dieses Experiment mit *S. carnosus* TM300xpFNBA4 durchgeführt. Auch hier zeigte sich eine Inhibition der Bindung an Fibronectin. Aufgrund dieser Beobachtung entstandene Zweifel an der Spezifität der Inhibition der Embp-vermittelten Fibronectinbindung in Anwesenheit von Heparin, wurde ein weiteres Kontrollexperiment durchgeführt. Dabei wurde mithilfe eines monoklonalen Antikörpers (α -FNH3-8) die C-terminale Heparinbindungsstelle

blockiert. Diese spezifische Blockade hatte keinen Effekt auf die Embp-Fibronectin-Interaktion. Somit kann zwar weiterhin auf eine Beteiligung der C-terminalen Fn Typ III Domäne, nicht jedoch auf die Beteiligung der Heparinbindungsstelle geschlossen werden.

Mithilfe rekombinant exprimierter Fibronectin Typ III Subdomänen konnte mittels ELISA-Bindungsstudien bakterielle Adhärenz, sowohl von TM300xpHB2_C-FIVAR wie auch pHB2_C-GAFIV, an die Subdomäne rFN12-14, nicht jedoch an das Kontrollfragment rFN4-7, nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das 1 MDa Extracellular Matrix Binding Protein Embp als ein Fibronectin-bindendes Oberflächenprotein von *S. epidermidis* bezeichnet werden kann. Insbesondere konnten Voruntersuchungen von Christner et al. dahingehend erweitert werden, dass durch die strukturelle Charakterisierung der minimalen Baueinheiten der FIVAR-Region und des GA-Moduls, deren Kapazität zur Fibronectinbindung molekular dargestellt werden konnte. Neben dieser Interaktion auf molekularer Ebene konnte hier erstmals gezeigt werden, dass molekular unterschiedliche Regionen (FIVAR-Region und GA-Modul) in der Lage sind, bakterielle Adhärenz an Oberflächen-immobilisiertes Fibronectin zu vermitteln. Es konnte dargestellt werden, dass die Embp-Fibronectin-Interaktion im C-terminalen Bereich der Typ III Subdomäne FN12-14 des Fibronectins lokalisiert ist. Die dort ebenfalls vorhandene Heparinbindungsstelle konnte als Epitop ausgeschlossen werden.

5. Zusammenfassung

Staphylococcus epidermidis ist einer der bedeutendsten Erreger nosokomialer Fremdmaterial-assoziiierter Infektionen. Das pathogene Potential von *S. epidermidis* beruht im Wesentlichen auf der Fähigkeit dieses Erregers Biofilme zu etablieren. Diese schützen die Bakterien einerseits vor dem Zugriff des Immunsystems zum anderen sind die Bakterien in Biofilmen durch eine Toleranz gegenüber antibakteriellen Wirkstoffen gekennzeichnet. Therapeutische Konsequenz dieser Charakteristika ist häufig die Notwendigkeit der Entfernung des infizierten Materials. Dieser Umstand verdeutlicht, dass nicht nur hohe Kosten entstehen, sondern auch erhebliche gesundheitliche Risiken für Patienten resultieren. Somit stellt die Aufklärung der Pathogenese dieser Infektionen eine alternativlose Notwendigkeit dar. Aus den so gewonnenen Erkenntnissen können geeignete Strategien zur Prävention und/oder neue therapeutische Konzepte entwickelt werden. Einen wichtigen Ansatzpunkt stellt insbesondere die Interaktion zwischen Bakterium und extrazellulärer Matrix dar. Die bakterielle Adhärenz ist eine wesentliche Voraussetzung für die Kolonisation von medizinischen Implantaten und die anschließende Ausbildung einer Fremdmaterial-assoziierten Infektion. Fibronectin (Fn) als ubiquitär vorhandene Komponente der extrazellulären Matrix nimmt hier eine besondere Stellung ein. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion des *S. epidermidis* Extracellular matrix binding protein (Embp) bei der Adhärenz an immobilisiertes Fn zu charakterisieren und die molekularen Determinanten dieser Interaktion zu beschreiben. So kann gezeigt werden, dass die Interaktion von Embp mit Fn bakterielle Adhärenz an Fn-beschichtete Oberflächen vermittelt. Im Gegensatz zum Fibronectin binding protein A (FnBPA), einem Fibronectin-bindenden Protein von *Staphylococcus aureus*, interagiert Embp nur mit Oberflächen-gebundenem Fn und ist nicht in der Lage gelöstes Fn auf die Bakterienoberfläche zu rekrutieren. Des Weiteren kann gezeigt werden, dass die Bindung des Embp an Fn über ein Epitop innerhalb der Fn Typ III Domäne, genauer FN12, erfolgt. Dieses Epitop befindet sich außerhalb der dort ebenfalls lokalisierten C-terminalen Heparinbindungsstelle (Hep-II).

