

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Professor Dr. med. Martin Aepfelbacher

Etablierung von Screeningverfahren zur Identifikation von *Staphylococcus epidermidis* Transposonmutanten mit einer veränderten Embp Produktion und Biofilmbildung

Dissertation

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

vorgelegt von

Nina Hector
aus Hamburg

Hamburg 2018

Die Experimente für diese Arbeit wurden von Oktober 2011 bis April 2013 unter Anleitung von Professor Dr. med. H. Rohde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 06.09.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Holger Rohde

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Dominic Wichmann

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6 – 26
1.1 Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> und Nosokomiale Infektionen	6
1.2 Staphylokokken	9
1.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	12
1.4 Bakterielle Biofilmbildung und <i>in vitro</i> -Nachweismethoden	13
1.4.1 Phase der ersten Anhaftung	16
1.4.1.1 Anhaftung an abiotische Oberflächen und beteiligte Faktoren.....	16
1.4.1.2 Anhaftung an konditionierte Oberflächen und beteiligte Faktoren	17
1.4.3 Phase der Akkumulation und Reifung und beteiligte Faktoren.....	18
1.4.4 Phase der Biofilmauflösung.....	19
1.4.5 Regulationsmechanismen	19
1.5 Embp-vermittelte Biofilmbildung	21
1.6 Prinzipien der Transposonmutagenese	24
1.7 Arbeitshypothese und Fragestellung	26
2. Material und Methoden	27 – 42
2.1 Material	27 – 32
2.1.1 Bakterienstämme	27
2.1.2 Plasmide/Phagen/Antikörper	28
2.1.3 Nährmedien.....	28
2.1.4 Lösungen, Reagenzien und Puffer	29
2.1.5 Antibiotika	30
2.1.6 Kits.....	31
2.1.7 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial.....	31
2.1.8 Software	32
2.2 Methoden	33 – 42
2.2.1 Phänotypische Methoden.....	33 – 34
2.2.1.1 Biofilmassay in Gegenwart von Ziegenserum	33
2.2.1.2 Biofilmassay in Gegenwart von Tigecyclin.....	33
2.2.2 Genetische Methoden	34 – 35
2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA	34
2.2.2.2 Präparation von chromosomaler DNA.....	35
2.2.2.3 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese	35
2.2.3 Genetische Manipulation von Bakterien	36 – 40
2.2.3.1 Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	36
2.2.3.2 Phagentransduktion.....	36
2.2.3.3 Elektroporation.....	38
2.2.3.4 Transposonmutagenese mit Plasmid pBTn.....	39

2.2.4 Immunchemische Methoden.....	40 – 42
2.2.4.1 Dot Blot Analyse von Oberflächenproteinen nach Kultur in Gegenwart von Ziegenserum.....	40
2.2.4.2 Dot Blot Analyse von Oberflächenproteinen nach Kultur in Gegenwart von Tigecyclin	41
3. Ergebnisse	43 – 82
3.1 Begriffsbestimmungen und Definitionen	43
3.2 Identifikation geeigneter Bedingungen zur Detektion Ziegenserum- induzierter <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung und Embp Produktion.....	44
3.3 Dot Blot Assay-basierter Screen zur Identifikation von <i>S. epidermidis</i> 1585wt Transposonmutanten mit einer veränderten Ziegenserum- induzierten Embp Produktion.....	46 – 61
3.3.1 Adaptation des Basis Dot Blot-Protokolls auf ein Protokoll im 96-Well-Format	46 – 51
3.3.1.1 Essentielle Versuchsschritte eines Dot Blot Assays im 96-Well- Format	47
3.3.1.2 Kulturdauer und Ziegenserumkonzentration im 96-Well-Format ..	49
3.3.1.3 Optimierung des Kulturvolumens.....	50
3.3.2 Verfahren zur Reaktivierung von archivierten Transposonmutanten im 96-Well-Format	52 – 54
3.3.2.1 Auftauen von in Mikrotiterplatten archivierten Bakterien.....	52
3.3.2.2 Anzucht von Vorkulturen aus <i>S. epidermidis</i> -Kolonien im 96-Well-Format (VK-96).....	53
3.3.3 Erstellung eines Dot Blot Assays im 96-Well-Format	54
3.3.4 Positiv- und Negativkontrollen im Screen.....	55
3.3.5 Validierung des Dot Blot Assay-basierten Screens zur Identifikation von <i>S. epidermidis</i> 1585hc Mutanten mit veränderter Embp Produktion	56
3.3.6 Versuchsprotokoll Dot Blot Assay-basierter Screen auf das Vorliegen einer verminderten Embp Induktion durch Ziegenserum	58
3.4 Biofilmassay-basierter Screen zur Identifikation von <i>S. epidermidis</i> - 1585hc Transposonmutanten mit einer veränderten Ziegenserum- induzierten Biofilmbildung	62 – 72
3.4.1 Analyse der Serum-induzierten Biofilmbildung bei <i>S. epidermidis</i> 1585hc.....	62
3.4.2 Aufbau eines Biofilm-Screeningassays im 96-Well-Plattenformat.....	63
3.4.3 Optimierte Vorkultur zur Erzielung von homogenen Bakterienzahlen in 96-Well Deepwellplatten (VK-96-OD)	65
3.4.4 Feineinstellung des Biofilmassay-basierten Screeningverfahrens.....	67
3.4.5 Versuchsprotokoll Biofilmassay-basierter Screen auf das Vorliegen einer verminderten Biofilmbildung durch Ziegenserum	70

3.4.6 Ergebnis nach Durchführung des Screens	72
3.5 Untersuchung zur Tigecyclin-induzierten Biofilmbildung	73 – 79
3.5.1 Embp- und Biofilminduktion durch Tigecyclin bei 1585wt.....	74
3.5.2 Versuchsprotokoll Dot Blot-basierter Screen zur Identifikation von <i>S. epidermidis</i> 1585wt Transposonmutanten mit einer veränderten Tigecyclin-induzierten Embp Produktion.....	76
3.6 Etablierung eines pBTn (<i>mariner</i>)-basierten Transposonmutagenese- systems in 1585wt	80
4. Diskussion	83
5. Zusammenfassung.....	91
6. Summary	92
7. Abkürzungsverzeichnis.....	93
8. Literaturverzeichnis.....	95
9. Danksagung	108
10. Lebenslauf.....	109
11. Eidesstattliche Versicherung.....	110

1. Einleitung

1.1 Biofilmbildung von *S. epidermidis* und Nosokomiale Infektionen

Die im klinischen Alltag am häufigsten nachgewiesene Spezies der Koagulasenegativen Staphylokokken (KNS) ist *Staphylococcus epidermidis*. Infektionen durch *S. epidermidis* treten vor allem im Kontext von Fremdmaterialimplantationen auf (DA-HAI, *device-associated healthcare-associated infection*) (Becker et al. 2014). Dies liegt an der Fähigkeit, die Oberfläche von Implantaten in Form festhaftender Biofilme zu kolonisieren. Die Kontamination der Materialien erfolgt hierbei regelhaft im Rahmen der Implantationsprozedur (Otto 2009, Becker et al. 2014). Die zunächst planktonischen Bakterienzellen können an die Fremdmaterialoberfläche anhaften. Durch diesen Wechsel zur sessilen Lebensweise ergibt sich eine Verhaltensänderung: Die Bakterien beginnen, eine amorphe extrazelluläre Matrix aus Proteinen, Polysacchariden, extrazellulärer DNA (eDNA) und Teichonsäuren zu bilden. Diese Struktur zusammen mit Wirtsbestandteilen und eingebetteten Agglomeraten aus Bakterienzellen selbst wird als Biofilm bezeichnet (Abbildung 1) (Hussain et al. 1992, Hussein et al. 1993, Hussain et al. 1997, Mack et al. 1996, Costerton et al. 1999, Sadovskaya et al. 2005, Izano et al. 2008, Mack et al. 2009, Otto 2009, Rohde et al. 2010, Becker et al. 2014). Der Biofilm schützt den Erreger vor der Eradikation durch das wirtseigene Immunsystem und Antibiotika (Costerton et al. 1999, Stewart und Costerton 2001, Foster 2005, Mack et al. 2009, Schommer et al. 2011). Biofilm-assoziierte Infektionen persistieren regelhaft und ihr Verlauf ist von subakut-chronischer Natur (Costerton et al. 1999, Stewart und Costerton 2001, von Eiff et al. 2002, Rohde et al. 2010, Römling und Balsalobre 2012). Der Biofilm kann vom Bakterium wieder aufgelöst werden, sodass sich die Infektion metastatisch ausbreiten und zu Komplikationen führen kann (Becker et al. 2014). Zur erfolgreichen Therapie ist in der Regel und je nach Fremdmaterial die Entfernung und gegebenenfalls Reinsertion in Kombination mit einer antibiotischen Therapie auch über längere Zeit notwendig (Darouiche 2004, Mack et al. 2009, Widerström et al. 2012, Becker et al. 2014).

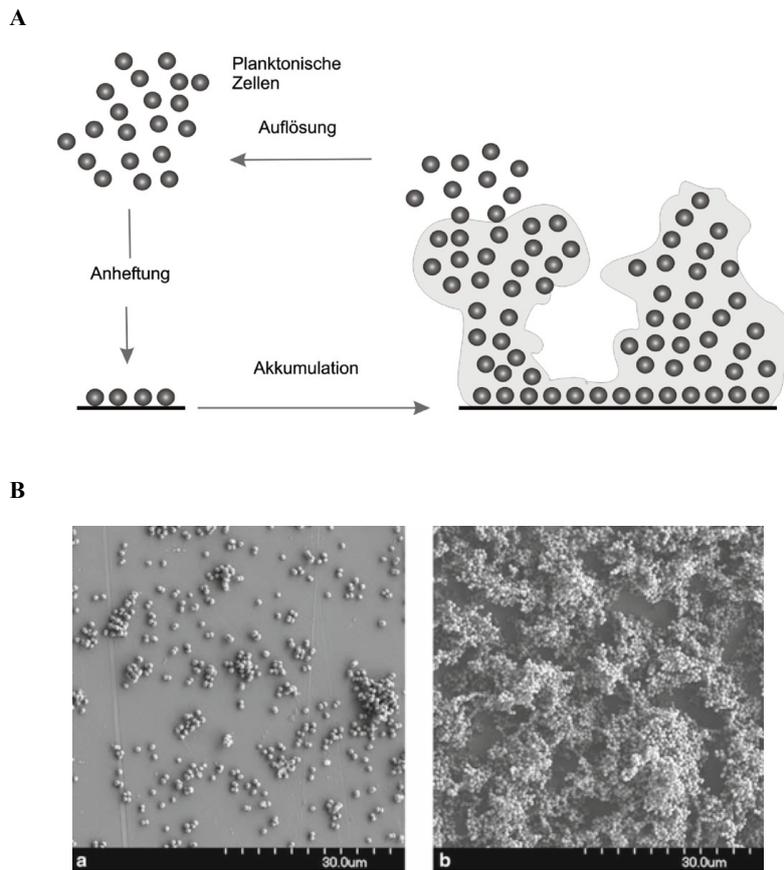


Abbildung 1: (A) Schematische Darstellung der Biofilmbildung. Bakterienzellen, die zunächst umherschwimmen, also planktonisch wachsen, haften an eine Oberfläche, akkumulieren und bilden anschließend einen Biofilm. Der Biofilm besteht aus einer amorphen extrazellulären Matrix (hellgrau dargestellt, Bestandteile siehe Kapitel 1.1, 1.4 und Abbildung 4) sowie den Bakterienzellen selbst. Abbildung aus Mack et al. 2006. **(B) Elektronenmikroskopisches Bild eines Biofilms.** Scanning Electron Microscopy eines *S. epidermidis*-Biofilms auf verchromtem Stahl nach 2-stündiger (a) und nach 18-stündiger (b) Inkubation. Es sind die sich bildenden turmartigen Strukturen aus Bakterienzellen zu sehen. Abbildung und Beschreibung aus Mack et al. 2009.

Eine nosokomiale Infektion (NI) ist „eine Infektion mit lokalen oder systemischen Infektionszeichen als Reaktion auf das Vorhandensein von Erregern oder ihrer Toxine, die im zeitlichen Zusammenhang mit einer stationären oder einer ambulanten medizinischen Maßnahme steht, soweit die Infektion nicht bereits vorher bestand“ (Infektionsschutzgesetz - IfSG § 2 Punkt 8). Die Gesamtprävalenzen der NIs, beziehungsweise HAIs (*healthcare-associated infections*, international) liegen in Deutschland bei 5,1 % (Behnke et al. 2013), den USA bei 4 % (Magill et al. 2014) und europaweit bei 7,1 % (Zarb et al. 2012). In Deutschland zeigt sich dieses Niveau zu 1994 stabil. Höhere Prävalenzraten sind in großen Krankenhäusern wie Universitätskliniken (6,1 %, Deutschland 2011) und auf Intensivstationen zu finden

(18,6 % in Deutschland 2011 und 28,1 % in Europa 2010) (Behnke et al. 2013, Zarb et al. 2012). Von allen HAIs in Europa im Zeitraum 2011 bis 2012 zählten Atemwegsinfektionen (23,5 %), postoperative Infektionen (SSI, *surgical site infection*, 19,6 %), Harnwegsinfekte (19,0 %), Blutstrominfektionen (BSI, 10,7 %) und gastrointestinale Infektionen (7,7 %) von 231 459 Patienten aus 30 Länder und 947 Akutkrankenhäuser zu den häufigsten (ECDC 2013). KNS stehen unter den isolierten Erregern an sechster Stelle (7,5 %), hinter *Escherichia coli* (15,9 %), *Staphylococcus aureus* (12,3 %) und *Enterococcus spp.* (9,6 %). *Clostridium difficile* war für 48 % aller gastrointestinalen Infekte verantwortlich (ECDC 2013).

Besonders häufige DA-HAIs unterliegen weltweit regelmäßigen Datenerhebungen (Deutschland: RKI/KISS, Europa: ECDC, USA: CDC/NHSN, weltweit: INICC). Dazu zählen *central line associated bloodstream infections* (CLABSIs), also durch einen zentralen Venenkatheter verursachte Blutstrominfektionen, *catheter-associated urinary tract infections* (CAUTIs) und *ventilator-associated pneumoniae* (VAPs). DA-HAIs sind auf Intensivstationen am häufigsten (Rosenthal et al. 2014). Dem jährlichen epidemiologischen Datenreport der ECDC 2015 zur Folge waren KNS mit 22,3 % von 6 313 Isolaten aus allen Blutstrominfektionen von Intensivpatienten die häufigste isolierte Spezies, gefolgt von *Enterococcus spp.* (12,5 %) und *Staphylococcus aureus* (10,1 %). CLABSIs waren für circa die Hälfte aller Blutstrominfektionen verantwortlich. Auch bei CAUTIs auf Intensivstationen spielen KNS eine wichtige Rolle. Sie waren zwar nur der acht häufigste Erreger, allerdings werden im Durchschnitt in 83,9 % der Patiententage Urinkatheter benutzt (ECDC 2015). In Bezug auf postoperative Infektionen (SSI) spielten KNS bei jeweils circa 1/5 der gefundenen Isolate von Infektionen nach koronararteriellen Bypass-Operationen, Knieendoprotheseneinsätzen und Hüftendoprotheseneinsätzen eine wichtige Rolle (ECDC 2015). Typische sonstige betroffene Fremdmaterialien sind zum Beispiel künstliche Herzklappen (Chu et al. 2009), andere kardiologische Implantate (Gandelman et al. 2007, Fukunaga et al. 2017, Siméon et al. 2017), vaskuläre Grafts (Saleem et al. 2010), Dialysekatheter (Klevens et al. 2008, Molina et al. 2013), zerebrospinale Shunts (Prusseit et al. 2009), künstliche Linsen (Widerstrom 2012) und Transfusionsbeutel (Kou et al. 2015). Komplikationen sind zum Beispiel Abszesse, Tunnelweginfektionen, infizierten Thrombophlebitiden, Meningitiden, Sepsen,

Endokarditiden, septische Transfusionsreaktionen und embolische Ereignisse (Mermel et al. 2009, Widerström et al. 2012, Becker et al. 2014, Kou et al. 2015). KNS zählen zu den opportunistischen Erregern (Sadovskaya et al. 2005), Infektionen betreffen also vor allem prädisponierte Patienten mit herabgesetzter Immunkompetenz (Costerton et al. 1999, Vuong und Otto 2002, Otto 2009, Becker et al. 2014, Büttner et al. 2015). Eine typische Ausnahme ist die nicht Fremdmaterial-assoziierte Nativklappenendokarditis im immunkompetenten Erwachsenen (von Eiff et al. 2002, Chu et al. 2008, Widerström et al. 2012, Becker et al. 2014). Insgesamt steht bei KNS-Bakteriämien die Verlängerung der Liegedauer im Gegensatz zur Mortalität im Vordergrund (Olaechea et al. 2011, Molina et al. 2013).

Die Diagnosestellung einer *S. epidermidis* Infektion ist erschwert, da positive Kulturergebnisse eine tatsächliche Infektion oder eine entnahmebedingte Kontamination repräsentieren können (von Eiff et al. 2002, Becker et al. 2014). Mit der Hinzunahme von Parametern wie der time to positivity und möglichst hoher Zahl entnommener Blutkulturen wird versucht, diesem Problem zu begegnen (Tokars 2004, Gastmeier et al. 2011, García-Vázquez et al. 2013).

1.2 Staphylokokken

S. epidermidis gehört zur Gattung *Staphylococcus*. Hierbei handelt es sich um grampositive, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende, nicht bewegliche, circa 1 µm durchmessende Kugelbakterien, die einzeln oder in Paar-, Tetraeder- oder traubenartigen Strukturen vorkommen (altgr.: σταφυλή, *staphylé* = Weintraube; κόκκος, *kókkos* = Kern, Korn) (Becker et al. 2014). Durch den Terminus *Staphylococcus* unterschied der Chirurg Alexander Ogston 1882 die traubenförmig strukturierten eitererregenden Mikrokokken von den von Theodor Billroth als kettenförmig strukturierte Mikrokokken beschriebenen Streptokokken (altgr.: στρεπτός, *streptós* = Halskette) (Ogston 1882). Die Gattungen *Staphylococcus* und weitere werden der Familie *Staphylococcaceae* zugeordnet (Euzéby 2010), welche dem Phylum Firmicutes mit niedrigem Guanin- und Cytosin-Gehalt zugehört (Abbildung 2) (Becker et al. 2014). Die vorherige Einteilung von *Staphylococcus* und

Micrococcus zur Familie *Micrococcaceae* wurde so überarbeitet. Die redefinierte Familie *Micrococcaceae* gehört nun zum Phylum *Actinobacteria* (Stackebrandt et al. 1995, Stackebrandt et al. 1997, Becker et al. 2014).

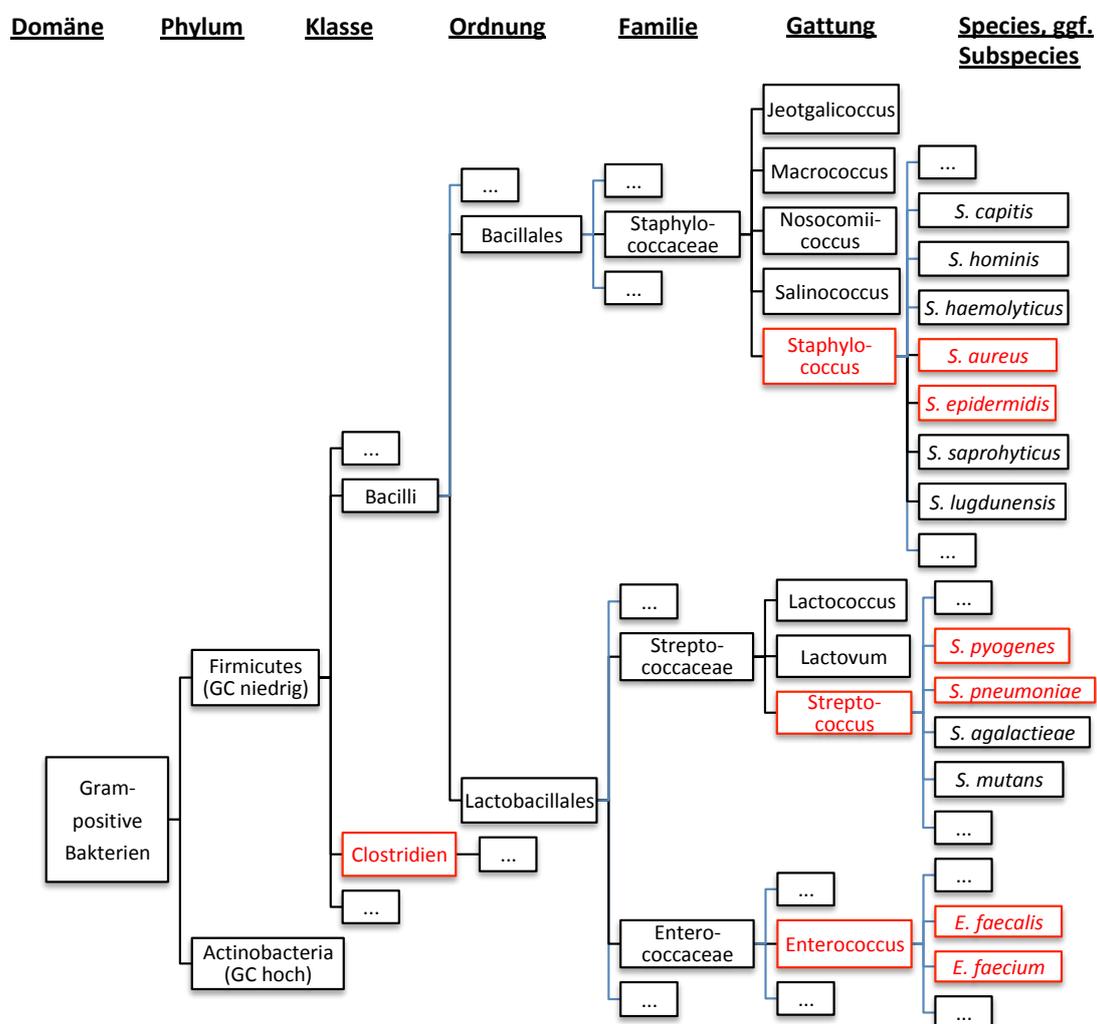


Abbildung 2: Skizze zur Taxonomie grampositiver Bakterien. Abbildung ohne Anspruch auf Vollständigkeit, sondern mit dem Fokus auf wichtige Vertreter grampositive humanpathogener Erreger in der medizinischen Mikrobiologie (rote Umrandungen) wie insbesondere *Staphylococcus*, *Enterococcus* und *Streptococcus* mit bekannten Speziesbeispielen. Frei nach der „List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature“ (LPSN; <http://www.bacterio.net>), abgerufen am 11.04.2016.

