

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene  
Zentrum für Diagnostische Medizin, Leitung Prof. Dr. M. Aepfelbacher

**Untersuchung struktureller Determinanten  
der Bindung des *Extracellular matrix binding protein* (Embp)  
von *Staphylococcus epidermidis* an die bakterielle  
Zelloberfläche**

**Dissertation**

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

vorgelegt von:  
Jérôme Pascal Wilde  
aus Hamburg

Hamburg 2016

Die vorliegenden Experimente wurden von August 2011 bis Mai 2013 unter Anleitung von Prof. Dr. H. Rohde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.10.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. H. Rohde**

**Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: PD Dr. H. Lotter**

## Inhalt

1. Einleitung.....	5
1.1. Nosokomiale Infektionen .....	5
1.2. Staphylokokken .....	6
1.2.1. Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) .....	7
1.2.2. Koagulase-negative Staphylokokken als Verursacher nosokomialer Infektionen....	7
1.2.3. Pathogenese von Implantat-assoziierten <i>S. epidermidis</i> Infektionen .....	8
1.3. Bakterielle Biofilmbildung .....	9
1.3.1. Stadien der bakteriellen Biofilmbildung .....	10
1.4. Das <i>Extracellular matrix binding protein</i> (Embp) .....	14
1.4.1. Struktureller Aufbau und Sub-Domänen von Embp .....	16
2. Zielsetzung dieser Arbeit .....	17
3. Material und Methoden .....	18
3.1. Material .....	18
3.1.1. Geräte .....	18
3.1.2. Chemikalien.....	19
3.1.3. Antikörper .....	19
3.1.4. Lösungen und Puffer .....	19
3.1.5. Antibiotika.....	21
3.1.6. Enzyme .....	21
3.1.7. Molekularbiologische Kits .....	21
3.1.8. Medien .....	22
3.1.9. Primer.....	23
3.1.10. Bakterienstämme.....	23
3.1.11. Plasmide .....	24
3.1.12. Datenbanken und Programme .....	24

3.1.13. Molekulargewichtstandards .....	25
3.2. Methoden .....	26
3.2.1. Allgemeine mikrobiologische Methoden.....	26
3.2.2. Molekularbiologische Methoden.....	26
3.3.3. Protein-biochemische Methoden .....	37
4. Ergebnisse.....	43
4.1. Erzeugung von Plasmid-Konstrukten zur Analyse von Determinanten der Embp – Zelloberflächeninteraktion .....	43
4.2. <i>In trans</i> Expression von Embp <sub>FIVAR</sub> <sup>-</sup> und Embp <sub>GA-FIV</sub> <sup>-</sup> -Fusionsproteinen in <i>S. carnosus</i> TM300.....	44
4.2.1. Identifikation und Charakterisierung der putativen Embp-Fusionsproteine mittels ESI-Massenspektrometrie .....	44
4.2.2. Präparation der Proteine des Kulturüberstandes.....	46
4.3. Optimierung der Detektion von Embp-Fusionsproteinen im Immunoblot.....	47
4.4. Analyse der Rekrutierung unterschiedlicher Embp-Fusionsproteine an die <i>S. carnosus</i> Zelloberfläche .....	50
4.4.1. Präparation der Oberflächenproteine durch chaotroper Detergenzien .....	50
4.4.2. Präparation der Oberflächenproteine durch Ultraschallbehandlung .....	52
4.4.3. Untersuchung einer möglichen Membranverankerung von Embp <sub>GA-FIV</sub> .....	53
4.5. Herstellung von systematisch verkürzten Varianten der rekombinanten Fusionsproteine Embp <sub>FIVAR</sub> und <sub>GA-FIV</sub> .....	55
4.5.1. Expression der verkürzten Varianten von pGA-FIV:: <i>myc</i> in <i>S. carnosus</i> TM300 ...	56
5. Diskussion .....	58
5.1. Expression von rekombinanten Embp-Fusionsproteinen .....	59
5.2. Beobachtete Prozessierung der Oberflächen-rekrutierten Embp-Fusionsproteine .....	60
5.3. Einfluss der einzelnen Embp-Domänen auf Oberflächenaffinität.....	64
5.4. Arten der Oberflächenbindung von Proteinen.....	66

5.5. Einbettung von Embp beziehungsweise Embp <sub>GA-FIV</sub> in die Zelloberfläche .....	69
Die bakterielle Zellwand präsentiert sich nach .....	70
5.6. Weitere Arbeiten und Limitationen dieser Dissertation .....	73
6. Zusammenfassung.....	75
7. Summary.....	76
8. Quellenangaben .....	77
9. Danksagung .....	88
10. Eidesstattliche Erklärung.....	89

## 1. Einleitung

### 1.1. Nosokomiale Infektionen

Unter einer nosokomialen Infektion wird die klinische Manifestation einer neu erworbenen Infektion verstanden, welche in direktem Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt steht [1]. Nosokomiale Infektionen sind eine der größten Herausforderungen für das moderne Gesundheitssystem. Durch sie werden Morbidität und Mortalität betroffener Patienten deutlich erhöht [2] und erhebliche Zusatzkosten für das Gesundheitssystem verursacht [3]. Das Sterbe-Risiko eines chirurgischen Patienten etwa, verdoppelt sich beim Vorliegen einer nosokomialen Infektion [4]. Eine Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren begünstigt die Entstehung von nosokomialen Infektionen. Neben kaum beeinflussbaren endogenen Risikofaktoren wie dem Alter des Patienten, der Schwere seiner Grunderkrankung oder genetischen Faktoren, sind äußere Faktoren wie lokale Antibiotikaresistenzen oder invasive Maßnahmen im Rahmen von Diagnostik und Therapie die wichtigsten Gründe für diese Form der Behandlungs-Komplikationen [4, 5]. Erste repräsentative Zahlen für Deutschland (NIDEP-1-Studie, 1994) zeigten eine Prävalenz nosokomialer Infektionen zwischen 3,6 % (Gesamtprävalenz) und 15,3 % (Patienten auf einer Intensivstation). Eine 2010 durchgeführte Punkt-Prävalenz-Studie des *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) erbrachte bei knapp 20.000 ausgewerteten Patienten aus 66 Krankenhäusern in 23 verschiedenen Ländern eine Rate an 7,1 % nosokomialen Infektionen (**Tabelle 1**). In der beobachteten Gruppe intensivpflichtiger Patienten fand sich sogar vier Mal häufiger eine nosokomiale Infektion [6].

**Tabelle 1:** Prävalenz nosokomialer Infektionen in Europa, adaptiert nach [6].

Abteilung	Untersuchte Patienten [n]	Rate an nosokomialen Infektionen [%]
Chirurgisch	6 653	7,8
Internistisch	7 833	6,4
Pädiatrie	1 024	3,7
Intensiv-Station	915	28,1
Gesamt	19 888	7,1

Derzeit sammeln in Deutschland etwa 800 Krankenhäuser mit circa 590 Intensivstationen ihre Daten zu nosokomialen Infektionen in einem zentralen Register, dem Krankenhaus

Infektions Surveillance System (KISS). Hierdurch werden seit 1997 die nationalen Infektionsdaten auf freiwilliger Basis kontinuierlich erfasst [7]. In einem ausgewerteten Zeitraum von Januar 2008 bis Dezember 2012 wurde die Anwendungsrate verschiedener invasiver Maßnahmen an insgesamt 2,2 Millionen Patienten auf Intensivstationen untersucht. Gefunden wurden hierbei unter anderen etwa 18.000 beatmungs-assoziierte Atemwegsinfektionen, circa 6.700 Katheter-assoziierte Harnwegsinfekte aber auch etwa 6.500 ZVK-(Zentral venöser Katheter)-assoziierte Sepsisepisoden (**Tabelle 2**). Bei diesen Infektionen werden am häufigsten *Staphylococcus spp.* (51 %) nachgewiesen, gefolgt von *Enterococcus spp.* (20 %) [8]. Dies weist darauf hin, dass insbesondere Staphylokokken ein großes Potential haben, nach invasiven Prozeduren Infektionen hervorzurufen.

**Tabelle 2:** ZVK-assoziierte Sepsisraten nach Art der Intensivstation (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen 2011 [8]).

Intensivstationstyp	ZVK-Anwendungsrate	ZVK-assoziierte Sepsisrate
	[%]	[%]
interdisziplinär	73	1,7
internistisch	51	1,9
chirurgisch	82,6	1,8

## 1.2. Staphylokokken

Staphylokokken werden zwei Gruppen zugeordnet, wobei die Einteilung entsprechend dem Vorhandensein einer Prothrombin-aktivierenden Plasmakoagulase in Koagulase-positive oder Koagulase-negative Staphylokokken erfolgt [9]. Der einzige klinisch relevante Vertreter der Gruppe koagulase-positiver Staphylokokken ist *Staphylococcus aureus*, der sich bei 20-40 % der Bevölkerung aus der nasalen Besiedlungsflora isolieren lässt [10]. Auch auf Grund eines umfassenden Spektrums an Virulenz-Faktoren ist diese Spezies Ursache einer großen Vielzahl unterschiedlichster Krankheitsbilder: von eher milde verlaufenden Lokalinfektionen der Haut wie Furunkeln über Arthritiden bis zur Osteomyelitis. Aber sie ist auch Auslöser schwerwiegender und potentiell lebensbedrohlicher Infektionen wie der Nativklappenendokarditis, von Meningitiden oder Pneumonien. Zudem haben zahlreiche *S. aureus*-Stämme die Möglichkeit zur Toxin-Produktion, welche zu Lebensmittelintoxikationen oder sogar zum Toxic-Schock-Syndrom (TSS) führen können [11].

### **1.2.1. Koagulase-negative Staphylokokken (KNS)**

Die Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) umfasst über 30 verschiedene Spezies, die Teil der menschlichen Haut- und Schleimhautflora sind [10, 12]. Am häufigsten erfolgt der Nachweis von *Staphylococcus epidermidis* [12], welcher ubiquitär auf der epidermalen und teilweise auch mukösen Körperoberfläche vorkommt [5]. Daher zählt *S. epidermidis* insgesamt zu den am häufigsten isolierten Staphylokokken-Spezies [12].

KNS besitzen kein mit *S. aureus* vergleichbares Repertoire an Pathogenitätsfaktoren [3], weshalb sie lange Zeit als apathogen eingestuft und ihr Nachweis in klinischen Isolaten als Kontamination bewertet wurde [13]. In den letzten drei Jahrzehnten musste die Bewertung der Pathogenität von KNS jedoch grundlegend revidiert werden: Epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass KNS und insbesondere *S. epidermidis* zu den wichtigsten Verursachern nosokomialer Infektionen zählen [14-17].

Koagulase-negative Staphylokokken bilden keine Toxine oder gewebeschädigenden Exoenzyme, daher bewirken sie im Gegensatz zu *S. aureus* meist keine hoch-febrilen Infektionen, sondern eher sub-akut bis chronisch verlaufende Krankheitsbilder [18, 19]. Die in ihrem Genom kodierten Faktoren sind eher dafür geeignet, eine dauerhaft persistierende Infektion zu ermöglichen, statt dem betroffenen Organismus aggressiv zu schaden [3]. Auf Grund dieses begrenzten Virulenzpotentials verursacht *S. epidermidis* in der Regel nur Infektionen bei Vorliegen einer bestimmten Prädisposition des Wirts. Somit kann *S. epidermidis* als klassischer opportunistischer Erreger bezeichnet werden [3, 20].

### **1.2.2. Koagulase-negative Staphylokokken als Verursacher nosokomialer Infektionen**

Verschiedene Bedingungen erhöhen für den Patienten das Risiko, eine Infektion mit KNS zu entwickeln. Hierzu zählen generelle funktionelle Einschränkungen des Immunsystems, etwa im Zusammenhang mit einer malignen Grunderkrankung, Chemotherapie oder Knochenmarkstransplantation, einer HIV-Infektion oder Frühgeburtlichkeit [21, 22].

Der bedeutendste unabhängige Risikofaktor für die Entstehung einer Infektion mit Koagulase-negativen Staphylokokken ist jedoch die Implantation von medizinischem Fremdmaterial [6, 23-25]. Die Implantation unterschiedlichster Fremdkörpern ist in der modernen Medizin ein generelles therapeutisches Prinzip. So werden beispielsweise allein in Deutschland jährlich etwa 2,5 Millionen Fremdkörper implantiert. Hieraus folgt, dass selbst bei niedrigen Infektionsraten, allein auf Grund der zunehmenden Verbreitung, diese

Infektionen an Bedeutung weiter zunehmen werden. So können in Deutschland etwa 100.000 Fremdkörper-assoziierte Infektionen pro Jahr erwartet werden (**Tabelle 3**) [26].

**Tabelle 3:** Anwendungen, Infektionsraten und beteiligte Krankheitserreger von implantierten, medizinischen Fremdkörpern (adaptiert nach [25, 26].

<b>Implantiertes Fremdmaterial</b>	<b>Anwendungen pro Jahr</b>	<b>Infektionen pro Jahr</b>	<b>Infektionsrate [%]</b>	<b>Anteil KNS bedingter Infektionen [%]</b>
Zentralvenöse Katheter	1 750 000	17 500 – 87 000	0,5-5	30-40
Gelenkprothesen	<b>D:</b> 300 000 <b>USA:</b> 600 000	<b>D:</b> 4 600-7 600 <b>USA:</b> 12 000	<b>D:</b> 1-5 <b>USA:</b> 2	20-40
Herzschrittmacher	<b>D:</b> 70 000 <b>USA:</b> 300 000	<b>D:</b> 700 – 2 100 <b>USA:</b> 12 000	<b>D:</b> 1-3 <b>USA:</b> 4	45-60

D: Deutschland; USA: Vereinigte Staaten von Amerika

Beispiele medizinischer Fremdkörper, die häufig eine Staphylokokken-verursachte Infektion bedingen, reichen von peripher oder zentral gelegenen, intra-vaskulär-eingebrachten Zugängen oder subkutan eingebrachten Portsystemen, Herzschrittmachern oder künstlichen Herzklappen, über Gelenk-Endoprothesen bis hin zu Liquor-ableitenden Drainagen [10, 13, 27, 28]. In den USA entsteht die Hälfte aller nosokomialen Infektionen auf dem Boden eines implantierten medizinischen Fremdkörpers. Zwei Drittel dieser Infektionen werden hierbei durch Staphylokokken verursacht [25]. In der SCOPE-Studie (*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*) mit knapp 25.000 ausgewerteten Sepsis-Fällen fanden sich am häufigsten (31 % der Fälle) KNS als verantwortliche Erreger. Auffällig war, dass die Hälfte dieser Fälle auf Intensiv-Stationen registriert wurde. Dies liegt unter anderem daran, dass bei über 70 % dieser Patienten ein ZVK eingebracht wurde [16]. Diese Zahlen sind nahezu deckungsgleich mit denen aus Deutschland, wo bei 1,6 Millionen beobachteten Patienten in 32% aller Sepsis-Diagnosen KNS als Erreger nachgewiesen wurden [7].

### **1.2.3. Pathogenese von Implantat-assoziierten *S. epidermidis* Infektionen**

Es stellt sich daher die Frage, welche Umstände es einem für lange Zeit als apathogen eingestuften Organismus erlauben, mittlerweile am häufigsten klinisch relevante Infektionen im Zusammenhang mit implantierten Fremdkörpern auszulösen [29]. Das ubiquitäre Vorkommen von *S. epidermidis* könnte eine häufige Kontamination des Fremdkörpers während der eigentlichen Implantation erklären. Jedoch scheint es wahrscheinlicher, dass

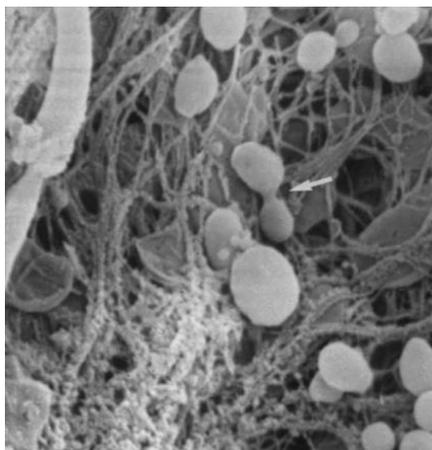
*S. epidermidis* über zusätzliche Mechanismen verfügt, welche ein Wachstum auf der Polymeroberfläche von Fremdkörpern über die Maße anderer Bakterien hinaus begünstigt. Tatsächlich findet sich in den kulturell nachgewiesenen *S. epidermidis*-Stämmen regelhaft die Fähigkeit zur Bildung eines mehrschichtigen, organisierten Zellverbandes, eines sogenannten Biofilms [30, 31]. Die Möglichkeit zur Bildung eines solchen Zellverbandes scheint der entscheidende Faktor zu sein, welcher die Assoziation von *S. epidermidis* zu Fremdkörperinfektionen erklärt [32-34].

Die Bildung dieses Biofilms hat unmittelbare klinische Relevanz, da die Biofilmbildung direkt für eine Unempfindlichkeit des Erregers gegenüber der wirtseigenen Immunabwehr, aber auch gegenüber konventionellen Antibiotika verantwortlich ist. Dies sogar auch dann, wenn eine grundsätzliche Empfindlichkeit des verursachenden Bakterien-Stammes nachgewiesen werden konnte [25, 35, 36]. In letzter Konsequenz kommt es häufig zu einer Chronifizierung der Infektion, bei der als letzte therapeutische Möglichkeit einzig die Entfernung des zuvor eingebrachten Materials bleibt [25, 36].

### **1.3. Bakterielle Biofilmbildung**

Erste Beobachtungen dieser Art machten Durack und Beeson bereits 1972. Es fiel auf, dass es trotz mikrobiologischen Nachweises einer Empfindlichkeit wiederholt einer mehrwöchigen Therapie mit Penicillin bedurfte, um eine bakterielle Endokarditis zu eradizieren [37]. Schnell fanden sich erste Ansätze einer möglichen Erklärung: Ein auf Grund einer Infektion explantiertes Spitz-Holter-Liquor-Ventil zeigte sich im Rahmen elektronenmikroskopischer Analysen von einer dichten, mehrlagigen Ansammlung von Bakterien überzogen [38]. Dieses Phänomen wurde zunächst als Schleimbildung bezeichnet, heute ist jedoch Begriff der bakteriellen Biofilmbildung gängig.

Nach heutigem Stand des Wissens entspricht ein Biofilm einer komplexen mikrobiologischen Gemeinschaft von Zellen (**Abbildung 1**). Diese ist in einer protektiven Matrix multidimensional strukturiert [39]. Große Teile dieser als Extrazelluläre-Matrix (EZM) bezeichneten anorganischen Masse werden in Form verschiedener Biopolymere durch die Bakterien selbst synthetisiert und vermitteln sowohl Zell-zu-Zell als auch Zell-zu-Oberflächen-Bindungen. Der chemische Charakter dieser Polymere hängt sowohl vom genetischen Hintergrund der verursachenden Spezies, des jeweiligen Stammes, als auch von vorherrschenden Umweltbedingungen ab. Sie umfassen sowohl Polysaccharide, Proteine als auch Nukleinsäuren [40].



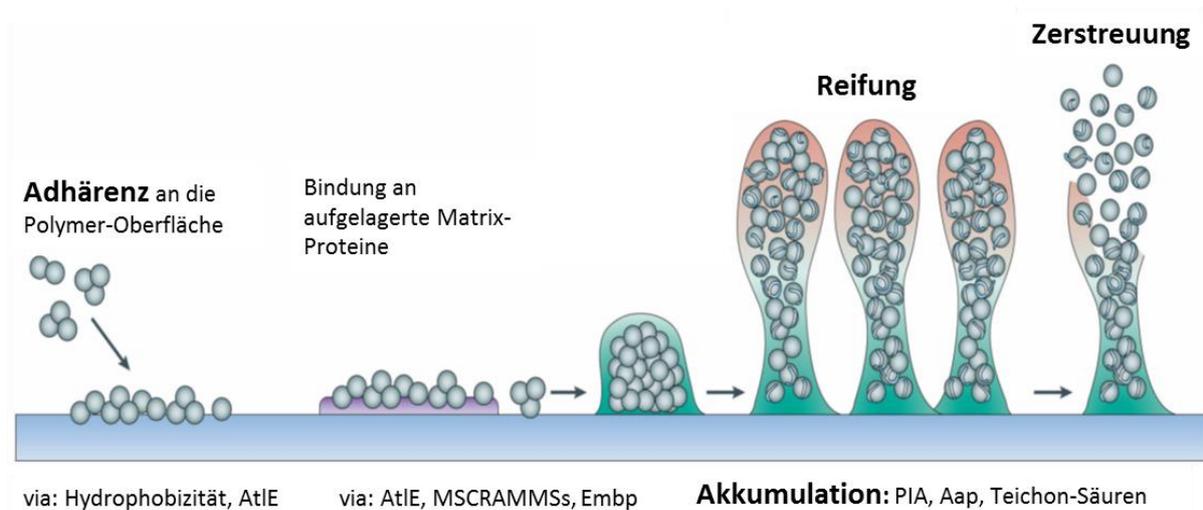
**Abbildung 1: Biofilm** Auf der Oberfläche eines Katheters finden sich zahlreiche, in der Biofilm-Matrix eingebettete *Staphylococcus epidermidis*-Zellen. Der Pfeil markiert ein Bakterium während der Zellteilung [29].

In dieser komplexen Struktur aus Zellen und EZM sind die Bakterien vor schädlichen äußeren Einflüssen geschützt [41]. Zum einen besteht der Schutz vor der angeborenen Immunreaktion des Wirtes [42-44] als auch vor der humoralen Immunreaktion des erworbenen Immunsystems [45-47]. Zum anderen schützt die Ausbildung eines Biofilms Bakterien zusätzlich vor der Wirkung antibiotischer Substanzen [48-51]. Die klinische Bedeutung einer Biofilm-assoziierten Fremdkörperinfektion soll anhand einer Total-Endo-Prothese (TEP) verdeutlicht werden: Bei einer solchen Infektion werden antimikrobiell wirkende, neutrophile Granulozyten zwar aktiviert, können aber die sich im Biofilm befindlichen Bakterien nicht eliminieren. Das ungehindert entstehende pro-inflammatorische Mikro-Milieu schädigt jedoch das umgebende Gewebe, und die hierdurch provozierte Knochenzerstörung bewirkt letztendlich eine relevante Implantat-Lockerung mit allen daraus folgenden Komplikationen und Konsequenzen [52-54]. Auf Grund der hier skizzierten klinischen Relevanz kann die Fähigkeit zur Biofilmbildung als bedeutendster Pathogenitätsmechanismus von *S. epidermidis* aufgefasst werden [32, 55]. Um die Auswirkungen der Biofilm-Bildung im Rahmen einer Infektion zu verstehen, benötigt es detaillierter Informationen zu dessen Entstehung und Entwicklung sowie zu den diversen hierin involvierten Faktoren.

### **1.3.1. Stadien der bakteriellen Biofilmbildung**

Die Biofilmbildung verläuft typischerweise in mindestens drei Schritten, wobei diese, einander folgend, fließend ineinander übergehen. Der initialen Bindung an die artifizielle Oberfläche folgt die Zell-Proliferation und hierdurch die Bildung der charakteristischen

Biofilmstruktur. Dieser zweite Schritt wird unter dem Begriff der Akkumulation zusammengefasst und dient der Reifung des Biofilms. Aus diesem reifen Biofilm lösen sich im letzten Schritt Bakterien heraus, wodurch es zur Verbreitung der zunächst lokalen Infektion im Organismus kommen kann. Dieser Abschnitt der Biofilmbildung wird daher als Zerstreuung bezeichnet [3, 56]. Eine schematische Darstellung der Biofilmbildung ist in **Abbildung 2** zu sehen.



**Abbildung 2: Die Biofilmbildung verläuft in einander folgenden Schritten.** In der ersten „Adhärenz-Phase“ binden die Bakterien an die artifizielle Oberfläche. Dies geschieht entweder an die unveränderte native Oberfläche, oder aber an darauf abgelagerte Serumproteine, die sogenannte konditionierte Oberfläche. In der „Akkumulations-Phase“ kommt es zur Zell-Proliferation. Hier entsteht die charakteristische Biofilmstruktur. Aus diesem nun „reifen“ Biofilm lösen sich in der „Zerstreuungs-Phase“ einzelne Bakterien aus dem Biofilm heraus. Adaptiert nach [3]

### Primäre Bindungsphase: Initialer Kontakt von Bakterium und Implantat

In der schnell verlaufenden primären Bindungsphase kommt es zur Adhäsion der Bakterien an die Polymeroberfläche von implantierten Fremdmaterialien. Hierbei werden zwei distinkte Formen der initialen Bindung, welche von unabhängigen Mechanismen getragen werden, unterschieden (Otto, 2009).

Zum einen binden die Bakterien direkt an die Oberfläche des frisch implantierten Fremdkörpers. Diese Form der primären Adhäsion ist hierbei als physiko-chemischer Vorgang [57, 58] zu sehen, der vor allem von der generellen Beschaffenheit der bakteriellen Zelle und somit unspezifischen Faktoren abhängig ist [26]. Insbesondere das Ausmaß der Hydrophobizität der bakteriellen Zelle bestimmt die Intensität des Attachements an eine native künstliche Oberfläche [57, 59]. Dieses Ausmaß wird neben der Expression von

Lipoteichonsäuren, zu großen Teilen sekundär durch die Expression des 148 kDa großen Autolysin AtlE bestimmt [3, 60].

Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Bindung an eine native, vollkommen abiotische Oberfläche nicht den tatsächlichen Bedingungen der Biofilmbildung im Setting einer klinischen Infektion entspricht (Clarke, 2006). Grund hierfür ist, dass der eingebrachte Fremdkörper bereits kurze Zeit nach der Implantation von einer Vielzahl körpereigener Bestandteile, der extrazellulären Matrix (EZM) überzogen wird [61].

Daher vermitteln bei der zweiten Form der primären Bindung Plasmaproteine wie Albumin, Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen und Vitronectin [62, 63] durch eine Oberflächenmodifikation, die als Konditionierung bezeichnet wird, den Kontakt zur bakteriellen Zelle. Die so abgelagerten Moleküle fungieren im Rahmen der bakteriellen Biofilmbildung als Liganden für eine Reihe bakterieller Oberflächenproteine. Diese werden als *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs) bezeichnet [64-66].

#### **Akkumulations-Phase: Ausbildung einer dreidimensionalen Bakterienzellarchitektur**

Auf die initiale Bindung folgt die komplexere und insgesamt länger dauernde Phase der Akkumulation. Hierbei organisieren sich die Zellen zu der mehrschichtigen Struktur des endgültigen Biofilms, wodurch der Großteil der Zellen den direkten Kontakt zum besiedelten Fremdkörper verliert [18, 67]. Zentrale Bedeutung im Rahmen der Akkumulation kommt daher der Ausbildung interzellulär adhäsiver Mechanismen zu, die letztlich zu einer Aggregation der Bakterien führen. Diese interzelluläre Aggregation erfolgt durch die bakterien-eigene Synthese verschiedener Makro-Moleküle: Proteine, Polysaccharide, Lipide aber auch Nucleinsäuren in Form von sogenannter extrazellulärer DNA (eDNA). Die Summe dieser Bio-Polymere ergibt die Extrazelluläre Matrix (EZM). Die Kombination aus Zellproliferation und Produktion der EZM bedingt durch Ausbildung eines vielschichtigen und dreidimensional geordneten Biofilms dessen Wachstum [26].

Zahlreiche Studien zeigten, dass einzelne Pathogenitätsfaktoren signifikant häufiger bei *S. epidermidis*-Stämmen nachgewiesen werden konnten, die klinisch manifeste Infektionen auslösen, als bei Kommensalen und somit apathogenen Stämmen der gleichen Spezies [68-70].

Besondere Bedeutung wurde hierbei dem  $\beta$ -1,6-glykosidisch verknüpften Poly-N-Acetylglukosamin *Polysaccharide intercellular adhesin* (PIA) beziehungsweise dem kodierenden *icaADBC*-Gen zugeschrieben [71, 72]. In Tiermodellen konnte der *in vivo* Nachweis für die Bedeutung von PIA für eine Infektionssituation erbracht werden: Zum einen ein Maus-Infektions-Modell, bei dem PIA-positive Stämme signifikant häufiger zu Abszessen führten [73]; zum anderen ein Ratten-Modell, bei dem PIA-positive *S. epidermidis*-Stämme wesentlich häufiger eine ZVK-assoziierten Infektion hervorriefen [74] als die jeweiligen isogenen *ica*-Mutanten. Auf Grund der hohen Prävalenz *icaADBC*-positiver klinisch relevanter *S. epidermidis*-Stämme wurde davon ausgegangen, dass PIA zwingenderweise nötig ist, um eine Biofilm-assoziierte Infektion zu ermöglichen. Da *S. epidermidis* ohne die Möglichkeit der Biofilm-Produktion große Teile seines pathogen Potentials verliert, wurde gefolgert, dass PIA-negative-Stämme als apathogen zu betrachten sind [75, 76]. Des Weiteren sollte das für die PIA-Synthese benötigte *icaADBC*-Operon als Marker verwendet werden, um *S. epidermidis* Hautisolate von invasiven Isolaten zu unterscheiden [69, 70].

In der Folge zeigten jedoch epidemiologische Untersuchungen, dass auch bei invasiven *S. epidermidis* Isolaten eine signifikante Anzahl *icaADBC*-negativ ist [77, 78]. *icaADBC*-negative *S. epidermidis* Stämme konnten klinisch im Kontext von ZVK-, Liquor-Shunt-, Herzschrittmacher- oder Gelenkprothesen-assoziierten Infektionen isoliert werden [79-83]. In einer viel beachteten Kollektion von 52 *S. epidermidis*-Stämmen, isoliert aus infizierten Knie- oder Hüft-Endo-Prothesen, konnte nur bei 62% der Biofilm-positiven Stämme das *icaADBC*-Gen nachgewiesen werden. Zeitgleich konnte gezeigt werden, dass in diesen Stämmen Proteinfaktoren das Polysaccharid PIA funktionell ersetzen konnten [83].