Zusammengefasst können hier erste Erkenntnisse eines bisher für Staphylokokken nicht beschriebenen Mechanismus der Interaktion mit Fibronektin beschrieben werden.

Summary

Staphylococcus epidermidis is a leading causative agent in hospital-acquired, foreign material-associated infections. The great success of this pathogen is at least in part attributable to the species' biofilm forming capability. Biofilm formation occurs in separate phases, being initiated during primary attachment of bacterial cells to artificial or native surfaces. Adherence allows for the subsequent bacterial proliferation and organization of a multi-layered biofilm architecture at the site of infection. In the present work the interaction of giant 1 MDa extracellular matrix binding protein (Embp) of *Staphylococcus epidermidis* and fibronectin (Fn) and its contribution in primary attachment was further elucidated.

The experiments primarily focused on defined Embp sections (i.e. FIVAR region and GA module) and their individual contribution to bacterial interactions with surface organized Fn. *S. carnosus* TM300 was used as a surrogate host to express defined truncated Embp isoforms. These isoforms comprised parts of the FIVAR region (Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉) or the GA module (Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉) in conjunction with an N-terminal export signal and a C-terminal, anticipated cell wall binding region. By this genetic approach, functional evidence was obtained showing that Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ and Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ are likewise sufficient for bacterial adherence to Fn. Using the Embp-FIVAR₇₉₀₃₋₁₁₀₇₉ and Embp-GAFIV₁₃₅₁₆₋₁₇₀₇₉ *in trans* expressing *S. carnosus* strains in adherence assays, the crucial importance of Fn type III repeats 12-14 for the interaction was demonstrated. A functional contribution of an internal heparin binding site located with FN12-14 was ruled out.

In addition, another aim of this work was to dissect the interaction of Embp and Fn on a biochemical level. Relying on structural analysis, a 170 amino acid repeat was found to be core structural element within the FIVAR region, while within the GA module a 125 amino acid repeat was identified as the apparent minimal structural unit. Recombinant rEmbp170 and rEmbp125 were used in ELISA- and surface plasmon resonance- (SPR-) assays to demonstrate that both structural unit possess fibronectin binding capacity. Both proteins showed specific binding to FN12-14.

Taken together Embp is sufficient for Fn binding *S. epidermidis*. The FIVAR region as well as the GA module both contribute to bacterial adherence. The involvement of the Fn type III repeat 12 has so far never been described in staphylococci. Especially the exclusion of the C-terminal heparin binding site which has been shown to be important for *Salmonella enterica* protein ShdA-mediated Fn binding supports the idea that Embp uses a so far undescribed mechanism for interactions with Fn.