Die Unterscheidung in koagulase-positive (KPS) und koagulase-negative Staphylokokken (KNS) ist bis heute gültig (Fairbrother 1940, Becker et al. 2014). Weiterhin ist *S. aureus* die nahezu einzige klinisch relevante KPS-Spezies (Becker et al. 2014). Der Haemagglutinationstest zum Nachweis des Clumpingfaktors von *S. aureus* ist wegen schlechter Sensitivität durch den gemeinsame Nachweis von Clumpingfaktor, Protein A und den kapsulären Polysacchariden 5 und 8 ersetzt

worden (third-generation test) (van Griethusen et al. 2001, Becker et al. 2014). Der Nachweis von Katalase, Oxidase und Novobiocinempfindlichkeit wird nach wie vor angewendet. Um die KNS speziesintern mit höherer Diskriminationschärfe voneinander zu unterscheiden, gibt es genotypisierende Herangehensweisen (Abbildung 3) (Widerström et al. 2012, Becker et al. 2014).

Oxidase	Negative							
Novobiocin	Susceptible							
Coagulase	Negative	Positive ¹ – variable ² – negative ³			Negative			
Species group	Hycus-Intermedius			Epidermidis-Aureus				
Cluster group	Muscae	Hycus	Intermedius	Aureus	Epidermidis	Warneri	Haemolyticus	Lugdunensis
Species	<i>S. muscae</i> <i>S. microti</i> <i>S. rostri</i>	<i>S. hycus</i> ² <i>S. agnetis</i> ² <i>S. chromogenes</i> ³ <i>S. felis</i> ³	<i>S. intermedius</i> ¹ <i>S. delphini</i> ¹ <i>S. lutrae</i> ¹ <i>S. pseudintermedius</i> ¹ <i>S. schleiferi</i> <i>ssp. schleiferi</i> [?] <i>ssp. coagulans</i> ¹	<i>S. aureus</i> <i>ssp. aureus</i> ¹ <i>ssp. anaerobius</i> ¹ <i>S. simiae</i> ¹	<i>S. epidermidis</i> <i>S. capitis</i> <i>ssp. capitis</i> <i>ssp. urealyticus</i> <i>S. caprae</i> <i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. warneri</i> <i>S. pasteurii</i>	<i>S. haemolyticus</i> <i>S. devriesei</i> <i>S. hominis</i> <i>ssp. hominis</i> <i>ssp. novobiocin</i> <i>ssp. septicus</i> <i>S. jettensis</i> <i>S. petrasii</i> <i>ssp. croceilyticus</i> <i>ssp. petrasii</i>	<i>S. lugdunensis</i>
Oxidase	Negative						Positive	
Novobiocin	Susceptible			Resistant				
Coagulase	Negative							
Species group	Auricularis	Simulans	Saprophyticus				Sciuri	
Cluster group	Auricularis	Simulans-Carnosus	Pettenkoferi-Massiliensis	Saprophyticus	Cohnii-Nepalensis	Arlettae-Kloosii	Sciuri	
Species	<i>S. auricularis</i>	<i>S. simulans</i> <i>S. carnosus</i> <i>ssp. utilis</i> <i>S. condimentis</i> <i>S. piscifermentans</i>	<i>S. pettenkoferi</i> <i>S. massiliensis</i>	<i>S. saprophyticus</i> <i>ssp. saprophyticus</i> <i>ssp. bovis</i> <i>S. equorum</i> <i>ssp. equorum</i> <i>ssp. linens</i> <i>S. gallinarum</i> <i>S. succinus</i> <i>ssp. succinus</i> <i>ssp. casei</i> <i>S. xylophilus</i>	<i>S. cohnii</i> <i>ssp. cohnii</i> <i>ssp. urealyticus</i> <i>S. nepalensis</i>	<i>S. arlettae</i> <i>S. kloosii</i>	<i>S. sciuri</i> <i>ssp. sciuri</i> <i>ssp. carmaticus</i> <i>ssp. rodentium</i> <i>S. fleuretii</i> <i>S. lentus</i> <i>S. stepanovicii</i> <i>S. vitulinus</i>	

Abbildung 3: Separation von Staphylokokkenspezies und – subspezies (ssp.). Die phylogenetische Separation ist erweitert um grundsätzliche diagnostische Charakteristika wie in Lamers et al. 2012 vorgeschlagen. Es wurden die Ergebnisse des Multilocus sequence typing von vier Genloki herangezogen, und zwar 16S-rRNA, rpoB (β -Untereinheit der RNA-Polymerase), tuf (Elongationsfaktor Tu) und dnaJ (Hitzechockprotein 40). Es handelt sich um sogenannte housekeeping-Gene, deren Genprodukte eine Rolle im zentralen Stoffwechsel spielen, sich also in jeder Spezies wiederfinden. Minimale Unterschiede auf dem Spezies- und Subspezieslevel können so detektiert werden. Diese Untersuchungen ergaben eine Einteilung in 15 Clustergruppen, die zu sechs Speziesgruppen gehören (Lamers et al. 2012, Widerström et al. 2012, Becker et al. 2014). Abbildung aus Becker et al. 2014.

Aus klinischer Sicht sind von den KNS noch *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* und *S. lugdunensis* hervorzuheben (siehe auch Abbildung 2 und 3). *S. haemolyticus*, *S. capitis* und *S. hominis* sind ebenfalls mit Fremdmaterial-assoziierten Infektionen assoziiert, *S. saprophyticus* ist ein gängiger Erreger akuter Urethritiden und *S. lugdunensis* nimmt als Erreger fulminant verlaufender Nativ- und Kunstklappenendokarditiden eine Sonderposition unter den KNS ein (Becker et al. 2014, Hitzenbichler et al. 2017).

Wie andere nosokomiale Erreger weisen auch KNS höhere Raten an Resistenzen gegenüber Antibiotika und Antiseptika auf (Kresken et al. 2011, Ma et al. 2011, Lepointeur et al. 2013, Becker et al. 2014). In Bezug auf die klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen von KNS-Isolaten ist das zwischen Staphylokokken transferierbare mobile genetische Element SCC_{mec} (SCC = *Staphylococcus Cassette Chromosome*) hervor zu heben. Es ist in das Chromosom der meisten klinischen KNS-Isolate inseriert und vermittelt über das penicillinbindende Protein PBP2a eine Methicillinresistenz (Du et al. 2013, Becker et al. 2014). Analog zu MRSA (Methicillinresistenter *S. aureus*) wird die Linie MRSE (Methicillinresistenter *S. epidermidis*) beschrieben (Du et al. 2013). Eine inter- und intrahospitale Verbreitung bestimmter *S. epidermidis*-Stämme wurde beobachtet (Rohde et al. 2005, Becker et al. 2014, Calà et al. 2015). Es ist auch denkbar, dass *S. epidermidis* ein genetisches Reservoir von Antibiotikaresistenzen für *S. aureus* bietet (Otto 2009).

1.3 *Staphylococcus epidermidis*

Der Name *S. epidermidis* geht auf den Pathologen William H. Welch zurück, der 1891 *S. epidermidis albus* von den bis dahin von Friedrich J. Rosenbach beschriebenen *S. pyogenes aureus* und *S. pyogenes albus* als weniger pathogenen, auch in aseptischen Wunden vorkommenden Keim abgrenzte (lat.: albus = weiß) (Welch 1891). *S. epidermidis* kolonisiert Haut und Schleimhäute in den ersten postnatalen Tagen bis Wochen (Kloos und Musselwhite 1975, Kloos 1980,) und repräsentiert den Hauptteil der normalen bakteriellen Hautflora (Vuong und Otto 2002, Becker et al. 2014). Es ist nicht klar, ob beim Wechsel von kolonisierender zur invasiven Lebensweise eine Pathogenitätsstrategie vorliegt oder die die kolonisierende Lebensweise ermöglichenden Mechanismen zum Virulenzfaktor werden (Mack et al. 2009, Otto 2009, Büttner et al. 2015). Grundsätzlich wird der Pathomechanismus von *S. epidermidis*-Infektionen aber eher als passiv beschrieben (Becker et al. 2014). Dennoch ist ein zytolytisches Toxin bekannt, es wird δ -Toxin oder auch PSM_γ genannt. Es führt durch Porenbildung in Zellmembranen zur Lyse zum Beispiel von

Erythrozyten (McKevitt et al. 1990). Auch PSM ϵ (zytolytisch) und PSM δ (Leukozytentoxin) sind als Toxine bekannt (Cheung et al. 2010).

Es gibt Überlegungen, ob sogar eine symbiontische Beziehung mit dem Wirt vorliegen könnte. Zum Beispiel konnte eine Inhibition der Kolonisation und Biofilmbildung von *S. aureus* durch *S. epidermidis* gezeigt werden (Iwase et al. 2010, Grice und Segre 2011, Sugimoto et al. 2013). In einer weiteren Studie konnte eine Eindämmung des Ausmaßes von Influenzavireninfektionen durch *S. epidermidis* via Embp gezeigt werden (Chen et al. 2016).

S. epidermidis bildet weiße, glatte, glänzende, nicht charakteristisch riechende Kolonien, die nach 2-3 Tagen Inkubation einen Durchmesser von etwa 3-6 mm erreichen (Becker et al. 2014). Eine stoffwechsellinaktivere, teils auxotrophe morphologische Variante des Wildtyps sind sogenannte *small colony variants* (SCV), die nur noch etwa 10 % der normalen Kolonie-Größe erreichen (Proctor et al. 2006, Becker et al. 2014). Diese wurden bei *S. epidermidis*, *S. aureus* und *S. capitis* als Auslöser Fremdmaterial-assoziierten Infektionen beschrieben und können in der Diagnostik den Eindruck einer Mischflora verursachen (Proctor et al. 2006, Becker et al. 2014).

1.4 Bakterielle Biofilmbildung und *in vitro*-Nachweismethoden

Biofilm ist eine dreidimensionale, multizelluläre und mehrfachgeschichtete Struktur (Büttner et al. 2015) aus von Bakterien gebildeten Proteinen (z.B. Embp) Polysacchariden (PIA), eDNA, Teichonsäuren und den Bakterienzellen selbst (Hussain 1993, Mack 1996, Stewart 2001, Rohde et al. 2005, Sadovskaya 2005, Izano 2008, Schommer 2011, Becker et al. 2014). Im vollständig ausgebildeten Biofilm haben die meisten Bakterien keinen direkten Kontakt zur Oberfläche mehr, sondern haften über die selbst produzierten Matrixbestandteile aneinander (Abbildung 1) (Rohde et al. 2005, Foster 2005, Mack et al. 2009, Otto 2009, Büttner et al. 2015). Zu Abbildungen auf molekularer Ebene siehe zum Beispiel Otto 2009. Die Biofilmbildung kann in vier Phasen aufgeteilt werden (Abbildung 4) (Becker et al. 2014, Schommer et al. 2011, Costerton et al. 1999, Rohde et al. 2010). Sie

unterscheiden sich in ihrer Physiologie und erfordern unterschiedliche, phasenspezifische Faktoren (Otto 2008). Während der ersten Anhaftung lagern sich die Bakterien an die Fremdmaterialoberfläche an, sie wechseln dadurch vom planktonischen zum sessilen Wachstum. In der Akkumulation und Reifung bilden sie die Biofilmbestandteile und reifen zur dreidimensionalen Struktur heran. Durch die kontrollierte Biofilmauflösung werden einzelne, dann wieder planktonische *S. epidermidis* Zellen freigelassen und können andere Bereiche des Wirts infizieren (Abbildung 4) (Otto 2008, Mack et al. 2009, Otto 2009; Rohde et al. 2010, Büttner et al. 2015).

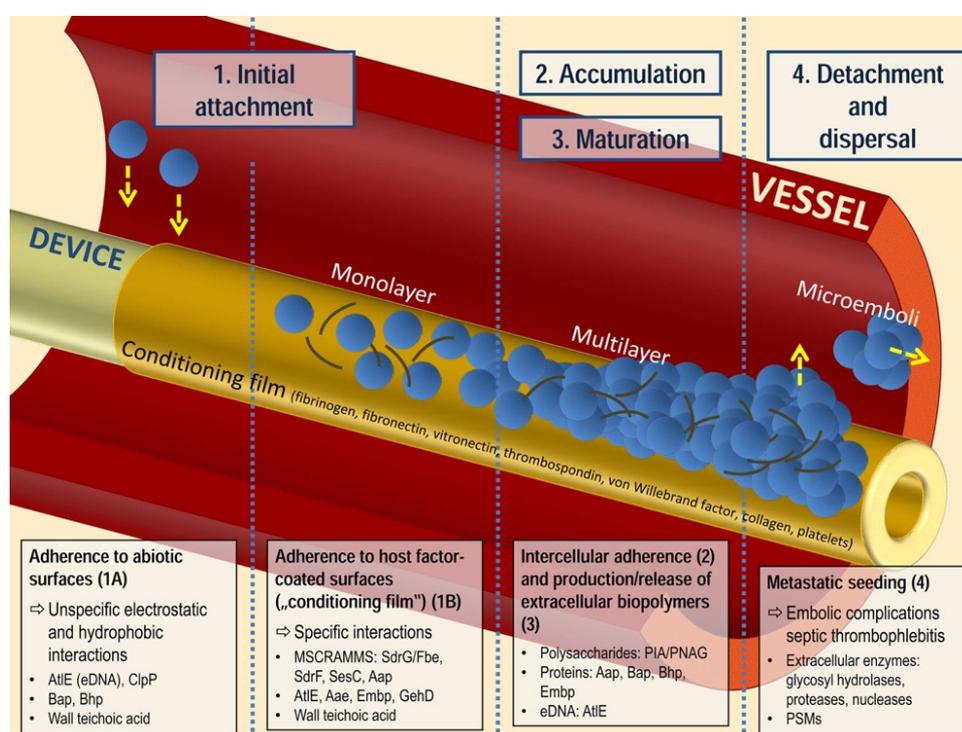


Abbildung 4: Pathogenese von katheterassoziierten Infektionen mit für die Biofilmbildung wichtigen Faktoren. Das Bild zeigt die vier Phasen der Biofilmbildung auf der Oberfläche eines intravaskulären Katheters mit schneller initialer Adhäsion und Anhaftung von KNS-Mikroorganismen an einen Fremdkörper aus polymerer Oberfläche. Daraus resultiert zunächst ein bakterieller Monolayer (1) und dann eine prolongierte akkumulative Phase mit Proliferation und Reifung, die für die interzelluläre Adhäsion essentiell ist (2 und 3). Schlussendlich erfolgt das Herauslösen einzelner Mikroorganismen aus der Makrokolonie, die sich in die Blutbahn absetzen und metastatische und embolische Komplikationen hervorrufen können. Abbildung und Beschreibung nach Becker et al. 2014.

In vivo basiert die Biofilmbildung am ehesten auf der parallelen Expression und Interaktion verschiedener Faktoren (zum Beispiel Embp, PIA, Aap und andere) (Schommer et al. 2011, Büttner et al. 2015). Es wird angenommen, dass *in vivo* eine

funktionelle Ersetzbarkeit der unterschiedlichen Faktoren füreinander eine bessere Adaptation an unterschiedliche Umweltbedingungen möglich macht (Christner et al. 2012). *In vitro* weisen Biofilme auf der Basis unterschiedlicher Faktoren unterschiedliche Morphologien auf. Proteinabhängige Biofilme (beispielsweise Embp) sind instabiler als polysaccharidabhängige (PIA) Biofilme. (Schommer et al. 2011, Büttner et al. 2015). Bei dem Wechsel zwischen kolonisierender und invasiver Lebensweise könnten die unterschiedlichen Stabilitätsgrade der Biofilme eine Rolle spielen (Schommer et al. 2011, Büttner et al. 2015).

Unter *in vitro*-Bedingungen gibt es standardisierte Methoden, die Biofilmbildung makroskopisch sichtbar zu machen oder sie zu mikroskopieren (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM, zum Beispiel Weiser et al. 2016). Eine der wichtigsten Methoden ist ein Biofilmassay (Mack et al. 2001). Bakterien werden in Flüssigmedium in speziellen modifizierten Polystyren-Mikrotiterplatten inkubiert (96 Well Nunclon Δ -Mikrotiterplatten), sodass sie dort Biofilm etablieren. Dieser haftet an den Böden der Mikrotiterplatte und kann angefärbt werden, sodass er makroskopisch erkennbar ist (Mack et al. 2001, siehe zum Beispiel Abbildung 7). Davon abgesehen können die zur Biofilmbildung beitragenden Faktoren je nach Molekülart mit anderen Nachweismethoden identifiziert werden. Für diese Arbeit relevant ist zum Beispiel der Nachweis des Proteins Embp, welches durch einen Immuno-Dot Blot Assay mittels anti-rEmbp-Antiserum detektiert werden kann (Christner et al. 2010, siehe zum Beispiel Abbildung 8).

Eine neue Erkenntnis ist, dass die Biofilmbildung eigentlich unter *in vitro*-Standardbedingungen biofilmbildungsfähiger Bakterienstämme durch die Hinzugabe von Blutserum, Antibiotika in subinhibitorischer Konzentration (zum Beispiel Tigecyclin) oder hohem osmotischem Druck induzierbar sein kann (Sellmann et al. 2005, Christner et al. 2010, Kaplan et al., 2011a, Kaplan 2011b, Linnes et al. 2013, Weiser et al. 2016). Dieser Aspekt trifft auf die Embp-basierte Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1585 zu und ist ein zentraler Punkt dieser Arbeit. Er stützt die Vermutung, dass *in vitro* biofilmbildungsfähige Stämme, zumindest unter bisher existierenden Nachweismethoden, nicht automatisch *in vivo* biofilmbildungsfähig sein müssen (Rohde et al. 2005, Christner et al. 2012).

1.4.1 Phase der ersten Anhaftung

Die erste Anhaftung von *S. epidermidis* Zellen kann entweder direkt an das abiotische Fremdmaterial (zum Beispiel Katheter oder Prothesen) oder aber an mit wirtseigener Extrazellulärmatrix beschichtetes, also konditioniertes Fremdmaterial geschehen. Bei den zur Anhaftung benötigten Adhäsinen wird unterschieden, ob und wie sie entweder direkt an abiotisches Fremdmaterial adhären oder spezifisch an wirtseigene Extrazellulärmatrix binden (Vuong und Otto 2002, Becker et al. 2014). Die Beschichtung mit Extrazellulärmatrix (ECM = *extracellular matrix*) findet innerhalb kurzer Zeit nach der Insertion statt (François et al. 1998). Sie besteht vor allem aus Fibrinogen (Fg), Fibronektin (FN), Thrombospondin, Kollagen (Cn), vonWillebrandfaktor (vWF), Vitronektin (Vn) und Thrombozyten (Becker et al. 2014, Büttner et al. 2015).

Unterteilt werden die Adhäsine in Proteine und Nicht-Proteine (Heilmann 2011, Becker et al. 2014). Die Proteine werden wieder unterteilt in kovalent gebundene, zellwandverankerte Proteine (CWA, *cell wall anchored*), nicht kovalent gebundene, oberflächenassoziierte Proteine und membrandurchspannende Proteine (Patti et al. 1994, Foster et al. 2014, Becker 2014). In dieser Reihenfolge werden die einzelnen Adhäsine auch jeweils in den beiden folgenden Unterkapiteln vorgestellt. Den CWA-Proteinen liegt zugrunde, dass C-terminal ein sogenanntes LPXTG-Sortase-Spaltungsmotiv (LPXTG = Leu-Pro-X-Thr-Gly, X = variable Aminosäure) angegliedert ist, über das sie in der Peptidoglykan verankert sind (Foster et al. 2014). Die Zelloberflächen-assoziierten Proteine hingegen sind über verschiedene Mechanismen wie hydrophobe Wechselwirkungen oder Ionenbindungen mit der Zelloberfläche der Bakterienzellen verbunden (Becker et al. 2014).

1.4.1.1 Anhaftung an abiotische Oberflächen und beteiligte Faktoren

Die Anhaftung an nicht mit Wirtsmatrix beschichtete, also abiotische Oberflächen wie zum Beispiel Polystyren, funktioniert in der Regel ohne spezifischen Rezeptor-Ligand-Interaktionen (Büttner et al. 2015). Es stehen intermolekulare

Wechselwirkungen wie hydrophobe Wechselwirkungen, van der Waals-Kräfte und andere ladungsbedingte Interaktionen im Vordergrund (Becker et al. 2014). Zu den bis jetzt bekannten Adhäsinen, die Proteine sind und die Anhaftung an abiotische Oberflächen vermitteln, gehören Bhp (Tormo et al. 2005b) und AtLE (Heilmann et al. 1997). Dabei ist Bhp ein CWA-Protein. AtLE ist oberflächenassoziiert. Zu den Nicht-Proteinen, die Anhaftung an abiotische Oberflächen vermitteln, gehören Teichonsäuren, im speziellen die WTA (wall teichoic acid) und eDNA (siehe auch Abbildung 4) (Gross et al. 2001, Sadovskaya et al. 2004, Holland et al. 2011, Becker et al. 2014).