Als funktioneller Träger einer *ica*-unabhängige Biofilmbildung wurde zum einen das 220 kDa große *accumulation associated protein* (Aap) identifiziert. Es war zuvor vermutet worden, dass Aap insbesondere als bakterieller Zelloberflächenrezeptor von PIA fungiert, also Bestandteil der PIA-abhängigen Biofilmbildung ist [84]. In nachfolgenden Arbeiten zeigte sich jedoch, dass Aap ein eigenständiges, PIA-unabhängiges interzelluläres Adhäsins darstellt [15, 85]. Aap ist ein im Wesentlichen aus zwei Domänen (A und B) aufgebautes Protein. Hierbei ist die interzellulär-adhäsive Funktion abhängig von einer proteolytischen Prozessierung, in deren Verlauf die Domäne A abgespalten wird, während die etwa 140 kDa große Domäne B auf der bakteriellen Zelloberfläche verbleibt. Diese proteolytische Prozessierung wird durch *S. epidermidis* eigene Proteasen vermittelt. Jedoch können auch Wirts-eigenen Proteasen die

Prozessierung vermitteln und hierdurch *S. epidermidis* Biofilmbildung induzieren. Dies bedeutet für die *in vivo* Situation, dass Teile der angeborenen körpereigenen Immunabwehr direkt die Entstehung eines bakteriellen Phänotyp unterstützen, der mit einer erhöhten Immunresistenz assoziiert ist [15]. Aap-abhängige Biofilme erscheinen mikroskopisch betrachtet flach und unstrukturiert, vermitteln jedoch einen mit PIA gleichwertigen Schutz vor Phagozytose und bewirken eine vergleichbare Reduktion an freigesetzten Entzündungsmediatoren [44]. Aap liegt hierbei als fibrilläre Struktur auf der bakteriellen Zelloberfläche [86].

Neben der Expression von Aap besitzt *S. epidermidis* weitere Mechanismen einer PIA-unabhängigen Biofilmbildung. Tatsächlich ist die *S. epidermidis* Biofilmbildung ein stark redundant organisierter Vorgang, erkennbar daran, dass klinisch relevante *S. epidermidis*-Stämme gleichzeitig für eine Vielzahl interzellulärer Adhäsine kodieren [69, 82, 87]. Diese Faktoren können in unterschiedlichen klinischen Situationen [83], zu unterschiedlichen Zeitpunkten der gleichen Infektion [88] oder sogar parallel zur gegenseitigen Verstärkung [89] synthetisiert werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch als Reaktion auf sich verändernde Umweltbedingungen die Synthese der Faktoren adaptiert wird [90]. Solch ein spontaner Wechsel konnte für *S. epidermidis* von einer PIA- auf eine Protein-basierte Biofilm-Form nachgewiesen werden [91].

Ein weiterer Aap-unabhängiger Faktor, der als interzelluläres Adhäsin wirksam wird und eine PIA-unabhängige Biofilmbildung vermittelt, ist das *Extracellular matrix binding protein* (Embp). In einer Sammlung klinischer *S. epidermidis*-Isolate konnte nur bei knapp der Hälfte der *icaADBC*-negativen, aber Biofilm-positiven Stämme das *aap*-Gen nachgewiesen werden. Das spricht dafür, dass PIA noch durch mindestens einen weiteren Faktor ersetzt werden kann. Über 90% der isolierten *S. epidermidis*-Stämmen kodierten in dieser Studie für Embp [83].

#### **1.4. Das *Extracellular matrix binding protein* (Embp)**

Williams et al. publizierten als erste ein zuvor nicht beschriebenes Protein mit Fibronectin-(Fn) bindenden Eigenschaften. Da neben der Bindung an Fibronectin zusätzlich eine Heparin-, Hyaluronat- und Plasminogen-bindende Aktivität nachgewiesen werden konnte, bezeichneten die Autoren das unbekannte Protein als *Extracellular matrix binding*

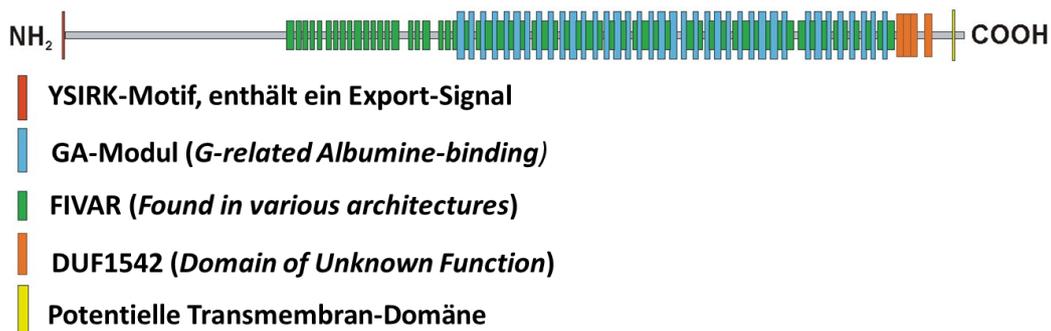
*protein* (Embp) [92]. Parallel zur Entdeckung fand sich in *S. aureus* das zu Embp homologes Protein Ebh [93].

Hinsichtlich seiner klinischen Bedeutung konnte gezeigt werden, dass Embp in einem *icaADBC*- und *aap*-negativem genetischen Hintergrund ausreichend für die Etablierung eines Biofilms ist [94]. Die Expression von Embp führt hierbei zur Ausprägung eines Biofilms, der sich sowohl mikro- als auch makroskopisch von PIA- oder Aap-vermittelten Biofilmen unterscheidet [44]. Der Embp-abhängige Biofilm erscheint eher flach, ebenmäßig und glatt. Embp weist eine enge Zelloberflächenassoziation auf, dennoch findet sich auch eine Akkumulation von Embp im extrazellulären Raum und in der Matrix. Trotz dieser Unterschiede zu Aap- und PIA-vermittelten Biofilmen schützt ein Embp-assoziiertes Biofilm *S. epidermidis* gleichwertig vor der Phagozytose durch Makrophagen [44].

Interessanterweise wird Embp unter Standardwachstumsbedingungen im Labor nicht oder nur in sehr geringen Mengen produziert [94]. Die Entdeckung der Biofilm-unterstützenden Eigenschaften gelang initial ausschließlich aufgrund der Tatsache, dass ein *S. epidermidis* Stamm gefunden wurde, bei welchem es durch eine chromosomale Umlagerung zur Überexpression von Embp auch in künstlichen Nährmedien gekommen war. Die genaue Regulation der Embp-Synthese ist zurzeit nur unvollständig verstanden. Es konnte jedoch bereits nachgewiesen werden, dass mindestens der Regulator *sarA* eine kritische Rolle hierbei spielt [95]: Kommt es zu einer Inaktivierung von *sarA*, wird Embp bis zu 16-fach stärker exprimiert, wodurch *sarA*-negative Mutanten einen Embp-abhängigen Biofilm bilden. *SarA* hat unabhängig von der Beeinflussung der Embp-Produktion weiteren Einfluss auf die *S. epidermidis* Biofilmbildung: Die Inaktivierung dieses Regulationssystems führt zu einer verstärkten Produktion der Metalloprotease SepA. Hierdurch kommt es zu einer deutlichen Zunahme der proteolytischen Aktivierung des auf der Zelloberfläche präsentierten Autolysins AtlE [95]. Durch die konsekutive Verstärkung des autolytischen Verhaltens kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von eDNA und in der Folge wird ein biofilmpositiver Phänotyp weiter verstärkt [96]. Aber auch vor einem *icaADBC*-positiven genetischen Hintergrund hat *sarA* einen Einfluss auf die Biofilmbildung, denn die Aktivierung von *sarA* bewirkt einen Wechsel von einem Embp-/eDNA- hin zu einem PIA-abhängigen Typ der Biofilmbildung [95, 97, 98].

### 1.4.1. Struktureller Aufbau und Sub-Domänen von Embp

Das Gen *embp* kodiert ein etwa 1 MDa großes Riesenprotein. Die 10204 Aminosäuren verteilen sich auf eine Vielzahl von Repeats, wodurch das Protein einen stark modularen Aufbau erhält: Am N-terminalen Ende findet sich ein Export-Signal mit YSIRK-Motiv, welchem sich eine große, ungeordnete Region von etwa 2500 Aminosäuren anschließt. Die folgenden hinteren drei Viertel der Primärstruktur bestehen nahezu ausschließlich aus repetitiven Motiven: zunächst 21 *Found In Various Architectures* (FIVAR) Motiven, gefolgt von 38 *G-related Albumine-binding* (GA)-Elementen mit jeweils alternierenden FIVAR-Motiven. Das C-terminale Ende setzt sich aus vier *Domains of unknown function* (DUF1542) sowie einer putativen Trans-Membran (Tm-) Domäne zusammen [94] (**Abbildung 3**). Funktionell konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Fibronectin (Fn)-bindenden Eigenschaften von Embp relevant für die Adhärenz von *S. epidermidis* an Fn-beschichtete Oberflächen ist [92]. Zusätzlich spielt Embp aufgrund seiner interzellulär-adhäsiven Eigenschaften eine funktionelle Rolle in der akkumulativen Phase der *S. epidermidis* Biofilmbildung [94]. Somit ist Embp ein multifunktionales *S. epidermidis* Oberflächenprotein.



**Abbildung 3:** Das *embp*-Gen kodiert für ein etwa 1 MDa großes Riesenprotein. N-terminal findet sich ein Export-Signal mit YSIRK-Motiv, gefolgt von zahlreichen repetitiven Motiven: 21 *Found In Various Architectures* (FIVAR) Motive, gefolgt von 38 *G-related Albumine-binding* (GA)-Elemente mit jeweils alternierenden FIVAR-Motiven. C-terminal wird das Protein durch vier „*Domains of unknown function*“, sogenannte DUF1542-Motive sowie einer putativen Trans-Membran Domäne abgeschlossen [94].

## 2. Zielsetzung dieser Arbeit

Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) und insbesondere *S. epidermidis* gehören zu den bedeutendsten Erregern nosokomialer Fremdmaterial-Infektionen. Die Fähigkeit von *S. epidermidis*, auf artifiziellen Oberflächen einen Biofilm auszubilden, ist von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese der Infektion. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass das *Extracellular matrix binding protein* (Embp), welches in klinischen *S. epidermidis* Isolaten weit verbreitet ist, von funktionaler Bedeutung für die Entstehung eines Biofilms ist.

Um funktionell aktiv zu werden, muss Embp nicht nur exprimiert, sondern nach dem Export aus der Bakterienzelle wieder an die Oberfläche rekrutiert werden. Die funktionell für die Zelloberflächenbindung von Embp notwendigen Determinanten sind bislang unklar. Eine bioinformatische Analyse der strukturellen Domänen von Embp erlaubt die Hypothese, dass hierfür die FIVAR oder aber FIVAR-GA Regionen verantwortlich sein könnten. Für diese wird N-Acetylglucosamin-bindende Aktivität angenommen, so dass eine Bindung an Glykostrukturen der bakteriellen Zellwand möglich wäre. Daneben ist eine Verankerung des Proteins an der Zellwand oder der Zellmembran über C-terminal gelegene Regionen (DUF1542 und TM-Domänen) möglich.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Hypothesen durch genetische und proteinchemische Analysemethoden zu überprüfen. Hierzu sollten Vektoren kloniert werden, mit welchen die *in trans* Expression von Embp-Fusionsproteinen möglich sein sollte. In diesen Vektoren wurden FIVAR oder FIVAR-GA-kodierende Sequenzen am 5' Ende mit dem natürlichen Embp-Export Signal sowie 3' mit den DUF1542- und TM-kodierenden Sequenzen unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promoters fusioniert. Diese Vektoren, in welche zur verbesserten Detektion der exprimierten Proteine Myc-Tags eingebracht wurden, sollten in dem Surrogatwirt *Staphylococcus carnosus* exprimiert und die Lokalisation der Proteine in unterschiedlichen Kompartimenten geprüft werden. Zusätzlich sollten Konstrukte erzeugt werden, in welchen die TM-Domäne oder aber TM-Domäne und DUF1542 Regionen eliminiert wurden. Durch *in trans* Expression in *S. carnosus* konnte hierdurch geklärt werden, inwiefern diese Bereiche von Embp relevant für dessen Oberflächenrekrutierung sind.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Geräte

**Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Name (Hersteller)</b>
Blot-Kammer	XCell SureLock Electrophoresis Cell (Invitrogen, Karlsruhe)
Brutschrank	Brutschrank 5050E (Heraeus-Christ, Osterode)
Elektrophorese-Kammer	- Elektrophoresekammer für Agarosegele (MWG-Biotech, Ebersberg) - Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad, München)
Elektroporator	GenePulser II (BioRad, München)
Elektroporationsküvetten	1 mm Elektroden-Abstand (Peqlab, Erlangen)
Entwicklergerät	Curix 60 (AGFA, Morsel)
Entwicklerkassette	X-Ray Cassette 13x18 (Fuji Film, Düsseldorf)
Gefrierschrank	-80 °C Kryotek (Hamburg) -20 °C Liebherr (Biberach a.d. Riss)
Geldokumentation	ChemiDoc XRS (BioRad, München)
Geltrockner	Gel Dryer 543 (BioRad, München)
Glasplatten	SpacerPlates und ShortPlates (BioRad, München)
Kippschüttler	Typ 3015 8 (GFL, Burgwedel)
Netzgerät	Electrophoresis Power Supply PS3002 (Invitrogen, Darmstadt) PowerPac 3000 Power Supply (BioRad, Hercules, USA) PowerEase 500 Power Supply (Invitrogen, Darmstadt)
pH-Meter	Mettler-Toledo (Seven easy, Giessen)
Photometer	SmartSpec 3000 (BioRad, München) Nano Drop ND-1000 (Peqlab, Erlangen)
Pipettierhilfe	Accu-Jet Pro Brand (Wertheim)
Schüttelinkubator	Certomat BS-1 ( Sartorius, Göttingen)
Ultraschallgerät	Digital Sonifier 250-D (Branson, Danbury, USA)
Steril-Werkbank	Thermo Scientific
Thermocycler	peqSTAR 96X Universal (Peqlab, Erlangen)
Thermomixer	Typ 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Transfermembran	Transfer Membranes Immobilon-P
Vortexer	Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich)
Waage	Kern 572 (Kern & Sohn GmbH, Balingen) Feinwaage Kern ALS 120-4 (Kern & Sohn GmbH, Balingen)
Wasserbad	GFL Typ 1013 (Burgwedel)
Zentrifuge	Multifuge 1 S-R (Heraeus, Osterode) Centrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg) Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) SpeedVAC SC110 (Savant, Dreieich)

### 3.1.2. Chemikalien

Die für die Versuche dieser Dissertation verwendeten Chemikalien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Applied Biosystems (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim).

### 3.1.3. Antikörper

**Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Antikörper**

Antikörper	Spezies	Referenz/ Hersteller
Anti-rEmbp2588	Kaninchen	[94]
Anti-rEmbp6599	Kaninchen	[94]
Anti-rabbit-IgG, Alkaline Phosphatase antibody	Ziege	Sigma-Aldrich, München
Anti-Myc	Maus	Cell Signaling Technology
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	Ziege	Dianova
Anti-rabbit-IgG-Peroxidase Konjugat	Maus	Jackson ImmunoResearch
ECL Anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase antibody	Schaf	GE Healthcare

### 3.1.4. Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden, sofern nicht anders angegeben, in vollentionisiertem (VE) Wasser angesetzt und wenn erforderlich in einem Dampfautoklaven sterilisiert.

**Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Lösungen und Puffer**

Lösung	Zusammensetzung oder Hersteller
APS	Ammoniumperoxodisulfat (Roth, Karlsruhe)
Blot-Puffer	50 ml Methanol 25 ml Transferpuffer, 20x 425 ml ddH <sub>2</sub> O
DNA-Ladepuffer	50 ml Glycerin 250 mg Bromphenolblau 2 ml EDTA 0,5 M 100 ml ddH <sub>2</sub> O
DNA-Nachweis	RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)
Coomassie-Entfärbung	400 ml Methanol 100 ml Essigsäure 500 ml ddH <sub>2</sub> O
Coomassie-Färbung	400 ml Methanol 100 ml Essigsäure 0,25 g Coomassie Blue 500 ml ddH <sub>2</sub> O

LDS-Puffer	NuPAGE LDS Sample Puffer, 4x (Invitrogen, Karlsruhe)
MES SDS-Puffer	NuPAGE MES SDS-Puffer, 20x (Invitrogen, Karlsruhe)
PBS, 20x	2,73 M NaCl 53 mM KCl 166 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 53 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
PBS-T	1 l PBS 0,5 ml Tween-20
Protein-Elektrophorese-Puffer, 10x	288 g Glycin 60 g Tris-Base 20 g SDS 2 l ddH <sub>2</sub> O
Protoplastenpuffer	50 mM Tris-HCl 20 mM MgCl <sub>2</sub> 30% Raffinose pH 7,6
SDS-Lade-Puffer, 5x	5 ml Tris/HCl 0.5 M, pH 6.8 2 ml Glycerol 0.8 g SDS 1 ml 0.5 % Bromphenol blue 2 ml ddH <sub>2</sub> O
SDS	SDS-Pellets (Roth, Karlsruhe)
SDS-Sammel-Gel-Puffer	0.5 M Tris/HCl 250 ml ddH <sub>2</sub> O pH 6.8
SDS-Trenn-Gel-Puffer	1.5 M Tris/HCl 250 ml ddH <sub>2</sub> O pH 8.8
TEMED	TEMED (Roth, Karlsruhe)
TFB-1-Puffer	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % v/v Glyzerin pH 5,8 (durch Essigsäure)
TFB-2-Puffer	10 mM MOPS 10 mM KCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % v/v Glycerin pH 7 (durch NaOH)
TBE-Puffer, 5x	250 mM Tris 250 mM Borsäure 10 mM EDTA pH 8,0
Transferpuffer, 20x	NuPAGE Transferpuffer (Invitrogen, Karlsruhe)

### 3.1.5. Antibiotika

**Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika**

Antibiotikum	Konzentration	Lösungsmittel	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml	Methanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anhydrotetrazyklin	1 mg/ml	Methanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Chloramphenicol	10 mg/ml	Methanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tetrazyklin	10 mg/ml	Methanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)

### 3.1.6. Enzyme

Die Enzyme wurden bei -20 °C gelagert und zur Verwendung auf Eis liegend aufgetaut.

**Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Enzyme**

Enzym	Hersteller
<b>Restriktionsendonukleasen</b>	
Ascl	New England BioLabs (NEB), Frankfurt am Main
DpnI	NEB, Frankfurt am Main
EcoRI-HF	NEB, Frankfurt am Main
NheI	NEB, Frankfurt am Main
Pacl	NEB, Frankfurt am Main
<b>Andere Enzyme</b>	
Lysostaphin	Sigma-Aldrich, Steinheim
T4 DNA-Ligase	NEB, Frankfurt am Main
<b>Puffer</b>	
BSA	NEB, Frankfurt am Main
Ligase Reaction Buffer	NEB, Frankfurt am Main
Puffer 1 / 4	NEB, Frankfurt am Main

### 3.1.7. Molekularbiologische Kits

**Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Kits**

Anwendung	Name (Hersteller)
DNA-Extraktion aus Agarose-Gel	NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren)
InFusion-Cloning	In-Fusion 2.0 Dry-Down PCR Cloning Kit (Clontech, Mountain View, CA)
PCR-Aufreinigung	NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren)
PCR-DyNAzyme Polymerase-Kit	Thermo Scientific DyNAzyme II DNA Polymerase (Thermo Scientific)
PCR-Phusion Polymerase-Kit	Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes)
Plasmidpräparation	QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
Western-Blot	ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, München)

### Phusion High-Fidelity Polymerase, NewEngland BioLabs

Die Phusion-Polymerase besitzt eine 3'-5' Exonuklease *proofreading* Aktivität, durch die auftretende Synthesefehler repariert werden können, wodurch eine höhere Genauigkeit gewährleistet werden kann. Die Denaturierung erfolgt bei 98°C, die Elongation bei 72° mit einer Geschwindigkeit von bis zu 4000 Basen/Minute.

### DyNAzyme I DNA Polymerase Kit, Finnzymes

Diese Polymerase besitzt eine Amplifikationsgeschwindigkeit von etwa 1000 Basen/Minute. Bei der Durchführung ist zu beachten: Denaturieren bei 95°C, Elongation bei 72°. Diese *taq*-Polymerase besitzt keine *proofreading*-Aktivität.

### **3.1.8. Medien**

Alle Medien wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und durch 15 minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert. Hitzeempfindliche Komponenten wie Antibiotika wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren hinzugefügt. Zur Herstellung von Festmedien wurde den Flüssigmedien 14 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) hinzu gegeben.

**Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Wachstumsmedien**

Medium	Zusammensetzung	Besonderheiten
SOC-Medium	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,6 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 10 mM/l MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O 10 mM/l MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O 20 mM/l Glukose	Raumtemperatur pH 6,8 – 7,0
LB-Medium	10 g/l Bacto-Tryptone 5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl	pH 7.0
BHI-Medium	30 g/l Brain Heart Infusion Broth	
TSB	30 g/l TSB	pH 7,3
B2-Brühe	10 g/l Caseinhydrolysat 25 g/l Hefeextrakt 1 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 g/l Glucose 25 g/l NaCl	pH 7,4 vor jeder Verwendung frisch ansetzen

### 3.1.9. Primer

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Primer von der Firma MWG-Operon bezogen. Aus den bei -20 °C gelagerten Stocklösungen wurden Arbeits-Aliquotes mit einer Primer-Konzentration von 10 pmol/µl angelegt und verwendet.

**Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Primer**

Name	Sequenz	Referenz
c-myc_rev	5'-TCCAGATCCTCTTCTGAGATG AG-3'	Diese Arbeit
DUF_inf_rev	5'-TTTAGAATAGGCGCGCCGGATTTAAGTATTAACATCAGTAA TGATATC-3'	Diese Arbeit
FIVAR_inf_rev3	5'-TTTAGAATAGGCGCGCCGTG CTCA AGCATCATCCATG-3'	Diese Arbeit
M13	5'-TGAGTTTCGTCAACAGTA-3'	Invitrogen
M13 rev	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'	Invitrogen
Tetprom_rev	5'-ACCGCCTCTGCAGGGTATCGATACTCGACATCTTGGTTAC-3'	H. Büttner
YSIRK_inf_1	5'-TACCGAGCTCGAATTCCCCG GGATTGTGATAAATG-3'	Diese Arbeit

### 3.1.10. Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme wurden zur Langzeitlagerung in Kryotubes (Mast Diagnostica/Reinfeld) bei -80 °C konserviert. Für den wiederholten Gebrauch wurden die jeweiligen Stämme auf selektiven Agarplatten ausplattiert. Diese Platten wurden für 12-24 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

**Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Bakterien-Zellen und -Stämme**

Stamm	Eigenschaften	Referenz/ Hersteller
<i>E. coli</i> FusionBlue	Kompetente Zellen des InFusion-Cloning-Kit: E.coli K-12-Stamm: endA1, hsdR17 (rK12-, mK12+), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac F'[proA+B+, lacIqZΔM15::Tn10(tetR)]	ClonTech
<i>E. coli</i> Top10	E. coli Wirt zur Klonierung von Plasmiden: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) OlacZΔM15ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-	Invitrogen oder eigene Herstellung
<i>S. aureus</i> RN4220	Restriktionsdefizienter <i>S. aureus</i> Stamm, Klonierungswirt	[99]
<i>S. carnosus</i> TM300	Surrogate-Wirt zur Expression von Staphylokokken-Genen	[100]

### 3.1.11. Plasmide

**Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Plasmide**

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pCN-57-P <sub>xyl/tetO</sub> -FIVAR	Embp-Fusionsprotein Embp <sub>FIVAR</sub> , enthält ein YSIRK-Motiv, acht FIVAR-Domänen, vier DUF1452-Domänen und eine putativen Tm-Domäne	H. Büttner
pCN-57-P <sub>xyl/tetO</sub> -FIVAR_ΔTm	Kodiert für Embp <sub>FIVAR</sub> , jedoch ohne Tm-Domäne	Diese Arbeit
pCN-57-P <sub>xyl/tetO</sub> -FIVAR_ΔDUFΔTm	Kodiert für Embp <sub>FIVAR</sub> , jedoch ohne DUF1542 und ohne Tm-Domäne	Diese Arbeit
pCN-57-P <sub>xyl/tetO</sub> -FIVAR::myc	Kodiert für Embp <sub>FIVAR</sub> mit einem zusätzlichem N-terminalen <i>myc</i> -tag	Diese Arbeit
pCN-57-P <sub>xyl/tetO</sub> -FIVAR::myc_ΔTm	Kodiert für Embp <sub>FIVAR::myc</sub> , jedoch ohne Tm-Domäne	Diese Arbeit
pCN-57-P <sub>xyl/tetO</sub> -FIVAR::myc_ΔDUFΔTm	Kodiert für Embp <sub>FIVAR::myc</sub> , jedoch ohne DUF1542 und ohne Tm-Domäne	Diese Arbeit
pCN_P <sub>xyl/tetO</sub> -GAFIV	Embp-Fusionsprotein Embp <sub>GA-FIV</sub> , enthält ein YSIRK-Motiv, acht GA-Modul-FIVAR-Domänen-Repeats, vier DUF1452-Domänen und eine Tm-Domäne	H. Büttner
pCN_P <sub>xyl/tetO</sub> -GA-FIV_ΔTm	Kodiert für Embp <sub>GA-FIV</sub> , jedoch ohne Tm-Domäne	Diese Arbeit
pCN_P <sub>xyl/tetO</sub> -GA-FIV_ΔDUFΔTm	Kodiert für Embp <sub>GA-FIV</sub> , jedoch ohne DUF1542 und ohne Tm-Domäne	Diese Arbeit
pCN_P <sub>xyl/tetO</sub> -GAFIV::myc	Kodiert für Embp <sub>GA-FIV</sub> mit einem zusätzlichem N-terminalen <i>myc</i> -tag	Diese Arbeit
pCN_P <sub>xyl/tetO</sub> -GA-FIV::myc_ΔTm	Kodiert für Embp <sub>GA-FIV::myc</sub> , jedoch ohne Tm-Domäne	Diese Arbeit
pCN_P <sub>xyl/tetO</sub> -GAFIV::myc_ΔDUFΔTm	Kodiert für Embp <sub>GA-FIV::myc</sub> , jedoch ohne DUF1542 und ohne Tm-Domäne	Diese Arbeit
pCR2.1-c-myc	5'-PacI, 3'-NheI, Kloniert via TOPO-TA, Genotyp: F-mcr A Δ(mrr-hsdRMS-mcr BC) Φ80lac ZΔM15 ΔlacX74 rec A1 ara D139 Δ(ara-leu)7697 gal U gal K rps L (Str) end A1 nup G	europins-MWG-operon

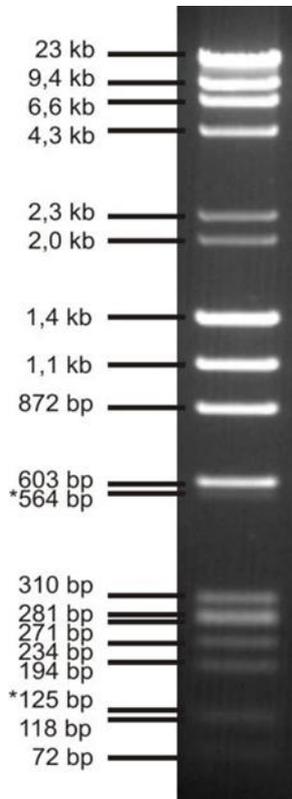
### 3.1.12. Datenbanken und Programme

Die durch PCR und Sequenzierungsreaktionen gewonnenen DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI (InforMax, Oxford, UK) und mittels der SMART-Software (<http://smart.embl-heidelberg.de>) bearbeitet und analysiert. Hierbei wurde auf das vollständig sequenzierte Genom des *S. epidermidis* StammsRP62A zurückgegriffen (Lokus Nummer CP000029; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

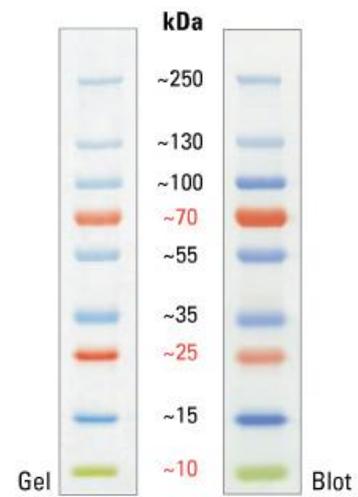
### 3.1.13. Molekulargewichtstandards

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

- $\lambda$ DNA-HindIII/ $\Phi$ X174-HaeIII (Finnzymes, Espoo, FIN)
- Page-Ruler-Plus (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, ThermoScientific)



**Abbildung 4:** Laufmuster des verwendeten DNA- Molekulargewichtstandards



**Abbildung 5:** Laufmuster des verwendeten Protein- Molekulargewichtstandards

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Allgemeine mikrobiologische Methoden**

#### **Anzucht von Bakterienstämmen und Stammhaltung**

Die verwendeten Bakterien-Stämme wurden zur regelhaften Verarbeitung durch einen Drei-Ösen-Ausstrich auf Fest-Medien ausplattiert, welchen zu Selektionszwecken ein Antibiotikum beigefügt wurde. *Staphylococcus*-Stämme wurden auf Blut- oder TSB-Agar, *E. coli*-Stämme auf LB-Agar kultiviert. Inkubiert wurden die Stämme in der Regel für 16 Stunden bei 37 °C in einem Brutschrank (Agarkulturen) oder einem Schüttelinkubator bei 150 rpm (Flüssigkultur). Vorkulturen wurden entweder für 6 Stunden oder über Nacht inkubiert und die Hauptkultur anschließend hiermit im Verhältnis 1:100 beimpft. Die dauerhafte Aufbewahrung der Stämme erfolgte Kryotubes bei -80°C.