6. Abkürzungen

A

| | |
|------------|------------------------|
| α - | Antikörper (gegen-) |
| Abb. | Abbildung |
| AP | Alkalische Phosphatase |

B

| | |
|-----|----------------------|
| BHI | Brain Heart Infusion |
|-----|----------------------|

C

D

| | |
|-----|----------------------------|
| DB | Dot Blot |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DUF | Domain of Unknown Function |

E

| | |
|-------|--------------------------------------|
| eDNA | extrazelluläre DNA |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| EmbP | Extracellular matrix binding protein |

F

| | |
|-------|--------------------------------|
| FIVAR | Found in various Architectures |
| FnBPA | Fibronectin binding protein A |
| FNX-X | Fibronectin Typ III Subdomäne |

G

| | |
|----|-----------------------------------|
| GA | G-related albumine-binding domain |
|----|-----------------------------------|

H

I

| | |
|------|--|
| IFT | Immunfluoreszenztest |
| ini. | (Aqua ad ini.) Wasser zu Injektionszwecken |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |

J

K

| | |
|-----|-----------------------------------|
| KNS | Koagulase-negative Staphylokokken |
|-----|-----------------------------------|

L

| | |
|-----------|---------------------|
| λ | Wellenlänge (in nm) |
| LB | Luria Bertani |

M

| | |
|---------|--|
| min | Minute |
| MSCRAMM | Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule |

N

| | |
|-------|--|
| NiNTA | Nickel ²⁺ -Nitrilotriessigsäure |
| nt | nucleotide |

O

P

| | |
|-------|---------------------------|
| PBE | Plaque-bildende Einheiten |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PBS/T | PBS mit 0,005 % Tween-20 |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |

Q

R

| | |
|-----|--------------------------|
| RE | Restriktionsendonuklease |
| rpm | rounds per minute |

S

| | |
|----------|---|
| S. | Staphylococcus |
| sek | Sekunde |
| SAP | Shrimp Alkaline Phosphatase |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| SPR | Surface Plasmon Resonance |
| St. | Streptococcus |
| STA | Staphylococcal Typing Agar |

T

| | |
|------|----------------------|
| TA | Teichonsäuren |
| Tab. | Tabelle |
| TM | Transmembranregion |
| TSB | Trypticase Soy Broth |

U

| | |
|----|--------------|
| UV | Ultraviolett |
|----|--------------|

V

| | |
|---|------|
| V | Volt |
|---|------|

W

| | |
|-----|---------------|
| w/v | weight/volume |
|-----|---------------|

X

Y

Z

| | |
|-----|-------------------------|
| ZVK | Zentralvenöser Katheter |
|-----|-------------------------|

7. Literaturverzeichnis

1. Joachim Hassenpflug; Malzahn, J., *Qualitätskontrolle fürs Kunstgelenk*. Gesundheit und Gesellschaft, 2011. **14**(4).
2. Mutschler, W.F., L.; Anagnostakos, K.; Trampuz, A.; Fink, B.; Perka, C., *AE-Bulletin 2010*. 2010, Arbeitskreis Endoprothetik.
3. Spanu, T., et al., *Use of the VITEK 2 System for Rapid Identification of Clinical Isolates of Staphylococci from Bloodstream Infections*. Journal of Clinical Microbiology, 2003. **41**(9): p. 4259-4263.
4. Darouiche, R.O., *Treatment of Infections Associated with Surgical Implants*. New England Journal of Medicine, 2004. **350**(14): p. 1422-1429.
5. Kloos, W.E. and M.S. Musselwhite, *Distribution and Persistence of Staphylococcus and Micrococcus Species and Other Aerobic Bacteria on Human Skin*. Applied Microbiology, 1975. **30**(3): p. 381-395.
6. Otto, M., *Molecular basis of Staphylococcus epidermidis infections*. Seminars in Immunopathology, 2012. **34**(2): p. 201-214.
7. System, A.r.f.t.N., *National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004*. American Journal of Infection Control, 2004. **32**(8): p. 470-485.
8. Otto, M., *Staphylococcus epidermidis [mdash] the 'accidental' pathogen*. Nat Rev Micro, 2009. **7**(8): p. 555-567.
9. *Modul ITS-KISS Referenzdaten*. 2014, Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen.
10. Peters, G., C. von Eiff, and M. Herrmann, *The changing pattern of coagulase-negative staphylococci as infectious pathogens*. Current Opinion in Infectious Diseases, 1995. **8**: p. S12-S19.
11. Raimundo, O.H., H.; Bruhn, J. B.; Suntrarachun, S.; Kellyz, N.; Deighton, M.A.; Garlandz, S.M., *Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit*. Journal of Hospital Infection, 2002. **51**: p. 33-42.
12. Cheung, G.Y.C. and M. Otto, *Understanding the significance of Staphylococcus epidermidis bacteremia in babies and children*. Current opinion in infectious diseases, 2010. **23**(3): p. 208-216.
13. Hidron, A.I., et al., *Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007*. Infection Control & Hospital Epidemiology, 2008. **29**(11): p. 996-1011.
14. Souvenir, D., et al., *Blood Cultures Positive for Coagulase-Negative Staphylococci: Antisepsis, Pseudobacteremia, and Therapy of Patients*. Journal of Clinical Microbiology, 1998. **36**(7): p. 1923-1926.
15. Parvizi, J., O.F. Erkocak, and C.J. Della Valle, *Culture-Negative Periprosthetic Joint Infection*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 2014. **96**(5): p. 430-436.