Herauszuheben sind AtLE (Zelloberflächen-assoziiertes Autolysin/Adhäsिन von *S. epidermidis*) und eDNA. AtLE ist ein 115kDa großes Protein, welches zu der Gruppe der bakteriellen Peptidoglykanhydrolasen gehört und damit für die Degradation der bakteriellen Zellwand mitverantwortlich ist (Biswas et al. 2006). Wegen seiner Funktion in der Zellwannerneuerung ist es ebenfalls verantwortlich für die eDNA-Freisetzung, welche von der Zellyse abhängig ist (Qin et al. 2007, Rohde et al. 2010). Der polyanionische Charakter von DNA und Teichonsäure hat die Kapazität, andere Moleküle miteinander in der Biofilmmatrix zu verbinden (Otto 2008).

1.4.1.2 Anhaftung an konditionierte Oberflächen und beteiligte Faktoren

Bei der Adhäsion an mit ECM beschichtetes Fremdmaterial stehen spezifische Interaktionen von Zelloberflächen-assoziierten Proteinen und ECM im Vordergrund (Hermann et al. 1993, Patti et al. 1994, Hermann et al. 1997, Becker et al. 2014, Büttner et al. 2015). Dabei spielt eine Sonderform von CWA-Proteinen, die MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) eine zentrale Rolle (Patti et al. 1994, Foster et al. 2014). Das Funktionsmerkmal von MSCRAMMs ist die Bindung von Fibrinogen via dock-lock-latch-Mechanismus (DLL) (Foster et al. 2014). Für diesen ursprünglich für SdrG (*Serin-Aspartat-Repeat-beinhaltendem Protein g*) von *S. epidermidis* beschriebenen Mechanismus sind zwei IgG-ähnlich gefaltete Domänen (N2 und N3) ausschlaggebend. Zwischen N2 und N3

besteht in der offenen Apoform eine Furche, an die der Ligand (z.B. Fg) andocken kann. Es folgt eine Konformitätsänderung zur geschlossenen Proteinform, sodass der Ligand an Ort und Stelle bleibt (lock). Anschließend entsteht ein stabilisierter MSCRAMM-Ligand-Komplex (latch). MSCRAMMs kommen auch in *S. aureus*, *Staphylococcus pseudointermedius*, Enterokokken und Streptokokken vor. Verschiedene MSCRAMMs können zwei oder mehrere Liganden binden (Foster et al. 2014).

Zu den Adhäsinen, die Proteine sind und die Interaktionen mit Wirtsmatrix vermitteln, gehören SdrG/Fbe (Pei et al. 1999, Nilsson et al. 1998), SdrF (McCrea et al. 2000, Arrecubieta et al. 2007), SdrH (McCrea et al. 2000), SesC (Shahrooei et al. 2009), Aap (Rohde et al. 2005, Macintosh et al. 2009), AtlE (Heilmann et al. 1997), Aae (Heilmann et al. 2003), GehD-Lipase (Bowden et al. 2002) und Embp (Christner et al. 2010). Dabei sind Fbe/SdrG, SdrF, SdrH, SesC und Aap CWA-Proteine, genauer MSCRAMMs. AtlE, Aae, GehD gehören zu den oberflächenassoziierten Proteinen und Embp am ehesten zu den membrandurchspannenden Proteinen (Christner et al. 2010, Becker 2014). Zu den Nicht-Proteinen, die Anhaftung an Wirtsmatrix vermitteln, gehören Teichonsäuren (Hussain et al. 2001). In klinischen Isolaten werden häufig die entsprechenden Gene *embp*, *aap*, *sdrG* und *icaADBC* für PIA, gefunden (Rohde et al. 2004, Rohde et al. 2007, Büttner et al. 2015).

1.4.3 Phase der Akkumulation und Reifung und beteiligte Faktoren

Der nächste Schritt der Biofilmbildung ist die Akkumulation und Reifung. Sie werden als parallel organisierter, multifaktorieller Prozess beschrieben, für den viele adhäsive Faktoren eine Rolle spielen (Christner et al. 2010, Christner et al. 2012). Die interzelluläre Adhäsion über polyanionische Makromoleküle steht dabei im Mittelpunkt (Otto 2009). Auch hier ist die Unterteilung der Adhäsine in Proteine und Nicht-Proteine möglich. Zu den Proteinen zählen ebenfalls Aap, Bhp und Embp, zu den Nicht-Proteinen gehören das Polysaccharid PIA, Teichonsäuren und eDNA (Becker et al 2014). PIA, der am besten untersuchte Faktor der *S. epidermidis*

Biofilmbildung, nimmt eine zentrale Rolle ein (Rohde et al. 2010). Embp und Aap zählen zu den bekanntesten multifunktionalen Proteinen (Büttner et al. 2015). Zur Embp-abhängigen Biofilmbildung siehe Kapitel 1.5.

PIA besteht aus zwei Polysaccharidketten mit anionischem Charakter (Mack et al. 1996, Vuong und Otto 2002, Rohde et al. 2010). PIA wird durch Enzyme synthetisiert, für die das Operon *icaADBC* kodiert (Heilmann et al. 1996b). Es konnte eine Korrelation zwischen der Invasivität von *S. epidermidis* und dem Vorhandensein des *ica*-Lokus gezeigt werden (Li et al. 2005). Als Hinweis auf die angenommene gegenseitige Ersetzbarkeit unterschiedlicher adhäsiver Faktoren kann beispielsweise herangezogen werden, dass die parallele Expression von Embp und PIA den Biofilm vor der Lyse durch Dispersin B schützt. Dispersin B ist eine Glykosidhydrolase, die eigentlich PIA-abhängigen Biofilm zersetzt (Kaplan et al. 2004, Ramasubbu et al. 2005, Christner et al. 2010, Büttner et al. 2015).

1.4.4 Phase der Biofilmauflösung

Die Auflösung oder Destabilisierung von Biofilmen kann durch extrazelluläre Enzymfunktionen oder durch sogenannte von den Bakterien gebildete PSMs (*phenol-soluble modulins*) erfolgen. Extrazelluläre Enzyme lassen sich entsprechend der im Biofilm vorhandenen Makromoleküle in Proteasen, Zuckerhydrolasen und Nukleasen aufteilen. PSMs sind kurze, amphiphatische Peptide der Größen 20-25 AS (α -PSMs) und 40-45 AS (β -PSMs) (Becker et al. 2014). Es wird angenommen, dass sie durch ihren amphiphatischen Charakter wie Surfactant wirken und damit den Biofilm desintegrieren können (Yao et al. 2005, Becker et al. 2014). Aber auch mechanische Krafteinwirkungen wie der Blutfluss und die herunterregulierte Produktion von Adhäsinen tragen zur Desintegration bei (Otto et al. 2008).

1.4.5 Regulationsmechanismen

Die Biofilmbildung von *S. epidermidis* wird hauptsächlich durch sogenannte Quorum

sensing-Systeme (QS) reguliert. Dazu zählt *agr* (*accessory gene regulator*) (Dufour et al. 2002, Novick et al. 2003) und *luxS/AI-2* (Xu et al. 2006). Andere globale Regulatoren sind der staphylococcal accessory regulator-Lokus *sar* (Tormo et al. 2005a, Christner et al. 2012, Becker et al. 2014) und der alternative Transkriptionsfaktor σ^B . *Agr* und *sar* unterliegen σ^B , einem globalen Regulator für Stressantworten in vielen Bakterienspezies (Becker et al. 2014).

Quorum sensing ist als ein Umweltwahrnehmungs- oder auch Zelldichtemessungssystem zu verstehen, das Bakterien das Überwachen der eigenen Populationsdichte erlaubt (Fuqua et al. 1994). Der Begriff geht auf die Beschreibung der Autoinduktion von Lumineszenz bei *Vibrio fischeri* in Abhängigkeit der Zelldichte zurück. Als Quorum wird diejenige minimale Einheit von Bakterien bezeichnet, die zur Verhaltensänderung in Richtung Lumineszenz führt (Fuqua et al. 1994). Lebt *V. fischeri* planktonisch, wird die für die Lumineszenz verantwortliche Genfamilie *lux* nicht abgelesen. Ein sogenannter Autoinducer, hier *V. fischeri* autoinducer VAI, wird von den Bakterien gebildet und akkumuliert nur bei sessilem Wachstum. Ab einer kritischen Konzentration von VAI wird die Transkription von *lux* aktiviert. Befindet sich *V. fischeri* also sessil in den Leuchtorganen bestimmter Tintenfische und Fische, verleiht es ihnen ab dem Erreichen des Quorums Lumineszenz (Fuqua et al. 1994).

Dies lässt sich auf die Regulation der Biofilmbildung durch *agr* übertragen. Steigt die Zelldichte der sich im Biofilm befindenden Bakterienzellen, akkumuliert das zu VAI äquivalente AIP (*autoinducing peptide*) von *S. epidermidis*. Ist das Quorum für die kritische Menge an AIP erreicht, hat dies über mehrere Zwischenschritte zur Folge, dass *agr* aktiviert und darüber die PSM-, Proteasen-, Nuklease- und Lipasen-Synthese hochreguliert wird (Novick und Geisinger 2008, Otto 2009, Becker et al. 2014). Hierdurch wird die Biofilmdesintegration vermittelt.

SarA hingegen ist ein globaler Regulator, der die Exoproteinsynthese durch die Modulation von *agr* kontrolliert (Christner et al. 2012). Auch *S. aureus* verfügt über ein SarA-System, welches mit dem von *S. epidermidis* zu 84 % übereinstimmt (Fluckiger et al. 1998). SarA kontrolliert PIA-abhängige und PIA-unabhängige Biofilmbildungen invers, sodass in beiden Fällen die Biofilmbildung induziert wird: Ist *sarA* aktiv, wird PIA hochreguliert, ist es inaktiv, werden Embp und SepA hochreguliert (Christner et al. 2012, Weiser et al. 2016). SepA ist für die AtlE-

Prozessierung verantwortlich, wodurch indirekt auch die eDNA-Freisetzung steigt (Christner et al. 2012).

Auch die ATP-abhängige Protease Clp der Unterklasse ClpP, welche fehlgefaltete Proteine beseitigt, steht unter dem negativen Einfluss von *agr*. Wahrscheinlich reguliert ClpP Faktoren, die zur ersten Anhaftung an abiotische Oberflächen beitragen. Gegebenenfalls könnte auch die Anreicherung an fehlgefalteten Proteinen bei verminderter ClpP-Aktivität die Biofilmbildung verändern. Die ClpP-Regulation könnte ein zusätzlicher Beitrag zur *agr*-abhängigen Kontrolle der primären Anhaftung an abiotische Oberflächen sein (Wang et al. 2007).

1.5 Embp-vermittelte Biofilmbildung

Embp ist ein von *S. epidermidis* exprimiertes, multifunktionelles Zelloberflächen-assoziiertes Protein. Es trägt in der Biofilmbildung zur Anhaftung an mit Wirtsmatrix beschichtetes Fremdmaterial, zur Akkumulation (Abbildung 4) sowie zum Schutz vor Phagozytose bei (Christner et al. 2010, Schommer et al. 2011, Becker et al. 2014). Es wurde in vielen invasiven *S. epidermidis*-Stämmen gefunden, die aus Blutkulturen (Rohde et al. 2004), von TEP-Infektionen (Rohde et al. 2007) und von intraokulären Infektionen (Duggirala et al. 2007, Christner et al. 2010) isoliert wurden. Im Biofilm ist es nah an der bakteriellen Zellwand lokalisiert, wobei kleine Mengen der Proteinmatrix die Bakterienzellen einbetten (Schommer et al. 2011). Das Molekulargewicht beträgt etwa 1.000 kDa und die Struktur weist mehrere Domänen auf. N-terminal befindet sich ein konserviertes Exportsignalpeptid (YSIRK; Aminosäuren, AS 58 - 84) (Rosenstein und Götz 2000, Bae und Schneewind 2003, DeDent et al. 2008). Daran schließt sich eine ungeordnete Region von etwa 2500 AS an (AS 85 - 2 586). Es folgen 21 repetitive *Found In Various Architectures* (FIVAR)-Domänen (AS 2 587 - 4 500), sowie 38 alternierende *G-related Albumine-binding* (GA) und FIVAR-Domänen (AS 4 501 - 9 443). Ein etwa 7000 AS langer Abschnitt zwischen den AS Positionen 2587 bis 9443 bildet das Kernstück des Proteins und ist für die bislang bekannten, biologischen Funktionen von Embp verantwortlich. C-terminal befinden sich vier Domänen mit unbekannter Funktion (DUF1542, *domains*

of unknown function, AS 9 444 - 9 841) und eine putative *trans*-Membrandomäne (TM, AS 10 070 - 10 088, siehe Abbildung 5) (Christner et al. 2010, Büttner et al. 2015). Embp wird in allen Wachstumsphasen exprimiert (Williams et al. 2002). Williams et al. beschrieb 2002 zuerst eine minimale Sequenz von 364 bp in einem 30,5-kb-großen *open reading frame* (ORF), die für die Bindung an Fibronektin (FN) bei *S. epidermidis* NCTC11047 ausschlaggebend war (vergleiche Abbildung 5, Embp32). Diese FN-bindende Domäne konnte auch andere Matrixkomponenten wie Plasminogen, Heparin und Hyaluronsäure binden. Das in dem ORF kodierte Proteine wurde aufgrund seiner Eigenschaften als *Extracellular matrix-binding protein* benannt (Williams et al. 2002).

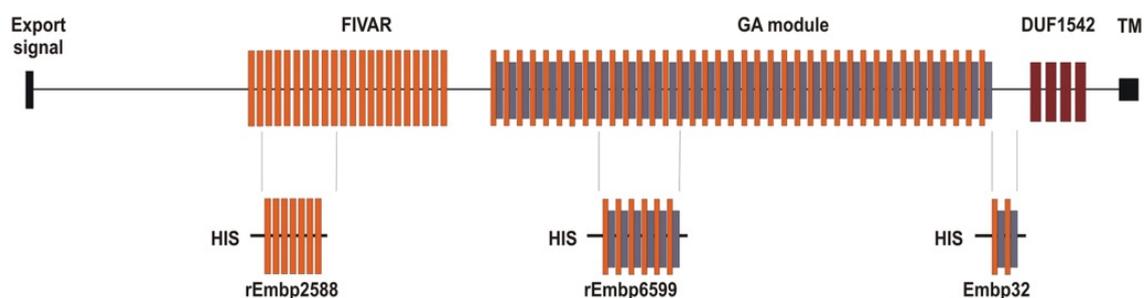


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Embp. Zu sehen ist die Proteinstruktur von Embp und die relative Position der rekombinanten Proteine, für die funktionelle Daten bestehen. Embp32 ist ein rekombinantes Embp-Fragment (AS 9180-9421) von *S. epidermidis* NCTC11047 mit vier alternierenden FIVAR und FIVAR-GA-Repeats mit Fibronektin-Bindungskapazität (Büttner et al. 2015, Williams et al. 2002). rEmb2588 (AS 2588-3187) beinhaltet sieben FIVAR-Domänen, während rEmb6599 (AS 6599-7340) sechs GA-Module beinhaltet, die von FIVAR-Domänen unterbrochen werden. Beide Embp-Ausschnitte (rEmb2588 und rEmb 6599) binden an an Oberflächen haftendes Fibronektin (Büttner et al. 2015, Christner et al. 2010). Abbildung und Text aus Büttner et al. 2015.

FIVAR-Domänen werden mit der interzellulären Adhäsion in Verbindung gebracht (Komatsuzawa et al. 2000, Hashimoto et al. 1998, Christner et al. 2010). Außerdem scheint die Kombination und Anzahl von FIVAR- und GA-Domänen für die Induktion der Zellaggregation wichtig zu sein (Christner et al. 2010). FIVAR-GA-Module sind ausschlaggebend für die FN-bindende Aktivität von Embp (Christner et al. 2010, Büttner et al. 2015). GA-Domänen sind in die Bindung von humanem Albumin involviert (de Château et al. 1996, Christner et al. 2010). Die genauen Beiträge, die FIVAR, GA, DUF1542 und die *trans*-Membrandomäne zur Embp-vermittelten Biofilmbildung leisten, sind jedoch noch nicht ausreichend verstanden (Christner et al. 2010).

Interessant ist, dass der von einer Portinfektion isolierte *embp*-positive *S. epidermidis*-Stamm 1585 (Rohde et al. 2005) unter *in vitro*-Standardbedingungen kein Embp und auch keinen Biofilm bildet (Christner et al. 2010, Schommer et al. 2011). Inkubiert man 1585 zusammen mit Ziegen Serum, exprimiert der Stamm plötzlich Embp und wird phänotypisch biofilmpositiv (Abbildung 6) (Christner et al. 2010). Auch osmotischer Druck kann die Embp- und Biofilmproduktion induzieren (Linnes et al. 2013). Bis jetzt bekannt ist, dass die Embp-Produktion durch den übergeordneten Regulator SarA gesteuert wird (Christner et al. 2012). Außerdem ist das QS-System *agr* ein Negativregulator des *embp*-Homolog *ebh* von *S. aureus* (Clarke et al. 2002, Christner et al. 2010). Die genauen Modalitäten der Embp-Expressionkontrolle sind jedoch unbekannt. Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Embp-basierte Biofilmbildung besser zu verstehen, indem für die Embp-Bildung essentielle Gene identifiziert werden sollen.

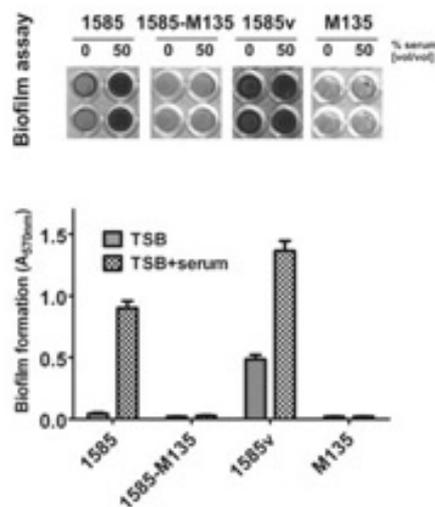


Abbildung 6: Darstellung der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1585 nach Serumexposition mittels Biofilmassay. Zu sehen sind die Nüpfchen aus Nunclon Δ -Mikrotiterplatten mit den mit Gentianaviolett angefärbten Biofilmen. Es wurden die *S. epidermidis*-Stämme 1585 = 1585wt, 1585-M135 (Mutante mit Embp-Defekt), 1585v (Positivkontrolle) und M135 in Gegenwart von 50 % Serum und ohne Serum getestet. Es ist eine Biofilmbildung bei 1585 mit 50 % Serum und bei 1585v ohne und mit 50 % Serum zu sehen (dunkelgrauen Nüpfchen). Die Biofilmdichte ist anhand der graphischen Auswertung der Extinktionsmessung abzulesen. TSB = Trypticase Soy Broth, geläufiges Nährmedium. Abbildung aus Christner et al. 2010.

1.6 Prinzipien der Transposonmutagenese

Um für einen bestimmten Prozess relevante Genorte zu identifizieren, macht man sich in der Bakteriologie das Prinzip der Transposonmutagenese zu Nutze. Bei einer Transposonmutagenese wird ein mobiles genetisches Element, genauer ein Transposon, in ein Bakteriengenom integriert (Pajunen et al. 2010). Dadurch soll idealerweise eine Transposonmutantenbank mit Mutanten in jedem offenen Leserahmen entstehen. Identifiziert man anschließend durch ein Screening diejenigen Mutanten, bei denen eine bestimmte Veränderung im Phänotyp vorliegt, kann über die Lokalisation der Transposoninsertion ein für diese Veränderung wichtiger Genort gefunden werden.

Um eine Transposonmutagenese durchzuführen, muss ein Transposon-tragendes Plasmid zum Beispiel durch Elektroporation oder Phagentransduktion in Bakterien eingebracht werden. Anschließend muss die Transposon-DNA in das Bakteriengenom integriert werden. Die Transposase, die die DNA-Abspaltung vom Plasmid sowie den DNA-Transfer und die -Integration an die Ziel-DNA katalysiert, ist auf dem Transposon selbst kodiert (Pajunen et al. 2010). Nach der Integration des Transposons muss das Plasmid wieder eliminiert werden. Auf dem Plasmid und auf dem Transposon sind unterschiedliche Antibiotikaresistenzen kodiert, die man sich bei dem Experiment zur Erfolgskontrolle zu Nutze macht.

In dieser Arbeit sollte eine Transposonmutantenbank in *S. epidermidis* 1585wt mit dem Transposon *himar1-mariner*-Tn vom Plasmid pBTn erstellt werden. In einer anderen für diese Arbeit relevanten Transposonmutantenbank wurde Tn917 vom Plasmid pTV1ts benutzt (Heinze 2012). Bei Tn917 sind Integrationsfehler beobachtet worden, die bei dem Mariner-basierten Transposonmutagenesesystem nicht mehr auftreten sollen (Bae et al 2004, Li et al. 2009). Die Methoden zum Plasmid-Transfer wie Elektroporation und Phagentransduktion sind in der Durchführung mit *S. epidermidis*-Stämmen häufig problematisch. Nicht selten werden mehrere Versuchsanläufe benötigt (Monk et al. 2012, Winstel et al. 2015, Winstel et al. 2016). Um das Plasmid pBTn in den Zielstamm *S. epidermidis* 1585wt einzubringen, sollte es auf Grundlage von Erfahrungen aus anderen Plasmidtransfers von *E. coli* DH5 α in *S. aureus* RN4220, dann in *S. epidermidis* 1457-M12 und anschließend in *S. epidermidis*

1585wt transloziert werden (Rohde et al. 2005). Bis 1457-M12 wird das Plasmid elektroporiert und danach durch Phagentransduktion in 1585wt übertragen (Phage A6C, Mack et al. 2001, Rohde et al. 2005). Nach dem Plasmidtransfer soll die Integration vom *himar1-mariner*-Transposon in das 1585wt-Genom und die Plasmidelimination erfolgen. Dies soll durch Wachstum unter Temperaturshifts und verschiedenen Antibiotikaselektionsdrücken gelingen. Die Temperaturshifts bestehen aus Zyklen mit Wachstum bei einer permissiven Temperatur (das Plasmid wird repliziert, 30 °C für pBTn,) und einer nicht permissiven Temperatur (das Plasmid wird nicht repliziert, 43 °C) (Li et al. 2009). Während des Wachstums bei der permissiven Temperatur soll sich das Transposon spontan in die chromosomale Bakterien-DNA integrieren. Durch das Wachstum bei der nicht permissiven Temperatur sollen sich nur noch Klone mit einer Transposoninsertion aber eliminiertem Plasmid vermehren. Deshalb erfolgt diese Inkubation zusammen mit dem Antibiotikum, gegen das eine Resistenz auf dem Transposon enthalten ist (hier Erythromycin). Aufgrund der Antibiotikaresistenzen des Plasmids (Chloramphenicolresistenz auf pBTn) und des Transposons (Erythromycinresistenz auf *himar1-mariner*-Tn) müssen die Transposonmutanten erythromycinresistent und chloramphenicolsensibel sein (Li et al. 2009, Xia et al. 2010). Diese Transposonmutanten, in der Regel tausende, können anschließend in Mikrotiterplatten zu einem Mutanten pro Well bei -80 °C archiviert werden. Damit würde eine Transposonmutantenbank für das Screening nach bestimmten phänotypischen Merkmalen wie zum Beispiel eine verminderte Embp Produktion und Biofilmbildung bereit stehen.