### **3.2.2. Molekularbiologische Methoden**

#### **Isolierung von Plasmid-DNA**

Für die Durchführung der Plasmidpräparationen wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben verwendet. Das System beruht auf einer alkalischer Lyse der Bakterienzellen, gefolgt von einer Denaturierung und Präzipitation der chromosomalen DNA und Proteine, während die Plasmid-DNA in Lösung verbleibt. Die Eluate wurden zur Klonierung, Sequenzierung oder zu Restriktionsanalysen verwendet.

Ausgangsmaterial für die Plasmid-Präparation waren stets 4 ml einer über Nacht beimpften Flüssig-Medium-Kultur, welcher zu Selektions-Zwecken ein Antibiotikum im Verhältnis 1:100 zugesetzt wurde. Von dem Herstellerprotokoll abweichend wurde die Silica-Säule länger getrocknet (5-minütige Leer-Zentrifugation) und für das Eluieren 50 µl, 72 °C warmes Aqua ad. Iniectabilia verwendet.

Da sich durch das hier beschriebene Verfahren die Zellwände von gram- positiven Staphylokokken nicht aufschließen lassen, wurden in diesen Fällen dem Lysepuffer des Herstellers 3 µl Lysostaphin (1500 U/ml) hinzugefügt. Die erzeugte Suspension wurde anschließend für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach dem enzymatischen Aufschluss der Zellwand wurde dem vorgegebenen Protokoll weiter gefolgt.

## Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Vorbereitung für die Sequenzanalyse oder zur Weiterverarbeitung wurde die Nukleinsäurekonzentration der jeweiligen DNA-haltigen Proben photometrisch bestimmt. Verwendet wurde hierfür der Nano Drop der Firma Peqlab (Erlangen). Die Messung basierte hierbei auf der Absorption durch die aromatischen Ringe der Nukleinsäure-Basen bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260}$ ).

## Konzentrieren der DNA

Um die DNA-Konzentration in einzelnen Proben zu erhöhen, wurden diese in eine SpeedVAC eingebracht. Hierbei wird durch Anlage eines Vakuums der Siedepunkt des DNA-Lösungsmittels reduziert und dieses somit zum Verdampfen gebracht. Um die Probe einer Plasmid-Präparation von circa 50  $\mu$ l auf etwa 15  $\mu$ l zu reduzieren, wurde das Tube für 20-25 Minuten zentrifugiert.

## Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Um zu überprüfen, ob präparierte Plasmide ein bestimmtes und gesuchtes Insert enthalten oder aber um ein erzeugtes PCR-Produkt weiterzuverarbeiten, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Hierbei erkennen Restriktionsendonukleasen spezifische, palindromische Sequenzen innerhalb eines DNA-Doppelstrangs und schneiden dann beide Stränge an dieser definierten Stelle. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2 bis 24 Stunden.

**Tabelle 14:** Allgemeines Pipettier-Schema für einen 20  $\mu$ l Restriktionsverdau

Reagenz	Volumen
Plasmid-Präparation	6 $\mu$ l
Restriktions-Enzym <b>A</b>	1 $\mu$ l
Restriktions-Enzym <b>B</b>	1 $\mu$ l
Puffer (passend zu <b>A</b> und <b>B</b> )	2 $\mu$ l (10 % v/v)
BSA-Zusatz	falls nötig
Aqua ad. Iniectionabilia	auf das Zielvolumen auffüllen
<b>Gesamtvolumen</b>	20 $\mu$ l

## **Agarose- Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA**

Zur Auftrennung von Fragmenten gespaltener Plasmide oder dem Nachweis von PCR-Amplifikaten wurde die horizontale Gelelektrophorese eingesetzt. Durch die Siebstruktur der Agarosegelmatrix weisen einzelne DNA-Fragmente spezifische weil insbesondere größenabhängigen Laufeigenschaften auf. Da die „Porengröße“ des Gels durch die Agarosekonzentration auf die Größe der aufzutrennenden Fragmente abgestimmt werden kann, wurden je nach Verwendungszweck unterschiedliche 0,8 % bis 2,5 % ige Agarosegele verwendet.

Hochreine Agarose wurde dazu in dem gewünschten Volumenverhältnis in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer aufgeköcht. Um die aufgetragene DNA später unter UV-Licht sichtbar machen zu können, wurde der noch flüssigen Agarose 5 µl RedSafe zugegeben. Zur Größen-Bestimmung wurde stets ein Größenstandard aufgetragen. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte in den dafür vorgesehenen Kammern bei 80 bis 120 V für 1-2 Stunden. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Erzeugte Ergebnisse wurden abschließend durch Betrachtung unter dem UV-Transilluminator dokumentiert.

## **Polymerasekettenreaktion**

Bei der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) handelt es sich um eine Standard-Methode zur enzymatischen *in vitro*-Amplifikation eines definierten DNA-Abschnitts. Hierbei dient doppelsträngige DNA als Vorlage (*template*) und gegenläufige (*forward* und *reverse*) Oligonukleotide, die sogenannten Primer, als Start für die eingesetzte hitzestabile DNA-Polymerase. Durch alternierende Temperatur-Zyklen kommt es abwechselnd zur Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer (*annealing*) an die nun vorliegenden Einzelstränge und anschließend zur Synthese des komplementären Stranges. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten PCR-Zyklen wurden im *peqSTAR 96 universal gradient cycler* der Firma Peqlab, Erlangen durchgeführt.

**Tabelle 15:** Cycler-Einstellungen für die Amplifikation mittels Phusion-Polymerase

Anzahl der Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit	Funktion
	110 °		<i>pre heat</i>
1 x	98 °	2 Minuten	Denaturieren
30 x	98 °	10 Sekunden	Denaturieren
	55 °	10 Sekunden	<i>annealing</i>
	72 °	30 Sekunden*	Elongation
1 x	72 °	3 Minuten	Elongation

\*Die Dauer der Elongationsphase ist von der Größe des zur amplifizierenden DNA-Fragments abhängig. Orientierend benötigt die Phusion-Polymerase etwa 15 Sekunden pro 1000 Basenpaare.

**Tabelle 16:** Allgemeines Pipettierschema für einen 50 µl PCR-Ansatz

Reagenz	mit Phusion-Polymerase [µl]	mit DyNAzyme- Polymerase [µl]
Puffer	10	5
Vorwärts-Primer	1,5	1,5
Rückwärts-Primer	1,5	1,5
dNTP's	1	1
Polymerase	0,5	0,5
Aqua ad. Inject.	34,5	39,5
Template-DNA	1	1

### Aufreinigen von PCR-Produkten

Nach Abschluss der PCR-Zyklen liegen neben dem gewollten Amplifikat auch ungewollte Bestandteile wie die Primer, die dNTP's oder auch unvollständig synthetisierte Amplifikate in dem Reaktionsgefäß vor. Um eine ungestörte Weiterverarbeitung der DNA zu erleichtern, sollte der PCR-Ansatz daher anschließend gereinigt werden.

Hierzu wurde das PCR CLEAN-UP: Nucleo Spin Extract II nach Herstellerangaben verwendet. Als einzige Abweichung wurden die DNA Produkte jeweils in 50µl, 70°C warmen Aqua ad. Iniectabilia, nach 3 minütiger Zentrifugation eluiert.

## **Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel**

Das NucleoSpin Extract II Kit kann ebenfalls dazu verwendet werden, eine gewünschte DNA-Bande aus einem Agarose-Gel zu isolieren. Dies kann das Fragment eines Restriktions-Verdau oder aber das Amplifikations-Produkt einer PCR sein.

Die gewünschte Bande wurde hierzu unter schwachem ultraviolettem (UV)-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 2 ml-Eppendorf-Tube überführt. Nachdem das Gelfragment in ausreichend Hochsalz-Puffer (pro 100 mg Gel werden 300 µl NT-Puffer zugegeben) bei 50 °C gelöst wurde, konnte die so erzeugte DNA-Lösung auf der Silica-Ionenaustauschsäule immobilisiert werden. Nach den Waschschritten des Herstellerprotokolls erfolgt abschließend die Elution der DNA in 50 µl 70 °C warmen Aqua ad. Iniectabilia.

## **Transformation von Bakterien**

### **Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen**

In dieser Dissertation klonierten Plasmide wurden zu Verifikationszwecken in kompetente *E. coli*-Stämme transformiert. Hierdurch wurde zudem stabile Konservierung bei -70 °C ermöglicht. Die verwendeten *E. coli*-Top10-Zellen wurden nach folgendem Protokoll selbst hergestellt: Für die Hauptkultur wurden 250 ml eines auf 37 °C vorgewärmten LB-Mediums 1:100 mit einer frischen Über-Nacht-Kultur *E. coli* Top10 beimpft und in einem 1 L Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 180 rpm. für 60-90 Minuten bis zu einer OD600 ~ 0,5 inkubiert. Nachdem die Kultur für 5 Minuten auf Eis heruntergekühlt und auf zwei autoklavierte 250 ml Zentrifugationsbecher verteilt wurde, erfolgt eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 4000 g unter 4 °C Kühlung. Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt: Das gewonnene *E. coli*-Top10 Zellpellet wurde in 37,5 ml eisgekühltem TFB1-Puffer resuspendiert und anschließend für 90 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss an diese Inkubationszeit erfolgte eine erneute Zentrifugation unter oben genannten Einstellungen. Nachdem das Pellet der gewaschenen Zellen in 5 ml eisgekühltem TFB2-Puffer aufgenommen wurde, konnte die entstandene Suspension bis zum Gebrauch in Aliquotes à 100 µl aufgeteilt und bei -70 °C gelagert werden.

### **Chemische Transformation mittels Hitze-Impuls**

Zur chemischen Transformation frisch hergestellter oder gekaufter *E. coli*-Top10 Zellen wurden diese auf Eis aufgetaucht und mit einer gewünschten Menge DNA-Produkt vermischt. Dies entsprach in den meisten Fällen 1-4 µl eines Ligationsansatzes oder 1 µl einer Plasmidpräparation. Nach einem vorsichtigen Durchmischen durch leichtes Umrühren, wurde die Zell-DNA-Suspension für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch den anschließenden Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden sollten sich Poren in der Bakterienmembran öffnen, durch die die Plasmid-DNA in die Zellen gelangen konnte. Die Zellen wurden hiernach sofort für 2 Minuten auf Eis gestellt und anschließend nach dem Hinzufügen von 250 µl, zimmerwarmen SOC-Mediums für 1 Stunde bei 37 °C und circa 200 rpm in dem Thermo-Mixer inkubiert. Nach der so ermöglichten Ausbildung der plasmidkodierte Antibiotika-Resistenz wurden die Zellen in drei gleichgroße Aliquotes aufgeteilt und auf Selektiv-Agar-Platten (in unserem Fall LB-Agar mit 1:1000 Ampicillin) ausplattiert. Die letzte Inkubation erfolgte meist über Nacht in einem 37 °C warmen Brutschrank.

### **Herstellung elektro-kompetenter *Staphylococcus* Zellen**

Eine weitere Methode zur Transformation ist die Elektroporation. Hierbei wird DNA nicht über den bereits beschriebenen Wärme-Impuls in geeignet kompetente Zellen eingebracht, sondern über die Anlage einer elektrischen Spannung. In dieser Dissertation wurde diese Art der Transformation verwendet, um Plasmide in Staphylokokken einzubringen, da hier eine chemische Transformation auf Grund der kräftigen Zellwand nicht möglich gewesen wäre.

Zur Herstellung elektro-kompetenter Staphylokokken wurden 50 ml frische B2-Brühe mit 1 ml einer über-Nacht inkubierten *S. aureus* RN4220- beziehungsweise *S. carnosus* TM300-Vorkultur beimpft. Diese Hauptkultur wurde in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD600 nm von 0,6-0,8 inkubiert. Um ein weiteres Zellwachstum zu verhindern, wurden die folgenden Schritte stets auf Eis und mit gekühlten Materialien durchgeführt: Nachdem die frische Kultur in ein 50 ml Falcon-Tube gegeben und für 15 Minuten auf Eis gestellt wurde, erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 4332 g und 4 °C. Das so entstandene Zellpellet wurde drei Mal mit je 25 ml, 4 °C kaltem autoklaviertem Millipore-Wasser gewaschen. Das Pellet wurde anschließend zwei weitere Male, zunächst in 10 ml und anschließend in 5 ml eiskaltem, autoklaviertem 10 %iger

Glycerinlösung gewaschen. Nachdem die Zellen 15 Minuten auf Eis ruhen und der 5 ml Überstand des letzten Waschdurchganges verworfen werden konnte, wurden das Pellet der nun elektrokompetenten Staphylokokken in 600-800  $\mu$ l 10%iger, 4 °C kalter Glycerinlösung resuspendiert. Die so gewonnene Zellsuspension konnte abschließend in 70  $\mu$ l große Aliquotes aufgeteilt werden.

### **Elektroporation**

Um eine hohe Effizienz bei den Elektroporations-Transformationen zu erreichen, wurden stets frische elektrokompetente Zellen hergestellt. Analog zur Herstellung dieser Zellen, sollten sämtliche Vorbereitungsschritte der Transformation auf Eis und mit gekühlten Materialien durchgeführt werden.

Ein Aliquot elektrisch-kompetenter Zellen wurde mit 300-500 ng der gewünschten DNA-Präparation vermischt und anschließend für 30 Minuten auf Eis gestellt. Nachdem die Zell-DNA-Suspension blasenfrei in den Spalt einer frischen, gekühlten Elektroporationsküvette pipettiert wurden, erfolgte die eigentliche Elektroporation bei 100  $\Omega$  Widerstand, 25  $\mu$ Farad elektrischer Kapazität der Kondensatoren und 2-2,5 kVolt Spannung. Die transformierten Zellen wurden unmittelbar nach dem Elektro-Puls in 390  $\mu$ l, 37 °C warmen B2-Medium aufgenommen, in ein 2 ml Eppendorf-Tube gegeben und für eine Stunde in einen Schüttelinkubator (37 °C, 200 rpm) gestellt. Nach dieser Zwischeninkubation zur Expression der plasmidkodierte Resistenzgene konnten die Zellen auf geeigneten Selektionsmedien, hier BHI-Agarplatten mit Chloramphenicol-Zusatz(10 mg/ml), ausgestrichen werden. Die Inkubationszeit im 37 °C Brutschrank variierte zwischen 24 (für Transformanden von *Staphylococcus aureus* RN4220) und 48 Stunden (Zelllinien von *Staphylococcus carnosus* TM300).

## Klonieren von DNA-Fragmenten

Das Klonieren beschreibt das Einfügen eines beliebigen DNA-Fragments in einen Vektor, der in einem geeigneten Zielstamm die Verwendung der hierdurch vermittelten Gene ermöglicht. In den so erzeugten Klonen, kann die DNA zudem stabil und dauerhaft gelagert werden.

### Ligation mittels T-Ligase

DNA-Ligasen sind Enzyme, die zwei getrennte DNA-Moleküle über eine Phosphodiester-Bindung miteinander verbinden (ligieren). Dabei werden an den jeweils überhängenden zueinander komplementären Restriktionsenden die 3'-OH- und die 5'-Phosphatgruppen unter Abspaltung eines Wassermoleküls miteinander verknüpft. Aus diesem Grund müssen die Vektor-DNA und das gewünschte DNA-Insert zuerst mit demselben Restriktionsenzym verdaut worden sein.

### Durchführungsprotokoll:

Sämtliche Schritte der Ligation wurden auf Eis durchgeführt und soweit möglich wurden gekühlte Materialien verwendet. Die eigentliche Inkubation erfolgte über Nacht in einem 16 °C warmen Heizblock, bei 4 °C Umgebungstemperatur.

**Tabelle 16:** Allgemeines Pipettier-Schema für einen 10 µl Ligations-Ansatz. Die jeweiligen Volumina für das Insert (**X**) beziehungsweise Vektor (**Y**) variierten je nach Ligationsansatz.

Reagenz	Volumen
Insert	<b>X</b> µl
Vektor	<b>Y</b> µl
T-4-Ligase-Puffer	1 µl (10 v/v%)
T-4-Ligase	0,5 µl
Aqua ad. In	Auffüllen auf 10µl

Die beste Ligations-Effizienz wurden bei einem Insert-Vektor-Verhältnis von 1:3 - 1:5 beobachtet. Hierbei bezieht sich dieses Verhältnis auf die molare Menge, daher sollte zur genaueren Bestimmung der benötigten Volumina beispielsweise der *molar ratio calculator* (<http://bioinfo.clontech.com/infusion>) verwendet werden.

### **Einfügen eines N-terminalen Myc-tag**

Um eine spezifische Antikörpermarkierung der bearbeiteten Zielproteine zu erreichen, wurde das im Staphylokokken-Genom nicht kodierte *Myc-tag* an die jeweiligen N-terminalen Enden der rekombinanten Fusionsproteine Embp<sub>-GA-FIV</sub> und Embp<sub>-FIVAR</sub> kloniert. Bezogen wurde das *myc*-Gen von der Firma Eurofins-MWG-Operon (München), kloniert in den pCR2.1-Vektor. Das Gen war am 5' -Ende von einer *PacI*- und am 3' -Ende von einer *NheI*-Restriktionsschnittstelle flankiert. Produkt und somit Ziel dieses Experimentes war entsprechend die Erzeugung der Plasmide pCN-57-c-Pxyl/Tet-R-FIVAR::*myc* und pCN-57-c-Pxyl/Tet-R-GA-FIV::*myc*.

### **Durchführungsprotokoll:**

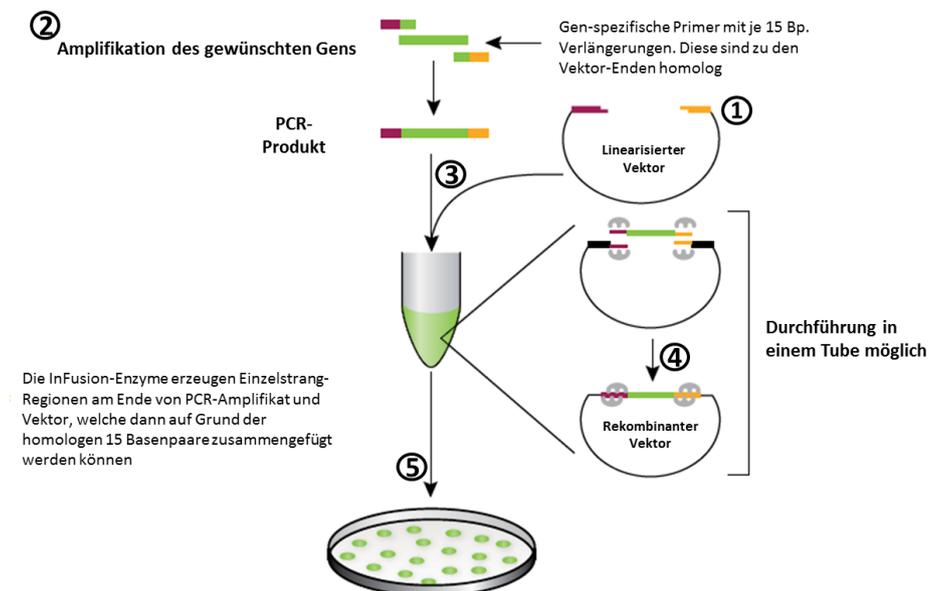
Um eine ausreichend große Menge an Vektor für die anschließende Ligation zu erhalten, wurde das gesamte Eluat (50 µl) einer frischen Plasmidpräparation der Stämme *E. coli* FusionBlue pCN-57-c-Pxyl/Tet-R-FIVAR beziehungsweise - pCN-57-c-Pxyl/Tet-R-GA-FIV über Nacht durch die Endonukleasen *PacI* und *NheI* bei 37 °C verdaut. Parallel wurde das durch Eurofins-MWG-Operon bereitgestellte *myc*-Gen als PCR-Template benutzt, um eine ausreichend große Menge dieses Gens zu amplifizieren. Verwendet wurde hierzu das oben beschriebene Standard-PCR Protokoll unter Verwendung der Phusion-Polymerase.

Das amplifizierte Reaktionsprodukt wurde anschließend aufgereinigt und zur Gewinnung eines ligierbaren Inserts über Nacht durch die Restriktionsenzyme *PacI* und *NheI* verdaut. Um eine direkte Zerschneidung der frisch ligierten Plasmide zu verhindern, wurden die eingesetzten Enzyme der beiden Restriktionsverdau-Ansätze (Vektor beziehungsweise Insert) durch eine 25 minütige Wärmeexposition bei 65 °C inaktiviert. Die eigentliche Ligation von *myc*-Insert in die Plasmide der rekombinanten Embp-Fusionsproteine wurde nach oben beschriebenem Protokoll (hier mit je 2 µl des Vektors und 1 µl des Inserts) angesetzt. Zur Weiterverarbeitung wurde je 1 µl der ligierten DNA-Suspension zu einem Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* Top10-Zellen gegeben und nach oben beschriebenem Protokoll transformiert. Die richtige Orientierung des Inserts wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

## InFusion-Cloning

Der zentrale Untersuchungsinhalt dieser Dissertation war die Verankerung des Embp auf der bakteriellen Zelloberfläche. Um in diesem Zusammenhang die Bedeutung der einzelnen Embp-Domänen zu charakterisieren, sollten einzelne dieser Domänen gezielt aus den rekombinanten Embp-Fusionsproteinen Embp<sup>-GA-FIV</sup> und Embp<sup>-FIVAR</sup> eliminiert werden.

Für die gewünschten Mutationen wurde das *In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit* der Firma Clontech verwendet (**Abbildung 6**). Die auf einer Clonase-Reaktion aufbauende Reaktion ähnelt der oben beschriebenen Ligationsreaktion insofern, als das auch hier eine große Menge an gereinigtem und linearisiertem Vektor sowie ein individuelles Insert benötigt wird. Jedoch bedarf es hier keiner passenden Restriktionsschnittstellen, da die Clonase-Reaktion lediglich einige wenige komplementäre Basen an den gewünschten Übergängen von Insert auf Vektor benötigt. Diese Basen können hierbei individuell wählbar durch geeignete InFusion-Primer dem gewünschten Insert angefügt werden.



**Abbildung 6: InFusion-Cloning (ClonTech), schematisches Versuchsprotokoll.** Das verwendete Herstellerprotokoll besteht aus fünf Zwischenschritten: **Schritt 1**) Gewinnung einer ausreichend großen Menge geeigneten Vektor-Backbones gefolgt von **Schritt 2**) Amplifikation des gewünschten Inserts durch Primer, die ein zu den Vektor-Enden komplementären Überstand amplifizieren. **Schritt 3**) Nach einer Aufreinigung der erzeugten DNA-Produkte können diese in **Schritt 4**) der eigentlichen InFusion-Cloning-Reaktion zusammengefügt werden. Das so erzeugte neue Plasmid wird im letzten **Schritt 5**) in geeignete, kompetente Zellen transformiert (Adaptierte Abbildung des InFusion-Cloning Manuals).

### Durchführungsprotokoll:

Zunächst wurde der Zielvektor in Form einer frischen Plasmidpräparation des Stammes *E. coli* Top10 pCN-57-c-Pxyl/TetR-gfp gewonnen. Zur Herstellung des gewünschten Vektor-*backbones* wurde anschließend der gesamte Ansatz (50 µl) durch die Enzyme Eco-RI-HF und Ascl in einem 60 µl Restriktionsverdau geschnitten. Parallel zur Gewinnung des Vektors erfolgte die Erzeugung der gewünschten Inserts mittels PCR. Als *template* wurden hierbei 1:400 verdünnte, frische Plasmidpräparationen der Stämme *E. coli* Top10 pCN-57-c-Pxyl/Tet-R-FIVAR::*myc* und *E. coli* Top10 pCN-57-c-Pxyl/Tet-R-GA-FIV::*myc* verwendet (**Tabelle 17**). Die fertig geschnittenen beziehungsweise amplifizierten Ansätze wurden anschließend durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und die korrespondierenden Banden für das Vektor-*backbone* beziehungsweise die gewünschten Inserts nach oben beschriebener Methode einzeln aus dem Agarosegel isoliert und das gewonnene Eluat in der SpeedVAC konzentriert. Nach Herstellerangaben ist die höchste Klonierungs-Effizienz bei einem molaren Vektor-Insert-Verhältnis von 2:1 zu erreichen. Aus diesem Grund erfolgte die Identifikation der benötigten Volumina (**Tabelle 16**) mit Hilfe des *molar ratio calculator* (<http://bioinfo.clontech.com/infusion/molarRatio.do>). Die ermittelten Volumina wurden anschließend zusammengegeben, auf das lyophilisierte Enzym/Puffer-Pellet des Reaktionstube gegeben und anschließend für 25 Minuten bei 37 °C und für weitere 25 Minuten bei 50 °C inkubiert. Abschließend folgte die Transformation der neu klonierten Plasmide in die dem Kit beigefügten, kompetenten *E. coli* K-12 FusionBlue-Zellen. Hierbei erfolgte die chemische Transformation von 2 µl des Reaktionsansatzes nach Inkubation auf Eis mittels Hitze-Impuls von exakt 45 Sekunden bei 42 °C. Nach der *rescue*-Inkubation in SOC-Medium wurden die Zellen auf LB-Agar mit 1:1000 Ampicillin-Zusatz ausplattiert. Die Korrektheit der erzeugten Klone wurde durch Sequenzierung bestätigt.

**Tabelle 16:** Einzusetzende Mengen von Insert und Vektor, ermittelt durch den *molar ratio calculator*

DNA-Fragment	Größe [Bp]	Einzusetzende Menge [ng]
Vektor	5900	150 ng
ΔTm-Insert	4900	622 ng
ΔDUF-ΔTm-Insert	3500	440ng

**Tabelle 17:** Pipettierschema und Cycler-Einstellungen für die Amplifikation der InFusion-Cloning-Inserts

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]	Zyklen	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer
Aqua ad. in	34,5	<i>Pre heat</i>	110	
Puffer	10	1 x	98	2,5 Minuten
YSIRK-Inf-1-Primer	1,5	3 5x	98	30 Sekunden
$\Delta$ -rev-Primer (*)	1,5		55	15 Sekunden
dNTP-Mix	1		72	2 Minuten
Phusion-Polymerase	0,5	1 x	72	6 Minuten
Template	1	Store	4	

(\*) für die  $\Delta T_m$ -Amplifikation wurde der „Fivar-inf-rev-3“-, für die  $\Delta DUF$ - $\Delta T_m$ -Amplifikation der „duf-inf-rev“-Primer verwendet

### Sequenzierung

Die Sequenzanalysen erfolgten als Auftragsarbeit durch MWG-Eurofins (München). Hierzu wurden 2  $\mu$ g Plasmid-DNA in 20  $\mu$ l Aqua ad. In. gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben. Zusätzlich wurde 1  $\mu$ l des für die Sequenzierung benötigten Primer in einem separaten Röhrchen beigefügt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit den Sequenzen der *NCBI*-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) verglichen und ausgewertet.

### 3.3.3. Protein-biochemische Methoden

#### Expression rekombinanter Proteine in *S. carnosus* TM300

Zur Expression der auf den Plasmiden kodierten Proteine wurden 25 ml frisches TSB-Medium 1:100 mit einer Über-Nacht-Kultur des zu untersuchenden *S. carnosus* TM300 Klons beimpft. Da die in dieser Dissertation verwendeten Plasmide einen Tetrazyklin-sensiblen Promotor enthielten, wurde die eigentliche Expression durch Zugabe von 125 ng Anhydrotetrazyklin pro ml Kultur-Medium induziert. Die Schüttelinkubation der Kultur erfolgte in einem 250 ml Erlenmeyerkolben bei 37  $^{\circ}$ C und 180 rpm für 6 Stunden.

## **Präparation von Staphylokokken-Proteinen**

### **Proteinpräparation von der Zelloberfläche**

Nach ausreichender Inkubation der Expressionskultur wurde das gesamte Kulturvolumen in ein 50 ml Falcon-Tubes überführt und für 10 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert. Nachdem das überstehende Wachstumsmedium verworfen wurde, konnte das entstandene Zell-Pellet in 1 ml PBS resuspendiert werden. Zum Lösen der Zellwand-assoziierten, nicht-kovalent gebundenen Proteine wurde die so entstandene Suspension für 5 Minuten bei 10.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, das einmalig gewaschene Pellet in 40-150 µl 4x LDS (abhängig von der Dichte der ausgehenden Hauptkultur, meist 60 µl) aufgenommen und für 5 Minuten bei 70 °C im Heizblock aufgekocht. Eine abschließende Zentrifugation der Bakterien ermöglichte Überführen des an LDS gebundenen Protein-Überstandes in ein neues Eppendorf-Tube. Die entstandene Proteinprobe wurde entweder direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

### **Proteinextraktion mittels Detergenzien**

Das Bakterien-Pellet einer nach oben beschriebenen Schema inkubierten Expressionskultur wurde in 1x PBS aufgenommen und in gleich große Aliquotes aufgetrennt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation der einzelnen Suspensions-Fraktionen bei 10.000 rpm in der Tischzentrifuge wurden die einzelnen Pellets in 600 µl der jeweiligen Detergens aufgenommen. Der Vorgang des Lösens der Proteine erfolgte durch Einspannen der Detergens-Bakterien-Suspension für 30-120 Minuten in einen Rotations-Mischer bei 12 rpm. Die Präparation der nach dem Waschen auf der Oberfläche der Zellen verbliebenen Proteine erfolgte nach oben beschriebenen Protokoll.