16. Lyytikäinen, O., et al., *Increased resistance among Staphylococcus epidermidis isolates in a large teaching hospital over a 12-year period*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **15**(2): p. 133-138.
17. Kresken, M. and D. Hafner, *Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in central Europe during 1975–1995*. Infection. **27**(2): p. S2-S8.
18. Andrews, J., et al., *A comparison of antimicrobial resistance rates in Gram-positive pathogens isolated in the UK from October 1996 to January 1997 and October 1997 to January 1998*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000. **45**(3): p. 285-293.
19. Schommer, N.N., et al., *Staphylococcus epidermidis Uses Distinct Mechanisms of Biofilm Formation To Interfere with Phagocytosis and Activation of Mouse Macrophage-Like Cells 774A.1*. Infection and Immunity, 2011. **79**(6): p. 2267-2276.
20. O'Toole, G., H.B. Kaplan, and R. Kolter, *BIOFILM FORMATION AS MICROBIAL DEVELOPMENT*. Annual Review of Microbiology, 2000. **54**(1): p. 49-79.
21. Rello, J., et al., *Evaluation of Outcome of Intravenous Catheter-related Infections in Critically Ill Patients*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2000. **162**(3): p. 1027-1030.
22. Dimick, J.B., et al., *INcreased resource use associated with catheter-related bloodstream infection in the surgical intensive care unit*. Archives of Surgery, 2001. **136**(2): p. 229-234.
23. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-1322.
24. Davies, D.G., A.M. Chakrabarty, and G.G. Geesey, *Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology, 1993. **59**(4): p. 1181-1186.
25. Knobloch, J.M., et al., *Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative Staphylococcus epidermidis*. Medical Microbiology and Immunology, 2002. **191**(2): p. 107-114.
26. Lewis, K., *Persister cells, dormancy and infectious disease*. Nat Rev Micro, 2007. **5**(1): p. 48-56.
27. Vacheethasane, K., et al., *Bacterial surface properties of clinically isolated Staphylococcus epidermidis strains determine adhesion on polyethylene*. Journal of Biomedical Materials Research, 1998. **42**(3): p. 425-432.
28. Heilmann, C., et al., *Evidence for autolysin-mediated primary attachment of Staphylococcus epidermidis to a polystyrene surface*. Molecular Microbiology, 1997. **24**(5): p. 1013-1024.
29. Gross, M., et al., *Key Role of Teichoic Acid Net Charge in Staphylococcus aureus Colonization of Artificial Surfaces*. Infection and Immunity, 2001. **69**(5): p. 3423-3426.