1.7 Arbeitshypothese und Fragestellung

S. epidermidis 1585 bildet Embp-vermittelten Biofilm, sofern ein Wachstum in Gegenwart von Ziegenserum stattfindet (Christner et al. 2010). Unter Standard-*in vitro*-Bedingungen, also ohne die Gegenwart von Ziegenserum, ist der Stamm biofilmmnegativ (Christner et al. 2010). Die Determinanten der Embp-Expressionskontrolle sowie Signaltransduktionswege, die an der Steuerung der Expression beteiligt sind, sind unbekannt. Um diese Determinanten zu identifizieren, bietet sich das Screening einer Transposonmutantenbank in *S. epidermidis* 1585 auf eine veränderte Embp Produktion oder Biofilmbildung an. Die Mutanten mit dem veränderten Phänotyp müssen im Anschluss an das Screening auf die Lokalisation der Transposoninsertion untersucht werden, um Aufschluss über essentielle Gene für die Embp Expression zu gewinnen.

Hauptziel dieser Arbeit war es, durch die Etablierung von Screeningmethoden die Grundlage für die Identifikation genetischer Determinanten der Serum-induzierten Embp Produktion und Biofilmbildung zu legen. Hierbei sollten Assays aufgebaut werden, welche die parallele Analyse von Transposonmutanten ermöglichen, die im Format einer 96-Well Mikrotiterplatte archiviert sind. Als Ausleseparameter wurden die Embp Produktion (nachgewiesen durch ein anti-rEmbp-Antiserum) und die Biofilmbildung gewählt. Diese sollten in einem Dot Blot Assay beziehungsweise in einem Biofilmassay bestimmt werden.

Mithilfe der etablierten Screeningmethoden sollten zwei Transposonmutantenbanken auf das Vorliegen von Mutanten mit verringerter Embp Produktion beziehungsweise verminderter Biofilmbildung untersucht werden. Hierzu sollte zu einer bereits bestehenden Transposonmutantenbank eine zusätzliche Sammlung von Transposonmutanten aufgebaut werden.

Es konnte in unabhängigen Untersuchungen gezeigt werden, dass das Glycylantibiotikum Tigecyclin eine biofilminduzierende Wirkung bei *S. epidermidis* besitzt. Dies wurde für *ica*-positive *S. epidermidis*-Stämme (Kaplan et al. 2011a) und auch für *S. epidermidis* 1585 (*embp*-positiv, *ica*-negativ) nachgewiesen (Weiser et al. 2016). In Nebenversuchen dieser Arbeit sollte deshalb eine Variante des Screens für das Bakterienwachstum in Gegenwart von Tigecyclin erstellt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

- S. epidermidis* 1585 Auch 1585wt bezeichnet. *Embp*-positiv, *icaADBC*- und *aap*-negativ, unter Standard-*in-vitro*-Bedingungen biofilm-negativ, nach Inkubation in Ziegenserum und Tigecyclin biofilm-positiv, isoliert aus einer Port-Infektion (Rohde et al. 2005, Christner et al. 2010, diese Arbeit, Weiser et al. 2016).
- S. epidermidis* 1585v Unter Standard-*in-vitro*-Bedingungen biofilmpositive Variante des unter Standard-*in-vitro*-Bedingungen biofilmmnegativen Stammes 1585wt, *Embp1*-positiv (Christner et al. 2010).
- S. epidermidis* 1585-M135 *embp::Tn917*, biofilm-negativ. Expression eines 115kDa großen *Embp*-Restfragments mit 18 FIVAR-GA-Modulen (Christner et al. 2010).
- S. epidermidis* 1585hc Von einem 6,3 kb großen Plasmid bereinigte (c für *plasmid-cured*) und hitzeresistente Subpopulation (wächst bei 45 °C, h für *heat-adapted*) von 1585wt. *embp*-positiv, unter Standard-*in-vitro*-Bedingungen biofilm-negativ. Nach Inkubation mit Ziegenserum biofilm-positiv. Trägerstamm der Transposonmutantenbank C. Heinze 2012 mit *Tn917* aus Plasmid pTV1ts (Christner et al. 2010, Christner et al. 2012, Heinze 2012, diese Arbeit) .
- S. epidermidis* 1457 *icaADBC*-positiv, PIA-positiv, biofilm-positiv (Mack et al. 2001).
- S. epidermidis* 1457-M10 *icaA::Tn917*, PIA- und biofilm-negativ (Mack et al. 2001).
- S. epidermidis* 1457-M12 defekte *ica*-Transkription durch die Insertion von *Tn917*, biofilm-negativ (Mack et al. 2000).

<i>S. aureus</i> RN4220	restriktionsdefizienter Stamm, Fairweather et al. 1983.
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> mit hoher Transformationseffektivität (Hanahan 1983), Invitrogen.
<i>E. coli</i> One Shot®TOP10	Invitrogen/Karlsruhe

2.1.2 Plasmide/Phagen/Antikörper

pBTn	Temperatursensibles Plasmid mit dem Transposon <i>himar1-mariner</i> -Tn. Das Plasmid trägt eine Chloramphenicolresistenzkassette. Das Transposon trägt <i>ermB</i> , ein 1,45-kb großes Fragment für die Erythromycinresistenz aus dem Transposon Tn551. Permissive Temperatur ist 30 °C. (Lampe et al. 1999, Bae et al. 2004, Li et al. 2009, Xia et al. 2010).
Phage A6C	(Rohde et al. 2005).
Rabbit anti-rEmbp6599 – Antiserum	1. – Detektion von Embp im Dot Blot Assay (Christner et al. 2010).
Peroxidase-coupled – anti-Rabbit IgG	2. – Antikörper für Dot Blot Assay (Christner et al. 2010).

2.1.3 Nährmedien

Trypticase Soy Broth (TSB)	Becton Dickinson, Cockeysville, USA
TSB+	TSB 6 g / l yeast extract 8 g / l Glucose
Brain Heart Infusion (BHI)	Oxoid™
BHI+	BHI Oxoid™ 0,167 g / l Natriumcitrat
BHI+-Softagar	BHI Oxoid™

	0,167 g / l Natriumcitrat 7 g / l Bacto-Agar
NB2+	20 g / l Nutrient Broth No 2 (Oxoid™) 0,4 g / l CaCl ₂
Staphylococcus Typing Agar (ST-Agar), fest	20 g / l Nutrient Broth No 2 (Oxoid™) 5 g / l NaCl 0,4 g / l CaCl ₂
für soft	+ 7 g / l Bacto-Agar (Difco)
B2-Medium	pH = 7,4 10 g / l Caseinhydrolysat 5 g / l D-Glucose 25 g / l NaCl 25 g / l Yeast-Extract 1 g K ₂ HPO ₄
Luria Bertani-Medium (LB)	pH = 7,0 10 g / l Bacto Tryptone 5 g / l Bacto Yeast 10 g / l NaCl
Einfriermedium	1,5 % Bacto-Peptide 85 %-iges Glycerin Medien getrennt autoklavieren, dann 30 ml Glycerin mit 100ml Bacto-Peptide 1,5 % (wt/vol) mischen.
NYE	1 % (w / v) Caseinhydrolysat 0,5 % (w / v) Hefeextrakt 0,085 M NaCl
Blutagarplatten	Columbia Agar mit Schafblut Plus (Oxoid)
Ziegenserum	Difco, Heidelberg, Germany

2.1.4 Lösungen, Reagenzien und Puffer

Phosphate buffered saline pH = 7,4

(PBS) 20%	2,73 M NaCl 53 mM KCl 166 mM Na ₂ HPO ₄ 53 mM KH ₂ PO ₄
PBS-Tween-Puffer	PBS-1 % 0,05 % Tween 20 (Roth, Karlsruhe)
Kälberserumalbumin (BSA) 3 %	3 g BSA (Serva, Heidelberg) 100 ml PBS-1 % Nach dem Mischen steril filtrieren
TBE-Puffer	54 g / l Tris (Invitrogen) 27,5 g / l Borsäure 20 ml / l EDTA 0,5 M, pH = 8
10 %-ige Glycerinlösung	88,24 ml Milipore-Wasser 11,76 ml Glycerin 85 %
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA-Marker aus <i>Hind</i> III-gespaltener DNA des ϕ -Phagens und <i>Hae</i> III- gespaltener DNA des Phagens ϕ X174	Finnzymes, Espoo (Finnland)
Lithium Dodecyl Sulfate (LDS) – Puffer	Invitrogen (Heidelberg)
Lysostaphin (Enzym)	Sigma (München)
Magermilchpulver	Merck (Darmstadt)
NEB – Puffer 1	New England Biolabs
Proteinfreier Blocking-Puffer	Pierce (Rockford, USA)
Restriktionsenzyme PstI und KpnI	New England Biolabs
Western Blotting Reagent 1+2	Amersham (Freiburg)

2.1.5 Antibiotika

Tigecyclin	Sigma-Aldrich (USA)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (USA)
Erythromycin	Sigma-Aldrich (USA)

2.1.6 Kits

DNA Präp-Kit	Quiagen (Hilden)
Plasmid Minipräp-Kit	Quiagen (Hilden)

2.1.7 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Biofuge pico	Heraeus (Osterode)
Biofuge 28 RS	Heraeus (Osterode)
ChemiDoc™XRS Geldokumentations-system	BioRad (Hercules, USA)
Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
Curix 60 Entwicklergerät	Agfa (Mortsel, B)
Deepwellplatten 96 Well	Greiner (Nürtingen)
Digital Sonifier	Branson (Danbury, CT)
Digital pH-Meter 646	Knick (Berlin)
Elektroporationsküvetten	BioRad (München)
ChemiDoc™XRS-Geldokumentationssystem	BioRad (München)
Gene Pulser® II Elektroporator	BioRad (Hercules, USA)
Genie 2 Vortex	Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)
Greiner-96-Mikrotiterplatten	Greiner (Nürtingen)
Infinite M 200 Photometer	Tecan® (Männedorf)
Megafuge 3,0 R	Heraceus (Osterode)
Mikrotiterplatteninkubator, dynamisch	Eppendorf (Hamburg)
Xplorer 12-Kanalpipette 5-100 µl	Eppendorf (Hamburg)
Xplorer 12-Kanalpipette 50-1200 µl	Eppendorf (Hamburg)
12-Kanalpipette 30-300 µl manuell	Eppendorf (Hamburg)
Multifuge 1 S-R	Heraceus (Osterode)
NunclonΔ96-Mikrotiterplatten	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Photometer für Küvetten	Bio-Rad (München)
PVDF-Membran	Millipore
Primus 96 <i>plus</i> Thermocycler	MWG (Eberswalde)
Röntgenfilme	Fuji (Düsseldorf)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co (New Brunswick, NJ)
Schüttelinkubator Certomat® BS-1	Sartorius (Göttingen)
Smart Spec plus Spektralphotometer	BioRad (München)
Sorvall RC5B	DuPont (Wilmington, DE)
Spektralphotometer Smart Speck Plus	BioRad (München)

Statischer Inkubator 5050E
Replika-Stempel mit 8 x 12 Stäben
Sterilfilter 0,22µm

Heraeus (Osterode)
Hartenstein (München)
Merck (Darmstadt)

2.1.8 Software

Graphpad-Prism5

GraphPad Software (Kalifornien)

2.2 Methoden

2.2.1 Phänotypische Methoden

2.2.1.1 Biofilmassay in Gegenwart von Ziegenserum

Die Durchführung des Assays basiert auf dem Protokoll des semiquantitativen Mikrotiterplattentests nach Mack et al. 2001. Eine Vorkultur in TSB wird 1:100 in frisches TSB verdünnt, um dieses mit 200 µl / Well in NunclonΔ96-Platten zu pipettieren. Es folgen 6 Stunden Inkubationszeit bei 37°C, damit die Zellen an den Wellboden adhären. Anschließend wird eine in einer Greiner-96-Platte vorgelegte Serumverdünnungsreihe je nach gewünschten Mengen mit insgesamt jeweils 200 µl Volumen auf die bereits befüllten Wells gegeben und es folgt noch mal eine Inkubation über Nacht für 16 Stunden. Nun werden die jeweils 400 µl / Well abgossen und zweimal mit jeweils 200 µl PBS-1%-Lösung gespült. Mit offenem Deckel wird die Platte 4 Stunden im 37 °C-Inkubator getrocknet, anschließend mit 300 µl / Well Gentianaviolett befüllt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgt erneut das Trocknen mit offenem Deckel bei 37 °C. Anschließend wird die Mikrotiterplatte im Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm gemessen. Die Auswertung erfolgt über die Software GraphPad Prism5 per Säulendiagramm mit Standardabweichung.

2.2.1.2 Biofilmassay in Gegenwart von Tigecyclin

Aus einer Übernachtskultur eines Bakterienstammes in TSB wird eine 1:100-Verdünnung in frischem TSB und in TSB+ erstellt. Davon werden jeweils 180 µl / Well in eine NunclonΔ-Mikrotiterplatte pipettiert. Es wird eine Verdünnungsreihe des Tigecyclins von 10 µg / µl bis 0,16 µg / ml erstellt und davon jeweils 20 µl / Well zu den Wells dazu gegeben. Das Tigecyclin ist nach dem Ansetzen in Flüssigkeit 12 Stunden haltbar und muss daher immer frisch verwendet werden. Für die Negativkontrolle wird den dafür vorgesehenen Wells 20 µl / Well Aqua ad injectabilia

hinzu pipettiert. Es folgt eine statische Inkubation über Nacht bei 37 °C. Am Folgetag wird nach der Inkubation die OD₆₀₀ im Photometer gemessen, anschließend wird die Mikrotiterplatte zwei Mal mit 200 µl PBS-1 % gewaschen und anschließend bei einer Wellenlänge von A₅₉₅ gemessen.

2.2.2 Genetische Methoden

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Versuchsprotokoll grundsätzlich nach Gebrauchsanweisung des Quiagen Kits. Entweder eine Übernachtskultur oder bei pBTn-haltigen Stämmen direkt eine Öse eines Drei-Ösenausstrichs, inkubiert bei 30 °C benutzen. Die Öse direkt in P1-Puffer resuspendieren. 1 ml steriles Miliporewasser auf 70 °C erhitzen. Je 2 ml der Vorkultur in 2 ml Eppendorftubes geben, 3 Minuten bei 13200 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen, Pellet in 250 µl P1-Puffer resuspendieren. 3 µl Lysostaphin hinzugeben, einmal vortexen, 25 Minuten bei 30 °C / 37 °C (je nach Plasmid, vergleiche pBTn Kapitel 2.1.2) inkubieren, dabei alle 5-10 Minuten schwenken. Bei niedriger Plasmidkonzentration kann diese Inkubationszeit auf 1 Stunde erhöht werden. 250 µl P2 Puffer hinzugeben, 6 x schwenken, 350 µl N3-Puffer hinzugeben, sofort mischen, 10 Minuten bei 13200 rpm zentrifugieren. Überstand ohne Pellet in die Säule geben, 1 Minute bei 13200 rpm zentrifugieren. 500 µl PB-Puffer hinzugeben, 1 Minute 13200 rpm zentrifugieren. Durchfluss verwerfen, 750 µl PE-Puffer hinzugeben, 1 Minute 13200 rpm zentrifugieren. Durchfluss verwerfen, 5 Minuten 13200 rpm leer zentrifugieren, Filter auf neuen 1,5 ml Tube setzen. 50 µl steriles 70 °C-Miliporewasser (statt E-Puffer, wegen eines potentiellen Kurzschlusses in der Elektroporation), 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen, 3 Minuten bei 13200 rpm zentrifugieren. Den plasmidhaltigen Überstand weiter verarbeiten oder einfrieren.

2.2.2.2 Präparation von chromosomaler DNA

Grundsätzlich nach Herstellerangaben des Quiagen-Kits. In einem Eppendorftube werden 2-3 Kolonien des Bakteriums in 500 µl Aqua ad injectabilia resuspendiert. Es wird 1 Minute bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand wird abgenommen. Die InstaGene Matrix wird auf der Magnetplatte und mit einem Rührfisch durchmischt und danach werden 200 µl davon zum Pellet gegeben. Nun gibt man 3 µl Lysostaphin hinzu und inkubiert den Ansatz 1 Stunde bei 37 °C. Es folgt eine Inkubation von 15-30 Minuten bei 56 °C sowie das Mischen für 10 Sekunden auf dem Vortex. Anschließend wird das Eppendorftube 8 Minuten bei 100 °C inkubiert und dann wieder 10 Sekunden auf den Vortex gehalten. Jetzt wird es 2-3 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Die DNA kann jetzt verwendet oder eingefroren werden. Bei Wiederverwendung der DNA muss sie erneut 10 Sekunden im Vortex gemischt und anschließend 2-3 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert werden.

2.2.2.3 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Für das Agarosegel 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer geben. In der Mikrowelle erhitzen. Abkühlen lassen, 5 µl RedSafe hinzugeben und in einen Gelträger mit Kamm gießen, fest werden lassen.

Je Plasmid einen 20 µl-Ansatz vorbereiten. 10 µl Plasmid, 2 µl NEB-Puffer 1, je 1 µl der Restriktionsenzyme PstI und KpnI, 4 µl Aqua ad injectabilia und 2 µl BSA vermengen. Diesen Ansatz 2-3 Stunden oder über Nacht bei 37 °C inkubieren, anschließend 30 Sekunden kurz zentrifugieren, um das Kondenswasser in das Eppendorftube zurück zu bringen. 4 µl DNA-Ladepuffer pro Ansatz hinzugeben. DNA-Marker und Restriktionsverdauansätze auf das Agarosegel auftragen und 60 Minuten bei 120 V laufen lassen. Anschließend wird das Gel mit dem Geldokumentationssystem ausgelesen.

2.2.3 Genetische Manipulation von Bakterien

2.2.3.1 Chemische Transformation von *E. coli*

Grundsätzlich nach Herstellerangaben. *E. coli* One Shot®TOP10 auf Eis auftauen lassen. 5 µl Plasmidpräparation zu 100 µl *E. coli* One Shot®TOP10 geben, kurz verrühren. 30 Minuten auf Eis inkubieren, für 30 Sekunden bei 42 °C erhitzen und wieder auf Eis legen. 500 µl raumtemperiertes S.O.C.-Medium hinzu geben. 1 Stunde bei 37 °C bei 200 rpm inkubieren. Je 100 µl und 50 µl auf vorgewärmte LB_{Ampicillin}-Agarplatten ausplattieren. Anschließend Kolonien aufnehmen, Plasmidpräparation und Restriktionsverdau durchführen.

2.2.3.2 Phagentransduktion

Phagentitration

In 5 15 ml-Falcontubes werden je 1 ml NB2+-Medium gegeben. In das erste wird 1 µl Phagenlysat gegeben, sodass es im Verhältnis 10^{-3} vorliegt und anschließend wird es gevortext. Aus dem ersten Tube werden 10 µl in das zweite pipettiert, gevortext und dann je immer 100 µl in das nächste pipettiert und gevortext. So entstehen 5 Falcontubes mit dem Phagenlysatverhältnis zum Medium von 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} und 10^{-8} . Nun wird ein neues Falcontube mit 5 ml NB2+-Medium gefüllt, worin dann das Plasmiddonor-Bakterium resuspendiert wird. Es wird eine $OD_{600} = 0,1$ eingestellt. Je 1 ml hiervon wird auf die 5 anderen Falcontubes verteilt. Jetzt wird in jeden Tube 4 ml STA-Soft-Agar, welches vorher in der Mikrowelle erhitzt wird, bis es flüssig ist, gegeben und umgehend jeweils auf eine STA-Agar-Platte gegossen. Nach dem Festwerden des Soft-Agars werden die Platten bei 30 °C über Nacht statisch inkubiert. Sofern auf den Platten am Folgetag Plaques zu sehen sind, wird auf jede Platte 5 ml NB2+-Medium gegeben und mit einem Glasstab das sich lösende STA-Soft-Agar gekratzt und in einem 50 ml-Falcontube gesammelt. Das Gemisch wird nun für 10 Sekunden und 70 % Ultraschall ausgesetzt, sodass es anschließend flüssig ist. Das Falcontube wird nun bei 6000 rpm 45 Minuten und 4 °C zentrifugiert, der Überstand

in ein anderes Tube überführt. Dieses wird nochmals für 15 Minuten bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Jetzt wird der Überstand im 0,22 µm-Sterilfilter gefiltert. Die dadurch entstandene Lösung fungiert als neues Phagenlysat und muss bei 4 °C gelagert werden.