### **Proteinextraktion mittels Ultraschall**

Die Präparation fest verankerter Zell-Oberflächen-Proteine erfolgte mittels Ultraschall. Hierzu wurde das in 1x PBS resuspendierte Pellet einer unter induzierten Bedingungen gewachsenen Expressionskultur in ein 15 ml Falcon-Tube überführt, auf Eis gestellt und mit insgesamt 4 Ultraschall-Stößen à 10 Sekunden bei einer Intensität von 70 % behandelt. Zwischen den einzelnen Impulsen ruhten die Zellen für je 30 Sekunden auf Eis. Die Trennung von Ultraschall-Extrakt und behandeltem Zellpellet erfolgte durch 5 minütige Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 10.000 rpm.

### **Proteinextraktion aus der Zellwand**

Das Zellpellet einer 50 ml Expressions-Kultur wurde nach einmaligem Waschen in 1x PBS in 600 µl Protoplastenpuffer aufgenommen und nach Hinzufügen von 4 µl Lysostaphin für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 5 Minuten konnten die bakteriellen Zellen von dem Lysostaphin-Extrakt und den darin enthaltenen Zellwand-assoziierten-Proteinen getrennt werden. Das gewonnene Protoplasten-Pellet wurde abschließend in 600 µl 0,1 % Triton-X-100 aufgenommen, wodurch die Zellmembran-assoziierten-Proteine herausgelöst werden konnten.

### **Fällung von Proteinen aus Überständen**

#### **Fällung aus Kulturüberständen**

Das durch die Zentrifugation einer induzierten Expressionskultur überstehende Wachstumsmedium wurde in ein neues Falcon-Tube überführt, 1:10 mit eiskalter Trichloressigsäure (TCA) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die hierdurch ausgefallenen Proteine wurden durch eine 30 minütige Zentrifugation, bei 4 °C und 13.000 rpm als leichter brauner Niederschlag an der Tube-Wand sichtbar. Um die TCA von den Proteinen zu trennen, wurde das entstandene TCA-Protein-Pellet in 150 µl Aceton aufgenommen, in ein neues Eppendorf-Tube überführt und erneut für 30 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Nachdem der TCA-Aceton-Überstand verworfen wurde, konnte das Proteinpellet durch eine 5 minütige Zentrifugation in der SpeedVAC vollständig getrocknet werden. Zur Weiterverarbeitung der Proteine wurden diese in 40 µl 4x LDS aufgenommen und für 5 Minuten in einem 70°C heißen Heizblock aufgeköcht.

#### **Fällung aus Zelloberflächenextrakten**

Die Präparation der durch Waschen oder Ultraschall aus dem Zellumschlag gelösten Proteine folgte dem gleichen Protokoll wie die Präparation der Proteine aus den Wachstumsmedien: Die Fraktionen der Wasch-Extrakte wurden jeweils 1:10 mit Trichloressigsäure (TCA) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde analog zur Fällung von Proteinen aus dem Wachstumsmedium verfahren.

## SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein elektrophoretisches Auftrennverfahren für Proteine. Kurzgefasst werden eingesetzte Proteine denaturiert und somit sekundäre und tertiäre Proteinstrukturen linearisiert. Zudem werden durch erzeugte SDS-Protein-Komplexe die Eigenladungen der aufgetragenen Proteine überdeckt, wodurch sich diese nur noch in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts zur Anode bewegen. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein vorgefärbter Proteinmarker mitgeführt.

Für die Elektrophorese wurde ein System aus zwei Acrylamid-Bisacrylamidgelen verwendet: einem Trenngel (unten) und einem Sammelgel (oben), die sich unter anderen im Hinblick auf den pH-Wert und Porengröße unterscheiden. Die Protein-Probe wird hierbei zunächst in dem Sammelgel konzentriert, bevor sie im Trenngel aufgetrennt wird. Diese Gele wurden nach folgender Zusammensetzung (**Tabelle 18**) selbst gefertigt und entsprachen in der Regel einem 8 %-igem Trenn- und einem 4 %-igem Sammelgel.

**Tabelle 18:** Zusammensetzung der selbst-hergestellten Trenn- und Sammelgele

	ddH <sub>2</sub> O	30% Degassed Acrylamide/Bis	Gel-Puffer	10% w/v SDS	APS	TEMED
<b>4 %- Sammelgel</b>	6,1 ml	1,3 ml	2,5 ml	0,1 ml	50 µl	10 µl
<b>8 %- Trenngel</b>	4,7 ml	2,7 ml	2,5 ml	0,1 ml	50 µl	5 µl
<b>10 %- Trenngel</b>	4,1 ml	3,3 ml	2,5 ml	0,1 ml	50 µl	5 µl

Nachdem die in 4x LDS aufgekochten Proteine in den Taschen des vollständig polymerisierten SDS-Gel aufgetragen wurden, fand die Elektrophorese in der Regel bei 150 V für 75-100 Minuten statt.

## **Kolloidale Coomassie-Färbung**

Die Visualisierung von Proteinbanden nach elektrophoretischer Auftrennung in der SDS-PAGE erfolgte mittels Coomassie-Färbung, bei der es zu einer irreversiblen Einlagerung des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue* in die Proteine kommt.

In dieser Arbeit wurde das SDS-Polyacrylamidgel zunächst mit der Coomassie-Lösung überschichtet (in etwa 40 ml) und für circa 10-20 Minuten auf einem Kipp-Schüttler gefärbt. Um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde es anschließend über Nacht oder aber wenigstens für 2 Stunden in der Entfärberlösung gewaschen. Das entfärbte SDS-Gel wurde zuletzt mit ddH<sub>2</sub>O gespült, auf Filterpapier gebracht und im Gelrockner getrocknet.

## **Western-Blot**

Der Transfer der zuvor in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran erfolgte mittels Elektroblot. Hierbei wandern die Proteine unter Einfluss eines diskontinuierlichen Puffersystems zur Anode und werden dabei auf der Nitrozellulosemembran immobilisiert.

Die PVDF-Membran wurde zunächst durch Schwenken in Methanol und Spülen im Blotting-Puffer aktiviert und anschließend luftblasenfrei auf das ungefärbte SDS-Gel gelegt. Jeweils über die Membran beziehungsweise unter das SDS-Gel wurde eine Lage feuchtes Filterpapier platziert, die Blotkammer zu beiden Seiten dieser Anordnung mit grobporigen Schwämmen gefüllt und verschlossen. Der eigentliche Transfer erfolgte bei einer Spannung von 25 V für 1 Stunde. Zur Fixierung der transferierten Proteine wurde die geblottete Membran über Nacht oder mindestens 1 Stunde mit steril-filtrierten BSA überschichtet und unter leichtem Schwenken bei 4 °C geblockt. Hierdurch sollten unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran abgesättigt werden.

## **Immundetektion**

Nachdem die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf die Polyvinylidifluorid-(PVDF)-Membranen übertragen wurden, erfolgte die Immundetektion der Proteinbanden mittels epitop-spezifischer Primärantikörper.

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle folgenden Inkubationsschritte bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator durchgeführt: Nach dem Blocken der geblotteten Membran wurde diese für 10 Minuten in PBS-T gewaschen und anschließend für 1 Stunde mit dem gewünschten, 1:1.000 in PBS-T verdünnten, epitop-spezifischen Antikörper, bei 4 °C inkubiert. Um nicht gebundene Primär-Antikörper zu entfernen, wurde die inkubierte Membran anschließend drei Mal für je 15 Minuten in PBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation bei 4 °C mit dem an Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper für 1 Stunde. Dieser Antikörper wurde hierzu ebenfalls 1:1.000 in PBS-T verdünnt. Nach einem letzten Waschen in PBS-T konnte die Immundetektion mittels Chemolumineszenz durch Zugabe einer 1:1 Mischung der Komponenten des verwendeten Western-Blotting-Kits durchgeführt werden. Die Dokumentation der Immunreaktion erfolgte mittels Röntgenfilm.

## **Präabsorption von polyklonalen Antiseren**

Zeigt ein Antikörper in der Immundetektion ein zu dominantes Hintergrund-Signal oder reagiert unspezifisch, kann das Ergebnis durch eine Präadsorption verbessert werden. Hierbei wird der zu verwendende Antikörper mit einem Aliquot nicht-exprimierender Zellen des Zielstammes inkubiert, wodurch unspezifisch bindende Anteile der Antikörper-Lösung eliminiert werden sollten.

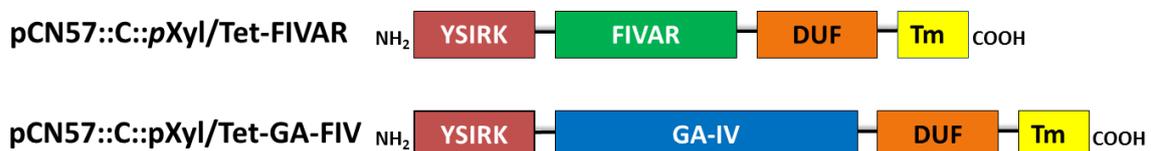
Hierzu wurde das Zellpellet einer 20 ml Über-Nacht-Schüttelkultur des nicht-induzierten und somit nicht-exprimierenden Zielstammes gewonnen und in 1,5 ml PBS aufgenommen. Nachdem der zu präadsorbierende Antikörper zugegeben wurde, wurde die entstandene Zellsuspension bei 4 °C für 2 Stunden bei 12 rpm Rotations-Inkubator eingespannt. Durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm unter 4 °C-Kühlung konnten die sich im PBS-überstand befindenden, präadsorbierten Antikörper von den Zellen getrennt werden und anschließend direkt weiterverwendet werden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Erzeugung von Plasmid-Konstrukten zur Analyse von Determinanten der Embp – Zelloberflächeninteraktion

Ziel dieser Dissertation war es, die strukturellen Determinanten der Bindung des *Extracellular matrix binding proteins* (Embp) auf der Oberfläche von *S. epidermidis* zu charakterisieren. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden in dieser Arbeit Plasmidkonstrukte erzeugt, welche die *in trans* Expression spezifischer Domänen mit putativer Funktion bei der Rekrutierung von Embp auf die Zelloberfläche erlauben sollten.

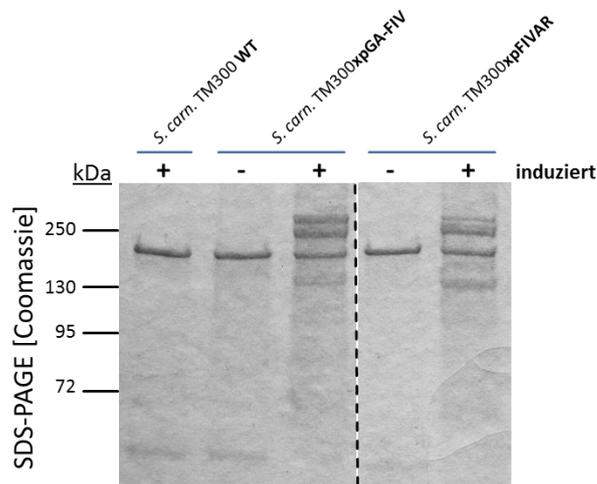
Als Vorarbeit für diese Dissertation lagen bereits zwei rekombinante Formen des Embp vor. Diese Plasmide, pCN57::C::pXyl/Tet-FIVAR (im Folgenden als pFIVAR bezeichnet) und pCN57::C::pXyl/Tet-GA-FIV (im Folgenden als pGA-FIV bezeichnet), sollten die Expression dieser Fusionsproteine in Staphylokokken unter Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promoters erlauben (Büttner, Wolters, nicht veröffentlicht). Am äußersten 5'-Ende kodieren beide Plasmide für ein YSIRK-Export-Motiv, am 3'-Terminus für vier DUF1542-Domänen sowie die putative Tm-Domäne. Somit entsprechen die Genprodukte beider Plasmide sowohl C- als auch N-terminal dem Embp-Gen. Unterschiede finden sich jedoch in der Repeat-Region: während pFIVAR hier für acht FIVAR-Motive kodiert (Embp<sub>7903-11079</sub>), finden sich bei pGA-FIV acht GA-Modul-FIVAR-Motiv-Tandemrepeats (Embp<sub>13516-17079</sub>) (**Abbildung 7**).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung von Konstrukten zur Expression von Embp-Fusionsproteinen in Staphylokokken.** Durch konventionelle Klonierungsstrategien wurden definierte Regionen von *embp* amplifiziert. Einerseits wurden für Embp<sub>FIVAR</sub> acht FIVAR-Motive (Embp<sub>7903-11079</sub>) (pCN57::C::pXyl/Tet-FIVAR) andererseits für Embp<sub>GA-FIV</sub> acht GA-Modul/FIVAR-Motive (Embp<sub>13516-17079</sub>) (pCN57::C::pXyl/Tet-GA-FIV) jeweils am 5' Ende mit dem Exportsignal sowie am 3' Ende mit dem putativen Zellwandanker fusioniert.

#### 4.2. *In trans* Expression von Embp<sub>FIVAR</sub><sup>-</sup> und Embp<sub>GA-FIV</sub>-Fusionsproteinen in *S. carnosus* TM300

Nachdem die Plasmide pFIVAR und pGA-FIV durch Elektroporation in *S. carnosus* TM300 eingebracht worden waren, sollte zunächst die generelle Funktionalität der Konstrukte geprüft werden. Hierzu wurden die Stämme *S. carnosus* TM300xpFIVAR und *S. carnosus* TM300xpGA-FIV in Gegenwart des Induktors Tetrazyklin angezüchtet. Nach sechs Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und die Zelloberflächen-assoziierten Proteine durch Aufkochen in LDS-Puffer extrahiert. Die Probe wurde anschließend im SDS-PAGE aufgetrennt und mittels nachfolgender Coomassie-Färbung dargestellt. Während bei den nicht-induzierten Kontrollen kein Unterschied der Proteinbandenmuster zum Wildtypstamm nachweisbar war, konnte bei beiden induzierten Stämmen eine zusätzlich Bande von etwa 250 kDa detektiert werden. Neben diesen 250 kDa Banden fanden sich jeweils reproduzierbar drei weitere, etwa 220 kDa, 190 kDa und 130 kDa große Proteine (Abbildung 8).

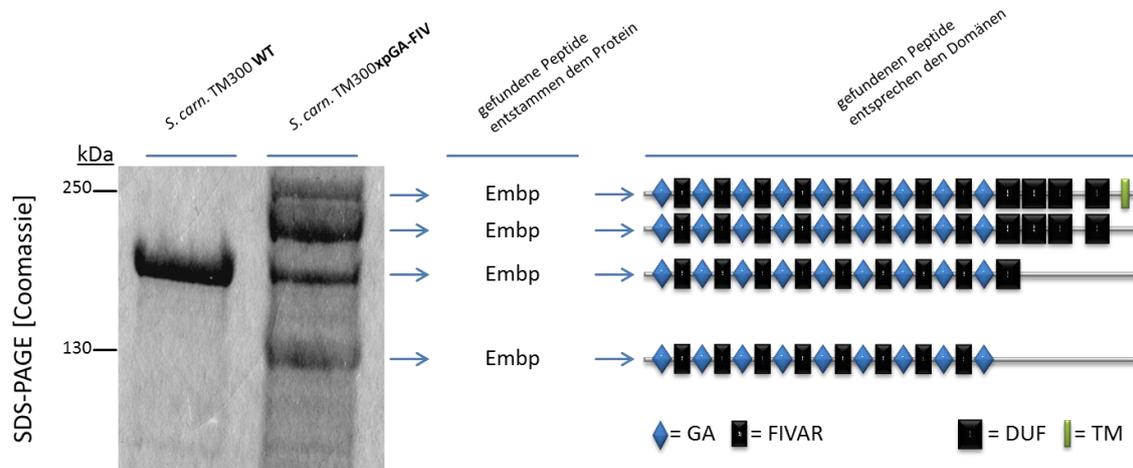


**Abbildung 8: Expression von Embp Fusionsproteinen in *S. carnosus*.** Die jeweiligen *S. carnosus* Stämme wurden in Gegenwart von Tetrazyklin angezüchtet und Oberflächen-assoziierte Proteine extrahiert sowie anschließend im SDS-PAGE analysiert. Die mit den jeweiligen Plasmiden transformierten Stämme exprimierten unter induzierenden Bedingungen (Spur 3 und 5) Proteine unterschiedlicher Größe, welche im Wildtyp nicht nachweisbar waren (Spur 1).

##### 4.2.1. Identifikation und Charakterisierung der putativen Embp-Fusionsproteine mittels ESI-Massenspektrometrie

Um die unter induzierenden Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle differentiell exprimierten Proteine zu identifizieren, wurden die Banden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und nach limitiertem tryptischen Verdau mittels ESI-Massenspektrometrie analysiert.

Hierbei zeigte sich, dass die Peptide der verdauten 250 kDa Bande der erwarteten Sequenz des Embp-Fusionsproteins zugeordnet werden konnten. Zudem konnten sowohl in der Protein-Präparation von *S. carnosus* TM300xpFIVAR als auch *S. carnosus* TM300xpGA-FIV die Peptide der 220, 190 beziehungsweise 130 kDa Bande ebenfalls den Embp-Fusionsproteinen zugeordnet werden (**Abbildung 9**).

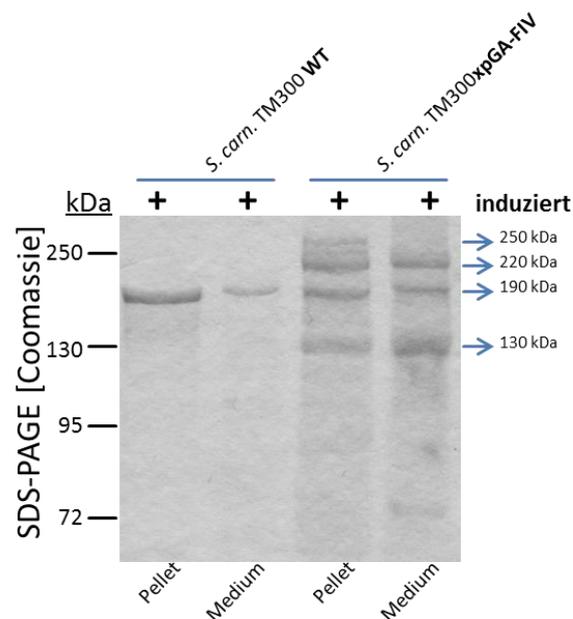


**Abbildung 9: Ergebnisse der ESI-Massenspektrometrie.** Alle vier zusätzlichen Proteine, isoliert von der Oberfläche des induzierten Stammes *S. carnosus* TM300xpGA-FIV, ließen sich auf die Sequenz von Embp projizieren. Während die 250 kDa große Form alle erwarteten Motive von Embp<sub>GA-FIV</sub> beinhaltet, fehlten diese zunehmend mit abnehmender Größe des Proteins. Dem 220 kDa großen Protein fehlte die Transmembran-(TM)-Domäne, dem 190 kDa Protein zusätzlich drei und dem 130 kDa großen Protein alle vier DUF1542-Domänen.

Bei der Betrachtung der Position der identifizierten Peptide innerhalb des erwarteten Embp-Konstrukts zeigte sich, dass bei den 220 kDa großen Isoformen keine Peptide der Transmembrandomäne (TM-Domäne) nachgewiesen wurden. Zusätzlich fehlten bei den 190 beziehungsweise 130 kDa großen Isoformen Peptide der hinteren drei (190 kDa Bande) beziehungsweise aller vier DUF1542-Domänen (130 kDa Bande). Hieraus wurde geschlossen, dass die *in trans* exprimierten Embp-Fusionsproteine in mindestens vier unterschiedlich großen Isoformen auf der Oberfläche von *S. carnosus* TM300 vorliegen: Einer 250 kDa Isoform, entsprechend dem vollständigen Fusionsprotein (Volllänge); einer 220 kDa Isoform ohne die TM-Domäne (Volllänge $\Delta$ TM); einer 190 kDa Isoform ohne Tm-Domäne und drei DUF1542 Motiven (Volllänge $\Delta$ 3DUF $\Delta$ TM) sowie einer 130 kDa Isoform ohne TM-Domäne und vier DUF1542 Motiven (Volllänge $\Delta$ 4DUF $\Delta$ TM).

#### 4.2.2. Präparation der Proteine des Kulturüberstandes

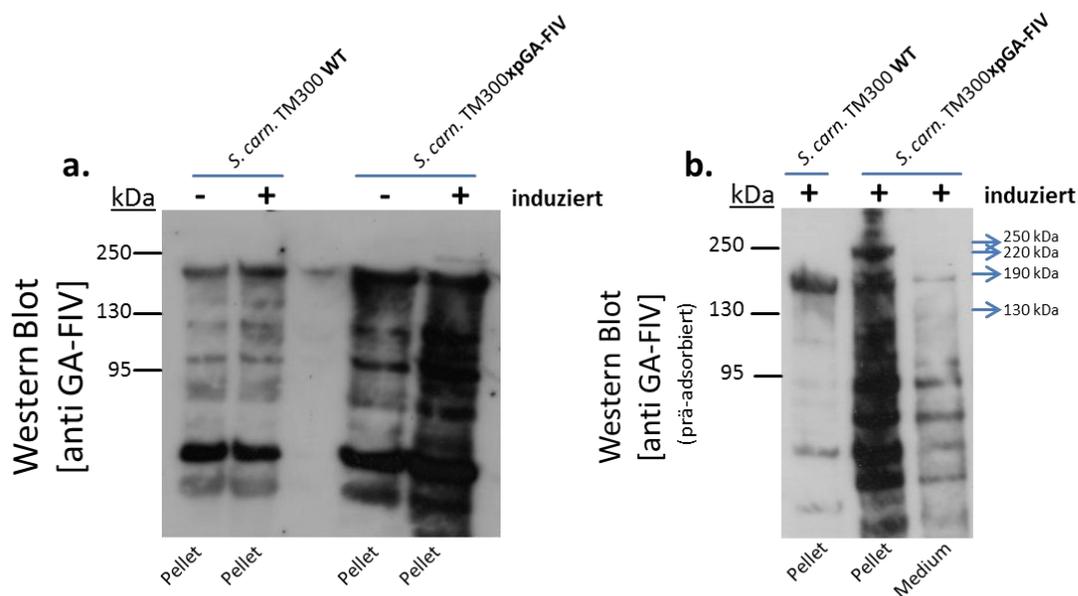
Da alle vier unterschiedlich großen Isoformen unabhängig von der Anwesenheit der putativen Transmembrandomäne auf der Zelloberfläche gefunden wurden, ergab sich als eine Hypothese, dass weder diese Domäne noch die DUF1542-Domänen essentiell für eine Oberflächenrekrutierung des Fusionsproteins sind. Ebenso erschien es möglich, dass sich die distinkten Embp-Isoformen hinsichtlich ihrer Affinität zur Oberfläche von *S. carnosus* unterscheiden. In diesem Fall sollten sich die verkürzten Embp-Isoformen vermehrt im Zellkulturüberstand wiederfinden. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Proteine des Kulturüberstandes von einer entsprechend den oben beschriebenen Bedingungen angesetzten *S. carnosus* TM300xpGA-FIV Kultur präpariert und mittels SDS-PAGE analysiert. Bei der Analyse der nachgewiesenen Proteine fanden sich unter induzierten Bedingungen Proteinbanden mit einer Größe von circa 220, 190 und 130 kDa. Diese entsprachen somit in ihrer Größe den bereits beschriebenen, verkürzten Isoformen der Embp-Fusionsproteine GA-FIV und FIVAR. Es fiel jedoch auf, dass die 250 kDa Bande, die dem vollständigen Genprodukt der Fusionsproteine entspricht und somit noch die TM-Domäne enthält, nicht im Medium (Kulturüberstand) detektierbar war (**Abbildung 10**). Dieses Ergebnis kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass die TM-Domäne die Freisetzung des vollständigen Fusionsproteins in den Kulturüberstand verhindert.



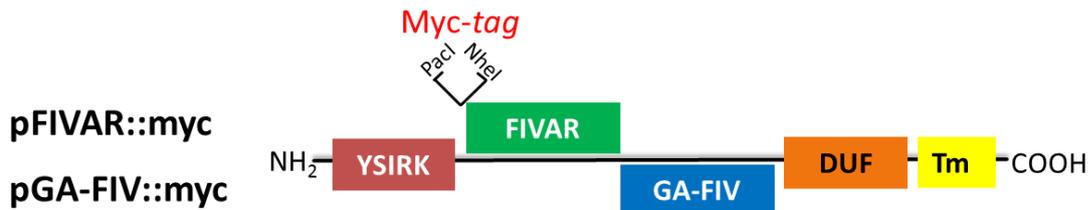
**Abbildung 10: Proteine der Zelloberfläche und des Wachstumsmediums.** Expression von Embp<sub>GA-FIV</sub> in *S. carnosus* TM300 unter induzierten Bedingungen. In der Protein-Präparation der Zelloberfläche (Spur 3) waren mindestens vier zusätzliche Banden sichtbar. Die mit circa 250 kDa größte dieser Banden fehlte in der Präparation des Überstandes (Spur 4).

### 4.3. Optimierung der Detektion von Embp-Fusionsproteinen im Immunoblot

Zur effizienten und spezifischen Detektion von Embp-Isoformen in Proteinpräparationen sollten Western-Blot Analysen durchgeführt werden. Die Detektion der Embp-Isoformen erfolgte hierbei unter Verwendung polyklonaler anti-rEmbp6559-(anti-FIVAR) beziehungsweise anti-rEmbp2558-(anti-GA-FIV) Kaninchenantisera [93]. In ersten Untersuchungen konnte jedoch eine Reaktivität dieser Antiseren mit Embp-unabhängigen *S. carnosus* Oberflächenproteinen nachgewiesen werden. Diese unspezifische Bindungsaktivitäten konnten auch durch Präabsorption der Seren an dem *S. carnosus* TM300 Wildtyp nicht vollständig eliminiert werden (**Abbildung 11**). Aus diesem Grund sollte am Übergang zwischen dem N-terminalen YSIRK-Exportsignal und der FIVAR- beziehungsweise GA-FIV kodierenden Region ein 47 Basenpaar großes Myc-tag integriert werden (**Abbildung 12**).

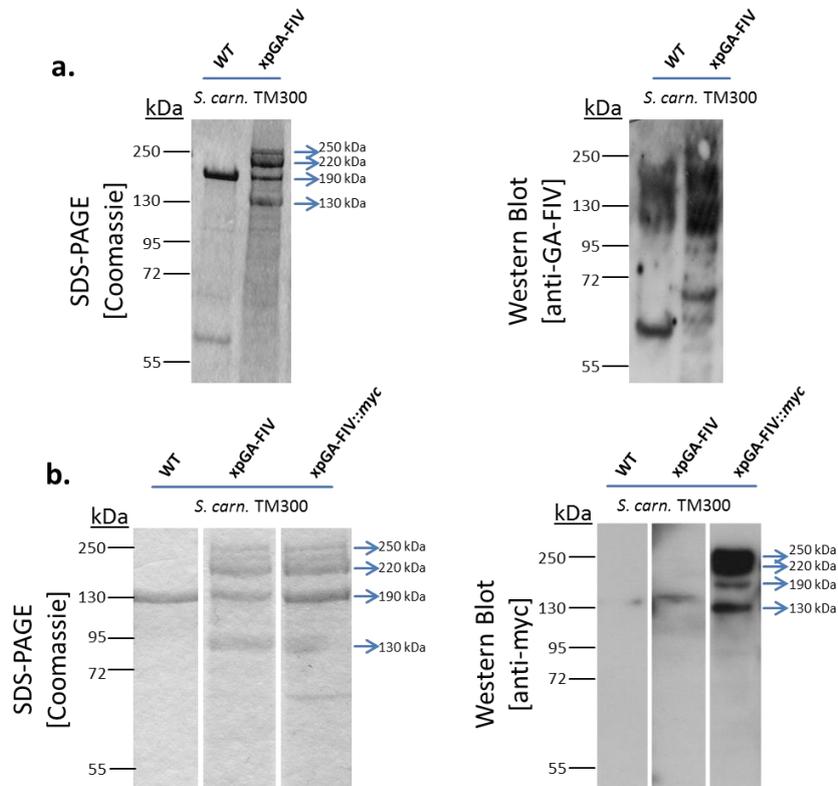


**Abbildung 11: Analyse der Reaktivität von polyklonalen anti-rEmbp Antiseren.** Die Zellwand-assoziierte Proteine des Stammes *S. carnosus* TM300-Wildtyp sowie des pGA-FIV tragenden Klons wurden nach Kultur mit und ohne Tetrazyklin-Induktion präpariert, im SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran unter Verwendung des anti-rEmbp2588 Antiserums vor und nach Präabsorption im Western-Blot untersucht. Hierbei zeigte die Detektion der Embp-Isoformen in Proteinpräparationen mittels Chemilumineszenz unter der Verwendung eines anti-Embp<sub>GA-FIV</sub> Antikörpers, vor der Absorption eine ungenügende Spezifität (**a**). Diese ließ sich auch durch Präabsorption des Serums am *S. carnosus* TM300-Wild-Typ-Stamm nicht vollständig eliminieren (**b**).