30. Arrecubieta, C., et al., *The Role of Staphylococcus aureus Adhesins in the Pathogenesis of Ventricular Assist Device–Related Infections*. Journal of Infectious Diseases, 2006. **193**(8): p. 1109-1119.
31. Menconi, M.J., et al., *Properties of blood-contacting surfaces of clinically implanted cardiac assist devices: Gene expression, matrix composition, and ultrastructural characterization of cellular linings*. Journal of Cellular Biochemistry, 1995. **57**(3): p. 557-573.
32. Vaudaux, P., et al., *Host Factors Selectively Increase Staphylococcal Adherence on Inserted Catheters: A Role for Fibronectin and Fibrinogen or Fibrin*. Journal of Infectious Diseases, 1989. **160**(5): p. 865-875.
33. Prabhakaran, S., et al., *A Novel Fibronectin Binding Motif in MSCRAMMs Targets F3 Modules*. PLoS ONE, 2009. **4**(4): p. e5412.
34. Hynes, R.O., *Fibronectins*. Springer Series in Molecular Biology. 1990: Springer.
35. Pankov, R. and K.M. Yamada, *Fibronectin at a glance*. Journal of Cell Science, 2002. **115**(20): p. 3861-3863.
36. Johnson, K.J., et al., *The Compact Conformation of Fibronectin Is Determined by Intramolecular Ionic Interactions*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(22): p. 15473-15479.
37. Leahy, D.J., I. Aukhil, and H.P. Erickson, *2.0 Å Crystal Structure of a Four-Domain Segment of Human Fibronectin Encompassing the RGD Loop and Synergy Region*. Cell, 1996. **84**(1): p. 155-164.
38. Carsons, S.E., *Fibronectin in Health and Disease*. 1989: CRC Press.
39. Hartford, O., et al., *The Fbe (SdrG) protein of Staphylococcus epidermidis HB promotes bacterial adherence to fibrinogen*. Microbiology, 2001. **147**(9): p. 2545-2552.
40. Heilmann, C., et al., *Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from Staphylococcus epidermidis*. Microbiology, 2003. **149**(10): p. 2769-2778.
41. Williams, R.J., et al., *Identification of a Fibronectin-Binding Protein from Staphylococcus epidermidis*. Infection and Immunity, 2002. **70**(12): p. 6805-6810.
42. Clarke, S.R., et al., *Analysis of Ebh, a 1.1-Megadalton Cell Wall-Associated Fibronectin-Binding Protein of Staphylococcus aureus*. Infection and Immunity, 2002. **70**(12): p. 6680-6687.
43. Christner, M., et al., *The giant extracellular matrix-binding protein of Staphylococcus epidermidis mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin*. Molecular Microbiology, 2010. **75**(1): p. 187-207.
44. Kuroda, M., et al., *Staphylococcus aureus giant protein Ebh is involved in tolerance to transient hyperosmotic pressure*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **374**(2): p. 237-241.
45. Tanaka, Y., et al., *A Helical String of Alternately Connected Three-Helix Bundles for the Cell Wall-Associated Adhesion Protein Ebh from Staphylococcus aureus*. Structure, 2008. **16**(3): p. 488-496.