Phagenpräparation

STA-Softagar wird in der Mikrowelle erhitzt, bis es flüssig ist, sodass es bis zum Gebrauch etwas abkühlen kann. Von dem Plasmiddonator-Bakterium werden etwa 2-3 Kolonien in 3 ml NB2+ resuspendiert und auf eine $OD_{600} = 0,1$ eingestellt. Es werden 3 x 250 µl Phagenlysat in einem 14 ml-Falcontube vorgelegt, dazu wird jeweils 250 µl NB2+ und dann jeweils 500 µl der NB2+-Bakterien-Suspension gegeben. In jedes der drei Tubes wird 3 ml STA-Softagar gegeben und auf je eine STA-Agarplatte gegossen. Sofern auf den Platten am Folgetag Plaques zu sehen sind, wird auf jede Platte 5 ml NB2+-Medium gegeben und mit einem Glasstab das sich lösende STA-Soft-Agar gekratzt und in einem 50 ml-Falcontube gesammelt. Das Gemisch wird nun für 10 Sekunden und 70 % Ultraschall ausgesetzt, sodass es anschließend flüssig ist. Der Falcontube wird nun bei 6000 rpm 45 Minuten zentrifugiert, der Überstand in ein neues 14 ml-Falcontube überführt und dieser wird nochmals 15 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Jetzt wird der Überstand im 0,22 µm-Sterilfilter gefiltert. Die dadurch entstandene Lösung kann nun zur Phagentransduktion eingesetzt werden und muss bei 4 °C gelagert werden.

Phagentransduktion

1 – 2 Agarplatten der zu infizierenden Bakterien in je 5 ml NB2+-Medium resuspendieren, sodass eine 1:100-Verdünnung aus dieser Suspension eine $OD_{600} = 0,1$ ergibt. In einem 14 ml-Falcontubes je 1 ml Phagenlysat (siehe Phagentitration und Phagengewinnung) und 1 ml Bakteriensuspension zusammen geben und 30 Minuten bei 30 °C / 37 °C (je nach Plasmid, vergleiche pBTn Kapitel 2.1.2) und 200 rpm dynamisch inkubieren. Nun 40 µl 1 M Natriumcitratlösung hinzugeben und 15 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugieren. Das Pellet zwei Mal mit 5 ml BHI+ waschen, dabei jeweils 10 Minuten bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugieren. Nun das Pellet mit 3 ml BHI+ sowie 3 µl entsprechendem Antibiotikum resuspendieren und 1

Stunde bei 30 °C / 37 °C (je Plasmid) und 200 rpm dynamisch inkubieren. Inzwischen wird das BHI-Softagar in der Mikrowelle erhitzt, bis es flüssig ist und dann wird es etwas abkühlen gelassen. Nach der Inkubationszeit nochmals 3 µl entsprechendes Antibiotikum sowie 3 ml BHI-Softagar in das Falcontube geben und auf BHI_{Antibiotikum}-Platten ausplattieren. 24 - 48 Stunden bei 30 °C / 37 °C (je Plasmid) inkubieren.

2.2.3.3 Elektroporation

1 Kolonie des Bakterienstamms, welches das Plasmid aufnehmen soll, wird in 5 ml B2-Medium bei 37 °C und 200 rpm dynamisch über Nacht inkubiert. 1000 µl (je nach Erfahrung mit dem zu verwendenden Bakterium kann dies von etwa 500 µl – 2000 µl schwanken) der Vorkultur wird in 50 ml frisches B2-Medium pipettiert und die OD₆₀₀ wird gemessen. Nun wird das Bakterium weiterhin bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bis es auf eine OD₆₀₀ = 0,6 - 0,8 angewachsen ist. Zwischen allen Schritten des Versuchs müssen die Tubes stets auf Eis gelagert werden. Die Inkubation dauert etwa 1 - 2 Stunden. Die 50 ml Medium mit Bakterium werden auf 2 x 25 ml in 50 ml-Falcontubes auf Eis aufgeteilt und 15 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und es folgt das dreimalige Waschen des Pellets mit je 25 ml destilliertem, 4 °C-temperiertem Miliporewasser und 15 minütiger Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C. Nach dem Waschen werden die Zellpellets in je 5 ml sterilem, 4 °C-temperiertem 10 %-igen Glycerol resuspendiert, in je ein 14 ml-Falcontube überführt und 15 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Pellets werden erneut mit je 2,5 ml sterilem, 4 °C-temperiertem 10 %-igen Glycerol resuspendiert und 15 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nun lässt man die Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur ruhen. Das Pellet wird in Abhängigkeit von der Ausgangs-OD₆₀₀ in 600 µl – 800 µl sterilem, 4 °C-temperiertem 10 %-igen Glycerol resuspendiert und in 70 µl-Portionen in Eppendorftubes aliquotiert. Die elektrokompenten Zellen von *S. aureus* RN4220 können bei -80 °C gelagert werden, die von *S. epidermidis* müssen frisch verwendet werden.

Zu dem Aliquot der elektrokompenten Zellen 1 µl Plasmidpräparation zugeben (möglichst über 200 µg / µl, sonst dementsprechend mehr Plasmidpräparation

einsetzen) und 30 Minuten auf Eis inkubieren. Nun wird das Gemisch in die Elektroporationsküvette pipettiert und bei Raumtemperatur, 100 Ω , 21 kV und 25 μ F elektroporiert. Sofort 390 μ l, bei 30 °C vorgewärmtes B2-Medium in die Elektroporationsküvette pipettieren und daraus die 461 μ l (390 μ l B2-Medium + 71 μ l elektrokompetente Zellen mit Plasmidpräparation) in ein vorgewärmtes Eppendorftube pipettieren. Dieses nun 1 h bei 30 °C und 200 rpm dynamisch inkubieren. Aus einem Eppendorftube je 4 x 100 μ l auf NYE_C-Platten ausplattieren und 24 h – 48 h bei 30 °C inkubieren.

2.2.3.4 Transposonmutagenese mit Plasmid pBTn

20 ml TSB werden mit 1 g Xylose versetzt und mit einem Sterilfilter 0,22 μ m steril filtriert. Dazu werden 20 μ l einer Chloramphenicolösung (10 mg / ml) und 5 μ l einer Erythromycinlösung (10 mg / ml) gegeben. In dem Gemisch werden 1 Kolonie des Plasmid tragenden Bakterienstamms resuspendiert und 24 Stunden bei 30 °C und 200 rpm dynamisch inkubiert. Am Folgetag wird hieraus eine 1:100-Verdünnung erstellt. Diese wird in einen Ansatz aus 20 ml TSB + 1g Xylose + 5 μ l Erythromycin (10 mg / ml) pipettiert und 24 Stunden bei 43 °C (kann variieren, siehe Kapitel 3.4) und 200 rpm dynamisch inkubiert. Die Inkubation bei den unterschiedlichen Temperaturen kann auch wiederholt werden. Aus dem bei 43 °C inkubierten Ansatz wird eine Verdünnungsreihe in je 1000 μ l PBS-1 % zu 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-8} und 10^{-9} erstellt und davon je 50 μ l auf je eine Blutagar-, BHI_{Chloramphenicol + Erythromycin} und eine BHI_{Erythromycin}-Platte ausplattiert. Diese Platten werden bei 43°C (kann variieren, siehe Kapitel 3.4) für 48 Stunden inkubiert. Bei den Verdünnungen, bei denen Kolonien auf der Blutagar- sowie BHI_{Erythromycin}-Platte und nicht auf der BHI_{Chloramphenicol + Erythromycin}-Platte angewachsen sind, werden die Klone von der BHI_{Erythromycin}-Platte gepickt. Diese werden erneut auf BHI_{Erythromycin}- und BHI_{Chloramphenicol + Erythromycin}-Platten bei 43 °C (kann variieren, siehe Kapitel 3.4) über 24 Stunden inkubiert. Diejenigen Klone, die dabei nur auf der der erythromycinhaltigen Agarplatte angewachsen sind, zeigen das erwünschte Verhalten. Auf dem Plasmid pBTn liegt nämlich eine Chloramphenicolresistenzkassette und das Transposon trägt eine

Erythromycinresistenz. Bei echten Transposonmutanten der Transposonmutagenese muss das Transposon in das Genom des Bakteriums aufgenommen (erythromycinresistent) und das Plasmid wieder eliminiert sein (nicht mehr chloramphenicolresistent, also –sensibel).

2.2.4 Immunchemische Methoden

2.2.4.1 Dot Blot Analyse von Oberflächenproteinen nach Kultur in Gegenwart von Ziegenserum

Aus einer Vorkultur wird eine 1:100-Verdünnung in 50 ml Falcontubes oder Erlenmeyerkolben zu je 5 ml TSB oder 5 ml der jeweiligen Ziegenserumverdünnung in TSB erstellt. Diese wird bei 170 rpm und 37 °C inkubiert und nach 8 Stunden je 2 ml in 2 ml-Eppendorftubes pipettiert. Die 50 ml-Falcontubes bzw. Erlenmeyerkolben werden weiter bei 170 rpm und 37 °C inkubiert und nach weiteren 16 Stunden erneut 2 ml-Proben für den Zeitpunkt „24-Stunden“ in 2 ml-Eppendorftubes pipettiert. Die 2 ml-Proben werden bei 13200 rpm 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit 500 µl PBS-1 % resuspendiert, noch einmal 5 Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die 8 Stunden-Probe wird am Vortag nach diesem Schritt bei -18 °C eingefroren und zum Verarbeiten der 24-Stunden-Probe wieder aufgetaut. Nun werden die Pellets aus den Proben beider Zeitpunkte mit 500 µl PBS-1 % aufgenommen und in einer 1,5 ml-Küvette eine 1:10-Verdünnung auf 1 ml erstellt. Es folgt die OD₆₀₀-Einstellung jeder Probe auf die niedrigste gemeinsame OD₆₀₀. Da der *S. epidermidis*-Stamm 1585v (Positivkontrolle), oft nach 8 Stunden nur einen sehr geringen Wachstumszuwachs und damit OD₆₀₀ aufweist, wurden die OD₆₀₀-Schwankungen dieser Probe gelegentlich nicht berücksichtigt.

Nach der OD₆₀₀-Einstellung wird aus jeder Küvette 500 µl in ein neues Eppendorf-Tube pipettiert und 5 Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert. Überstand verwerfen und mit 50 µl 1x – LDS – Puffer resuspendieren. Nun werden die Proben bei 95 °C für 5 Minuten aufgeköcht. PVDF-Membran mit etwas PBS-1 % befeuchten, mit Methanol

aktivieren und mit etwas PBS-1 % waschen. Dot Blot-Membran auf angefeuchtetes Filterpapier legen und 8 µl jeder Probe auf die Membran pipettieren. Über Nacht mit 3 %-igem Milchpulver bei 4 °C auf dem Kipptisch blocken. Am Folgetag wird die Membran 4 x 8 Minuten mit PBS-1 %-T0,05 % bei 200 rpm und Raumtemperatur waschen. 1 Stunde mit 1.-Antiserum 1:10000 in 30 ml PBS-1 % bei 200 rpm, Raumtemperatur inkubieren. 4 x 8 Minuten mit PBS-1 % - T0,05 % bei 200 rpm, Raumtemperatur waschen. 1 Stunde mit 2.-Antikörper, 1:10000 in 30 ml PBS-1 % bei 200 rpm, Raumtemperatur inkubieren. 4 x 8 Minuten mit PBS-1 %-T0,05 % bei 200 rpm, Raumtemperatur waschen. Für die Membran der Größe einer Mikrotiterplatte insgesamt 1000 µl Western-Blotting-Reagenz, also 500 µl Lösung 1 + 500µl Lösung 2 in einem Eppendorftube vorbereiten. Bei kleineren Membranen entsprechend weniger. Die Membran wird luftblasenfrei auf eine doppelt so große Folie gelegt, das Substrat dazu gegeben und etwas geschwenkt, sodass die Membran makroskopisch mit einem Film überzogen ist. Die Folie luftblasenfrei auf die Membran umschlagen. Die eingeschlagene Membran wird auf Zellstoff gelegt. Beispielsweise mit einem dicken Stift wird wie mit einem Nudelholz das überflüssige Substrat vorsichtig aus der Folie herausgestrichen, damit der Fotofilm später nicht benetzt wird. Anschließend belichten.

2.2.4.2 Dot Blot Analyse von Oberflächenproteinen nach Kultur in Gegenwart von Tigecyclin

Für die Tigecyclinverdünnungsreihe wird eine 1 mg / ml – Lösung aus der Trockensubstanz Tigecyclin in Aqua ad injectabilia erstellt und diese zu den gewünschten Konzentrationen mit TSB gemischt, dass 5 ml – Ansätze entstehen. Aus einer Vorkultur werden 1:100-Verdünnungen in 50 ml - Falcontubes oder Erlenmeyerkolben in je 5 ml TSB und 5 ml des TSB-Tigecyclin-Gemisches pipettiert. Diese werden bei 170 rpm und 37 °C inkubiert und nach 8 Stunden je 2 ml in 2 ml-Eppendorftubes pipettiert. Die 50 ml-Falcontubes bzw. Erlenmeyerkolben werden weiter bei 170 rpm und 37 °C inkubiert und nach weiteren 16 Stunden erneut 2 ml-Proben für den Zeitpunkt „24-Stunden“ in 2 ml-Eppendorftubes pipettiert. Die 2 ml-

Proben werden bei 13200 rpm 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit 500 µl PBS-1 % resuspendiert, noch einmal 5 Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die 8 Stunden-Probe wird am Vortag nach diesem Schritt bei -18 °C eingefroren und zum Verarbeiten der 24-Stunden-Probe wieder aufgetaut. Nun werden die Pellets aus den Proben beider Zeitpunkte mit 500 µl PBS-1 % aufgenommen und in einer 1,5 ml-Küvette eine 1:10-Verdünnung auf 1 ml erstellt. Es folgt die OD₆₀₀-Einstellung jeder Probe auf die niedrigste gemeinsame OD₆₀₀. Da der *S. epidermidis*-Stamm 1585v (Positivkontrolle), oft nach 8 Stunden nur einen sehr geringen Wachstumszuwachs und damit OD₆₀₀ aufweist, wurden die OD₆₀₀-Schwankungen dieser Probe gelegentlich nicht berücksichtigt.

Nach der OD₆₀₀-Einstellung wird aus jeder Küvette 500 µl in ein neues Eppendorf-Tube pipettiert und 5 Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert. Überstand verwerfen und mit 50 µl 1x – LDS – Puffer resuspendieren. Nun werden die Proben bei 95 °C für 5 Minuten aufgekocht. Dot Blot-Membran mit etwas PBS-1 % befeuchten, mit Methanol aktivieren und mit etwas PBS-1 % waschen. Dot Blot-Membran auf angefeuchtetes Filterpapier legen und 8 µl jeder Probe auf die Membran pipettieren. Über Nacht mit 3 %-igem Milchpulver bei 4 °C auf dem Kipptisch blocken. Am Folgetag wird die Membran 4 x 8 Minuten mit PBS-1 %-T0,05 % bei 200 rpm und Raumtemperatur waschen. 1 Stunde mit 1.-Antiserum 1:10000 in 30 ml PBS-1 % bei 200 rpm, Raumtemperatur inkubieren. 4 x 8 Minuten mit PBS-1 % - T0,05 % bei 200 rpm, Raumtemperatur waschen. 1 Stunde mit 2.-Antikörper, 1:10000 in 30 ml PBS-1 % bei 200 rpm, Raumtemperatur inkubieren. 4 x 8 Minuten mit PBS-1 %-T0,05 % bei 200 rpm, Raumtemperatur waschen. Für die Membran der Größe einer Mikrotiterplatte insgesamt 1000 µl Western-Blotting-Reagenz, also 500 µl Lösung 1 + 500µl Lösung 2 in einem Eppendorftube vorbereiten. Bei kleineren Membranen entsprechend weniger. Die Membran wird luftblasenfrei auf eine doppelt so große Folie gelegt, das Substrat dazu gegeben und etwas geschwenkt, sodass die Membran makroskopisch mit einem Film überzogen ist. Die Folie luftblasenfrei auf die Membran umschlagen. Die eingeschlagene Membran wird auf Zellstoff gelegt. Beispielsweise mit einem dicken Stift wird wie mit einem Nudelholz das überflüssige Substrat vorsichtig aus der Folie herausgestrichen, damit der Röntgenfilm später nicht benetzt wird. Anschließend belichten.

3. Ergebnisse

3.1 Begriffsbestimmungen und Definitionen

Im Hinblick auf die Entwicklung eines Screens im 96-Well-Format mussten je nach experimentellem Setting spezifische Modifikationen im Umgang mit Kulturen erarbeitet werden. Tabelle 1 fasst diese mit den korrespondierenden Abkürzungen zusammen.

Tabelle 1: Unterschiede von Einzel- und 96-Well-Format-Kulturen: Abkürzungen und Beschreibung vom speziellen Umgang mit Vorkulturen und Kulturen bei Experimenten, die in den Folgekapiteln beschrieben werden.

Abkürzung	Beschreibung
Vorkulturen	
VK-RG	Animpfen von TSB im Reagenzglas mit einer Bakterienkolonie, Kultur dynamisch über Nacht. In der Regel <i>S. epidermidis</i> 1585wt oder 1585hc (Teststämme), 1585v (Positivkontrolle) und 1585-M135 (Negativkontrolle).
VK-RG-OD	Wie VK-RG, anschließend Verdünnung 1:100 in frisches TSB und Vereinheitlichung des Zellwachstums mittels Einstellung auf eine Ziel-OD ₆₀₀ .
VK-96	Vorkultur im 96-Well-Format von <i>S. epidermidis</i> 1585wt oder 1585hc. Ziel ist die Imitation der Mikrotiterplatten, in denen die Transposonmutanten archiviert sind und die Anzucht von Vorkulturen daraus. Zunächst Kolonien von 1585wt und 1585hc in 96-Well-Greinerplatten in Einfriermedium einfrieren. Für die VK-96 diese Platten wieder auftauen. Anschließend Stempeln des Inhalts auf große Agarplatten und nach Koloniebildung weiter stempeln in 96-Deepwellplatten mit TSB und inkubieren. (Kapitel 3.3.2.2).
VK-96-OD	Wie VK-96, anschließend Verdünnung in frisches TSB in einer neuen 96-Deepwellplatte und Vereinheitlichung des Zellwachstums mittels Einstellung auf eine Ziel-OD ₆₀₀ in allen Vertiefungen der Platte. (Kapitel 3.4.3).
Kulturen Dot Blot Assay	
Kultur DB-Basis	TSB und Ziegenserum- oder Tigecyclinverdünnungen in 50 ml - Falcon Tubes vorgelegen. Übertragung von VK-RGs 1:100 in die Falcontubes. Anschließend dynamische Inkubation und Probengewinnung nach definierter Kulturdauer. Einstellung der Zelldichte aller gewonnenen Proben auf eine OD ₆₀₀ . (Versuchsprotokoll aus Material und Methoden).
Kultur DB-96	Kultur statt in Falcon-Tubes in Näpfchen von 96-Deepwellplatten. Inokulation der Näpfchen mit einer Ziegenserum- oder Tigecyclinverdünnung. Anschließend Animpfen aus einer VK-96 oder einer VK-96-OD. Dynamische Inkubation und weiterer Versuchsablauf im 96-Well-Format. (Screeningbedingungen).
Kultur DB-96-Test	Kultur in 96-Deepwellplatten, ohne diese aus VK-96 oder VK-96-OD anzupfen, sondern aus VK-RGs. Inokulation der Näpfchen der Deepwellplatten mit TSB und Ziegenserum- oder Tigecyclinverdünnungen. Anschließend Animpfen der Näpfchen einer Platte aus VK-RGs von <i>S. epidermidis</i> 1585wt / 1585hc, 1585v und 1585-M135 (Abbildung 9). Nach Inkubation wird der 96-Well-Plattenansatz mit Mehrkanalpipetten durch die Versuchsschritte geführt und so die 96-Well-Anordnung beibehalten. Die Versuchsschritte, die Bakterien im 96-Well-Format aufzutauen, anzuzüchten und daraus Vorkulturen zu erstellen (VK-96) wurden so übersprungen. (Kapitel 3.3.1)
Kulturen Biofilmassay	
Kultur BFA-Basis	Einzelne Inokulation von Näpfchen einer 96-Well-NunclonΔ-Mikrotiterplatte aus einer 1:100-Verdünnungen von VK-RG oder VK-RG-OD. Anschließend Inkubation für die Adhärenzphase und Zugabe von Ziegenserum oder Tigecyclin in gewünschter Konzentration, weitere Inkubation. (Versuchsprotokolle aus Material und Methoden).
Kultur BFA-96	Inokulation aller Näpfchen einer 96-Well-NunclonΔ-Mikrotiterplatte mit einer Verdünnung aus VK-96 oder VK-96-OD in frischem TSB mittels Mehrkanalpipette. Anschließend Inkubation für die Adhärenzphase, Zugabe von Ziegenserum und weitere Inkubation. (Screeningbedingungen).

3.2 Identifikation geeigneter Bedingungen zur Detektion Ziegenserum-induzierter *S. epidermidis* Biofilmbildung und Embp Produktion

Ziel der in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente war es, ein Basis-Versuchsprotokoll zu erarbeiten, mithilfe dessen Biofilmbildung und Embp Produktion bei *S. epidermidis* 1585 in Gegenwart von Ziegenserum dargestellt werden können. Es sollte vor allem die Ziegenserumkonzentration gefunden werden, die zuverlässig eine stabile Embp Produktion sowie Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 1585 induziert.

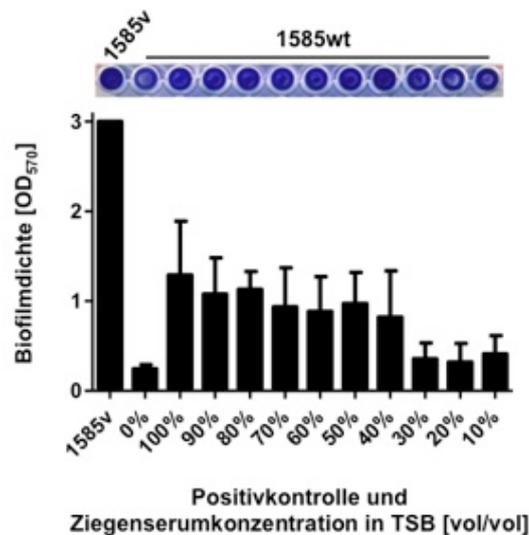


Abbildung 7: Ziegenseruminduzierte Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1585wt. Untersuchung der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1585wt in Gegenwart von Ziegenserum mittels Biofilmassay. Kultur BFA-Basis aus VK-RG, Ziegenserumexposition über Nacht. Nach Waschen und Trocknen wurden die angehefteten Zellen mit Gentianaviolett angefärbt. Es ist eine Biofilmbildung im Bereich von 40 % - 100 % Ziegenserumkonzentration zu sehen. 1585v ohne Serum ist die Positivkontrolle, 1585wt ohne Serum ist die Negativkontrolle. N = 8 für jede Säule des Diagramms.