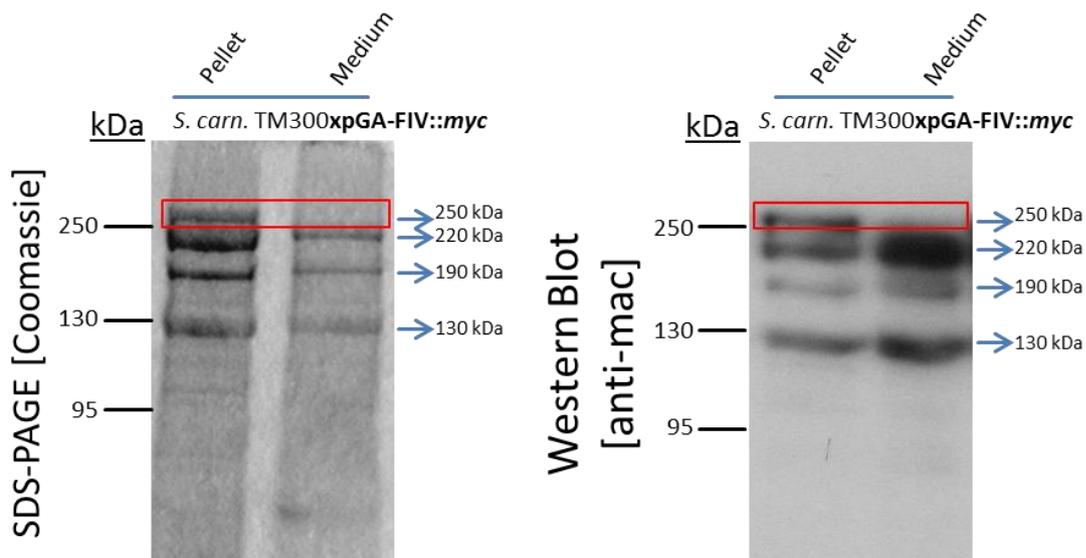


**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Integration eines Myc-tag in pFIVAR sowie pGA-FIV.** Das Myc-tag wurde amplifiziert und nach Spaltung der Plasmide mittels Pacl und NheI durch T4-Ligation zwischen das N-terminale YSIRK-Export-Motiv und die Repeat-Domänen der beiden rekombinanten Embp-Fusionsproteinen eingebracht.

Die erfolgreiche Klonierung des *myc*-kodierenden Insert in die Plasmide pFIVAR und pGA-FIV wurde durch Sequenzierung bestätigt und beide Plasmide (pFIVAR::myc; pGA-FIV::myc) wurden mittels Elektroporation in *S. carnosus* TM300 eingebracht. Die SDS-PAGE Analyse der Oberflächenproteine von *S. carnosus* TM300xpFIVAR::myc und *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::myc zeigten nach Coomassie-Färbung im Vergleich zu den Ergebnissen unter Verwendung der *myc*-freien Konstrukte keine Veränderungen auf (**Abbildung 13b**). In der Analyse dieser Proteinpräparationen im Western Blot unter Verwendung von anti-*myc*-IgG kam es zu Detektion von Proteinen lediglich in Proben des induzierten *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::myc, nicht jedoch bei Protein von *S. carnosus* TM300 oder *S. carnosus* TM300xpGA-FIV (**Abbildung 13b**). Die verbesserte Spezifität der Detektion von Embp<sub>FIVAR</sub> und Embp<sub>GA-FIV</sub> durch anti-*myc*-IgG konnte auch bei Analyse der Kulturüberstände nachvollzogen werden (**Abbildung 14**).



**Abbildung 13: Verbesserter Protein-Nachweis Myc-markierter Embp-Fusionsproteine.** Zellwand-assoziierte Proteine der unter Tetrazyklin-Induktion inkubierten Stämme *S. carnosus* TM300 Wildtyp sowie der pGA-FIV und pGA-FIV::myc tragenden Klone wurden gewonnen und im SDS-PAGE aufgetrennt. Während die Detektion der präparierten Embp-Isoformen unter Verwendung des bis hierhin verwendeten anti-rEmb2588-Antikörpers (anti-GA-FIV) keine ausreichende Spezifität aufwies (a), zeigte die Chemilumineszenz des neuen Antikörpers (anti-myc) eine deutlich verbesserte Spezifität (b).



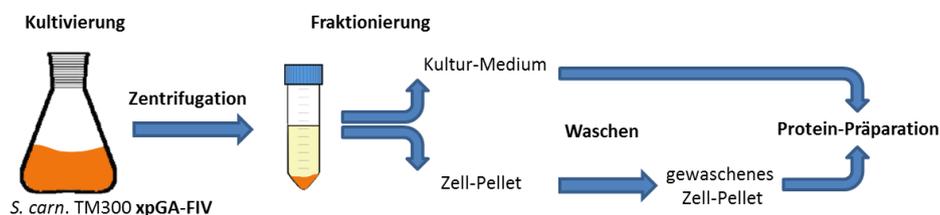
**Abbildung 14: Präparation der Proteine aus dem Überstand von *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::myc.** Durch einen anti-myc-Western-Blot konnten die zuvor gemachten Beobachtungen bestätigt werden: Die 250kDa große Form von Embp<sub>GA-FIV</sub> fand sich nicht im Kulturüberstand. Somit verhindert das Vorhandensein einer TM-Domäne die Freisetzung von Embp<sub>GA-FIV</sub> in das Wachstumsmedium.

## 4.4. Analyse der Rekrutierung unterschiedlicher Embp-Fusionsproteine an die *S. carnosus* Zelloberfläche

### 4.4.1. Präparation der Oberflächenproteine durch chaotroper Detergenzien

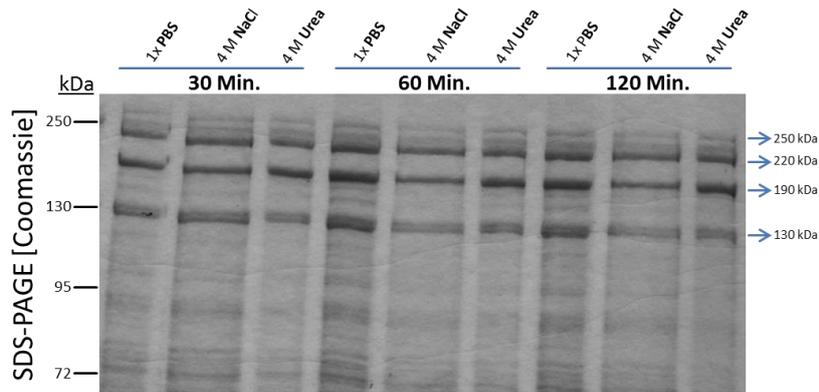
Aufgrund des Fehlens eines N-terminalen LPXTG-Motivs ist es wahrscheinlich, dass Embp nicht-kovalent an die Zelloberfläche gebunden wird [94]. Im nächsten Schritt sollte daher die Frage bearbeitet werden, ob die verkürzten Embp-Isoformen im Vergleich zum vollständigen Fusionsprotein eine veränderte Affinität zur bakteriellen Zelloberfläche aufweisen. Die erzielten Ergebnisse könnten Hinweise darauf geben, ob die TM-Domäne oder aber die DUF1542-Motive an der Rekrutierung von Embp an die Zelloberfläche beteiligt sind.

Unter der Annahme, dass für die Bindung von Embp elektrostatische Wechselwirkungen relevant sein könnten, wurden Experimente durchgeführt, bei welchen Embp<sub>GA-FIV::myc</sub>-tragende Zellen mit 4M NaCl oder 4M Urea gewaschen wurden (**Abbildung 15**).



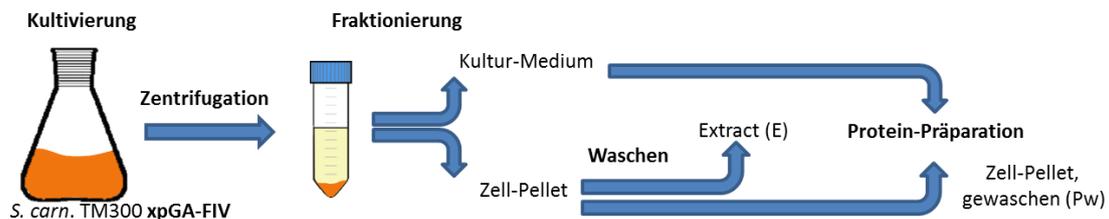
**Abbildung 15: Extraktion von Zelloberflächenproteinen durch chaotrope Puffer - schematischer Versuchsaufbau.** Das unter induzierten Bedingungen geerntete Zellpellet von *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::myc wird mit verschiedenen Puffern gewaschen und anschließend die auf der Oberfläche verbliebenen Proteine präpariert.

Anschließend wurden die Zelloberflächenproteine dieser Zellen präpariert und im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE analysiert. Als Kontrolle wurde eine Fraktion der *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::myc Kultur ebenso lang mit PBS gewaschen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass sich auch nach zwei-stündigem Waschen der Zellen mit 4M Urea und 4M NaCl weiterhin die scheinbar gleiche Menge an Proteinen von der Zelle präparieren ließ wie es nach einem kurzen, 30-minütigem Waschen mit 1xPBS möglich war (**Abbildung 16**, vergleiche Spur 6 und 9 mit Spur 1).



**Abbildung 16: Expression von Embp<sub>GA-FIV</sub> in *S.carnosus* TM300, Behandlung der Zelloberfläche mit Detergenzien.** Präparation der Oberflächenproteine nach Waschen der Zellen mit 1xPBS, 4M NaCl beziehungsweise 4M Urea. Auch nach 2-stündiger Applikation (Spur 6 und 9) von chaotropen Puffern fand sich unverändert viel Protein auf der Zelloberfläche (verglichen mit Kontroll-Spur 1). Aus diesem Grund kann von einer starken Bindung des Embp<sub>GA-FIV</sub>-Proteins an die Oberfläche ausgegangen werden.

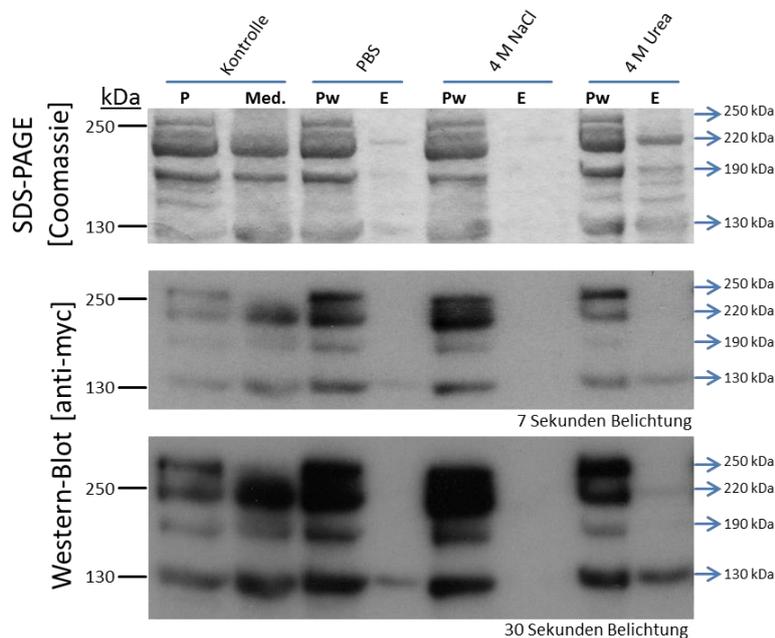
Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass aufgrund der hohen Konzentration der Isoformen auf der Zelloberfläche, subtile quantitative Unterschiede im SDS-PAGE nicht darstellbar waren. Auch bei diesen vermeintlich diskreten Unterschieden in der Bindungsstärke, sollte es zu einer vermehrten Freisetzung in den Waschpuffer kommen sollte. Unter dieser Annahme wurden daher parallel zu den Zellwandproteinen gewaschener TM300 Zellen (im Folgenden als *pellet washed* [Pw] bezeichnet) auch die in den eingesetzten Waschpuffern gelösten Proteine (im Folgenden als Extrakte [E] bezeichnet) analysiert (**Abbildung 17**).



**Abbildung 17: Waschen der Zellen mit Detergenzien und Isolation des Extraktes, schematisches Versuchsprotokoll.** Die Zellen einer induzierten Kultur des Stammes *S.carnosus* TM300xpGA-FIV::myc werden geerntet und das Pellet anschließend mit verschiedenen Detergenzien gewaschen. Die im so erzeugten Überstand gelösten Proteinen (E) können so den auf der Oberfläche verbliebenen Proteinen (Pw) gegenübergestellt werden.

Die vergleichende Analyse der Proteine in „Pw“ und „E“ im Western-Blot zeigt, dass in E [PBS] und E [NaCl] weder im Coomassie gefärbten SDS-PAGE noch im anti-myc-Western Blot relevante Mengen der Embp-Isoformen darstellbar waren (**Abbildung 18**). In E [Urea] jedoch konnten im Western-Blot spezifische Signale detektiert werden, wobei insbesondere die 130 kDa sowie, deutlich schwächer, die 220 und 190 kDa GA-FIV Isoform zur Darstellung

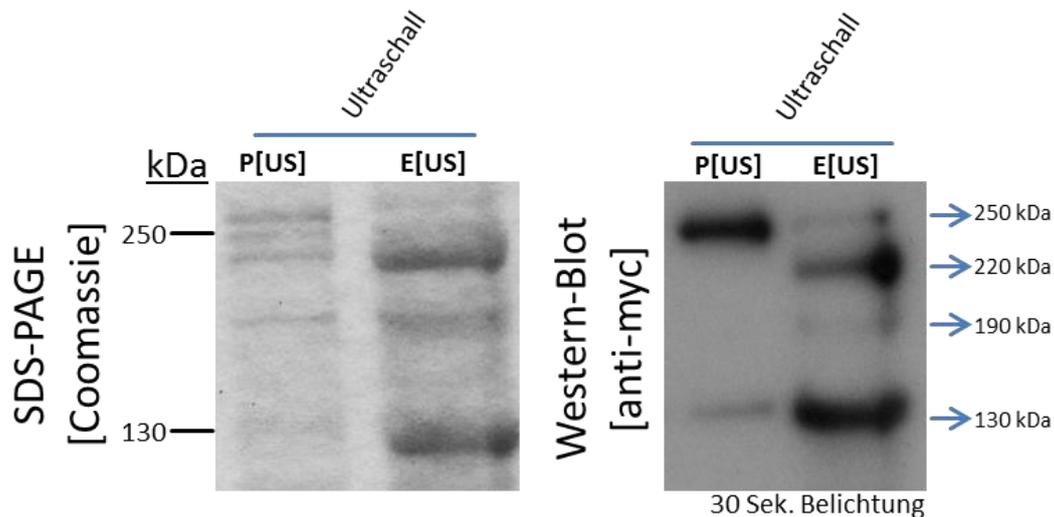
kamen (**Abbildung 18**). Die Ergebnisse dieser Untersuchung können als Hinweis dafür gewertet werden, dass die 130 kDa Embp<sub>GA-FIV</sub>-Isoform im Vergleich zu den 190 und 220 kDa Isoformen eine verminderte Affinität zur Zelloberfläche aufweist. Da unter keiner Bedingung die 250 kDa Isoform extrahiert werden konnte, scheint diese Isoform besonders fest an der Oberfläche verankert zu sein.



**Abbildung 18: Expression von Embp<sub>GA-FIV</sub>, Isolation eines Wasch-Extraktes nach Detergenzien-Behandlung.** In den Extrakt-Fractionen der einzelnen chaotropen Substanzen (Spur 4, 6 und 8) fanden sich lediglich geringe Mengen der zuvor auf der Oberfläche gebundenen Proteine. Der Großteil der exprimierten Proteine ließ sich auch nach dem Waschen weiterhin auf der gewaschenen Zelloberfläche (Spur 3, 5, und 7) nachweisen.

#### 4.4.2. Präparation der Oberflächenproteine durch Ultraschallbehandlung

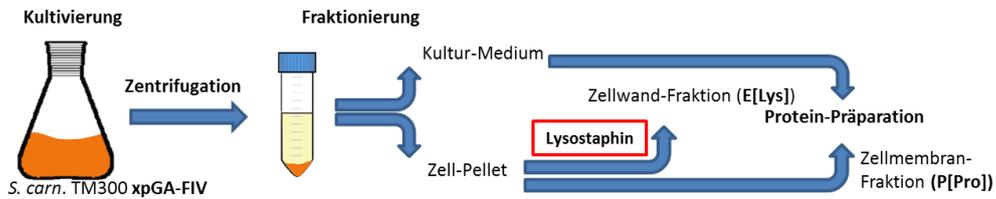
Diese neue Hypothese sollte im Weiteren durch die Analyse von durch Ultraschallapplikation gewonnenen Zelloberflächenextrakten (Extrakt, E[US]) von *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::myc geprüft werden. Diese wurden den auch nach der Ultraschallbehandlung auf der Oberfläche zurückgehaltenen Proteine (Pellet, P[US]) gegenübergestellt (**Abbildung 19**). In E [US] waren sowohl im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE als auch im anti-myc-Western Blot kräftige, myc-spezifische Banden sichtbar, wobei insbesondere die 220 kDa, 190 kDa und 130 kDa Embp<sub>GA-FIV</sub>-Isoform nachgewiesen werden konnten. Gleichzeitig kam es zu Änderungen des Bandenmusters der Embp<sub>GA-FIV</sub>-Isoformen in P[US]: hier ließ sich fast ausschließlich die 250 kDa Isoform im Western-Blot nachweisen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass für eine besonders stabile Rekrutierung von Embp<sub>GA-FIV</sub> das Vorliegen der TM Domäne kritisch ist. Jedoch sind weder eine TM-Domäne noch DUF1542-Domänen notwendige Voraussetzung für eine Oberflächenlokalisation des exprimierten Embp<sub>GA-FIV</sub>-Proteins.



**Abbildung 19: Expression von Embp<sub>GA-FIV</sub> in *S. carnosus* TM300, Behandlung der Zelloberfläche mit Ultraschall.** Ein Embp<sub>GA-FIV</sub>-exprimierendes Zellpellet wurde mit Ultraschallstößen behandelt und anschließend die gelösten Proteine dem behandelten Zellpellet gegenübergestellt. Hierbei fanden sich in der Extrakt-Fraktion E[US] große Mengen an Protein, was für eine ausgeprägte Mobilisation der Fusionsproteine von der Zelloberfläche spricht. Der Großteil der 250 kDa großen Embp<sub>GA-FIV</sub>-Bande fand sich auch nach der Behandlung auf der Zelloberfläche. Die Affinität des vollständigen Fusionsproteins, inklusive der Tm-Domäne ist somit stark genug, um der Einwirkung mehrerer Ultraschall-Impulse zu widerstehen.

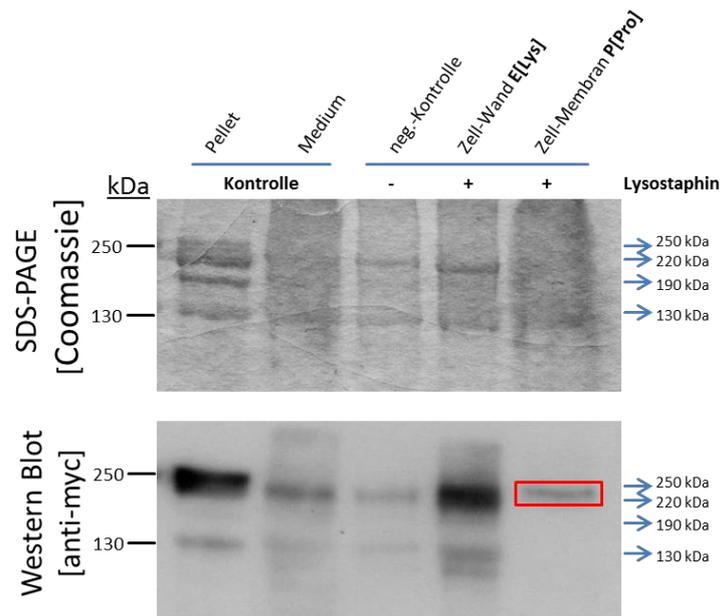
#### 4.4.3. Untersuchung einer möglichen Membranverankerung von Embp<sub>GA-FIV</sub>

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass insbesondere die 250 kDa große Isoform von Embp<sub>GA-FIV</sub> sehr stabil auf der Oberfläche von *S. carnosus* rekrutiert wird. Im Unterschied zu den kleinere, unter anderem durch Ultraschall extrahierbaren Embp<sub>GA-FIV</sub>-Isoformen weist diese eine erhaltene TM-Domäne auf. Es sollte daher die Frage untersucht werden, ob die TM-Domäne Embp<sub>GA-FIV</sub> tatsächlich in der Zellmembran verankert. Um diese Frage zu beleuchten, wurden Proteinpräparationen von Protoplasten von *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::myc hinsichtlich der Anwesenheit der 250 kDa Embp<sub>GA-FIV</sub>-Isoform analysiert. Hierzu wurden *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::myc Zellen nach sechs Stunden Wachstum unter induzierenden Bedingungen geerntet, das Pellet in einem hypertonen Saccharose-Puffer aufgenommen und mit Lysostaphin behandelt. Durch die enzymatische Aktivität des Lysostaphins wurde eine Degradation des Peptidoglykans erreicht. Somit wurden alle Zellwand-gebundenen Proteine (Extrakt, E[Lys]) freigesetzt, die anschließend mittels Zentrifugation und Pelletierung der Protoplasten von den Zellmembran-assoziierten Proteinen getrennt werden konnten (P[Pro]) (**Abbildung 20**).



**Abbildung 20: Präparation einer Zellwand- und Zellmembran-Fraktion, schematisches Versuchsprotokoll.**

Nach dem Ernten von induzierten *S.carnosus* TM300xpGA-FIV::*myc*-Zellen wird das Pellet in einen hypertonen Puffer aufgenommen und mit Lysostaphin behandelt. Hierdurch kommt es zu einer Degradation des Peptidoglykans, wodurch alle Zellwand-gebundenen Proteine freigesetzt und anschließend mittels Zentrifugation von den Zellmembran-assoziierten Proteinen getrennt werden können.

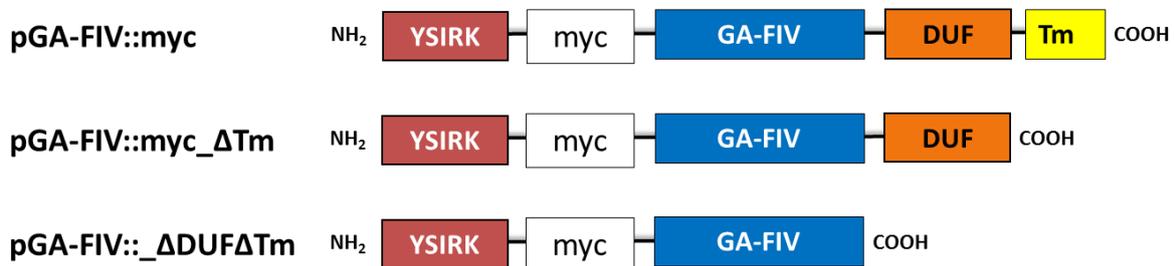


**Abbildung 21: Isolierung einer Zellwand- und einer Zellmembran-Fraktion.** Das Lysostaphin-Extrakt (E[Lys], Spur 4) entsprach hierbei der Zellwand- und die lysierten Protoplasten (P[Pro], Spur 5) der Zell-Membran-Fraktion. Innerhalb des heterogenen, hochmolekularen Schmieres der Protoplasten fand sich eine isolierte, 250 kDa große anti-myc-reagible Proteinbande (rot hervorgehoben). Aus diesem Grund scheint das 250 kDa große Embp<sub>GA-FIV</sub> in der Tat Zellmembran-gebunden zu sein.

In E[Lys] ließen sich im Western-Blot anti-myc-IgG reaktive Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 220, 190, 130 und sogar 120 kDa nachweisen. Diese entsprechen den bereits beschriebenen, verkürzten Isoformen von GA-FIV. In P[Pro] fand sich im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE ein hochmolekularer Schmier, in dem nach Durchführung eines anti-myc-Western Blot jedoch eine einzelne, 250 kDa große Protein-Bande zur Darstellung kam. Jedoch konnte keine der verkürzten Embp<sub>GA-FIV</sub>-Isoformen in P[Pro] nachgewiesen werden (**Abbildung 21**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in der Tat die 250 kDa, TM-Domäne positive Embp<sub>GA-FIV</sub> Isoform in der Zellmembran verankert vorliegt. Alle anderen Embp<sub>GA-FIV</sub> Isoformen scheinen insbesondere durch Wechselwirkungen mit der Zellwand auf der Oberfläche von *S. carnosus* zu binden.

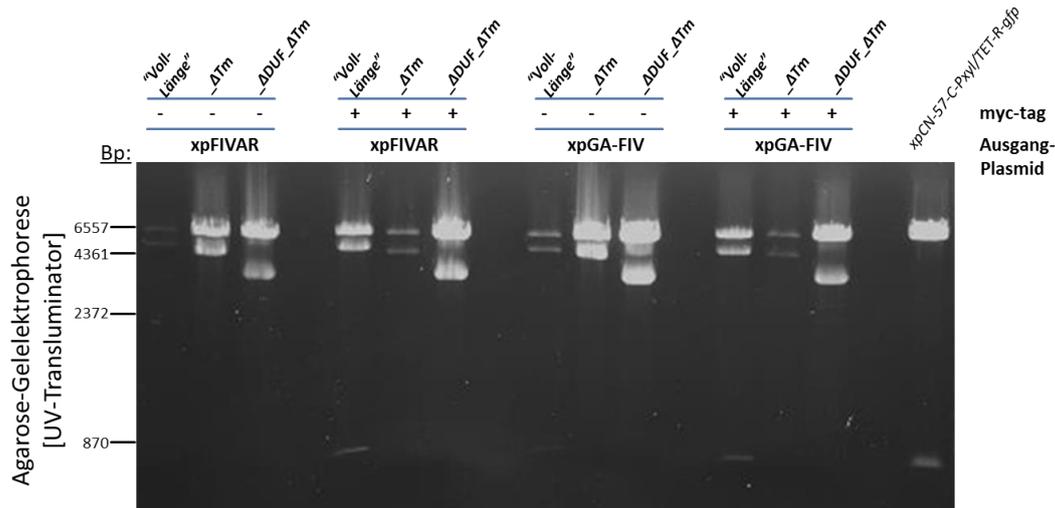
#### 4.5. Herstellung von systematisch verkürzten Varianten der rekombinanten Fusionsproteine Embp<sub>FIVAR</sub> und Embp<sub>GA-FIV</sub>

Um die bisher gezogenen Schlüsse und aufgestellten Hypothesen über die Verteilung und das Verhalten von Embp<sub>GA-FIV</sub> auf der Zelloberfläche von *S. carnosus* zu Isoformen systematisch zu verifizieren, sollten gezielt verkürzte Formen der Embp-Fusionsproteine Embp<sub>FIVAR</sub> und Embp<sub>GA-FIV</sub> hergestellt werden. Die Konstrukte wurden so gestaltet, dass sie die gezielte *in trans* Expression der gefundenen 220 und 130 kDa großen Isoformen erlaubten (**Abbildung 22**). Die Plasmide wurden hierbei wie folgt benannt: pGA-FIV::*myc*\_ΔTm (kodierend für Export Signal, GA-FIV und DUF1542), pGA-FIV::*myc*\_ΔDUFΔTm (kodierend für Export Signal und GA-FIV), pFIVAR::*myc*\_ΔTm (kodierend für Export Signal, FIVAR und DUF1542), pFIVAR::*myc*\_ΔDUFΔTm (kodierend für Export Signal und FIVAR).



**Abbildung 22: Konstruktion von verkürzten Varianten der rekombinanten Fusionsproteine Embp<sub>FIVAR</sub> und Embp<sub>GA-FIV</sub>, schematisches Versuchsprotokoll.** Durch *InFusion cloning* wurden verkürzte Formen der vorliegenden Fusionsproteine Embp<sub>FIVAR</sub> und Embp<sub>GA-FIV</sub> (hier dargestellt) erzeugt. Hierbei entsprechen die Genprodukte dieser Plasmide den in den Vorversuchen nachgewiesenen, verkürzten Formen von Embp<sub>GA-FIV/FIVAR</sub> (Vergleiche mit **Abbildung 6**).

Hierzu wurden die korrespondierenden Abschnitte aus pGA-FIV::*myc* und pFIVAR::*myc* amplifiziert und nach individueller Adaptation des Durchführungsprotokolls mittels *InFusion cloning* in den bereits verwendeten pCN57::*C::pXyl/Tet*-Vektor kloniert. Mit Hilfe spezifischer Primer war es zudem möglich, die gewünschten Genabschnitte um die Palindromsequenzen der Restriktionsenzyme *Ascl* beziehungsweise *Eco-RI-HF* zu ergänzen, was eine schnelle und zugleich sichere Identifikation der erzeugten Klone ermöglichte (**Abbildung 23**). Nachdem die Korrektheit der klonierten Konstrukte mittels Sequenzierung bestätigt wurde, konnten diese für weitere Untersuchungen in den Expressionsstamm *S. carnosus* TM300 eingebracht werden.

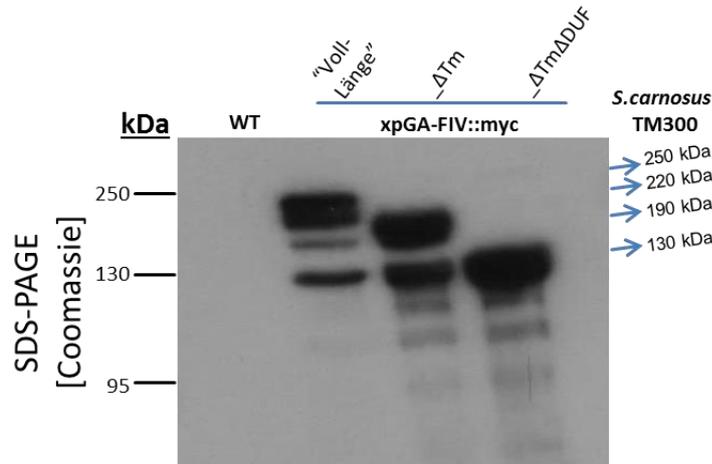


**Abbildung 23: Restriktionsverdau der konstruierten Plasmide.** Restriktionsverdau der neu konstruierten Plasmide, aufgetragen neben ihren Ausgangsformen (Spur 1, 4, 7 und 10). Die jeweils größten Banden (circa 6700 Basenpaare) entsprachen dem Vektor-*backbone*. Dieser ist zur Kontrolle ebenfalls aufgetragen (Spur 13).