46. Sakamoto, S., et al., *Electron microscopy and computational studies of Ehb, a giant cell-wall-associated protein from Staphylococcus aureus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **376**(2): p. 261-266.
47. Linke, C., et al., *The Extracellular Protein Factor Epf from Streptococcus pyogenes Is a Cell Surface Adhesin That Binds to Cells through an N-terminal Domain Containing a Carbohydrate-binding Module*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(45): p. 38178-38189.
48. Rohde, H., et al., *Induction of Staphylococcus epidermidis biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases*. Molecular Microbiology, 2005. **55**(6): p. 1883-1895.
49. Rohde, H., et al., *Detection of Virulence-Associated Genes Not Useful for Discriminating between Invasive and Commensal Staphylococcus epidermidis Strains from a Bone Marrow Transplant Unit*. Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**(12): p. 5614-5619.
50. Lam, H., et al., *Antibodies to PhnD Inhibit Staphylococcal Biofilms*. Infection and Immunity, 2014. **82**(9): p. 3764-3774.
51. Götz, F., *Staphylococci in colonization and disease: prospective targets for drugs and vaccines*. Current Opinion in Microbiology, 2004. **7**(5): p. 477-487.
52. Christner, M., et al., *Rapid Identification of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Fingerprinting*. Journal of Clinical Microbiology, 2010. **48**(5): p. 1584-1591.
53. Joh, D., et al., *Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells*. Matrix Biology, 1999. **18**(3): p. 211-223.
54. Meenan, N.A.G., et al., *The Tandem β -Zipper Model Defines High Affinity Fibronectin-binding Repeats within Staphylococcus aureus FnBPA*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(35): p. 25893-25902.
55. Bingham, R.J., et al., *Crystal structures of fibronectin-binding sites from Staphylococcus aureus FnBPA in complex with fibronectin domains*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(34): p. 12254-12258.
56. Bustanji, Y., et al., *Dynamics of the interaction between a fibronectin molecule and a living bacterium under mechanical force*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(23): p. 13292-13297.
57. Kaplan, J.B., et al., *Genes Involved in the Synthesis and Degradation of Matrix Polysaccharide in Actinobacillus actinomycetemcomitans and Actinobacillus pleuropneumoniae Biofilms*. Journal of Bacteriology, 2004. **186**(24): p. 8213-8220.
58. Vuong, C., et al., *A Crucial Role for Exopolysaccharide Modification in Bacterial Biofilm Formation, Immune Evasion, and Virulence*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(52): p. 54881-54886.
59. Rohde, H., et al., *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. **28**(9): p. 1711-1720.

60. Schaeffer, C.R., et al., *Accumulation-Associated Protein Enhances Staphylococcus epidermidis Biofilm Formation under Dynamic Conditions and Is Required for Infection in a Rat Catheter Model*. Infection and Immunity, 2015. **83**(1): p. 214-226.
61. Conlon, B.P., et al., *Role for the A Domain of Unprocessed Accumulation-Associated Protein (Aap) in the Attachment Phase of the Staphylococcus epidermidis Biofilm Phenotype*. Journal of Bacteriology, 2014. **196**(24): p. 4268-4275.
62. Bateman, A., M.T.G. Holden, and C. Yeats, *The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation*. Bioinformatics, 2005. **21**(8): p. 1301-1303.
63. Izano, E.A., et al., *Differential Roles of Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis Biofilms*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**(2): p. 470-476.
64. Becker, K., C. Heilmann, and G. Peters, *Coagulase-Negative Staphylococci*. Clinical Microbiology Reviews, 2014. **27**(4): p. 870-926.
65. Boles, B.R. and A.R. Horswill, *agr-Mediated Dispersal of Staphylococcus aureus Biofilms*. PLoS Pathogens, 2008. **4**(4): p. e1000052.
66. Iwase, T., et al., *Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization*. Nature, 2010. **465**(7296): p. 346-349.
67. Cheung, G.Y.C., et al., *Staphylococcus epidermidis Strategies to Avoid Killing by Human Neutrophils*. PLoS Pathog, 2010. **6**(10): p. e1001133.
68. Vuong, C., et al., *Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in Staphylococcus epidermidis*. Journal of Infectious Diseases, 2003. **188**(5): p. 706-718.
69. Wang, R., et al., *Staphylococcus epidermidis surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice*. The Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(1): p. 238-248.
70. Schenk, S. and R.A. Laddaga, *Improved method for electroporation of Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters, 1992. **94**(1-2): p. 133-138.
71. Mack, D., et al., *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*. Infection and Immunity, 1994. **62**(8): p. 3244-3253.
72. Kayser, F.H., J. Wüst, and P. Corrodi, *Transduction and Elimination of Resistance Determinants in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1972. **2**(3): p. 217-223.
73. Mack, D., N. Siemssen, and R. Laufs, *Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent Staphylococcus epidermidis: evidence for functional relation to intercellular adhesion*. Infection and Immunity, 1992. **60**(5): p. 2048-2057.