Hierfür wurde die Induktion der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 1585 in Gegenwart unterschiedlicher Serumkonzentrationen (10 - 100 %) mittels Biofilmassay getestet. Als Kontrollen wurden *S. epidermidis* 1585v (Positivkontrolle) und 1585 ohne Serum (Negativkontrolle) mitgeführt (Abbildung 7). Bei der Analyse zeigte sich, dass eine Biofilmbildung oberhalb einer Serumkonzentration von 40 % nachgewiesen werden kann. Dabei ergab sich ab dieser Konzentration keine wesentliche Zu- oder Abnahme

der Biofilmbildung (Abbildung 7). Im Vergleich zur Positivkontrolle 1585v war die Stärke des durch Serum induzierten Biofilms schwächer.

Im Folgenden wurde die Serumkonzentrations-abhängige Embp-Produktion mittels Dot Blot Assay getestet. Als Positivkontrolle diente der *S. epidermidis* Stamm 1585v, als Negativkontrolle die Mutante 1585-M135, die sich durch einen Defekt im *embp*-Gen auszeichnet (Abbildung 8).

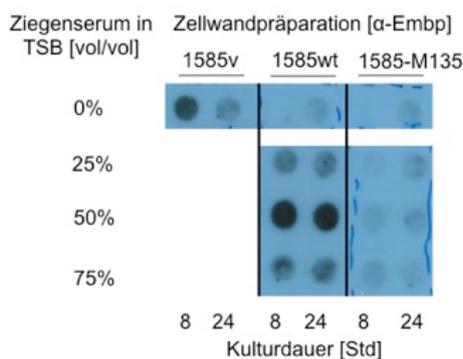


Abbildung 8: Ziegenseruminduzierte Embp Produktion von *S. epidermidis* 1585wt. Untersuchung der Embp Produktion nach Anzucht mit 25 %, 50 % und 75 % Ziegenserumkonzentration mittels Dot Blot Assay. Kultur DB-Basis aus VK-RGs. Probengewinnung nach 8 und 24 Stunden. Nach OD₆₀₀-Einstellung erneute Zentrifugation. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in LDS-Puffer aufgenommen und aufgeköcht. Von jeder Probe wurden 10 μ l auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Die Embp-Detektion erfolgte durch Inkubation mit anti-rEmbp6559 (1:10000), sowie einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen IgG (1:10000). Belichtungszeit 3 Minuten. Es ist ein positiver Embp-Nachweis bei *S. epidermidis* 1585wt mit 50 % Ziegenserum nach 8- und 24-stündiger Kultur zu sehen. In abgeschwächter Form ist dies ebenfalls bei 25 % und 75 % Ziegenserum zu beobachten. 1585v ohne Serum ist die Positivkontrolle, 1585wt ohne Serum und 1585-M135 (Mutante mit Embp-Defekt) mit und ohne Serum sind Negativkontrollen.

Nach Optimierung der Kulturbedingungen gelang es, eine Ziegenserum-induzierte Embp Produktion darzustellen. Hierzu wurden aus einer 5 ml Bakterienkultur 2 ml entnommen und auf eine OD₆₀₀ von circa 0,5 eingestellt. Von Vorteil war hierbei, die Kulturen in Erlenmeyerkolben oder 50 ml-Falcontubes zu inkubiert, da sich in 15 ml-Falcontubes während der dynamischen Inkubation im konischen Boden des Gefäßes Pellets bildeten. Nach Präparation der Oberflächenproteine wurden diese durch den Einsatz eines anti-rEmbp Antiserums im Dot Blot analysiert. Exemplarisch zeigt der Dot Blot in Abbildung 8 eine starke Embp-Induktion nach 8 Stunden sowie 24 Stunden Kultur in Gegenwart von 50 % Ziegenserum. Unter diesen Bedingungen zeigte sich bei der Negativkontrolle 1585-M135 kein Signal. In weiteren Schritten zur Etablierung eines Screening-Dot Blots wurden basierend auf den hier gezeigten

Ergebnissen eine Ziegenserumkonzentration von 50 % als optimale Kulturbedingung festgelegt.

3.3 Dot Blot Assay-basierter Screen zur Identifikation von *S. epidermidis* 1585wt Transposonmutanten mit einer veränderten Ziegenserum-induzierten Embp Produktion

3.3.1 Adaptation des Basis Dot Blot-Protokolls auf ein Protokoll im 96-Well-Format

Die Experimente zur Identifikation der optimalen Ziegenserumkonzentration waren durch Kultur von *S. epidermidis* in Reagenzgläsern durchgeführt worden (VK-RG und Kulturen BFA- sowie DB-Basis, Tabelle 1). Ziel der in dem folgenden Abschnitt beschriebenen Experimente war es, die Kultur von *S. epidermidis* in Gegenwart von 50 % Ziegenserum auf ein 96-Well Mikrotiterplattenformat zu überführen. Neben einer Ziegenserumkonzentration von 50 % wurden in diesem Schritt auch Kulturen in Gegenwart von 75 % und 25 % Ziegenserum mitgeführt. Eine wesentliche Schwierigkeit bestand in der Begrenzung des Kulturvolumens auf 400 µl / Well in Mikrotiterplatten.

Die Experimente erfolgten zunächst ausgehend von *S. epidermidis*-Kulturen DB-96-Test (Tabelle 1). Das in Abbildung 9 gezeigte Inokulationsmuster der 96-Well-Platten wurde in den meisten der folgenden Experimente benutzt. Durch diesen Versuchsaufbau war es möglich, unterschiedliche Bakterienstämme schnell in die Kultur im 96-Well-Format einzubringen und das Inokulationsmuster der 96-Well-Plattenkulturen spontan nach Bedarf zu variieren. Mit dem Stempelverfahren (VK-96) hätte dies für jeden Versuch lange vorbereitet werden müssen. So konnten einzelne Kulturbedingungen wie beispielsweise Kulturvolumina oder Inkubationszeiten gut verändert und die direkte Auswirkung auf den Embp-Nachweis auf dem Röntgenfilm gezeigt werden. Als Kontrollen dienten die Kulturen in TSB ohne Ziegenserum und der Mutante 1585-M135 mit den Ziegenserumkonzentrationen 25 %, 50 % und 75 %.

	H	G	F	E	D	C	B	A	
1			0 % Serum						← 1585v
2			0 % Serum						← 1585wt
3			0 % Serum						← 1585-M135
4			75 % Serum						← 1585wt
5			50 % Serum						
6			25 % Serum						
7			75 % Serum						← 1585-M135
8			50 % Serum						
9			25 % Serum						
10									← Kein Inhalt
11									
12									

Abbildung 9: Inokulationsmuster der 96-Well-Platten für die Folgeversuche. Dargestellt ist das Schema einer 96-Well-Platte. In den Folgeversuchen wird die Kulturvariante DB-96-Test (Tabelle 1) verwendet. Es dient der Testphase, die Kulturbedingungen Kultur DB-Basis auf die Durchführung im 96-Well-Format zu übertragen. Das Schema zeigt, in welcher Anordnung die VK-RGs regelhaft in die 96-Well-Platten pipettiert wurden. Innerhalb der Versuche kommt es zu Wechseln zwischen Mikrotiter- und Deepwellplatten (Füllungsvolumen 400 µl / Well versus 1000 µl / Well).

3.3.1.1 Essentielle Versuchsschritte eines Dot Blot Assays im 96-Well-Format

Die am stärksten vereinfachte Variante des Dot Blot-Protokolls im 96-Well-Format bestand darin, die Kulturen DB-96-Test nach Inokulationsmuster aus Abbildung 9 in einer Mikrotiterplatte statisch zu inkubieren (Kulturvolumen 200 µl / Well). Nach der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte zentrifugiert, die Pellets wurden mit einer Mehrkanalpipette in je 30 µl LDS-Puffer aufgenommen und in eine PCR-Mikrotiterplatte pipettiert. Hierin wurden die Ansätze in einem PCR-Cycler bei 95 °C erhitzt und die Überstände mit der Mehrkanalpipette auf die PVDF-Membran übertragen. Bei diesem Vorgehen konnte jedoch kein Embp nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies gelang erst sukzessive durch die Einführung der dynamischen Inkubation (Abbildung 10 A, Mikrotiterplatte in Schüttelinkubator) in Kombination mit der Vergrößerung des Kulturvolumens durch den Einsatz von Deepwellplatten (Abbildung 10 B, 1000 µl Kulturvolumen, Schüttelinkubator). Insbesondere die dynamische Inkubationsform war entscheidend für den Nachweis

einer Serum-induzierten Embp-Produktion. Die Kultur in einer Deepwellplatte unter statischen Inkubationsbedingungen erbrachte auch keinen Embp-Nachweis (Daten nicht gezeigt). Durch spezifische Fixierung im Schüttelinkubator war sogar die parallele Untersuchung vieler Platten möglich (Abbildung 11).

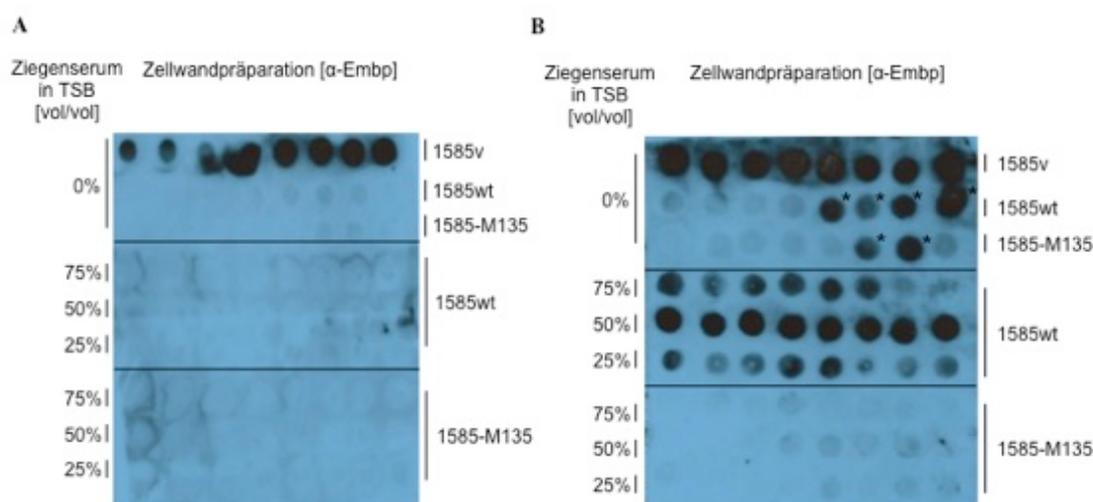


Abbildung 10: Minimalform des Dot Blot Protokolls im 96-Well Format mit positivem Embp-Nachweis bei 1585wt. Untersucht wurde, welche Minimalform des Basis Dot Blot Assay Protokolls im 96-Well-Format zur Embp Produktion von *S. epidermidis* 1585wt führt. Nach Kultur DB-96-Test mit dem Inokulationsmuster von Abbildung 9 wurden die Platten zentrifugiert, die Überstände verworfen, die Pellets in LDS-Puffer aufgenommen und in 96-Well-PCR-Platten im PCR-Cyclor aufgekoht. Aus jedem Well wurden 10 µl auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Die Embp-Detektion erfolgte durch Inkubation mit anti-rEmbp6559 (1:10000) sowie einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen IgG (1:10000). **(A)** Kulturvolumen 200 µl / Well in einer Mikrotiterplatte, 8-stündige Inkubation bei 300 rpm und 37 °C. 2 Minuten Belichtungszeit. Es ist ein positiver Embp-Nachweis bei der Positivkontrolle *S. epidermidis* 1585v zu sehen. **(B)** Kulturvolumen 1000 µl / Well in einer Deepwellplatte mit 24-stündige Inkubation bei 550 rpm und 37 °C. 30 Sekunden Belichtungszeit. Es ist ein positiver Embp-Nachweis bei der Positivkontrolle (1585v), bei *S. epidermidis* 1585wt mit 50 % Ziegen Serum sowie bei 75 % und 25 % in abgeschwächter Form zu sehen. * markiert für Embp positive Chemolumineszenzreaktionen bei den Negativkontrollen, die durch das Überlaufen der maximal befüllten Deepwellplatten-Näpfchen zu erklären sind.

Der in Abbildung 10 B dargestellte Dot Blot zeigt, dass 1585wt nach Wachstum in Gegenwart von 50 % Ziegen Serum eine mit der Positivkontrolle vergleichbare antigene Reaktivität aufweist. Diese ist auch bei 75 % und 25 % Ziegen Serum zu erkennen, jedoch weniger konsistent in allen Wells. Als Ziegen Serumkonzentration für den Screen bei Durchführung der Kulturen im 96-Well-Format wurde daher 50 % festgelegt.



Abbildung 11: Versuchsanordnung zur parallelen Inkubation mehrere Deepwellplatte. Dargestellt ist ein Foto der auf einer Motorplatte eines Schüttelinkubators mit Pflasterstreifen fixierten Deepwellplatten.

Problematisch bei dem Einsatz eines Kulturvolumens von 1000 μl war, dass dies zu einer grenzwertigen Befüllung der Wells führte. In der Folge kam es zu Kreuzkontaminationen (* in Abbildung 10 B). Für Folgeversuche wurde daher das Kulturvolumen auf maximal 400 μl / Well festgelegt. Darüber hinaus kam es in allen Reihen, deren Proben mit Serum inkubiert wurden, tauchen verschwommene Ränder in Kreisform auf. Um dieses Phänomen zu verhindern, wurden die Zellpellets in den Folgeversuchen vor der Inkubation mit dem LDS-Puffer gewaschen.

3.3.1.2 Kulturdauer und Ziegenserumkonzentration im 96-Well-Format

Es sollte nun die optimale Inkubationszeit zur Embp Induktion ermittelt werden. Hierzu wurden Inkubationszeiten von 8 Stunden, 14 Stunden und 20 Stunden verglichen (Abbildung 12). Unabhängig von den gewählten Inkubationszeiten war eine deutliche Embp-Induktion in Gegenwart von 50 % Ziegenserum nachweisbar. Bei Inkubation in Gegenwart von 25 % und 75 % Serum war die Signalintensität schwächer und weniger konsistent in allen Wells darstellbar.

Aus dieser Versuchsreihe ergab sich die Entscheidung, die Embp-Produktion nach 8 Stunden Kultur in Gegenwart von 50 % Ziegenserum zu analysieren.

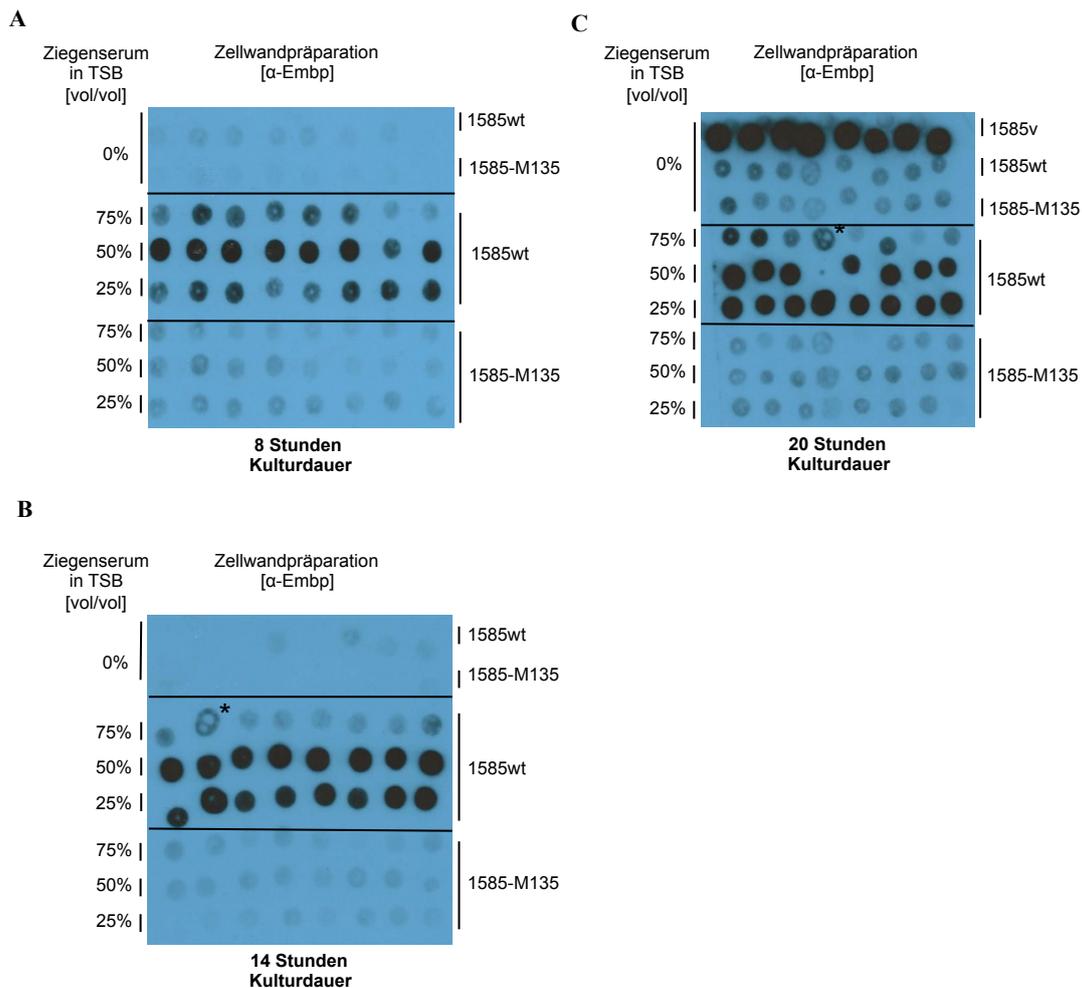


Abbildung 12: Validierung der Kulturdauer und Ziegenserumkonzentration für den Screen. Untersucht wurde die Auswirkung unterschiedlicher Kulturdauern und Ziegenserumkonzentrationen auf die Embp Produktion von *S. epidermidis* 1585wt, nachgewiesen mittels Dot Blot Assay unter bis jetzt erarbeiteten Bedingungen im 96-Well-Format. Kultur DB-96-Test mit dem Inokulationsmuster von Abbildung 9 und Inkubation wie in Abbildung 11 bei 180 rpm und 37 °C. Anschließend wurden die Platten zentrifugiert, die Überstände verworfen, die Pellets in LDS-Puffer aufgenommen und aufgeköcht. Aus jedem Well wurden 9 µl auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Die Embp-Detektion erfolgte durch Inkubation mit anti-rEmbp6559 (1:10000) sowie einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen IgG (1:10000). Belichtungszeit jeweils 2 Minuten. **(A)** Es ist ein positiver Embp Nachweis bei *S. epidermidis* 1585wt nach 8-stündiger Exposition mit 25 %, 50 % und 75 % Ziegenserum zu sehen. Die Positivkontrolle findet sich exemplarisch in **(C)**. **(B)** Es ist ein positiver Embp Nachweis bei 1585wt nach 14-stündiger Exposition mit 25 % und 50 % Ziegenserum zu sehen. Die Positivkontrolle findet sich exemplarisch in **(C)**. * markiert eine Blasenbildung durch das Pipettieren der Zellwandpräparation auf die PVDF-Membran. **(C)** Es ist ein positiver Embp Nachweis bei 1585wt nach 20-stündiger Exposition mit 25 %, 50 % und teilweise mit 75 % Ziegenserum zu sehen. * siehe **(B)**.

3.3.1.3 Optimierung des Kulturvolumens

Im Weiteren sollte versucht werden, das Kulturvolumen weiter zu verkleinern und somit Ziegenserum zu sparen. Es wurde daher der Einfluss des Kulturvolumens auf die Nachweisbarkeit der Embp-Induktion in Gegenwart einer

Ziegenserumkonzentration von 50 % untersucht. Hierbei wurden die Bakterien in 200 µl, 300 µl oder 400 µl Medium / Well angezchtet (Abbildung 13).

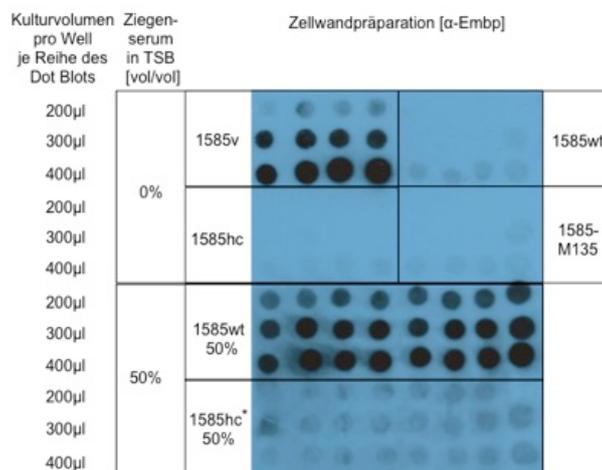


Abbildung 13: Identifikation des optimalen Kulturvolumens bei Kultur im 96-Well Format. Untersucht wurde die Auswirkung der Kulturvolumina 200 µl, 300 µl und 400 µl auf die Embp Produktion von *S. epidermidis* 1585wt, nachgewiesen mittels Dot Blot Assay im bisher erarbeiteten 96-Well-Format. Ziegenserumkonzentration nur noch 50 % und 0 %. Kultur DB-96-Test, 14-stündige Ziegenserumexposition bei 180 rpm und 37 °C. Anschließend wurden die Platten zentrifugiert, die Überstände verworfen, die Pellets in LDS-Puffer aufgenommen und aufgeköcht. Aus jedem Well wurden 9 µl auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Die Embp-Detektion erfolgte durch Inkubation mit anti-rEmbp6559 (1:10000) sowie einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen IgG (1:10000). 2 Minuten Belichtungszeit. Es ist ein positiver Embp Nachweis bei *S. epidermidis* 1585wt mit 50 % Ziegenserum und 1585v bei allen Kulturvolumina zu sehen. Die Intensität der Chemolumineszenzreaktion sinkt mit reduziertem Kulturvolumen. * Die Hinzunahme des *S. epidermidis*-Stamm 1585hc (Transposonmutantenbank Heinze 2012) erbringt keinen Embp Nachweis. Dies wäre die Voraussetzung, um den Dot Blot-basierten Screen auch auf diese Transposonmutantenbank anzuwenden. Weiterführende Versuche siehe Kapitel 3.3.5 und folgende.