#### 4.5.1. Expression der verkürzten Varianten von pGA-FIV::*myc* in *S. carnosus* TM300

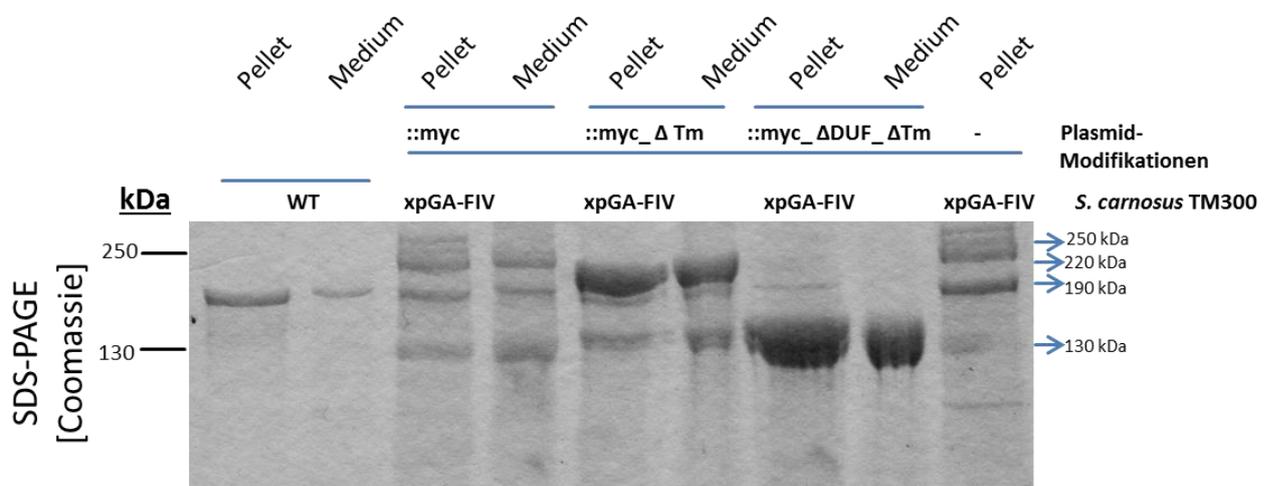
Die Plasmide zur *in trans* Expression verkürzter Embp<sub>GA-FIV</sub> und <sub>-FIVAR</sub> Isoformen sollten nun hinsichtlich ihrer Funktionalität in *S. carnosus* geprüft werden. Hierzu wurden *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::*myc*<sub>ΔTm</sub> und *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::*myc*<sub>ADUFΔTm</sub> unter induzierenden Bedingungen für sechs Stunden angezüchtet und anschließend die Oberflächenproteine durch Aufkochen der Bakterien präpariert. Die Zelloberflächen-assoziierten Proteine wie auch die Proteine der zuvor asservierten und nun konzentrierten Kulturüberstände wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot unter Verwendung des anti-*myc*-IgG analysiert. Als Referenz dienten *S. carnosus* TM300 und *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::*myc*.

In der vergleichenden Analyse der Präparationen von *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::*myc*<sub>ΔTm</sub> und von *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::*myc*<sub>ADUF\_ΔTm</sub> mit den Oberflächenproteinen von *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::*myc*, zeigten sich die erwarteten Protein-Bandenmuster. Während bei *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::*myc* vier GA-FIV Isoformen (250, 220, 190, 130 kDa) nachgewiesen werden konnten, so zeigten sich bei *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::*myc*<sub>ΔTm</sub> drei Banden (korrespondierend zu 220, 190 und 130 kDa), bei *S. carnosus* TM300xpGA-FIV::*myc*<sub>ADUF\_ΔTm</sub> jedoch nur eine Bande (korrespondierend zur 130 kDa Isoform) (**Abbildung 24**).



**Abbildung 24: Expression der verkürzten  $Embp_{GA-FIV}$ -Formen in *S.carnosus* TM300.** Immunoblot der aufgetrennten Oberflächenproteinpräparationen induzierter Kulturen von *S.carnosus* TM300xpGA-FIV::myc (Spur 2) , -xpGA-FIV::myc\_ΔTm (Spur 3) und -xpGA-FIV::myc\_DUF\_ΔTm (Spur 4). Hierbei entsprachen die anti-myc-reagiblen Proteinbanden der neu hergestellten Expressionsstämme dem anhand der Vorversuche erwarteten Muster (vergleiche **Abbildung 6** und **19**). Zudem lies sich auch bei den verkürzten  $Embp_{GA-FIV}$ -Formen die zuvor beobachtete Prozessierung der exprimierten Proteine nachweisen.

Die gezielt erzeugten, verkürzten  $Embp_{GA-FIV}$ -Isoformen ließen sich ebenso in den konzentrierten Kulturüberständen von TM300xpGA-FIV::myc\_ΔTm und von TM300xpGA-FIV::myc\_ΔDUF\_ΔTm nachweisen (**Abbildung 25**). Diese Beobachtungen entsprachen der bereits beschriebenen Analyse von TM300xpGA-FIV::myc (**Abbildung 14**), die gezeigt hatte, dass vor allem die TM-Domäne-freien  $Embp_{GA-FIV}$  Isoformen in den Überstand freigesetzt werden.



**Abbildung 25: Expression der verkürzten  $Embp_{GA-FIV}$ -Formen in *S.carnosus* TM300, Präparation der Überstände.** Die selektiv verkürzten Formen von  $Embp_{GA-FIV}$  ließen sich wie erwartet auch in den Überständen der jeweiligen Expressionskulturen wiederfinden (Spuren 4, 6 und 8).

## 5. Diskussion

*S. epidermidis* stellt den Großteil der üblicherweise apathogen humanen Hautflora dar [101]. Unter bestimmten, prädisponierenden Bedingungen [13] kann jedoch auch *S. epidermidis* Infektionen auslösen. Bedeutendster Risikofaktor für eine solche opportunistische Infektion ist die Implantation von medizinischem Fremdmaterial [6, 102]. Die Infektion medizinischer Fremdkörper ist stark abhängig von der Erreger-Fähigkeit zur Biofilmbildung [103], einem multifaktoriellen Phänotyp des bakteriellen Zellwachstums [3]. Diese Faktoren betreffen jeweils spezifische Bereiche in der Interaktion mit der zur besiedelnden Oberfläche oder dem Immunsystem des Wirtes [19]. Einer der klinisch am häufigsten nachgewiesenen Virulenzfaktoren ist das 1 MDa große *Extracellular matrix binding protein* Embp [82, 83]. Neben seiner weiten Verbreitung kommt dem Embp insofern eine bedeutende klinische Relevanz zu, da Embp suffizient für eine eigenständige Biofilmbildung ist [94].

Zielsetzung dieser Dissertation war es, die Entstehung von Embp-abhängigen *S. epidermidis* Biofilmen besser zu verstehen. Funktionell konnte bereits frühzeitig Fibronectin als Embp-Interaktionspartner identifiziert [92] und die Kontrolle der Embp-Synthese über das *sarA*-Expressionssystem beschrieben werden [95]. Mikroskopische Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass Embp nach dem Export auf der bakteriellen Zelloberfläche rekrutiert wird [44]. Die an diesem Prozess beteiligten strukturellen Determinanten von Embp sind bislang jedoch unbekannt. Bisher konnten mittels bioinformatischer Analyse von Embp lediglich potentielle Domäne für diese Bindung identifiziert werden [94]. Es war somit Ziel dieser Arbeit, diese Hypothesen durch geeignete genetische und proteinchemische Analysemethoden zu überprüfen.

Auf Grund seiner Größe von über 1 MDa ist es nahezu unmöglich, das Embp-Protein in seiner vollen Länge biochemisch zu analysieren. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Konstrukte etabliert, welche die gezielte Expression von rekombinanten Embp-Fusionsproteinen ermöglichen sollten. Hierbei wurde das Export-Motiv mit den C-terminal gelegenen DUF1542- und der TM-Domäne fusioniert. Zwischen das Exportmotiv und diese putativen Strukturen der Zellwandrekrutierung wurden entweder acht FIVAR-Repeats oder acht FIVAR-GA-Tandemrepeats eingebracht. Die entsprechenden Plasmide pCN57::C::pXyl/Tet-FIVAR (im Folgenden als pFIVAR bezeichnet) und pCN57::C::pXyl/Tet-GA-FIVAR (im Folgenden als pGA-FIV bezeichnet) wurde dann in den Expressionsstamm *Staphylococcus carnosus* transformiert.

### 5.1. Expression von rekombinanten Embp-Fusionsproteinen

Unter induzierten Bedingungen wurden die *in trans* exprimierte Fusionsproteine auf der Oberfläche transformierter *S. carnosus* TM300 rekrutiert. Somit zeigte sich, dass die Plasmidkonstrukte funktionell aktiv und die *in trans* exprimierte Embp-Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Lokalisation dem vollständigen Embp entsprachen. Bei der Analyse von Proteinpräparationen im Western-Blot wie auch im SDS-PAGE fanden sich jedoch unterschiedlich lange Formen dieser Proteine. Die größte, 250 kDa große Bande entsprach dem erwarteten Genprodukt, während die mit einer Größe von jeweils 220, 190 beziehungsweise 130 kDa kleineren Banden auf eine partielle, möglicherweise proteolytische Prozessierung des Proteins hindeuten. Es konnte gezeigt werden, dass dem Protein der 220 kDa großen Bande die TM-Domäne fehlt. Der 180 kDa großen Form fehlen zusätzlich drei der vier DUF1542-Domänen, während die 130kDa große Bande lediglich aus den GA-FIVAR-Repeats besteht. Jede dieser verkürzten Formen, nicht jedoch das vollständige Fusionsprotein, konnte zudem im Kulturüberstand nachgewiesen werden.

Bereits diese Ergebnisse lassen einige Vermutungen über die Oberflächenbindung des Fusionsproteins Embp<sub>GA-FIV</sub> zu. Zum einen konnte durch Nachweis der 130 kDa Isoform auf der bakteriellen Zelloberfläche Evidenz dafür gesammelt werden, dass bereits die GA-FIVAR-Repeats eine suffiziente Oberflächenbindung vermitteln. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Cheng: es konnte gezeigt werden, dass der Labor-Stamm *S. aureus* Newman eine C-terminal verkürzte Form des Embp-Homolog Ebh exprimiert, die wie in unserem dargelegten Fall auch ohne DUF- oder TM-Domäne auf der Oberfläche rekrutiert wurde [104]. Ähnliches wurde auch für *S. epidermidis* beobachtet: In der Transposonmutante M84 unterbricht eine Tn917 Insertion die Transkription von Embp und führt zur Produktion eines C-terminal verkürzten Proteins. Auch hier hat die Deletion von DUF1542 und der TM-Domäne keine Änderung der Oberflächenrekrutierung zur Folge [94].

Während diese Befunde auf eine Irrelevanz der DUF1542-Module und der TM-Domäne in Bezug auf die Oberflächenbindung hindeuten könnten, zeigte sich an der differentiellen Verteilung der Embp<sub>GA-FIV</sub> Isoformen, dass die 250 kDa Isoform zu keinem Zeitpunkt im Kulturüberstand nachweisbar war. Auch konnte diese Form selbst durch Ultraschallbehandlung nicht von der bakteriellen Zelloberfläche disloziert werden. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die TM-Domäne doch eine stärkere oder zumindest

veränderte Bindung auf der bakteriellen Oberfläche vermittelt als lediglich die GA-FIVAR-Repeats. Es muss als derzeit ungeklärt betrachtet werden, ob dieser Einfluss der TM-Domäne auch bei der vollständigen Zahl von GA-FIVAR Modulen im kompletten *embp*-Genprodukt relevant werden kann. Um diese Frage zu untersuchen, ist es notwendig, chromosomale Deletionen von DUF1542 und der TM-Domäne zu erzeugen. Unter Verwendung solcher Mutanten kann dann der Frage nachgegangen werden, ob diese Domänen auch im Kontext des ansonsten vollständigen Proteins einen messbaren Einfluss auf die Stärke der Embp-Oberflächenverankerung nehmen.

## 5.2. Beobachtete Prozessierung der Oberflächen-rekrutierten Embp-Fusionsproteine

Eine Kernbeobachtung dieser Arbeit war die Entstehung unterschiedlich langer Embp<sub>GA-FIVAR</sub> Isoformen (**Abbildung 9**). Der Nachweis unterschiedlich langer Formen von *in vitro* exprimierten Proteinen ist nicht unbekannt: Das 258 kDa große WAP von *Bacillus subtilis* konnte ebenfalls als 220, 109 und 58 kDa große Form nachgewiesen werden [105] und auch das Emb Protein fand sich bei *Streptococcus defectivus* neben der 210 kDa großen, erwarteten Form in insgesamt vier verschiedenen großen Proteinbanden [106]. Auch für das 190 kDa, Fibrinogen-bindende Protein Fbe/SdrG von *S. epidermidis* konnten in Zellproteinpräparation zeitabhängig auftretende, verkürzte Isoformen nachgewiesen werden [107]. Die Ursachen für das Auftreten solcher Isoformen sind bislang wenig analysiert. Für die Verkürzung des EbpS bei *S. aureus* vermuteten die Autoren eine unspezifische Proteolyse während des Präparationsvorganges [108]. In anderen Fällen konnte der Nachweis unterschiedlich langer Formen des untersuchten Oberflächenproteins in einen direkten funktionellen Zusammenhang gesetzt werden. So muss bei *S. epidermidis* das *accumulation associated protein* Aap proteolytisch prozessiert werden, um funktionell als interzelluläres Adhäsion aktiv zu werden [15]. Im Rahmen dieser Prozessierung finden sich neben der unprozessierten 220 kDa großen Isoform eine 180 und 140 kDa große Variante [15]. Diese Isoformen sind Folge einer Prozessierung, während der es zu einer Abspaltung der sogenannten A-Domäne kommt. Die auf der Zelloberfläche zurückbleibende B-Domäne vermittelt dann durch homotype und heterotype Interaktionen die Aggregation von *S. epidermidis* Zellen [109] [15]. Die A-Domäne scheint eher eine Rolle in der primären Adhärenz zu haben, während die durch die Spaltung biologisch aktive B-Domäne für die interzelluläre Akkumulation innerhalb der Biofilmbildung wichtig ist [110, 111]. Verantwortlich für diese Spaltung sind sowohl endogene *S. epidermidis* Serin- oder

Metalloproteasen als auch die Granulozyten-Proteasen Cathepsin G und Elastase [15]. Die dynamische Modifikation der Aap-Struktur kann durch die Änderung der oberflächenadhäsiven Eigenschaften direkt die Interaktion mit Effektoren der angeborenen Immunität beeinflussen und *S. epidermidis* vor Phagozytose schützen. Bei Aap ist zudem offensichtlich, dass durch die Variation repetitiver Elemente und somit der Proteingröße, eine flexible Modifikation der antigenen Oberflächeneigenschaften erreicht werden kann [83, 111]. Ein weiteres Beispiel für die Modifikation funktioneller Oberflächeneigenschaften durch proteolytische Prozessierung stellt das Autolysin E (AtIE) von *S. epidermidis* dar. In seiner Hauptfunktion als Peptidoglykan-Hydrolase separiert es die Tochterzellen während der Zellteilung [112]. *In vitro* konnten von der Oberfläche AtIE exprimierender Stämme unterschiedlich große Proteinbanden (jeweils 120, 60, 52, 45 beziehungsweise 38 kDa) extrahiert werden [60]. Es konnte gezeigt werden, dass nach dem Export des 157 kDa großen Genprodukts zunächst eine 120 kDa große Zwischenform entsteht, aus der durch extrazelluläre Prozessierung zwei Zellwand-gebundene Enzyme aktiviert werden: eine 60kDa große Amidase und eine 52kDa große Glucosaminidase [113]. Die kleineren, 45 beziehungsweise 38 kDa großen Proteine stellen am ehesten Degradationsprodukte dieser Enzyme dar [60]. Bei AtIE ist die proteolytische Prozessierung demnach als Aktivierung der enzymatischen Aktivität aufzufassen [113, 114]. Ob die Modifikation von Embp beziehungsweise Embp<sub>GA-FIV</sub> und das Auftreten von verkürzten Isoformen ebenfalls funktionelle Konsequenzen hat und den Zugriff des Immunsystems verhindert, muss in zukünftigen Untersuchungen analysiert werden.

Der Nachweis von verkürzten Isoformen könnte auch als Folge einer unspezifischen Degradation und somit als Artefakt aufgefasst werden. Ursache hierfür könnten Schwachstellen des Proteins durch die Rekombination von DNA Fragmenten sein, in deren Folge beispielsweise die Übergänge zwischen einzelnen Domänen instabil werden könnten. Gegen diese Hypothese spricht der Nachweis der 180 kDa großen Embp<sub>GA-FIV</sub>-Bande, bei der drei der vier DUF1542 Domänen und die TM-Domäne fehlen. Da alle vier DUF-Domänen gemeinsam aus dem Wildtyp-Gen *embp* heraus amplifiziert und kloniert wurden, sollte innerhalb dieses Abschnittes keine Instabilität zu erwarten sein. Bei dem *S. aureus* Aap Ortholog SasG konnten indes ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Hierbei wurde zunächst das vollständig synthetisierte SasG-Protein auf der Oberfläche präsentiert, um

anschließend innerhalb der B-Domänen gespalten zu werden. Die Autoren halten hierfür am ehesten eine spontane Teilung von labilen Anteilen des Proteins für verantwortlich. Durch diesen Vorgang wurden zudem wie in dem in dieser Arbeit beschriebenen Fall ebenfalls Proteinanteile unterschiedlicher Länge in das Wachstumsmedium freigesetzt [115]. Diese Umstände, dass die von uns beobachtete Prozessierung auch innerhalb von Repeat-Domänen stattfand, welche direkt aus dem eigentlichen Embp kloniert wurden sowie der Umstand, dass die proteolytische Spaltung von *in vitro* exprimierten Proteinen bereits anderweitig beschrieben wurde, sprechen in der Summe gegen die Hypothese des instabilen Fusionsproteins Embp<sub>GA-FIV</sub>.

Die Effekte proteolytischer Prozesse sind im Stoffwechsel von Bakterien weit verbreitet, da Proteasen eine zentrale Rolle in vielen regulatorischen Kaskaden spielen [116]. Die proteolytische Aktivität wird bei Staphylokokken über zentrale Regulatoren gesteuert, die hierüber auch Einfluss auf den sequentiellen Ablauf der *S. epidermidis* Biofilmbildung nehmen [117]. Die am besten beschriebenen Regulatoren sind das *agr*- (*accessory gene regulator*) [118] und das *sarA*-System (*staphylococcal accessory regulator A*) [119]. In frühen Phasen der Biofilmbildung bewirken die Inaktivierung von *sarA* beziehungsweise eine *agr*-Aktivierung eine erhöhte Expression von Metallo- und Serin-Proteasen [120]. Die unter anderen resultierende, vermehrte Prozessierung und Aktivierung von AtlE bewirkt eine verstärkte Zelllyse, die über den vermehrten Zelluntergang mehr eDNA freisetzt und schlussendlich den Biofilm stabilisiert [95, 121]. Insbesondere der letzte Schritt des Vier-Stufen-Modells, das Biofilm-*detachment*, kann beispielhaft für die Beteiligung von Proteasen dienen [3]: Durch einen beschleunigten proteolytischen Abbau von Zelloberflächenproteinen wird die Bindungsfähigkeit an extrazelluläre Matrixproteine des Wirts stark herabgesetzt [122, 123]. Auch sogenannte *detergent like molecules*, welche nicht-kovalente Bindungen aufheben können, werden über das *agr* reguliert [124]. Jedoch kann die Expression unterschiedlicher Proteasen nicht nur zwischen den Stadien der Biofilmbildung, sondern auch innerhalb der einzelnen Wachstumsphase flexibel variiert werden [118].

Eine der am besten untersuchten Protease in Staphylokokken ist die Serin-Glutamyl-Endopeptidase (V8-Protease). Die V8-Protease ist in *sspA* kodiert und wird nach der Synthese in den extrazellulären Raum exportiert. Dort bewirkt die V8-Protease unter anderem den Abbau des *fibronectin binding proteins* (Fnbp) und des Proteins A und

modifiziert hierdurch die Oberflächeneigenschaften von *S. aureus* [125]. Mit einer 60 %igen Sequenz-Homologie entspricht die *Serine protease in Staphylococcus epidermidis* (Esp) sehr der V8 Protease [126]. Neben Serin-Proteasen findet sich bei Staphylokokken auch eine Cystein-Protease. Bei *S. aureus* handelt es sich um Staphopain A, welches mit breiter Substratspezifität unter anderem Elastin abbaut. Bei *S. epidermidis* findet sich ein SspA-Ortholog, welches als *Staphylococcus epidermidis cysteine protease* (Ecp) [126] bezeichnet wird. Ecp baut humanes Serumalbumin, Elastin, Fibronectin und auch Fibrinogen ab, wodurch möglicherweise die *S. epidermidis* Bindung an die konditionierte Fremdkörperoberflächen erleichtert werden kann [125]. Die im *aur*-Gen kodierte Protease Aureolysin gehört zu der Gruppe der Metalloproteasen. Aureolysin aktiviert durch Prozessierung des Proenzym die V8-Protease [125]. Da Aureolysin verschiedene Oberflächenproteine modifiziert, wird angenommen, dass unter anderem durch Aktivität solcher Metalloproteasen das Herauslösen von bakteriellen Zellen aus dem Biofilmverbund erleichtert wird [123]. Auch für Aureolysin gibt es bei *Staphylococcus epidermidis* ein Ortholog: SepP1/SepA, welches im *sepA*-Gen kodiert wird [126]. SepP1 hat eine geringe Substratspezifität, schneidet jedoch bevorzugt hinter aromatischen oder hydrophoben Aminosäuren. Auf der Makromolekül-Ebene baut es neben Casein auch Elastin ab [125]. SepA ist dagegen von zentraler Bedeutung für die Prozessierung von AtIE und wird mit Embp ko-reguliert [95].

Um die Protease zu identifizieren, welche für die in dieser Arbeit beobachtete Prozessierung verantwortlich ist, könnten Embp<sub>GA-FIVAR</sub> beziehungsweise Embp<sub>FIVAR</sub> exprimierende Zellen unter der Zugabe von verschiedenen Protease-Inhibitoren kultiviert werden. Während  $\alpha$ -2-Makroglobuline unspezifisch mehrere Protease-Klassen hemmen würden [125, 126], finden sich sowohl Klassen-spezifische Inhibitoren auch Breit-Spektrum-Inhibitoren in Form von *complete kits*, die jeweils nach Herstellerangaben der induzierten Kultur zugefügt werden können [127]. Für Serinproteasen Alpha-1-Antitrypsin oder PMSF (Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid), für Cysteinproteasen E-64 oder Iodacetamid (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>INO) und für Metalloproteasen Phosphoramidon oder EDTA [127].

Sollten diese Inhibitorstudien Hinweise auf die Beteiligung einer spezifischen Protease geben, so müsste diese durch weitere Untersuchungen, beispielsweise unter Verwendung spezifischer Protease-knock-out-Mutanten analysiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Vorteil einer veränderten Affinität von Proteinen zur bakteriellen Zelle in der resultierenden Möglichkeit zur gezielten Änderung der interzellulär-adhäsiven Eigenschaften liegt. Durch proteolytische Modifikation wird hierbei die Möglichkeit zur Integration oder Desintegration von einzelnen Zellen in der Biofilmmatrix geschaffen. Dies bedingt die erhöhte Flexibilität bei der Adaptation an neue Umweltbedingungen und ist Teil der Pathogenese Staphylokokken-induzierter Infektionen [15, 125]. Des Weiteren können aus dem Biofilmverbund heraus biologisch aktive Proteine beziehungsweise Protein-Fragmente freigesetzt werden [123]. In unserem Fall konnten wir zeigen, dass durch die beobachtete, möglicherweise proteolytische Prozessierung „GA-Modul-FIVAR-Domäne“-Tandem-Repeats in den Überstand freigesetzt wurden. Diesen Domänen konnten sowohl die Möglichkeit zur Fibronektin-Bindung also auch direkt zur Initiierung der Biofilmbildung nachgewiesen werden [19, 92, 94]. Ihre Freisetzung könnte daher Einfluss auf die Bakterien-Fibronektin-Interaktion nehmen.

### 5.3. Einfluss der einzelnen Embp-Domänen auf Oberflächenaffinität

Der Oberflächennachweis von Embp<sub>GA-FIVAR</sub> Isoformen, bei welchen weder die TM-Domäne noch die DUF1542 Module nicht nachweisbar waren, stellt die Bedeutung dieser Strukturen für die Rekrutierung von Embp in Frage. Allerdings erscheint es möglich, dass eine Rekrutierung zwar erfolgt, die Bindung an die *S. epidermidis* Oberfläche jedoch schwächer ist, sobald die TM-Domäne oder gar DUF1542 Module fehlen. Es wurden daher Experimente durchgeführt, welche die Frage beantworten sollten, welche Konsequenzen das Fehlen dieser Domänen für das Bindungsverhalten der Embp<sub>GA-FIVAR</sub>-Isoformen an die Zelloberfläche hat. Hierbei wurden Embp<sub>GA-FIVAR</sub>-exprimierende Zellen mit unterschiedlichen Puffern gewaschen oder mit Ultraschall behandelt; und es wurde geprüft, ob durch diese Maßnahmen die distinkten Isoformen in differentieller Weise von der Staphylokokken-Oberfläche entfernt werden können (**Abbildung 18**). Hierbei konnte gezeigt werden, dass zur Entfernung der verkürzten Formen chaotroper Stress in Form von Urea nötig war. Urea löst als Detergenz insbesondere elektrostatische Bindungen. Da trotz der eingesetzten hohen Konzentration (4M) lediglich geringe Anteile der 130 kDa Bande (Embp<sub>GA-FIVAR</sub>Δ4DUFΔTm, somit nur aus GA-FIVAR-Repeats bestehend) gelöst werden, sprechen unserer Ergebnisse gegen eine ausschließlich elektrostatische Interaktion der GA-FIVAR-Module mit der Zelloberfläche. Eine Entfernung der Banden mit zusätzlichen DUF1542-Domänen (180 kDa, Embp<sub>GA-FIVAR</sub>Δ3DUFΔTm beziehungsweise 150 kDa, Embp<sub>GA-FIVAR</sub>ΔTm) war nur durch

Ultraschallapplikation möglich (**Abbildung 19**). Die vollständige, 250 kDa Form von Embp<sub>GA-FIVAR</sub> konnte indes nicht durch Ultraschall extrahiert werden, was für eine zusätzliche Bindungssteigerung durch die hier vorhandene TM-Domäne spricht.

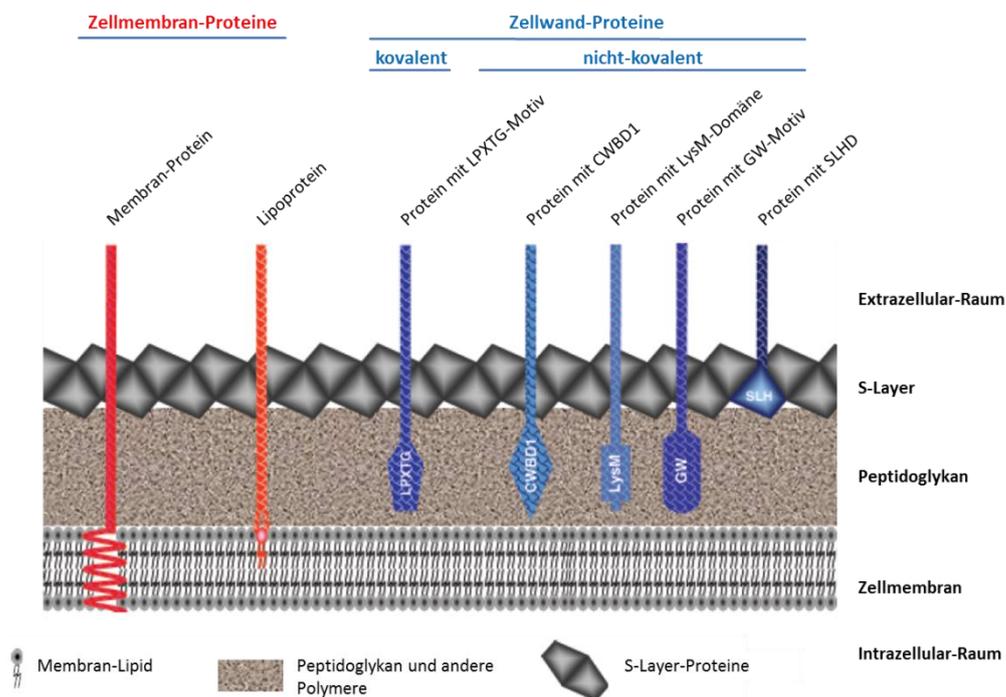
Um Hinweise auf die exakte Lokalisation der einzelnen Domänen an der Zelloberfläche zu erhalten, wurde die Präparation der Oberflächenproteine mit Hilfe von Lysostaphin in eine Zellwand- und eine Zellmembranfraktion aufgeteilt. Lysostaphin ist ein von *Staphylococcus simulans* exprimiertes Enzym, welches als Glycin-Glycin-Endopeptidase [128] die Pentaglycin-Querbrücken im Peptidoglykan von Staphylokokken durchtrennt [129]. Hierdurch werden Zellwand-gebundene Proteine freigesetzt [130]. Hieraus schließen wir, dass alle Formen des rekombinanten Embp-Fusionsproteins, welche innerhalb der Zellwand gebunden wären, durch den Einsatz von Lysostaphin von der Zelloberfläche entfernt werden würden.