74. Kreiswirth, B.N., et al., *The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage*. *Nature*, 1983. **305**(5936): p. 709-712.
75. Charpentier, E., et al., *Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004. **70**(10): p. 6076-6085.
76. Knobloch, J.K.-M., et al., *RsbU-Dependent Regulation of Staphylococcus epidermidis Biofilm Formation Is Mediated via the Alternative Sigma Factor σ_B by Repression of the Negative Regulator Gene icaR*. *Infection and Immunity*, 2004. **72**(7): p. 3838-3848.
77. SCHLEIFER, K.H. and U. FISCHER, *Description of a New Species of the Genus Staphylococcus: Staphylococcus carnosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1982. **32**(2): p. 153-156.
78. Sinha, B., et al., *Heterologously Expressed Staphylococcus aureus Fibronectin-Binding Proteins Are Sufficient for Invasion of Host Cells*. *Infection and Immunity*, 2000. **68**(12): p. 6871-6878.
79. Bateman, B.T., et al., *Evaluation of a Tetracycline-Inducible Promoter in Staphylococcus aureus In Vitro and In Vivo and Its Application in Demonstrating the Role of sigB in Microcolony Formation*. *Infection and Immunity*, 2001. **69**(12): p. 7851-7857.
80. Mack, D., et al., [20] *Genetic and biochemical analysis of Staphylococcus epidermidis biofilm accumulation*, in *Methods in Enzymology*, J.D. Ron, Editor. 2001, Academic Press. p. 215-239.
81. Ohashi, T. and H.P. Erickson, *Domain Unfolding Plays a Role in Superfibronectin Formation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(47): p. 39143-39151.
82. Decker, R., et al., *An 18 kDa Scaffold Protein Is Critical for Staphylococcus epidermidis Biofilm Formation*. *PLoS Pathogens*, 2015. **11**(3): p. e1004735.
83. Löfblom, J., et al., *Optimization of electroporation-mediated transformation: Staphylococcus carnosus as model organism*. *Journal of Applied Microbiology*, 2007. **102**(3): p. 736-747.
84. Sharma, A., et al., *Crystal structure of a heparin - and integrin - binding segment of human fibronectin*. Vol. 18. 1999. 1468-1479.
85. Kingsley, R.A., et al., *The ShdA adhesin binds to the cationic cradle of the fibronectin 13FnIII repeat module: evidence for molecular mimicry of heparin binding*. *Molecular Microbiology*, 2004. **52**(2): p. 345-355.
86. Murdoch, D.R., et al., *Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: The international collaboration on endocarditis-prospective cohort study*. *Archives of Internal Medicine*, 2009. **169**(5): p. 463-473.
87. Schwarz-Linek, U., M. Höök, and J.R. Potts, *Fibronectin-binding proteins of Gram-positive cocci*. *Microbes and Infection*, 2006. **8**(8): p. 2291-2298.
88. Talay, S.R., et al., *Fibronectin-binding protein of Streptococcus pyogenes: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells*. *Infection and Immunity*, 1992. **60**(9): p. 3837-3844.

89. Lindgren, P.-E., et al., *Two different genes coding for fibronectin-binding proteins from Streptococcus dysgalactiae*.
90. Probert, W.S. and B.J.B. Johnson, *Identification of a 47 kDa fibronectin-binding protein expressed by Borrelia burgdorferi isolate B31*.
91. Signäs, C., et al., *Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from Staphylococcus aureus: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989. **86**(2): p. 699-703.
92. Fröman, G., et al., *Isolation and characterization of a fibronectin receptor from Staphylococcus aureus*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(14): p. 6564-6571.
93. Schwarz-Linek, U., et al., *Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem [beta]-zipper*. Nature, 2003. **423**(6936): p. 177-181.
94. Holmes, S.D., et al., *Studies on the interaction of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis with fibronectin using surface plasmon resonance (BIAcore)*. Journal of Microbiological Methods, 1997. **28**(1): p. 77-84.
95. Arciola, C.R., et al., *Staphylococcus epidermidis–fibronectin binding and its inhibition by heparin*. Biomaterials, 2003. **24**(18): p. 3013-3019.
96. Gravekamp, C., et al., *Immunogenicity and protective efficacy of the alpha C protein of group B streptococci are inversely related to the number of repeats*. Infection and Immunity, 1997. **65**(12): p. 5216-5221.
97. Sachchidanand, et al., *Mapping the Heparin-binding Site on the 13–14F3 Fragment of Fibronectin*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(52): p. 50629-50635.
98. Dabo, S.M., et al., *Bartonella henselae Pap31, an Extracellular Matrix Adhesin, Binds the Fibronectin Repeat III13 Module*. Infection and Immunity, 2006. **74**(5): p. 2513-2521.