Unabhängig vom Kulturvolumen konnte eine deutliche Embp-Expression bei 1585wt nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Intensität der Chemolumineszenzreaktion mit abnehmenden Kulturvolumen geringer wurde. Vergleicht man die Signalintensität bei *S. epidermidis* 1585wt und 1585v, so ergaben sich 300 µl als optimales Kulturvolumen. Basierend auf diesem Kulturvolumen konnte berechnet werden, dass für das Screening der bereits etablierten Transposonmutantenbank in 1585hc (umfasst etwa 4100 Tn-Mutanten; Heinze 2012) bei der Ziegenserumkonzentration 50 % ein Gesamtvolumen von etwa 0,615 l Ziegenserum notwendig sein würden.

3.3.2 Verfahren zur Rekultivierung von archivierten Transposonmutanten im 96-Well-Format

3.3.2.1 Auftauen von in Mikrotiterplatten archivierten Bakterien

Die Transposonmutantenbank ist in Mikrotiterplatten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ archiviert. Für das Screening müssen die Transposonmutanten wieder in Kultur gebracht werden, ohne dass es zu Kreuzkontaminationen zwischen den einzelnen Mutanten kommt. Für das Auftauverfahren wurde ein Replika-Stempel mit 96 Stäben benutzt, um die Bakterienzellen von Schritt zu Schritt zu transferieren. Um das Vorgehen der Rekultivierung testen zu können, wurden 1585wt und 1585hc (Trägerstamm der Transposonmutantenbank aus Heinze 2012) jeweils in 25 ml Einfriermedium resuspendiert und auf eine $\text{OD}_{600} = 0,1$ eingestellt. 200 μl der Suspension wurden in Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Dies entspricht einer Imitation der eingefrorenen Transposonmutantenbank. Nachdem die Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur aufgetaut wurden, konnte der Stempel in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte getaucht werden. Die danach an den einzelnen Stäben haftenden Bakterienzellen konnten so auf eine Agarplatte übertragen werden. Nach statischer Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht sind auf der Agarplatte 8×12 klar voneinander separierte Kolonien pro Stempelabdruck entstanden, bei denen im Screen jede Kolonie den Bakterienzellen einer Transposonmutante entspricht (siehe Abbildung 14).

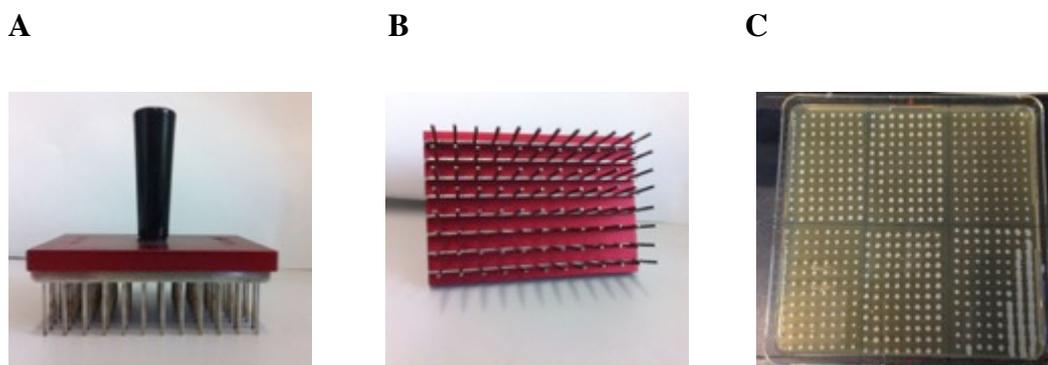


Abbildung 14: Darstellung der verwendeten Replika-Stempel sowie durch Stempel auf Agarplatten übertragenen Replikakulturen. (A, B) Foto des Replika-Stempels mit 96 Stäben. (C) Foto einer Agarplatte mit *S. epidermidis* 1585wt-Kolonien aus sechs Replika-Stempel-Abdrücken. Im rechten unteren Abschnitt ist das Verlaufen der Kolonien zu sehen.

Das Auftauen der Mikrotiterplatten wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten, auch nach Wochen getestet und war problemlos möglich. Erklärungen zur Vermeidung von ineinander laufenden Kolonien wie im unteren rechten Feld von Abbildung 14 C siehe Fußnoten in den Versuchsprotokollen. Die Kolonien können für den nächsten Versuchsschritt erneut mit dem Stempel aufgenommen werden. Darüber hinaus können die Agarplatten bei 4 °C gelagert werden. So können beim Screening einzelne Transposonmutanten direkt zurückverfolgt und direkt neue Kulturen für weitere Tests angefertigt werden.

Beim Auftauen der Transposonmutantenbank in 1585hc (Heinze 2012) im Rahmen des tatsächlichen Screenings bildeten sich anfangs nicht zuverlässig 96 Kolonien pro Stempelabdruck. Die Bakterien haben nach dem Auftauen der Mikrotiterplatten Pellets am Näpfchenboden geformt. Um dieses Problem zu beheben, wurden vor dem Replikatransfer alle Vertiefungen durch Pipettieren suspendiert.

3.3.2.2 Anzucht von Vorkulturen aus *S. epidermidis*-Kolonien im 96-Well-Format (VK-96)

Um Bakterienzellmaterial für eine Oberflächenproteinpräparation zu erzeugen, musste nun ein Weg gefunden werden, um ausgehend von den im 96-Well-Format vorliegenden Replika-Kulturen (Abbildung 14 C) Flüssigkulturen anzulegen. Dazu wurden die Kolonien eines Stempelabdrucks von 1585wt erneut mit dem Stempel (Abbildung 14 A, B) aufgenommen und in eine Deepwellplatte mit 400 µl / Well frischem TSB übertragen. Der Stempel wurde abgelegt und etwas auf den Boden geklopft. Die Deepwellplatte wurde auf der Motorplatte eines Schüttelinkubators bei 180 rpm inkubiert (Abbildung 11). Aus dieser VK-96-Platte wurde eine 1:100-Verdünnung in einer neuen Deepwellplatte (Kultur-DB-96) erstellt und der Dot Blot Abbildung 15 erstellt. Der Dot Blot ergab ein verwertbares Ergebnis, sodass dieses Vorgehen der Vorkulturerstellung in das Versuchsprotokoll übernommen werden sollte.

Im finalen Versuchsprotokoll für den Dot Blot Assay-basierten Screen findet sich allerdings die Verwendung einer VK-96-OD statt der VK-96 wieder. Grund ist, dass

sich erst später heraus stellte, dass es unter VK-96-Bedingungen nicht zu einem einheitlichen Zellwachstum in allen Vertiefungen der Deepwellplatten kommt. Dies wird erst in der VK-96-OD-Variante gewährleistet (Kapitel 3.4.3). Wegen besserer Aussagekraft wurde diese Vorgehensweise für den Screen übernommen. Die VK-96-OD wurde im Rahmen der Screeningmodifikation auf eine Biofilmassay-basierte Version entwickelt. Es besteht ein Unterschied in der Weiterverwendung der VK-96-OD für die Dot Blot-basierte Version. Hier muss aus den VK-96-OD-Platten 5 µl / Well in neue Kultur-DB-96-Platten mit einem vorgelegten TSB-Ziegenserumgemisch (50 % Ziegenserum) pipettiert werden.

3.3.3 Erstellung eines Dot Blot Assays im 96-Well-Format

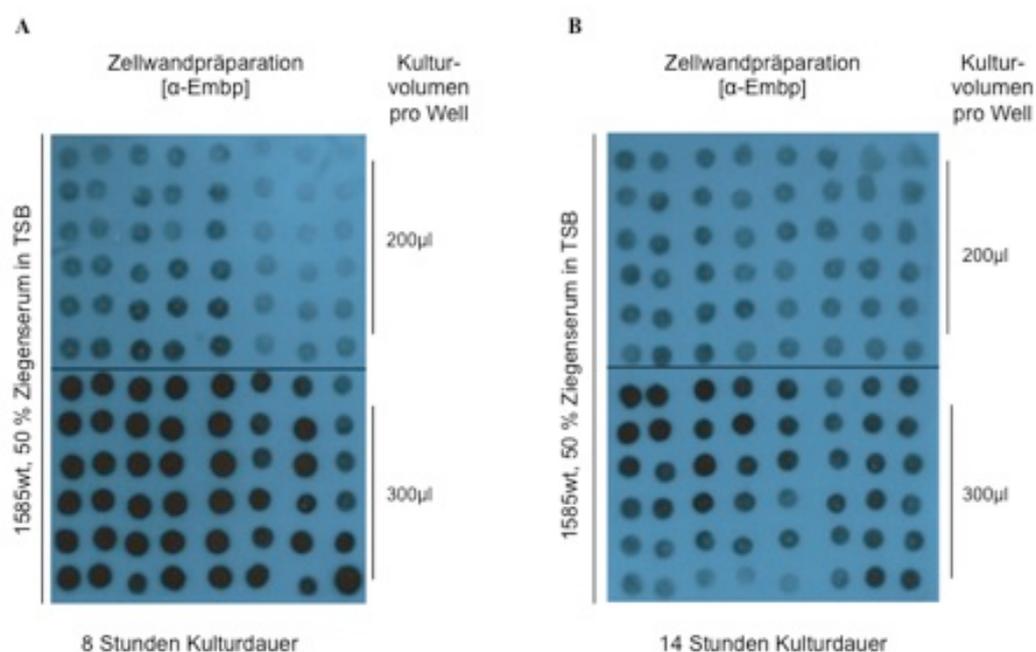


Abbildung 15: Validierung der endgültigen Screeningbedingungen im 96-Well-Format. Abschließender Vergleich der Kulturvolumina 200 µl und 300 µl und der Kulturdauern von 8 und 14 Stunden für den Embp Nachweis von *S. epidermidis* 1585wt unter Screeningbedingungen. 50 % Ziegenserum als feste Größe. Kultur DB-96 aus VK-96 ausschließlich mit *S. epidermidis* 1585wt. Nach Kultur wurden die Platten zentrifugiert, die Überstände verworfen, die Pellets in LDS-Puffer aufgenommen und aufgekocht. Aus jedem Well wurden 9 µl auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Die Embp-Detektion erfolgte durch Inkubation mit anti-rEmbp6559 (1:10000) sowie einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen IgG (1:10000). 2 Minuten Belichtungszeit. **(A)** Es ist ein deutlicher Embp-Nachweis bei 300 µl / Well, also 150 µl / Well Serum, nach 8-stündiger Serumexposition zu erkennen. **(B)** Es ist ein deutlicher Embp-Nachweis ebenfalls bei 300 µl / Well, also 150 µl Serum / Well, nach 14-stündiger Kultur zu erkennen. Allerdings ist die Intensität des Signals inhomogener im Vergleich zur 8-stündigen Inkubation in (A).

Es sollte nun geprüft werden, ob das Kulturvolumen von 300 µl auch ausreichend sein würde, wenn die Beimpfung der Wells aus der Vorkulturvariante VK-96 erfolgen würde (VK-96-OD war noch nicht bekannt). Es zeigte sich, dass auch bei diesem Vorgehen nach 8-stündiger Kultur in einem Endvolumen von 300 µl die Embp-Induktion in allen Wells nachgewiesen werden konnte. Bei einem Kulturvolumen von 200 µl war das erzeugte Signal erneut nur schwach. Die Inkubation über 14 Stunden führte bei einer 300 µl Kultur zu einer inhomogenen Signalverteilung zwischen den einzelnen Nöpfchen (Abbildung 15).

Zusammenfassend wurde unter Berücksichtigung der erhobenen Daten festgelegt, dass der Screen der Transposonmutanten nach 8-stündiger Inkubation in 300 µl TSB und in Gegenwart von 50 % Ziegenserum erfolgen sollte. Unter diesen Bedingungen ist eine parallele Verarbeitung von sechs 96 – Well – Mikrotiterplatten und damit die Analyse von 576 Mutanten pro Versuchsdurchlauf möglich. Es können mehrere Versuchsdurchläufe versetzt laufen.

3.3.4 Positiv- und Negativkontrollen im Screen

Damit die Positiv- und Negativkontrolle mit der eingefrorenen Transposonmutantenbank vergleichbar ist, müssen diese Stämme ebenfalls eingefroren werden, um sie wie die Transposonmutanten im Screen mit auf zu tauen und im Sinne des 96-Well-Formats weiter zu verarbeiten. Dafür wurden Kolonien der Stämme *S. epidermidis* 1585v und 1585-M135 in Einfriermedium resuspendiert, auf eine $OD_{600} = 0,1$ eingestellt und zu 200 µl / Well in je einer Greinermikrotiterplatten eingefroren. Diese werden dann zum ersten Durchlauf wie alle anderen Platten aufgetaut und auf Agarplatten gestempelt. Im Screen selbst braucht dann nur noch aus je eine Reihe mit acht Kolonien von der Agarplatte eine VK-96 (beziehungsweise VK-96-OD) erstellt werden. So können je eine Reihe Positiv- und Negativkontrolle in eine gemeinsame Deepwellplatte übertragen werden. Dadurch entsteht zusätzliche eine Kontroll-Deepwellplatte pro Durchlauf entsteht. Da nicht die gesamte Deepwellplatte mit der Positiv- / Negativkontrolle versehen wird, sondern nur jeweils eine Reihe (also acht Nöpfchen), sollten die mittleren Reihen der Deepwellplatten (Reihe 6 und 7) genutzt

werden, da diese bei der Inkubation am fehleranfälligen sind (vergleiche Kapitel 3.4.3).

3.3.5 Validierung des Dot Blot Assay-basierten Screens zur Identifikation von *S. epidermidis* 1585hc Mutanten mit veränderter Embp Produktion

Eine zentrale Voraussetzung für die Durchführung eines Screenings auf verminderte Embp-Expression ist eine stabile Expression des untersuchten Phänotyps unter den gewählten Bedingungen. Eine der zu untersuchenden Transposonmutantenbanken basiert auf *S. epidermidis* 1585hc (Heinze 2012). Die Etablierung des Prozederes war unter Verwendung des Wildtypstamms 1585 erfolgt, da ebenfalls Ziel dieser Arbeit war, in 1585wt eine andere Transposonmutantenbank zu erstellen und diese zu screenen. Daher musste die Durchführbarkeit des Dot Blot-Screeningprotokolls auch für den Stamm 1585hc untersucht werden (Abbildung 13).

Es zeigte sich, dass *S. epidermidis* 1585hc, anders als der Wildtyp, in Gegenwart von 50 % Ziegenserum nur geringe Mengen Embp produziert (Abbildung 13). Im daraufhin durchgeführten Basis-Dot Blot Assay, also Kultur DB-Basis aus VK-RGs (Tabelle 1) zeigte sich, dass in Gegenwart von 75 % Ziegenserum die Embp-Produktion induziert wird. Im Vergleich zu dem bei *S. epidermidis* 1585 üblicherweise detektierten Signal in Gegenwart von 50 % Serum oder zu 1585v war die Intensität der Reaktivität jedoch deutlich schwächer (Abbildung 16, vergleiche auch Abbildung 8). Es konnte kein deutlicher Unterschied der Embp- Expression nach 8 oder 24 Stunden Inkubationszeit mit Ziegenserum gefunden werden.

Die nur schwache Embp-Induktion konnte auch nicht durch systematische Variation der Serumkonzentration verändert werden (Abbildung 17). Es wurde basierend auf diesen Ergebnissen geschlussfolgert, dass für das Screening von *S. epidermidis* 1585hc ein alternatives Assay-Format notwendig ist.

3.3.6 Versuchsprotokoll Dot Blot Assay-basierter Screen auf das Vorliegen einer verminderten Embp Induktion durch Ziegenserum

Vorarbeit:

- Große Agarplatten gießen¹
- Für die Positiv- und Negativkontrolle 1585v und 1585-M135 in Einfriermedium resuspendieren
- Auf eine $OD_{600} = 0,1$ einstellen
- Pro Well 100 μ l in eine Greinermikrotiterplatte überführen
- Platte mit Folie verschließen
- Bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ einfrieren

Tag 1:

- Sechs Mikrotiterplatten der Transposonmutantenbank sowie je der Positiv- und Negativkontrolle auftauen
- Inhalt der Nöpfchen resuspendieren
- Bakterienzellen mit Replika-Stempel auf eine ausreichend große BHI_{Erythromycin}-Agar-Platte (Mutantenbank mit pBTn, sonst je Tn-Resistenz) übertragen
- Positiv- und Negativkontrolle mit Replika-Stempel nur auf BHI-Agar-Platte² übertragen
- Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ statisch über Nacht³

Tag 2:

- Für die Vorkultur 400 μ l / Well TSB_{Erythromycin} in sechs Deepwellplatten pipettieren
- Für die Positiv- und Negativkontrolle 400 μ l / Well TSB nur in die Reihen 6 und 7 einer Deepwellplatte pipettieren

¹ Platten nach dem Gießen mit der offenen Agarfläche nach unten für circa 2 - 3 Stunden in einem $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Inkubator trocknen. Bei Trocknen mit der Agarfläche nach oben, bei Raumtemperatur oder über einen längeren Zeitraum kann es zu Kontaminationen kommen.

² Die BHI-Platte der Positiv- und Negativkontrolle kann, bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, für 12 Durchläufe (12 Reihen) benutzt werden, ohne die Kontrollen bei jedem Durchlauf neu auftauen zu müssen.

³ Die beimpften Agarplatten erst mit der Deckelseite nach oben inkubieren, bis die anfangs noch flüssigen Stempelabdrücke angetrocknet sind. Anschließend Platten wenden, da sich nach mehrstündiger Inkubation Kondenswasser unter dem Deckel bildet, welches auf die Agarplatte herunter tropfen kann und die Kolonien ineinander laufen lässt (Abbildung 14 C).

- Kolonien der BHI_{Erythromycin}-Platten von Tag 1 mit Replika-Stempel in die Deepwellplatten übertragen (Stempel etwas auf den Boden der Deepwellplatte klopfen)
- Für die Positiv- und Negativkontrolle je nur eine Reihe des Stempelabdrucks in je eine der Reihen 6 und 7 der Kontroll-Deepwellplatte übertragen
- Inkubation der Deepwellplatten über Nacht bei 300 rpm und 37°C⁴

Tag 3:

- 360 µl / Well TSB_{Erythromycin} in sechs neue Deepwellplatten pipettieren
- 360 µl / Well TSB in Reihen 6 und 7 einer Deepwellplatte für die Positiv- und Negativkontrolle pipettieren
- Je 40 µl / Well aus den Vorkultur-Deepwellplatten in die neuen Deepwellplatten hinzu pipettieren
- Erneut bei 37 °C und 300 rpm⁴ für circa 2,5 - 3 Stunden inkubieren, bis eine OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6⁵ erreicht ist (= VK-96-OD-Platten)
- 90 ml Ziegenserum und 90 ml TSB_{Erythromycin} mischen
- Davon 300 µl / Well in eine weitere Deepwellplatte in Reihe 6 und 7 für die Kontrollen pipettieren
- Davon 300 µl / Well in sechs Deepwellplatten pipettieren (= Kultur-DB-96-Platten)
- 3 ml Ziegenserum und 3 ml TSB mischen
- Aus den VK-96-OD-Deepwellplatten 100 µl / Well in Greinermikrotiterplatten und im gleichen Schritt 5µl / Well in Kultur-DB-96-Deepwellplatten pipettieren
- Die Kultur-DB-96-Deepwellplatten für 8 Stunden bei 37°C bei 300 rpm⁴ inkubieren
- Aus den Greinermikrotiterplatten OD₆₀₀ messen (Wellenlänge = 600 nm, keine Reference, 25 Flashes). Ziel-OD₆₀₀ ist 0,4 – 0,6⁵

⁴ Inkubation wie in Abbildung 11. Die Platten sollten jeweils einzeln auf dem Boden mit Pflasterstreifen fixiert werden, da sie sich sonst bei der dynamischen Inkubation lösen. Die Drehzahl von 300 rpm ist sehr wichtig, siehe Kapitel 3.4.3.

⁵ Bei abweichenden OD₆₀₀-Werten Inkubationszeit von 2,5 – 3 Stunden anpassen, siehe Kapitel 3.4.3.