Wir konnten in der Tat durch Entfernung der Zellwand zeigen, dass die verkürzten Formen von Embp<sub>GA-FIVAR</sub> (220, 180 und 150 kDa) exklusiv Zellwand assoziiert sind. Somit kann gefolgert werden, dass zumindest im Falle des rekombinanten Embp-Fusionsproteins sowohl die GA-Modul-FIVAR-Repeats, als auch die DU1542-Domänen durch Interaktion mit Bindungspartnern der Zellwand auf der Oberfläche rekrutiert werden. Mit dieser Annahme kann der Nachweis der verkürzten Formen von Embp<sub>GA-FIVAR</sub> im Kulturüberstand durch Peptidoglykan-abbauende Enzyme im Rahmen des Zellwachstums erklärt werden. Die vollständige Form von Embp<sub>GA-FIVAR</sub> (250 kDa, inklusive der TM-Domäne) wurde indes nicht durch Lysostaphinbehandlung der exprimierenden Staphylokokken freigesetzt. Diese Isoform fand sich auch nach dieser Maßnahme exklusiv in der Fraktion der Protoplastenproteine.

Aus diesen Befunden kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass Embp<sub>GA-FIVAR</sub> durch die GA-FIVAR-Repeats wie auch die DUF1542-Domänen an die Zellwand gebunden wird. Diese Bindung wird durch eine in der Zellmembran verankerte TM-Domäne weiter gefestigt. Diese Ergebnisse entsprechen den Schlussfolgerungen von Hussain et al. für das *S. aureus* Oberflächen-assoziierte Protein Emp. Emp war hier stark mit der bakteriellen Zelloberfläche assoziiert, ließ sich nicht im hochkonzentrierten Wachstumsmedium nachweisen und konnte dennoch durch Aufkochen mit SDS von der Zellwand gelöst werden [131]. Dieses Verhalten kann als Ausdruck einer nicht-kovalenten Bindung des Proteins an die Zelloberfläche aufgefasst werden.

## 5.4. Arten der Oberflächenbindung von Proteinen

Oberflächenproteine grampositiver Erreger können auf sehr unterschiedliche Art und Weise kovalent wie auch nicht-kovalent an die Zelloberfläche gebunden werden. Jedoch müssen sie hierbei an wenigstens einen Teil der Zellhülle gebunden sein: entweder die Zellwand oder die Zellmembran. Zudem sollten zumindest Anteile dieser Proteine die Breite der Zellwand durchspannen, damit funktionell relevante Domänen ihren jeweiligen Interaktionspartnern in der Umwelt zugänglich sind [129, 132] (**Abbildung 26**). Diese verschiedenen Mechanismen können grob in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Zum einen (I) Transmembran-Proteine, welche über eine hydrophobe Transmembran-Domäne direkt in der Zytoplasmamembran verankert sind und (II) Lipoproteine, die kovalent an Membranlipide gebunden sind. Des Weiteren gibt es (III) Proteine mit einem sogenannten LPXTG-Motiv, welches kovalent dem Peptidoglykan angefügt wird und (IV) Oberflächenproteine, die spezifische Domänen innerhalb der Zellwand, sogenannte *cell wall binding domains*, erkennen [132].



**Abbildung 26: Schematische Darstellung unterschiedlicher Arten der Proteinbindung bei gram-positiven Bakterien.** Zellmembranproteine binden über eine Transmembrandomäne oder über eine kovalente Bindung mit Hilfe integrierter Lipoproteine an die Zellmembran. Zellwandproteine hingegen können einerseits mittels eines LPXTG-Motivs durch das Enzym Sortase kovalent an die Zellwand gebunden werden, oder aber die Verankerung erfolgt über sogenannte *cell wall binding domains* (CWBD). Innerhalb dieser CWBDs unterscheidet man die CWBD1, die LysM-Domäne und das GW-Modul. Ein weiterer Mechanismus der Proteinbindung erfolgt über ein *S-layer-homology motif* (SLH) (adaptiert nach [131]).

Zellmembranproteine sind in der Doppellipidschicht der Zytoplasmamembran eingelagert. Sie können die Membran vollständig durchziehen oder lediglich in ihr verankert sein. In dem eigentlichen Transmembranbereich, der wenige Aminosäuren groß ist, finden sich vornehmlich hydrophobe Aminosäuren [133]. Das Signalpeptid, welches den organisierten Transport des Proteins zur Zytoplasmamembran bestimmt, kann entweder nach der Translokation abgeschnitten werden, oder es dient als sogenannte Signalankersequenz selbst der Membraninteraktion [134, 135]. Die Gene von Lipoproteinen beinhalten hingegen als Signalpeptid eine sogenannte *lipobox*, welche sich hinter der Signal-Peptid-Schnittstelle befindet und üblicherweise mehrere Cystein-Reste umfasst [136]. Diese ermöglichen über SH-Bindungen eine kovalente Bindung des Proteins an die Doppellipidmembran [137]. Des Weiteren können Oberflächenproteine an die Zellwand gebunden vorliegen, entweder direkt an das Peptidoglykan oder an sogenannte *secondary cell wall polymers* (SCWP). Die Bindung selbst kann kovalenter oder nicht-kovalenter Natur sein.

Die kovalente Bindung erfolgt typischerweise über eine C-terminal gelegene Domäne, welche als LPXTG-Motiv bezeichnet wird. In *S. aureus* tragen etwa 19 Proteine dieses Motiv, [138], bei dem LPXTG das Akronym für die kodierende Aminosäure-Sequenz Leucin(L)-Prolin(P)-X-Threonin(T)-Glycin(G) ist. X ist hierbei eine variable Aminosäure [129]. Gefolgt wird dieses Motiv üblicherweise von einem C-terminal gelegenen, hydrophoben Bereich und einem Anhang meist positiv geladener Reste [139]. Nachdem das Signal-Peptid abgeschnitten wurde, wird das translozierte Protein über die hydrophobe Domäne in der Membran gehalten, was eine weitere Sekretion des Proteins verhindert. Diese temporäre Fixierung ermöglicht dem membranständigen Enzym Sortase, das LPXTG-Motiv zwischen dem Threonin und dem Glycerin zu spalten. Der Komplex aus Sortase und dem prozessierten Protein bindet anschließend an das Pentaglycin von Lipid II [130], einer Vorstufe der Peptidoglykansynthese. Auch diese Transpeptidase-Reaktion wird durch Sortase katalysiert [140]. An dieses Molekül gebunden, werden die Oberflächenproteine während der Transpeptidase-Reaktion der Zellwandbiosynthese in das Peptidoglykan eingebaut [141] und erreichen so ihre finale Lokalisation. Ein LPXTG-Knock-Out-Protein konnte nicht mehr auf der Zelloberfläche, sondern nur noch im Wachstumsmedium nachgewiesen werden und bewirkte zusätzlich eine reduzierte Adhärenz der exprimierenden Zellen [142].

Jedoch haben nicht alle an der Biofilmbildung beteiligte Faktoren ein LPXTG-Motiv. So lässt sich dieses weder bei den Autolysinen Atl, AtlE oder Aas, dem Elastin-bindenden-Protein Ebps [143] noch bei dem *Extracellular matrix protein-binding protein* Emp [131] nachweisen. Diese LPXTG-negativen Proteine können demnach in eine Gruppe zusammengefasst werden, die zur Bindung an die Zelloberfläche spezifische Zellwandbestandteile erkennt und nicht-kovalent an diese *cell wall binding domains* (CWBDs) bindet [132]. So finden sich beispielsweise bei Pneumokokken sogenannte *cholin-binding domains* (CWBD-1), welche sich durch mehrere unvollständige, jeweils circa 20 Aminosäuren umfassende Repeats auszeichnen. Diese Repeats binden vorzugsweise an Cholin-Reste, insbesondere von Teichon- und Lipoteichonsäuren [132]. Weiterhin findet sich in verschiedenen Proteinen gram-positiver Bakterien eine Lys-M-Domäne (*lysine motif domain*). Diese 40-65 Aminosäuren große Domäne konnte bei mindestens 4000 verschiedenen Proteinen nachgewiesen werden [144]. Die Lys-M-Domänen erkennen N-Acetylglukosamine und binden somit direkt an das Peptidoglykan, eine Bindung, die durch die Präsenz von Lipoteichonsäuren verhindert wird [144]. Zu den Proteinen mit einer Lys-M-Domäne zählt das 35,8 kDa große Aaa (*autolysin/adhesin in S. aureus*), welches sowohl eine enzymatische bakteriolytische Aktivität als auch Bindungsaffinität an diverse extrazelluläre Matrixproteine besitzt [145]. Das 35 kDa große, Zelloberflächen-assoziierte Protein Aae, welches ebenfalls sowohl autolytische als auch adhäsive Eigenschaften vermittelt, kodiert N-terminal drei repetitive Lys-M-Domänen [143].

Eine weitere Möglichkeit zur Bindung von Proteinen auf der Oberfläche von gram-positiven Bakterien sind 80 Aminosäuren-große Glycerin-Tryptophan-Dipeptid-Elemente, sogenannte GW-Module. Die Bindungsstärke ist hierbei proportional zur Anzahl dieser Module [132]. Als Beispiel sei hier Internalin B (Itl B) von *Listeria monocytogenes* genannt. Dieses wird über C-terminal gelegene GW-Tandem-Repeats auf der Zelle gebunden [146]. Hierbei hat ItlB sowohl eine Assoziation mit der Zellwand als auch der Zellmembran. Für diese Konstellation ist die Bindung von ItlB an Lipoteichonsäuren (LTA) verantwortlich [147].

Zuletzt bindet das sogenannte *S-layer-homology motif* (SLH) Proteine nicht-kovalent Bindung an die Zellwand. S-Layer Proteine haben drei Tandemrepeats dieser 55 Aminosäuren-großen Motive gemeinsam. Der S-Layer ist hierbei die zweidimensionale, membranartige Oberflächenstruktur, welche wie ein kristallines Gitter aus (Glyko-)-Proteinen die äußerste

Schicht vieler gram positiver Bakterien bildet [129]. Staphylokokken sind nicht in der Lage, S-Layer auszubilden [132].

In Hinsicht auf die Ergebnisse dieser Arbeit ist relevant, dass keine der hier aufgezeichneten Mechanismen zur Oberflächenbindung die Möglichkeit ausschließt, die entsprechenden Proteine im extrazellulären Medium nachzuweisen. [134].

### **5.5. Einbettung von Embp beziehungsweise Embp<sub>GA-FIV</sub> in die Zelloberfläche**

Um ein Modell der Bindung von Embp an die *S. epidermidis* Zelloberfläche entwickeln zu können, ist es sinnvoll, sich zunächst mit der generellen Struktur und den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Zellwand Gram-positiver Erreger zu befassen.

Gram-positive Bakterien haben im Gegensatz zu gram-negativen Prokaryoten nur eine innere Zellmembran, weshalb sie als monoderm bezeichnet werden [57]. Dieser Membran ist eine dicke Zellwand aufgelagert, welche aus linearen, durch Peptide quervernetzten Polysaccharid-Ketten besteht [148]. Das Peptidoglykan besteht bei Staphylokokken aus repetitiv angeordneten,  $\beta(1,4)$  glykosidisch verbundenen N-Acetylmuramin- und N-Acetylglucosamin-Disacchariden [MurNAc-( $\beta$ 1-4)-GlcNAc]. Neben dem Peptidoglykan ist die Zellwand auch aus sogenannten *secondary cell wall polymers* (SCWP) aufgebaut. Diese kovalent gebundenen, sekundären Polymere machen anschließend etwa 50% der Gesamtzellwandmasse aus [149].

Beispielhaft für diese Art der Modifikation werden dem neu synthetisierten Peptidoglykan-Gerüst bei *S. aureus* Teichonsäuren oder Lipoteichonsäuren hinzugefügt [150]. Teichonsäuren sind anionische Zelloberflächen-Glykopolymere die entweder direkt kovalent an das Peptidoglykan der Zellwand (*wall teichonic acid*, WTA) oder über einen Lipidanker an die Zellmembran (*lipoteichonic acid*, LTA) gebunden [3]. Die stammspezifisch modifizierten WTAs finden sich gleichmäßig über die gesamte Zelloberfläche verteilt [129] und spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Gram-positiver Bakterien [150, 151]. So haben die WTAs mitunter eine Funktion bei der Rekrutierung von Zelloberflächenproteinen in *S. aureus*, da ihr Vorhandensein die Bindung von AtlE an die Zelloberfläche moduliert. Eine veränderte Verteilung von WTAs bewirkt somit eine selektiv lokalisierten Rekrutierung von AtlE auf der Zelloberfläche [114]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Teichonsäuren die Bindung von *S. epidermidis* an Fibronectin-beschichtete Oberflächen signifikant erhöht [152].

Die bakterielle Zellwand präsentiert sich nach Abschluss dieser beispielhaft aufgezeigten Modifikation als ein komplexes, dreidimensionales Netzwerk [153]. Die Zusammensetzung der Zellwandpeptide variiert zwischen einzelnen Bakterienarten [129, 141] während das Peptidoglykan-Grundgerüst art- und auch stammübergreifend einheitlich bleibt.

Derzeit wird davon ausgegangen, dass das Embp-Molekül an den wesentlichen Bestandteil dieses Grundgerüsts, das N-Acetylglucosamin, gebunden ist. Diese Bindung wird auf Grund einer generellen Affinität zu Zuckerresten angenommen, welche die kodierten FIVAR-(*found in various architectures*)-Domänen vermitteln [94]. Diese Affinität bewirkt weiterhin die Bindung an sowohl lösliches als auch gebundenes Fibronectin, zudem erklärt sie durch Bindung an Glykostrukturen der Zellwand, die Embp-vermittelte, interzelluläre Akkumulation [19, 94]. Solche FIVAR-Domänen finden sich neben dem Embp beziehungsweise seinem Homolog in *S.aureus* Ehb auch in anderen Zellwandproteinen, darunter dem 236 kDa großen *S. aureus* Protein FmtB [154], der dem der Akkumulationsphase zugeordneten Protein SasC [155]. Während im Fall von Embp-vermittelten *S. epidermidis*-Infektionen die FIVAR-Domänen für eine Fibronectin-Bindung ausreichend waren, mussten diese für eine Biofilm-Akkumulation mit den ebenfalls kodierten GA-Modulen als Tandemrepeats vorliegen [94]. Zudem konnte eine quantitative Assoziation zwischen der Anzahl der exprimierten Repeats und der Möglichkeit zur Biofilmbildung nachgewiesen werden [94]. Diese GA-Module (*protein G-related albumin-binding*) interagieren ebenso wie das namensgebende Protein G der Streptokokken [156, 157] mit humanen Serum-Albumin sowie der Fc-Region von IgG [158] und finden sich in verschiedenen Zelloberflächenproteinen [159].

Die weiteren Domänen von Embp sollten an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, auch wenn ihnen bisher noch keine direkten Funktionen im Zusammenhang mit der Oberflächenbindung von Proteinen nachgewiesen werden konnten. Das in Embp kodierte YSIRK-GS-Export-Motiv findet sich gehäuft in Genen sphärischer Bakterien wie Streptokokken und Staphylokokken, darunter mindestens 20 Proteinen von *Staphylococcus aureus* [160]. Proteine mit einem YSIRK-Motiv finden sich über die gesamte Zelloberfläche ringartig verteilt [138, 161]. Mutationen innerhalb des YSIRK-Abschnittes verändern die Effizienz des Sekretions-Transports auf die Zelloberfläche, während die eigentliche Rekrutierung, die Art der Bindung und die Proteinfunktionalität unbeeinflusst bleiben [160]. YSIRK ist somit nicht essentiell für die Protein-Translokation, macht diese jedoch effektiv. Auch die DUF(*domain of unknown function*)-1542 Domänen finden sich in diversen

Oberflächenproteinen. Häufig liegen diese, wie auch im Falle Embp, gleich in mehreren Kopien vor. Bei MabA von *Lactobacillus rhamnosus* finden sich 26 dieser Domänen [162], 18 in FmtB [154] und 17 Repeats in SasC, beides Proteine von *S. aureus* [155]. Bisher konnten diesen Domänen keine direkten Funktionen zugeordnet werden. Sie binden weder an eine native Plastik-Oberfläche, an vWF (von Willebrand Faktor) oder Fibrinogen noch vermitteln sie gar eine interzelluläre Aggregation [155].

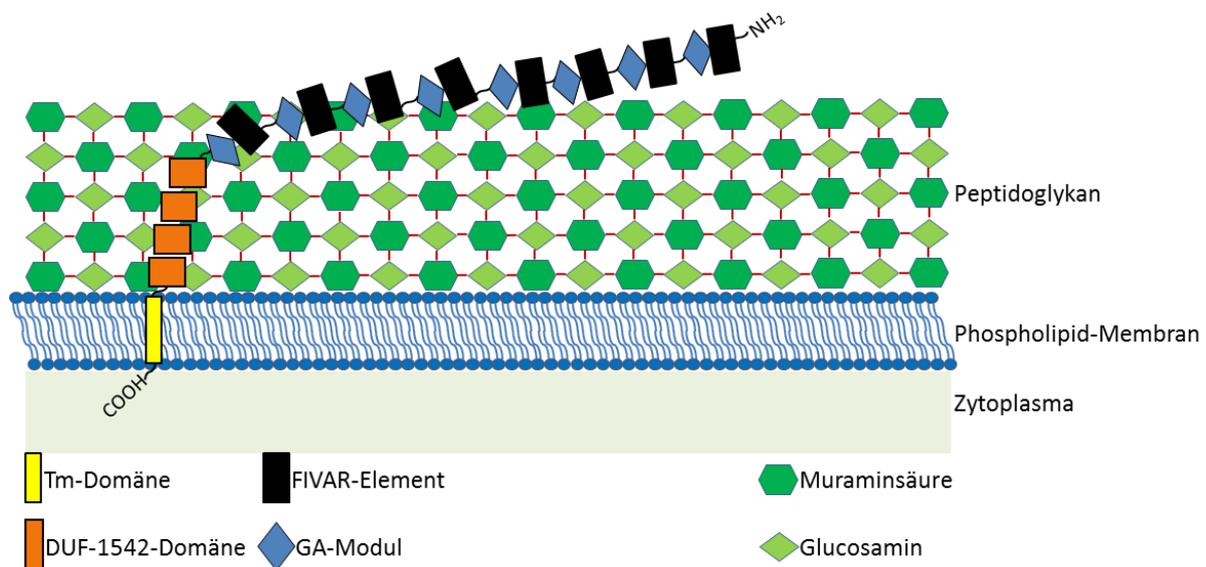
Das Embp kodiert mit den FIVAR-Repeats demnach für Domänen, von denen angenommen wird, dass sie an die N-Acetylglucosamin-Reste der Zellwand binden können. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass auch DUF1542-Domänen mit Komponenten der Zellwand interagieren. Die Art dieser Bindung ist hierbei eine anders als die, welche die GA-FIVAR-Repeats mit der Zelloberfläche eingehen. Insgesamt scheint Embp<sub>GA-FIVAR</sub> nicht-kovalent an der bakterielle Zelloberfläche gebunden zu sein, jedoch ist dies keine rein elektrostatische Interaktion (vergleiche **Abbildung 15**). Ein Beispiel für eine solche elektrostatische Interaktion wäre die von hydrophob oder neutral geladenen Anteilen des Proteins mit negativ-geladenen Molekülen der Zelloberfläche, wie Teichonsäuren oder anderen lipophilen Zellwandkomponenten. Da sich die Proteine durch Aufkochen in SDS auslösen lassen, scheint jedoch eine ionische Bindung [93, 105] sämtlicher Formen von Embp<sub>GA-FIVAR</sub> möglich.

In der Summe lässt sich durch die Verbindung bereits beschriebene Funktionen der einzelnen Embp-Domänen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, ein Modell für die Einbettung des Embp<sub>GA-FIV</sub>-Proteins in die bakterielle Zelloberfläche erstellen (**Abbildung 27**): Gemäß Kristallographie-Versuchen von Tanaka et al. erscheinen die GA-Modul-FIVAR-Domänen-Repeats, als helikale Bündel. Hierdurch verleihen sie dem Embp-Homolog in *S. aureus*, Ebh, eine elongierte, Fibrillen-ähnliche Struktur von ca. 320nm Länge. Zudem kann von einer gewissen Plastizität an den Übergängen der einzelnen Repeats ausgegangen werden [163].

Da diese Arbeit zeigen konnte dass GA-FIVAR-Repeats exklusiv Zellwand-assoziiert vorliegen, projiziert dieses Modell die acht Repeats von Embp<sub>GA-FIV</sub> als längliche Struktur in die oberflächlichen Schichten der Zellwand.

Auch die sich anschließenden DUF1542-Domänen folgen als dünne,  $\alpha$ -helikale, fibrilläre Elemente dieser länglichen Grundstruktur [164]. Funktionell wurde den 18 DUF1542 Domänen im Falle des 205 kDa großen Epf (*extracellular protein factor*) von *Streptococcus*

*pyogenes* eine strukturelle Bedeutung zugeschrieben, indem sie entsprechend einer Art Stiel die Präsentation des N-terminalen Proteinendes außerhalb der Zellwand ermöglichen [164]. Da die bakterielle Zellwand per se permeabel ist, müssen Domänen zur Interaktion mit der Umgebung nicht zwangsläufig aus der Zellwand herausragen [132]. Aus diesem Grund bleibt unserer Meinung nach die genaue Rolle der DUF1542-Domänen weiterhin unsicher. Der hypothetische „Stiel“ wäre bei Embp beziehungsweise Embp<sub>GA-FIV</sub> zudem deutlich kürzer, da hier lediglich für vier (gegenüber 18 in Epf) DUF1542-Domänen kodiert wird. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese Verkürzung im Fall von Embp durch die große Anzahl an potentiellen Ligandenbindungsdomänen (21 FIVAR-Domänen und 38 GA-FIVAR-Tandemrepeats) ausgeglichen würde. Somit verbinden die vier DUF1542-Repeats auch in unserem Modell die N-terminalen GA-FIV-Repeats mit der C-terminalen Transmembrandomäne. Die genaue Lokalisation des zunächst als „putative TM-Domäne“ beschriebenen *embp*-Genabschnitts konnte in dieser Arbeit innerhalb der Zytoplasmamembran bestätigt werden. Diese agiert hierbei wie ein Anker der das rekombinante Fusionsprotein Embp<sub>GA-FIV</sub> fest in der Zelloberfläche fixiert. Funktionell konnte zudem gezeigt werden, dass sich auch die DUF1542-Domänen durch eine eigene Interaktion mit der Zellwand an der Oberflächenbindung des Gesamtproteins beteiligen.



**Abbildung 27: Modell zur Einbettung des rekombinanten Fusionsproteins Embp<sub>GA-FIV</sub> in die Zelloberfläche von *S. carnosus* TM300.** Die putative TM-Domäne verankert das Gesamtprotein fest in der Zellmembran, während die GA-Modul-FIVAR-Domain-Tandemrepeats innerhalb der Peptidoglykanschicht gebunden liegen. Anteile dieser Repeats liegen extrazellulär, um Liganden, u.a. Fibronectin binden zu können. Für die Rekrutierung dieses Proteinabschnitts sind die FIVAR-Domänen ausreichend. Die DUF1542-Domänen verbinden Tm- und Ligandenbindungs-Domäne. Sie liegen ebenfalls innerhalb der Zellwand und vermitteln eine zusätzliche Bindung des Proteins an die Zelloberfläche.

Unser Model für die Einbettung von Embp<sub>GA-FIVAR</sub> scheint insgesamt vergleichbar mit der skizzierten Bindung von EpbS (*Elastin-binding-protein*) an der Zelloberfläche zu sein. EpbS besitzt die Zellmembran durchspannende, hydrophobe Bereiche, wodurch EpbS zu den Membran-gebundenen Proteinen zählt [108]. Die gleichen Eigenschaften schreiben wir derzeit der einzelnen TM-Domäne von zu. Zur weiteren Verankerung findet sich bei EpbS eine Lys-M-Domäne, welche eine zusätzliche Bindung an das Peptidoglykan ermöglicht [108]. Dies würde nach unseren Ergebnissen sowohl auf die DUF1542-Domänen als auch auf die GA-FIVAR-Repeats zutreffen. Interessanter Weise konnten die Autoren auch im Fall von EpbS eine Prozessierung des Proteins beobachteten. Diese Prozessierung schrieben sie am ehesten der Wirkung extrazellulärer Proteasen während des Extraktionsvorganges zu [108].

## 5.6. Weitere Arbeiten und Limitationen dieser Dissertation

Um die erzielten Ergebnisse sicher zu reproduzieren, wurden selektiv verkürzte Formen der rekombinanten Embp-Fusionsproteine Embp<sub>GA-FIVAR</sub> und Embp<sub>FIVAR</sub> hergestellt. Durch Präparation der Oberflächenproteine von Stamm *S. carnosus* TM300xpFIVAR::Myc\_ΔDUF\_ΔTM konnte gezeigt werden, dass für die Rekrutierung auf der Zelloberfläche tatsächlich bereits die FIVAR-Motive, auch ohne GA-Modul, ausreichend sind (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigte sich im Rahmen diese Experimente, dass die beobachtete Prozessierung exprimierter Embp-Derivate unabhängig deren Länge ist. Während der Arbeit mit den verkürzten Formen der zuvor verwendeten Embp-Konstrukte fiel des Weiteren auf, dass die Stämme, die primär TM-Domänen- beziehungsweise DUF152-TM-Domänen-defizitäre Fusionsproteine exprimierten, in ihrem Wachstum gehemmt wurden: Im direkten Vergleich wuchsen die Kulturen von *S. carnosus* TM300xpGA-FIVAR::Myc\_ΔDUF\_ΔTM und *S. carnosus* TM300xpGA-FIVAR::Myc\_ΔTM deutlich weniger dicht als die von *S. carnosus* TM300xpGA-FIVAR::Myc (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung hierfür findet sich bei *S. aureus*: Das Embp-Homolog Ebh scheint, neben der Fähigkeit zur Fibronektin-Bindung, für die geordnete Peptidoglykan-Synthese verantwortlich zu sein [104]. Mutanten zeigten ein gestörtes Zellwachstum und wiesen eine reduzierte Resistenz gegenüber osmotischen Einflüssen auf [165]. Vor diesem Hintergrund scheinen auch unsere Ergebnisse anzudeuten, dass die genaue Rolle von Embp in der Pathogenese von *S. epidermidis*-assoziierten Infektion weiterhin unklar bleibt. Zur genaueren Verifizierung der gemachten Ergebnisse sollten daher weitere Arbeiten ausgeführt und Kontrollen durchgeführt werden.

Zum einen sollte die beobachtete proteolytische Spaltung der exprimierten Proteine charakterisiert werden. Durch Verwendung sowohl spezifischer als auch unspezifischer Inhibitoren sollte die verantwortliche Protease identifiziert werden. Anschließend kann der Effekt der fehlenden Spaltung in Hinblick auf Zellwachstum und Proteinrekrutierung evaluiert werden. Weiterhin könnte das Einbringen eines zusätzlichen, N-terminalen *tag* die Lokalisierung der hierbei abgeschnittenen Proteinfragmente ermöglichen. Um bei der Proteinpräparation, insbesondere für den Lysostaphin-Versuch (**Abbildung 20**), eine höchstmögliche Reinheit zu gewährleisten, sollten Referenzproteine für die einzelnen Kompartimente bestimmt werden. So könnte Clumping Faktor A (ClfA) als LPXTG-gebundenes Protein und somit Referenzmarker für die Zellwand-Fraktion, die F1/F0-ATPase für die Zellmembran-Fraktion und die zytoplasmatische Isocitrat Dehydrogenase für die Interzellular-Fraktion [108] Kontaminationen detektieren beziehungsweise auszuschließen. Zuletzt sollten die genauen Bindungsepitope der einzelnen Embp-Domäne durch biochemische Methoden unter Verwendung gereinigter Interaktionspartner identifiziert werden.

Einschränkend muss betont werden, dass die Ergebnisse dieser Dissertation Limitierungen aufweisen. Zum einen wurde der Großteil der Arbeiten in *S. carnosus* TM300 durchgeführt. Zwar wurden die Proteine auch in dem für *in vitro* Arbeiten benötigten Labor-Stamm *S. aureus* RN4220 exprimiert, jedoch nicht den klinisch relevanten Stämmen *S. aureus*- oder *S. epidermidis*-Stämmen. Als weitere Einschränkung sei erwähnt, dass sämtliche Arbeiten unter Zuhilfenahme eines artifiziellen Promotors durchgeführt wurden. Dieser wies ein etwa 16-fach erhöhtes Expressionsniveau auf [94], während Embp *in vivo* üblicherweise nur in Anwesenheit von Serum als natürlicher Induktor exprimiert wird [95]. Dennoch entspricht die Zugabe von Tetrazyklin als Induktor einer Embp<sub>GA-FIVAR</sub>-Expression von Beginn der Inkubation an, den Beobachtungen mittels RT-PCRs, nach denen Embp während sämtlicher Wachstumsphasen synthetisiert wird [92]. Zuletzt muss betont werden, dass die Ergebnisse auf Beobachtungen anhand rekombinanter Embp-Fusionsproteine beruhen. Da jedoch das C-terminale Ende dieser artifiziellen Konstrukte aus dem Embp-Wildtyp-Gen kloniert wurde und somit dem gesamten natürlichen C-Terminus von Embp entspricht, kann davon ausgegangen werden, dass die gemachten Aussagen bezüglich der Eigenschaften dieser Motive auf die klinische Situation übertragen werden können.