8. Danksagung

Nach vielen Jahren intensiver, zeitaufwendiger Forschung bin ich zum Ende meiner Promotionsarbeit gekommen. Auf meinem Weg sind mir viele Menschen zur Hilfe gekommen, denen ich an dieser Stelle noch einmal ausdrücklich meinen Dank aussprechen möchte.

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

Exzellente technische Betreuung während meiner Zeit im Labor war vor allem der Verdienst von Gesche Kroll, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich durch ihre jahrelange Erfahrung in der Staphylokokkenforschung hervorragend in die benötigten Techniken eingearbeitet hat.

Im Labor habe ich weitere Doktoranden –Naturwissenschaftler wie Mediziner - meines Doktorvaters kennenlernen dürfen. Mit ihnen erlebte ich intensive Diskussionen – nicht nur zu dem uns verbindenden Thema, sondern auch unterhaltsame Abende in unserem Arbeitsgruppenstammlokal „Jimmy Elsaß“. Ganz besonders in Erinnerung ist mir Rahel Decker geblieben, die mit ihrer quirlig-freundlichen Art jeden gemeinsamen Arbeitstag bereichert hat.

Ein großer Dank gilt der Werner-Otto-Stiftung, die meine Forschungsarbeit durch ein zweijähriges Stipendium gefördert hat. Ohne diese finanzielle Unterstützung wäre eine so aufwendige Arbeit sicher nicht möglich gewesen.

Außerdem gibt es einen Menschen, der stets mit Rat und Tat bereit stand. An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Holger Rohde für seine herausragende Motivation und großartige Betreuung danken. Neben den praktischen Aspekten der Laborarbeit hat mein Doktorvater auch einen großen Beitrag zur Entwicklung meiner theoretischen Kompetenzen beigesteuert. Insgesamt kann ich mich nur für die tolle Betreuung in den letzten Jahren bedanken.

Zusätzlich zum täglichen Geschäft hat Professor Rohde mir ermöglicht, meine Zwischenergebnisse in Form von Vorträgen mehrfach einem wissen-

schaftlichen Fachpublikum im Rahmen der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie zu präsentieren. Auch auf internationalen Kongressen, wie der Gordon Research Conference - Staphylococcal Diseases oder dem International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, konnte ich Posterpräsentationen mit meinen Zwischenergebnissen vorstellen. Insgesamt haben diese Kongresserfahrungen mein Interesse an der Wissenschaft weiter gefestigt und mir einen guten Zugang zu national wie auch international anerkannten Staphylokokkenforschern ermöglicht. Die Teilnahme an den oben erwähnten hochkarätigen Kongressen ist sicher nicht als selbstverständlich anzunehmen, insofern hierfür nochmal meinen besonderen Dank.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie für die uneingeschränkte Unterstützung danken. In den letzten Jahren mussten aufgrund der zeitintensiven Forschung Einschnitte im Familienleben verkraftet werden. Forschung liegt mir sehr am Herzen und dafür haben meine Ehefrau Alexandra und meine Tochter Laura mir viel Zeit und Freiraum gelassen. Während des Studiums meiner Frau und mir haben meine Eltern Sigrid und Hans-Uwe Büttner uns den Rücken freigehalten. Sie haben sich wirklich großartig um ihre Enkeltochter gekümmert. Vielen Dank!

9. Lebenslauf

10. Eidesstattliche Erklärung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Henning Büttner