## 6. Zusammenfassung

Nosokomiale Infektionen gehören zu den größten medizinischen Herausforderungen der westlichen Welt. Wichtigster Risikofaktor für eine solche Infektion ist die Implantation eines medizinischen Fremdkörpers, wobei *S. epidermidis* zu den am häufigsten nachgewiesenen Erregern zählt. Die Staphylokokken wachsen hierbei häufig in einem protektiven Biofilm, wodurch diese Art der Infektion schwer zu therapieren ist. Die Biofilmbildung erfolgt hier in mehreren, aufeinander folgenden Schritten. Der medizinische Fremdkörper wird nach seiner Implantation häufig mit wirt-eigenen Proteinen bedeckt, wodurch die Staphylokokken über eigene Oberflächenstrukturen an diese Proteine binden können. Auf der Fremdkörperoberfläche wird hierbei am häufigsten Fibronectin nachgewiesen und das wichtigste Fibronectin-Adhäsion bei *S. epidermidis* ist das weit verbreitete 1 MDa große *extracellular matrix binding protein* Embp. Das Embp vermittelt im Rahmen der Biofilmbildung sowohl eine primäre Adhärenz, eine interzelluläre Akkumulation als auch durch Induktion eines *immune escape* einen Schutz vor Phagozytose. Embp ist somit ein vielseitiger und effektiver Mediator der Biofilmbildung.

Anhand unserer Ergebnisse konnten wir zeigen, dass Embp ein Zellmembran-gebundenes Protein ist. Zudem konnten wir nachweisen, dass jeder der unterschiedlichen Embp-Domänen eine jeweils individuelle Bindung an die bakterielle Zelloberfläche vermittelt. Die Domänen sind hierbei an beiden Kompartimenten der Zelloberfläche, sowohl Zellwand als auch Zellmembran gebunden.

## 7. Summary

Nosocomial infections are among the biggest medical challenges of the western world. The biggest single risk-factor for such an infection is the implantation of an indwelling medical device with *S. epidermidis* being one of the most common pathogens isolated from the infection site. The staphylococci grow in a protective structure, called biofilm, a phenotype that makes the treatment of such an infection a lot more difficult. Biofilm formation is typically a multi-step process, with the bacterial adherence being the first step. Quickly after implantation, the medical device is coated with host tissue proteins, which allow the staphylococci to bind the artificial surface via self-expressed surface-structures. Within this so called conditioned surface, fibronectin is the most commonly found host-protein. On the bacterial side of this interaction, the 1 MDa *Extracellular matrix binding protein* (Embp) is the most important and most common fibronectin-binding-protein. Embp is an effective multi-functional surface-protein, allowing the primary adherence as well as intercellular accumulation or even mediating protection from host-phagocytosis by induction of a so called immune escape.

The here presented data show that Embp is a membrane-anchored protein. Furthermore we could demonstrate that the different domains within its structure each mediate an individual share of the cell-surface recruitment. Here these domains bind to both components of the bacterial surface, the cell-membrane as well as the cell-wall.

## 8. Quellenangaben

1. NRZ, *Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen - Definitionen*. <http://www.nrz-hygiene.de/surveillance/kiss/cdc-definitionen/> 07.03.2015 18:00.
2. Geffers, C., D. Sohr, and P. Gastmeier, *Mortality attributable to hospital-acquired infections among surgical patients*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008. **29**(12): p. 1167-70.
3. Otto, M., *Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen*. *Nat Rev Microbiol*, 2009. **7**(8): p. 555-67.
4. Robert-Koch-Institut, *Heft 8 - Nosokomiale Infektionen*, in *Gesundheitsberichterstattung*. 2002.
5. Noble, *Staphylococcal carriage and skin and soft tissue infection*. K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.) - *The staphylococci in human disease*, Churchill Livingstone, New York., 1997: p. p. 401-412.
6. Zarb, P., et al., *The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use*. *Euro Surveill*, 2012. **17**(46).
7. Geffers, C. and P. Gastmeier, *Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System)*. *Dtsch Arztebl Int*, 2011. **108**(6): p. 87-93.
8. NRZ, *Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen - Infektions-Surveillance*. <http://www.nrz-hygiene.de/surveillance/kiss/its-kiss/infektionen/> 07.03.2018 19:00.
9. Sperber, W.H. and S.R. Tatini, *Interpretation of the tube coagulase test for identification of Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol*, 1975. **29**(4): p. 502-5.
10. Kloos, W.E. and T.L. Bannerman, *Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci*. *Clin Microbiol Rev*, 1994. **7**(1): p. 117-40.
11. Lowy, F.D., *Staphylococcus aureus infections*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(8): p. 520-32.
12. Mack, D., M. A. Horstkotte, H. Rohde, and J. K. M. Knobloch, *Coagulase-Negative Staphylococci*. In J. L. Pace, M. E. Rupp, and R. G. Finch (ed.) - *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*, CRC Press, Boca Raton., 2006: p. p. 109-153.
13. Rupp, M.E. and G.L. Archer, *Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress*. *Clin Infect Dis*, 1994. **19**(2): p. 231-43; quiz 244-5.
14. Gastmeier, P., *Healthcare-associated versus community-acquired infections: a new challenge for science and society*. *Int J Med Microbiol*, 2010. **300**(6): p. 342-5.
15. Rohde, H., et al., *Induction of Staphylococcus epidermidis biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases*. *Mol Microbiol*, 2005. **55**(6): p. 1883-95.

16. Wisplinghoff, H., et al., *Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(3): p. 309-17.
17. Zimmerli, W. and C. Moser, *Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012. **65**(2): p. 158-68.
18. Rohde, H., et al., *Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches*. Reviews in Medical Microbiology, 2006. **17**(2).
19. Büttner, H., D. Mack, and H. Rohde, *Structural basis of Staphylococcus epidermidis biofilm formation: mechanisms and molecular interactions*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2015. **5**.
20. Vuong, C. and M. Otto, *Staphylococcus epidermidis infections*. Microbes Infect, 2002. **4**(4): p. 481-9.
21. Mack, D., et al., *Staphylococcus epidermidis Biofilms: Functional Molecules, Relation to Virulence, and Vaccine Potential*. Top Curr Chem, 2009. **288**: p. 157-82.
22. Goldmann, D.A. and G.B. Pier, *Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization*. Clin Microbiol Rev, 1993. **6**(2): p. 176-92.
23. Fidalgo, S., et al., *Bacteremia due to Staphylococcus epidermidis: microbiologic, epidemiologic, clinical, and prognostic features*. Rev Infect Dis, 1990. **12**(3): p. 520-8.
24. Otto, M., *Staphylococcal biofilms*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **322**: p. 207-28.
25. Darouiche, R.O., *Treatment of infections associated with surgical implants*. N Engl J Med, 2004. **350**(14): p. 1422-9.
26. Mack, D., et al., *Biofilm formation in medical device-related infection*. Int J Artif Organs, 2006. **29**(4): p. 343-59.
27. Emori, T.G. and R.P. Gaynes, *An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory*. Clin Microbiol Rev, 1993. **6**(4): p. 428-42.
28. Nickinson, R.S., et al., *The microbiology of the infected knee arthroplasty*. Int Orthop, 2010. **34**(4): p. 505-10.
29. Uckay, I., et al., *Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis*. Ann Med, 2009. **41**(2): p. 109-19.
30. Gotz, F., *Staphylococcus and biofilms*. Mol Microbiol, 2002. **43**(6): p. 1367-78.
31. Mack, D., *Molecular mechanisms of Staphylococcus epidermidis biofilm formation*. J Hosp Infect, 1999. **43 Suppl**: p. S113-25.
32. Christensen, G.D., et al., *Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci*. J Clin Microbiol, 1983. **18**(2): p. 258-69.
33. Inman, R.D., et al., *Clinical and microbial features of prosthetic joint infection*. Am J Med, 1984. **77**(1): p. 47-53.

34. Dunne, W.M., Jr., D.B. Nelson, and M.J. Chusid, *Epidemiologic markers of pediatric infections caused by coagulase-negative staphylococci*. *Pediatr Infect Dis J*, 1987. **6**(11): p. 1031-5.
35. Geipel, U. and M. Herrmann, [*The infected implant: bacteriology*]. *Unfallchirurg*, 2005. **108**(11): p. 961-975; quiz 976-7.
36. Lentino, J.R., *Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists*. *Clin Infect Dis*, 2003. **36**(9): p. 1157-61.
37. Durack, D.T. and P.B. Beeson, *Experimental bacterial endocarditis. II. Survival of a bacteria in endocardial vegetations*. *Br J Exp Pathol*, 1972. **53**(1): p. 50-3.
38. Bayston, R. and S.R. Penny, *Excessive production of mucoid substance in staphylococcus SIIA: a possible factor in colonisation of Holter shunts*. *Dev Med Child Neurol Suppl*, 1972. **27**: p. 25-8.
39. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. *Science*, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
40. Flemming, H.C. and J. Wingender, *The biofilm matrix*. *Nat Rev Microbiol*, 2010. **8**(9): p. 623-33.
41. Costerton, J.W., et al., *Microbial biofilms*. *Annu Rev Microbiol*, 1995. **49**: p. 711-45.
42. Vuong, C., et al., *A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(52): p. 54881-6.
43. Kristian, S.A., et al., *Biofilm formation induces C3a release and protects Staphylococcus epidermidis from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing*. *J Infect Dis*, 2008. **197**(7): p. 1028-35.
44. 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*. *Infect Immun*, 2011. **79**(6): p. 2267-76.
45. Heinzlmann, M., et al., *Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic Staphylococcus epidermidis RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1997. **4**(6): p. 705-10.
46. Knobloch, J.K., et al., *Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative Staphylococcus epidermidis*. *Med Microbiol Immunol*, 2002. **191**(2): p. 107-14.
47. Cerca, N., et al., *Molecular basis for preferential protective efficacy of antibodies directed to the poorly acetylated form of staphylococcal poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine*. *Infect Immun*, 2007. **75**(7): p. 3406-13.
48. Stewart, P.S. and J.W. Costerton, *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*. *Lancet*, 2001. **358**(9276): p. 135-8.
49. Wiederhold, N.P., et al., *Antibacterial activity of linezolid and vancomycin in an in vitro pharmacodynamic model of gram-positive catheter-related bacteraemia*. *J Antimicrob Chemother*, 2005. **55**(5): p. 792-5.

50. Hoiby, N., et al., *Antibiotic resistance of bacterial biofilms*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **35**(4): p. 322-32.
51. Otto, M., *Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **306**: p. 251-8.
52. Wagner, C., et al., *Post-traumatic osteomyelitis: analysis of inflammatory cells recruited into the site of infection*. Shock, 2003. **20**(6): p. 503-10.
53. Wagner, C., U. Obst, and G.M. Hansch, *Implant-associated posttraumatic osteomyelitis: collateral damage by local host defense?* Int J Artif Organs, 2005. **28**(11): p. 1172-80.
54. Younger, J.J., et al., *Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal to clinical outcome*. J Infect Dis, 1987. **156**(4): p. 548-54.
55. Ziebuhr, W., et al., *Nosocomial infections by Staphylococcus epidermidis: how a commensal bacterium turns into a pathogen*. Int J Antimicrob Agents, 2006. **28 Suppl 1**: p. S14-20.
56. O'Toole, G., H.B. Kaplan, and R. Kolter, *Biofilm formation as microbial development*. Annu Rev Microbiol, 2000. **54**: p. 49-79.
57. Chagnot, C., et al., *Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective*. Front Microbiol, 2013. **4**: p. 303.
58. Ludwicka, A., et al., *Attachment of staphylococci to various synthetic polymers*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A, 1984. **256**(4): p. 479-89.
59. Vacheethasanee, K., et al., *Bacterial surface properties of clinically isolated Staphylococcus epidermidis strains determine adhesion on polyethylene*. J Biomed Mater Res, 1998. **42**(3): p. 425-32.
60. Heilmann, C., et al., *Evidence for autolysin-mediated primary attachment of Staphylococcus epidermidis to a polystyrene surface*. Mol Microbiol, 1997. **24**(5): p. 1013-24.
61. von Eiff, C., G. Peters, and C. Heilmann, *Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci*. Lancet Infect Dis, 2002. **2**(11): p. 677-85.
62. Vaudaux, P., et al., *Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin*. J Infect Dis, 1989. **160**(5): p. 865-75.
63. Espersen, F., et al., *Attachment of staphylococci to different plastic tubes in vitro*. J Med Microbiol, 1994. **40**(1): p. 37-42.
64. Patti, J.M., et al., *MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues*. Annu Rev Microbiol, 1994. **48**: p. 585-617.
65. Foster, T.J. and M. Hook, *Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol, 1998. **6**(12): p. 484-8.
66. Clarke, S.R. and S.J. Foster, *Surface adhesins of Staphylococcus aureus*. Adv Microb Physiol, 2006. **51**: p. 187-224.

67. Mack, D., et al., *Mechanisms of biofilm formation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses*. Int J Med Microbiol, 2004. **294**(2-3): p. 203-12.
68. Ziebuhr, W., et al., *Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in Staphylococcus epidermidis blood culture strains and mucosal isolates*. Infect Immun, 1997. **65**(3): p. 890-6.
69. Frebourg, N.B., et al., *PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating Staphylococcus epidermidis strains*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(2): p. 877-80.
70. Galdbart, J.O., et al., *Screening for Staphylococcus epidermidis markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses*. J Infect Dis, 2000. **182**(1): p. 351-5.
71. 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*. Infect Immun, 1992. **60**(5): p. 2048-57.
72. Mack, D., et al., *The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis*. J Bacteriol, 1996. **178**(1): p. 175-83.
73. Rupp, M.E., et al., *Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of Staphylococcus epidermidis in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model*. Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2627-32.
74. Rupp, M.E., et al., *Characterization of Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model*. Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2656-9.
75. Li, H., et al., *Conversion of Staphylococcus epidermidis strains from commensal to invasive by expression of the ica locus encoding production of biofilm exopolysaccharide*. Infect Immun, 2005. **73**(5): p. 3188-91.
76. Yao, Y., et al., *Factors characterizing Staphylococcus epidermidis invasiveness determined by comparative genomics*. Infect Immun, 2005. **73**(3): p. 1856-60.
77. Frank, K.L., A.D. Hanssen, and R. Patel, *icaA is not a useful diagnostic marker for prosthetic joint infection*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(10): p. 4846-9.
78. Koskela, A., et al., *Prevalence of the ica operon and insertion sequence IS256 among Staphylococcus epidermidis prosthetic joint infection isolates*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009. **28**(6): p. 655-60.
79. Kogan, G., et al., *Biofilms of clinical strains of Staphylococcus that do not contain polysaccharide intercellular adhesin*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **255**(1): p. 11-6.
80. Bradford, R., et al., *Coagulase-negative staphylococci in very-low-birth-weight infants: inability of genetic markers to distinguish invasive strains from blood culture contaminants*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2006. **25**(5): p. 283-90.

81. Petrelli, D., et al., *Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in Staphylococcus epidermidis isolates from central venous catheter infections*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2006. **25**(12): p. 773-81.
82. 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*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(12): p. 5614-9.
83. 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. 1711-20.
84. Hussain, M., et al., *A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of Staphylococcus epidermidis strains on surfaces*. Infect Immun, 1997. **65**(2): p. 519-24.
85. Conrady, D.G., et al., *A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(49): p. 19456-61.
86. Banner, M.A., et al., *Localized tufts of fibrils on Staphylococcus epidermidis NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein*. J Bacteriol, 2007. **189**(7): p. 2793-804.
87. Arciola, C.R., et al., *Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials*. Biomaterials, 2012. **33**(26): p. 5967-82.
88. Vandecasteele, S.J., et al., *Expression of biofilm-associated genes in Staphylococcus epidermidis during in vitro and in vivo foreign body infections*. J Infect Dis, 2003. **188**(5): p. 730-7.
89. Stevens, N.T., et al., *Biofilm and the role of the ica operon and aap in Staphylococcus epidermidis isolates causing neurosurgical meningitis*. Clin Microbiol Infect, 2008. **14**(7): p. 719-22.
90. Otto, M., *Physical stress and bacterial colonization*. FEMS Microbiology Reviews, 2014. **38**(6): p. 1250-1270.
91. Hennig, S., S. Nyunt Wai, and W. Ziebuhr, *Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an ica-positive Staphylococcus epidermidis isolate*. Int J Med Microbiol, 2007. **297**(2): p. 117-22.
92. Williams, R.J., et al., *Identification of a fibronectin-binding protein from Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6805-10.
93. Clarke, S.R., et al., *Analysis of Ehb, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6680-7.
94. Christner, M., et al., *The giant extracellular matrix-binding protein of Staphylococcus epidermidis mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin*. Mol Microbiol, 2010. **75**(1): p. 187-207.
95. Christner, M., et al., *sarA negatively regulates Staphylococcus epidermidis biofilm formation by modulating expression of 1 MDa extracellular matrix binding protein and autolysis-dependent release of eDNA*. Mol Microbiol, 2012. **86**(2): p. 394-410.

96. Whitchurch, C.B., et al., *Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation*. Science, 2002. **295**(5559): p. 1487.
97. Tormo, M.A., et al., *SarA is an essential positive regulator of Staphylococcus epidermidis biofilm development*. J Bacteriol, 2005. **187**(7): p. 2348-56.
98. Handke, L.D., et al., *SigmaB and SarA independently regulate polysaccharide intercellular adhesin production in Staphylococcus epidermidis*. Can J Microbiol, 2007. **53**(1): p. 82-91.
99. Kreiswirth, B.N., et al., *The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage*. Nature, 1983. **305**(5936): p. 709-12.
100. Schleifer, K.H.a.F., U., *Description of a New Species of the Genus Staphylococcus: Staphylococcus carnosus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1982(32(2)): p. 153-156.
101. Kloos, W.E., et al., *Ribotype delineation and description of Staphylococcus sciuri subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes*. Int J Syst Bacteriol, 1997. **47**(2): p. 313-23.
102. Rogers, K.L., P.D. Fey, and M.E. Rupp, *Coagulase-negative staphylococcal infections*. Infect Dis Clin North Am, 2009. **23**(1): p. 73-98.
103. Scherr, T.D., et al., *Hiding in Plain Sight: Interplay between Staphylococcal Biofilms and Host Immunity*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 37.
104. Cheng, A.G., D. Missiakas, and O. Schneewind, *The giant protein Ehb is a determinant of Staphylococcus aureus cell size and complement resistance*. J Bacteriol, 2014. **196**(5): p. 971-81.
105. Foster, S.J., *Molecular analysis of three major wall-associated proteins of Bacillus subtilis 168: evidence for processing of the product of a gene encoding a 258 kDa precursor two-domain ligand-binding protein*. Mol Microbiol, 1993. **8**(2): p. 299-310.
106. Manganelli, R. and I. van de Rijn, *Characterization of emb, a gene encoding the major adhesin of Streptococcus defectivus*. Infect Immun, 1999. **67**(1): p. 50-6.
107. Hartford, O., et al., *The Fbe (SdrG) protein of Staphylococcus epidermidis HB promotes bacterial adherence to fibrinogen*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 9): p. 2545-52.
108. Downer, R., et al., *The elastin-binding protein of Staphylococcus aureus (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 243-50.
109. Conrady, D.G., J.J. Wilson, and A.B. Herr, *Structural basis for Zn<sup>2+</sup>-dependent intercellular adhesion in staphylococcal biofilms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(3): p. E202-11.
110. Macintosh, R.L., et al., *The terminal A domain of the fibrillar accumulation-associated protein (Aap) of Staphylococcus epidermidis mediates adhesion to human corneocytes*. J Bacteriol, 2009. **191**(22): p. 7007-16.
111. 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*. Infect Immun, 2015. **83**(1): p. 214-26.

112. Biswas, R., et al., *Activity of the major staphylococcal autolysin Atl*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **259**(2): p. 260-8.
113. Zoll, S., et al., *Structural basis of cell wall cleavage by a staphylococcal autolysin*. PLoS Pathog, 2010. **6**(3): p. e1000807.
114. Schlag, M., et al., *Role of staphylococcal wall teichoic acid in targeting the major autolysin Atl*. Mol Microbiol, 2010. **75**(4): p. 864-73.
115. Geoghegan, J.A., et al., *Role of surface protein SasG in biofilm formation by Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2010. **192**(21): p. 5663-73.
116. Gottesman, S., *Regulation by proteolysis: developmental switches*. Curr Opin Microbiol, 1999. **2**(2): p. 142-7.
117. Otto, M., *Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis peptide pheromones produced by the accessory gene regulator agr system*. Peptides, 2001. **22**(10): p. 1603-8.
118. Chan, P.F. and S.J. Foster, *Role of SarA in virulence determinant production and environmental signal transduction in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 1998. **180**(23): p. 6232-41.
119. Abdelnour, A., et al., *The accessory gene regulator (agr) controls Staphylococcus aureus virulence in a murine arthritis model*. Infect Immun, 1993. **61**(9): p. 3879-85.
120. Shaw, L., et al., *The role and regulation of the extracellular proteases of Staphylococcus aureus*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 1): p. 217-28.
121. Lai, Y., et al., *The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci*. Mol Microbiol, 2007. **63**(2): p. 497-506.
122. Karlsson, A., et al., *Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in Staphylococcus aureus sarA mutants due to up-regulation of extracellular proteases*. Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 4742-8.
123. McAleese, F.M., et al., *Loss of clumping factor B fibrinogen binding activity by Staphylococcus aureus involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 29969-78.
124. Boles, B.R. and A.R. Horswill, *Agr-mediated dispersal of Staphylococcus aureus biofilms*. PLoS Pathog, 2008. **4**(4): p. e1000052.
125. Dubin, G., *Extracellular proteases of Staphylococcus spp.* Biol Chem, 2002. **383**(7-8): p. 1075-86.
126. Dubin, G., et al., *Molecular cloning and biochemical characterisation of proteases from Staphylococcus epidermidis*. Biol Chem, 2001. **382**(11): p. 1575-82.
127. Merck-Millipore. 2016 15.02.2015; Available from: <http://www.merckmillipore.com/US/en/products/life-science-research/inhibitors-and-biochemicals/Proteases-Inhibitors/fXgb.qB.69QAAAFameBkiQpx.nav>.
128. Schindler, C.A. and V.T. Schuhardt, *LYSOSTAPHIN: A NEW BACTERIOLYTIC AGENT FOR THE STAPHYLOCOCCUS*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1964. **51**: p. 414-21.

129. Navarre, W.W. and O. Schneewind, *Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(1): p. 174-229.
130. Ton-That, H., et al., *Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of Staphylococcus aureus at the LPXTG motif*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12424-9.
131. Hussain, M., et al., *Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of Staphylococcus aureus with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins*. J Bacteriol, 2001. **183**(23): p. 6778-86.
132. Desvaux, M., et al., *Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **256**(1): p. 1-15.
133. Sadowski, P.G., et al., *Sub-cellular localization of membrane proteins*. Proteomics, 2008. **8**(19): p. 3991-4011.
134. Tjalsma, H. and J.M. van Dijk, *Proteomics-based consensus prediction of protein retention in a bacterial membrane*. Proteomics, 2005. **5**(17): p. 4472-82.
135. van Roosmalen, M.L., et al., *Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1694**(1-3): p. 279-97.
136. Tjalsma, H., et al., *Signal peptide-dependent protein transport in Bacillus subtilis: a genome-based survey of the secretome*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(3): p. 515-47.
137. Tjalsma, H., et al., *Proteomics of protein secretion by Bacillus subtilis: separating the "secrets" of the secretome*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 207-33.
138. Schneewind, O. and D.M. Missiakas, *Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1592): p. 1123-39.
139. Fischetti, V.A., V. Pancholi, and O. Schneewind, *Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci*. Mol Microbiol, 1990. **4**(9): p. 1603-5.
140. Ton-That, H. and O. Schneewind, *Anchor structure of staphylococcal surface proteins. IV. Inhibitors of the cell wall sorting reaction*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24316-20.
141. Marraffini, L.A., A.C. Dedent, and O. Schneewind, *Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria*. Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(1): p. 192-221.
142. Grundmeier, M., et al., *Truncation of fibronectin-binding proteins in Staphylococcus aureus strain Newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function*. Infect Immun, 2004. **72**(12): p. 7155-63.
143. Heilmann, C., et al., *Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from Staphylococcus epidermidis*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 10): p. 2769-78.
144. Buist, G., et al., *LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans*. Mol Microbiol, 2008. **68**(4): p. 838-47.

145. Heilmann, C., et al., *The multifunctional Staphylococcus aureus autolysin aaa mediates adherence to immobilized fibrinogen and fibronectin*. Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 4793-802.
146. Braun, L., et al., *InlB: an invasion protein of Listeria monocytogenes with a novel type of surface association*. Mol Microbiol, 1997. **25**(2): p. 285-94.
147. Jonquieres, R., et al., *Interaction between the protein InlB of Listeria monocytogenes and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria*. Mol Microbiol, 1999. **34**(5): p. 902-14.
148. Shockman, G.D. and J.F. Barrett, *Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria*. Annu Rev Microbiol, 1983. **37**: p. 501-27.
149. Giesbrecht, P., et al., *Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(4): p. 1371-414.
150. Weidenmaier, C., et al., *Role of teichoic acids in Staphylococcus aureus nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections*. Nat Med, 2004. **10**(3): p. 243-5.
151. Weidenmaier, C. and A. Peschel, *Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(4): p. 276-87.
152. Hussain, M., et al., *Teichoic acid enhances adhesion of Staphylococcus epidermidis to immobilized fibronectin*. Microb Pathog, 2001. **31**(6): p. 261-70.
153. Fischer, W., *Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of Staphylococcus aureus*. Med Microbiol Immunol, 1994. **183**(2): p. 61-76.
154. Komatsuzawa, H., et al., *Tn551-mediated insertional inactivation of the fmtB gene encoding a cell wall-associated protein abolishes methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother, 2000. **45**(4): p. 421-31.
155. Schroeder, K., et al., *Molecular characterization of a novel Staphylococcus aureus surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7567.
156. Sjobring, U., L. Bjorck, and W. Kastern, *Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties*. J Biol Chem, 1991. **266**(1): p. 399-405.
157. Lejon, S., J.F. Cramer, and P. Nordberg, *Structural basis for the binding of naproxen to human serum albumin in the presence of fatty acids and the GA module*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2008. **64**(Pt 2): p. 64-9.
158. de Chateau, M., E. Holst, and L. Bjorck, *Protein PAB, an albumin-binding bacterial surface protein promoting growth and virulence*. J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 26609-15.
159. Lejon, S., et al., *Crystal structure and biological implications of a bacterial albumin binding module in complex with human serum albumin*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42924-8.
160. Bae, T. and O. Schneewind, *The YSIRK-G/S motif of staphylococcal protein A and its role in efficiency of signal peptide processing*. J Bacteriol, 2003. **185**(9): p. 2910-9.
161. DeDent, A., et al., *Signal peptides direct surface proteins to two distinct envelope locations of Staphylococcus aureus*. Embo j, 2008. **27**(20): p. 2656-68.

162. Velez, M.P., et al., *Characterization of MabA, a modulator of Lactobacillus rhamnosus GG adhesion and biofilm formation*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. **59**(3): p. 386-98.
163. 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. 488-96.
164. 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*. J Biol Chem, 2012. **287**(45): p. 38178-89.
165. Kuroda, M., et al., *Staphylococcus aureus giant protein Ebh is involved in tolerance to transient hyperosmotic pressure*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **374**(2): p. 237-41.

## 9. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Herrn Professor Martin Aepfelbacher danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene durchführen zu können. Der Dank gilt hierbei für die zu Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte. Ich danke der AG Aepfelbacher, deren Mitarbeiter stets versucht haben, auch einem Mediziner wie mir die große weite Welt der Forschung näher zu bringen - wenn ich es in ihren Augen auch nur knapp bis zur Kaffeeküche geschafft habe.

Für eine herausragende technische Betreuung („*Duuuuuu Geeeeesche...?*“) geht der nächste Dank direkt an Gesche Kroll. Sie war es auch beim wiederholten Mal nicht leid, ihre jahrelange Erfahrung und offensichtliche Geduld in meine Einarbeitung und diversen Rettungen meiner Experimente zu investieren. Zudem Henning Büttner für exzellente Vorarbeiten an den Plasmiden und die wohlwollende Motivation für das zeitliche zu erbringende Opfer: „*Tja, dann musst du wohl länger bleiben oder das ganze Wochenende reinkommen... oder beides!*“. Des Weiteren Marta Kotasinska für die ESI-Massenspektrometrie-Ergebnisse und gleichzeitige Relativierung von allem, was man mir vorher gezeigt hat: „*Ach...das brauchst du nicht. Guck! Ich mach das auch nicht!*“.

Zuletzt danke ich meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Holger Rohde: Danke für das interessante Thema und die überragende Betreuung. Danke für die Inspirationen und den fast schon erschreckenden Optimismus. Mit deinem Leitspruch „*Keine Sorge, alles wird gut*“ gehe ich selbst neuerdings den Kollegen im OP auf die Nerven.

Für jedes gemeinsame Bier einen Dank und schon schlagen unsere Frauen die Hände über dem Kopf zusammen und sagen im Chor „*Du hast doch gesagt ihr trinkt nur eins!!!*“.

Anja, danke für Alles, ich liebe dich!

## **10. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebene Literatur und Hilfsmittel fanden keine Verwendung. Ferner versichere ich, dass diese Dissertation an keiner anderen Einrichtung vorgelegt oder veröffentlicht wurde.

---

Jérôme Pascal Wilde, Juli 2016 in Hamburg