- Die sechs Kultur-DB-96-Deepwellplatten sowie die Kontroll-Deepwellplatte 10 Minuten bei 3000 rcf, 4 °C zentrifugieren
- Medium verwerfen
- Pellets zwei Mal mit 500 µl PBS-1 % waschen
- 10 Minuten bei 3000 rcf, 4 °C zentrifugieren
- Überstand abkippen
- Pellets mit 30 µl / Well LDS-1x aufnehmen
- In eine PCR-Mikrotiterplatte pipettieren
- Im PCR-Cycler 5 Minuten bei 95 °C erhitzen
- PVDF-Membran in Methanol aktivieren und in PBS-1 % waschen und auf ein angefeuchtetes Filterpapier legen
- Mit der Mehrkanalpipette 5 – 100 µl, Programm Pip, 9 µl der Proteinpräparation aus der PCR-Mikrotiterplatte auf die Membran pipettieren⁶
- Über Nacht mit 3 % Milchpulver, 4 °C auf dem Kipptisch blocken

Tag 4:

- Die Membranen 4 x 8 Minuten mit PBS-1 %-T0,05 %, 200 rpm, Raumtemperatur waschen
- 1 Stunde mit 1.-Antiserum (Rabbit anti-rEmbp6599 Antiserum), 1:10000 in 30 ml PBS-1 % bei 200 rpm, Raumtemperatur inkubieren
- 4 x 8 Minuten mit PBS-1 % - T0,05 % bei 200 rpm, Raumtemperatur waschen
- 1 Stunde mit 2.-Antikörper (Peroxidase-coupled anti-Rabbit IgG), 1:10000 in 30 ml PBS-1 % bei 200 rpm, Raumtemperatur inkubieren
- 4 x 8 Minuten mit PBS-1 %-T0,05 % bei 200 rpm, Raumtemperatur waschen
- Für jede Membran in der Größe einer Mikrotiterplatte insgesamt 1000 µl Western Blotting-Reagenz also jeweils 500 µl der Lösungen 1 und 2 in einem Eppendorftube vorbereiten
- Membranen luftblasenfrei auf eine Folie legen
- 1000 µl Substrat darauf geben und etwas schwenken, bis die Membran sichtbar mit einem Film übergeben ist
- Die Folie luftblasenfrei auf die Membran umschlagen

⁶ Die genauen Pipetteneinstellungen sind wichtig, bei weniger als 9 µl bleibt der Tropfen an den Pipettenspitzen hängen. Für den Vorgang „up“ ist die Geschwindigkeit egal, 8 wurde genommen. Für down ist die Einstellung 4 wichtig, weil die Probe sonst zu sehr rausspritzt und keine runden Dots entstehen.

- Eingeschlagene Membran in Zellstoff legen und das überflüssige Substrat vorsichtig aus der Folie herausstreichen
- 2 Minuten belichten

Anmerkung:

In den Zwischenschritten, in denen abzentrifugierte Pellets entstehen, können diese in der Deepwell- oder PCR-Mikrotiterplatte eingefroren werden, falls eine Unterbrechung des Protokolls notwendig ist. Dies wurde mehrfach getestet. Das Screening kann mit mehreren Durchläufen versetzt durchgeführt werden.

3.4 Biofilmassay-basierter Screen zur Identifikation von *S. epidermidis* 1585hc Transposonmutanten mit einer veränderten Ziegenserum-induzierten Biofilmbildung

3.4.1 Analyse der Serum-induzierten Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 1585hc

Ziegenserum induziert neben der Embp-Produktion auch die *S. epidermidis* Biofilmbildung. Da für das Screening der Transposonmutantenbank in *S. epidermidis* 1585hc (Heinze 2012) das Dot Blot-basierte Verfahren nicht in Frage kommt (siehe Kapitel 3.3.5), wurde als alternativer *read-out* für den Einfluss von Ziegenserum auf *S. epidermidis* 1585hc die Messung der Biofilmbildung gewählt. Zunächst wurde formal die Induktion der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 1585hc geprüft (Abbildung 18).

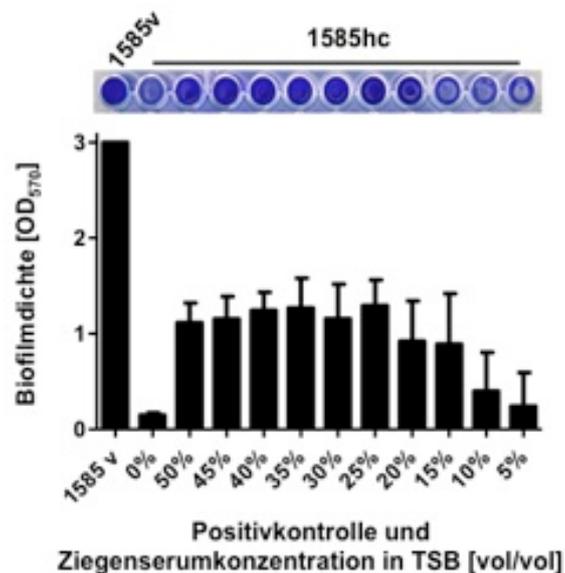


Abbildung 18: Ziegenseruminduzierte Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1585hc. Kultur BFA-Basis aus VK-RG. Das Medium aus der Adhärenzphase (200 µl / Well) wurde in den Näpfchen belassen. Ziegenserumexposition für 16 Stunden. Nach Waschen und Trocknen wurden die angehefteten Zellen mit Gentianaviolett angefärbt. Es zeigt sich eine deutliche Biofilmbildung bei 1585hc im Bereich 20 % - 50 % Ziegenserum sowie bei der Positivkontrolle 1585v. 1585hc ohne Serum ist die Negativkontrolle. N = 24 für jede Säule des Diagramms.

Bei den drei unabhängig voneinander erstellten zur Auswertung heran gezogenen Biofilmassays wurde die Kulturvariante BFA-Basis aus VK-RGs gewählt. Eine

Veränderung bestand darin, das Medium aus der Adhärenzphase (200 µl / Well) nicht zu verwerfen, bevor das Ziegenserum als Verdünnung in TSB hinzu gegeben wurde. Unter diesen Versuchsbedingungen zeigte sich in den Biofilmassays eine überzeugende und reproduzierbare, durch Serum induzierte Biofilmbildung bei 1585hc nach Inkubation mit 20 % - 50 % Serum (Abbildung 18). Somit war die Grundlage gegeben, das Screeningverfahren auf eine Biofilmassay-basierte Variante für 1585hc zu modifizieren.

Bei der Ausreizung des Fassungsvermögens von 400 µl / Well der NunclonΔ-Mikrotiterplatten war der Deckel nach der Inkubation mit Medium benetzt, sodass Kreuzkontaminationen wahrscheinlich wurden. Es wurde daraufhin eine maximale Füllmenge von 385 µl / Well für alle Versuchsschritte festgelegt.

3.4.2 Aufbau eines Biofilm-Screeningassays im 96-Well-Plattenformat

Es wurde angenommen, dass als Vorkultur für den Biofilmassay-basierten Screen die VK-96 aus dem Dot Blot-Protokoll übernommen werden kann. Um diese Annahme zu prüfen sowie die Homogenität des Serum-induzierten Biofilms auf einer vollständigen 96-Well Mikrotiterplatte zu analysieren, sollten in allen Vertiefungen der Biofilmphänotyp von 1585hc in Gegenwart von Serum getestet werden. Um die 385 µl / Well Maximalkulturvolumen zu wahren und sinnvolle Ziegenserumkonzentrationen zu testen (Abbildung 18), wurden 180 µl / Well Medium in NunclonΔ-Mikrotiterplatten für die Adhärenzphase vorgelegt und 5 µl / Well aus einer VK-96-Deepwell-Platte hinzu pipettiert. Nach 6-stündiger statischer Inkubation wurde zu der Kultur 200 µl / Well eines TSB-Ziegenserum-Gemisches hinzugegeben. Eine Hälfte der NunclonΔ-Mikrotiterplatte erhielt 100 µl Serum + 100 µl TSB pro Well, die andere erhielt 150 µl Serum + 50 µl TSB. Die finale Ziegenserum-Konzentration gemessen am gesamten Wellinhalt von nun 385 µl / Well lag somit bei etwa 26 % beziehungsweise 39 %. Grundsätzlich konnte eine Biofilmbildung induziert werden, allerdings wirkte dieser größten Teils rissig. Eine einheitliche verlässliche Biofilmbildung war nicht sichtbar (Abbildung 19). Es gab keinen Unterschied zwischen den beiden Serumkonzentrationen 26 % und 39 %. Dies bestätigten auch die

Extinktionsmessungen des angefärbten Biofilms mit hohen Standardabweichungen. Da im Screen später aber nicht nur Mutanten mit einer aufgehobenen, sondern auch mit einer nur verringerten Biofilmbildung identifiziert werden sollten, müssten die Biofilme aller 96 Wells einer solchen Testplatte bestenfalls identisch sein.

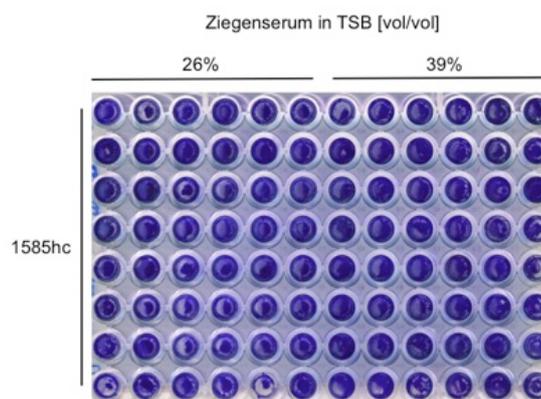


Abbildung 19: Test einer Biofilmassay-basierten Variante des Screens im 96-Well-Format für *S. epidermidis* 1585hc. Getestet wurde ein Biofilmassay nach aus den vom Dot Blot Assay-basierten Screen bekannten Vorkulturbedingungen im 96 Well-Format mit *S. epidermidis* 1585hc. Verglichen wurden die Ziegen血清konzentrationen 26 % (100 µl Serum in 385 µl Kulturvolumen) und 39 % (150 µl Serum in 385 µl Kulturvolumen). Kultur BFA-96 aus VK-96 ausschließlich mit 1585hc. Adhärenzphase 6 Stunden, Medium wurde belassen, Ziegen血清exposition über Nacht. Nach Waschen und Trocknen wurden die angehefteten Zellen mit Gentianaviolett angefärbt. Insgesamt konnte eine Biofilmbildung bei 1585hc durch die Inkubation mit Ziegen血清 induziert werden. Die Biofilme wirken aber uneinheitlich und rissig. Es ergibt sich kein deutlicher Unterschied zwischen den Serumkonzentrationen 26 % und 39 %.

Es wurde angenommen, dass der Grund für die Inhomogenität der Biofilme ein uneinheitliches Zellwachstum der Bakterien in den einzelnen Vertiefungen der VK-96-Deepwellplatte ist. Aus diesem Grund wurde noch einmal ein Biofilmassay der Kulturvariante Kultur-BFA-Basis, allerdings nicht aus VK-RGs, sondern aus VK-RG-ODs erstellt. So wurden die Vorkulturen vor Inokulation der Nunclon-Δ-Mikrotiterplatte auf eine definierte OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt wurden. Die Induktion der Biofilmbildung wurde in Gegenwart von 39 %, 26 % und 13 % Ziegen血清 analysiert (Abbildung 20).

In dem Versuch zeigte sich eine homogene Biofilmbildung nach der Inkubation mit 39 % und 26 % Ziegen血清. Auch die Inkubation mit 13 % Ziegen血清anteil führte erneut zu einer Biofilminduktion, allerdings in abgeschwächter Form. Die Biofilme bei 39 % und 26 % sind makroskopisch deutlich homogener als im Biofilmassay von Abbildung 19. Dies spiegelte sich auch in den Standardabweichungen der Extinktionsmessungen wieder (Abbildung 20). Zwischen den Serumkonzentrationen

39 % und 26 % war nahezu kein Unterschied in der Stärke des Biofilms zu erkennen. Es wurde daraus geschlossen, dass die Einstellung einer definierten Zellzahl auf Basis einer OD₆₀₀-Bestimmung ein notwendiger Schritt für den Biofilmassay-basierten Screen darstellt.

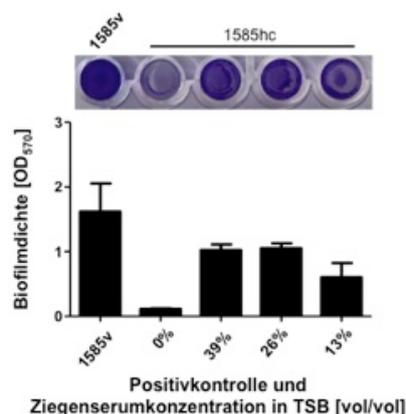


Abbildung 20: Biofilmassay 1585hc mit Ziegenserum nach Vereinheitlichung der Zelldichte. Untersucht wurde, welche Auswirkung die Einstellung einer einheitlichen Zelldichte der Vorkultur anhand der Vereinheitlichung der OD₆₀₀ auf die Gleichmäßigkeit des Biofilms hat. Kultur BFA-Basis aus VK-RG-OD. Kulturvolumina siehe Abbildung 19. Ziegenserumexposition über Nacht. Nach Waschen und Trocknen wurden die angehefteten Zellen mit Gentianaviolett angefärbt. Es sind homogen angefärbte Biofilme nach der Inkubation mit 39 % und 26 % zu sehen, die in den Extinktionsmessungen nahezu keine Standardabweichung aufweisen. 1585v ist die Positivkontrolle, 1585wt ohne Serum ist die Negativkontrolle. N = 8 für jede Säule des Diagramms.

3.4.3 Optimierte Vorkultur zur Erzielung von homogenen Bakterienzellzahlen in 96-Well Deepwellplatten (VK-96-OD)

Ziel der in diesem Abschnitt geschilderten Untersuchungen war es, die Anzuchtbedingungen im 96-Well-Plattenformat so zu optimieren, dass tatsächlich in allen Vertiefungen vergleichbare Zellmengen vorliegen. Dies sollte dadurch erreicht werden, dass ein Kulturschritt in einer Deepwellplatte vor die Inokulation der Biofilmplatte vorgeschaltet wird.

Aus einer VK-96 wurde eine 1:100 in eine neue Deepwellplatte mit 400 µl / Well frischem TSB verdünnt. Zu diesem Zeitpunkt lag die OD₆₀₀ bei etwa 0,1. Im Laufe der nun folgenden dynamischen Inkubation (180 rpm, 37 °C wie in den Vorversuchen) kam es zu einem Anstieg der OD₆₀₀. Abbildung 21 zeigt exemplarisch das Phänomen, dass nur an den äußeren Wells der Deepwellplatten das Zellwachstum die angestrebte

OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 erreichte. Die Vertiefungen in der Mitte der Platte (zum Beispiel E6) wiesen nur eine geringe OD₆₀₀ auf (OD₆₀₀ in E6 = 0,06). Makroskopisch war in den mittleren Wells der Platte eine Pelletbildung zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

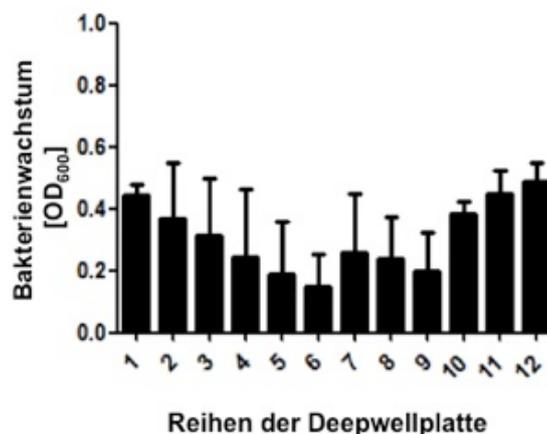


Abbildung 21: Zellwachstum in 96-Deepwellplatten-Kulturen. Dargestellt ist das Bakterienwachstum einer VK-96 von *S. epidermidis* 1585hc nach einer weiteren 3,5-stündigen Inkubation bei 180 rpm und 37 °C mittels OD₆₀₀-Messung. Nach Kultur Übertragung von 100 µl / Well aus der Deepwellplatte in eine 96-Well-Greiner-Mikrotiterplatte und Extinktionsmessung im Photometer. Das Diagramm zeigt stark voneinander abweichende Messungen mit hohen Standardabweichungen. Auffällig sind hohe OD₆₀₀-Werte in den äußeren Reihen der 96-Well-Platten (Reihen 1 und 12) und nach innen hin abnehmende Werte mit immer größer werdenden Standardabweichungen. N = 8 für jede Säule des Diagramms.

Als Ursache für dieses Phänomen wurde angenommen, dass die Drehzahl der dynamischen Inkubation nicht ausreichte, um in den mittig liegenden Wells ausreichend Bewegung des Flüssigmediums zu erzeugen. Daher wurde die Drehzahl bei der dynamischen Inkubation in mehreren Versuchen sukzessive gesteigert. Darüber hinaus wurde für den OD₆₀₀-Ansatz nun mit einer 1:10- statt einer 1:100-Verdünnung aus der Vorkultur, also 360 µl Frischmedium + 40 µl aus der Vorkultur, gearbeitet.

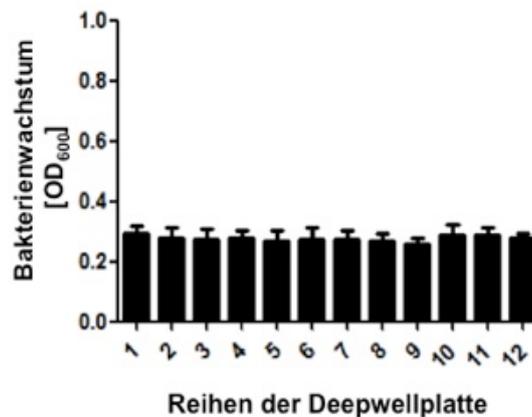


Abbildung 22: Zellwachstum in 96-Deepwellplatten-Kulturen nach angepasster Drehzahl (VK-96-OD). Dargestellt ist das Bakterienwachstum einer nun als „VK-96-OD“ bezeichneten Vorkultur von *S. epidermidis* 1585hc mittels OD₆₀₀-Messungen nach einer 1,5-stündigen Inkubation bei nun 300 rpm und 37 °C. Nach Kultur Übertragung von 100 µl / Well aus der Deepwellplatte in eine 96-Well-Greiner-Mikrotiterplatte und Extinktionsmessung im Photometer. Das Diagramm zeigt einheitliche Messwerte mit sehr geringen Standardabweichungen aus allen Vertiefungen der 96-Well-Platte. N = 8 für jede Säule des Diagramms.

Abbildung 22 zeigt, dass die dynamische Inkubation bei 300 rpm ein einheitliches Zellwachstum der 1:10-Verdünnung aus der Vorkultur ermöglicht. Nach 1/1/2 – stündiger Inkubation dieses Ansatzes wurde über alle Wells hinweg eine OD₆₀₀ ≈ 0,3 mit geringer Standardabweichung gemessen. Makroskopisch war keine Pelletbildung mehr zu sehen (Daten nicht gezeigt). Es wurde daraufhin festgelegt, dass der Ansatz im Screen 2,5 - 3 Stunden bei 300 rpm inkubiert werden sollte, um eine OD₆₀₀ ≈ 0,4 - 0,6 einheitlich zu erhalten. Anschließend wird aus dieser VK-96-OD-Deepwellplatte unverdünnt die für die Adhärenzphase gewünschte Menge Bakterien-TSB-Suspension in die Mikrotiterplatten pipettiert.

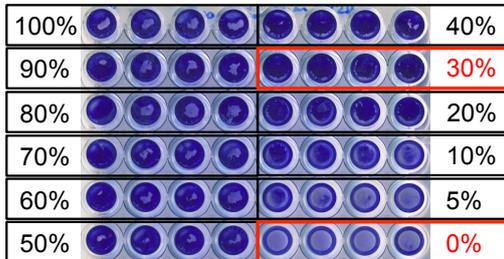
3.4.4 Feineinstellung des Biofilmassay-basierten Screeningverfahrens

In den nun folgenden Untersuchungen sollte die genaue Serumkonzentration zur Biofilminduktion und damit einhergehend die genauen Füllvolumina der Mikrotiterplattennäpfcchen beim Biofilmassay abschließend festgelegt werden. Ziel war es vor allem, die Menge des einzusetzenden Ziegenserums zu minimieren und nach Möglichkeit das experimentelle Prozedere zu vereinfachen.

A Adhärenzphasenkulturvolumen
180 µl / Well

Ziegenserumanteile in Prozent am
Adhärenzphasenkulturvolumen

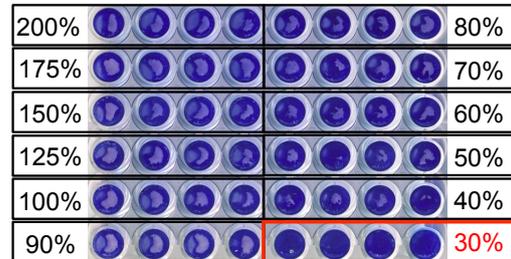
1585hc in allen Wells



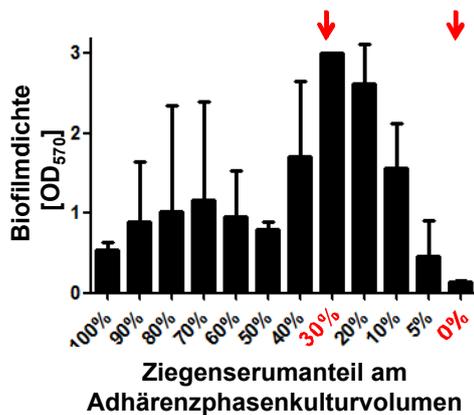
C Adhärenzphasenkulturvolumen
100 µl / Well

Ziegenserumanteile in Prozent am
Adhärenzphasenkulturvolumen

1585hc in allen Wells



B



D

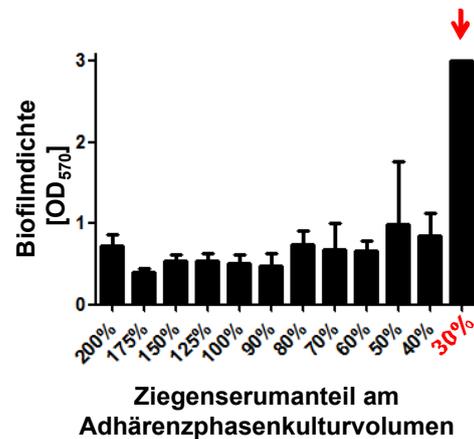


Abbildung 23: Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1585hc nach VK-96-OD in Gegenwart unterschiedlicher Ziegenserumkonzentrationen und Kulturvolumina. Untersucht wurde, welche minimale Ziegenserumkonzentration in Kombination mit dem minimalen Kulturvolumen bei *S. epidermidis* 1585hc zu einer einheitlichen Biofilmbildung im 96-Well-Format führt. Dargestellt ist ein Biofilmassay in einer NunclonΔ-Mikrotiterplatte, deren eine Hälfte in (A) und die andere in (C) zu sehen ist. Gemessen anhand des Kulturvolumens der Adhärenzphase wurden 180 µl / Well (A und B) mit 100 µl / Well (B und C) TSB verglichen. Kultur BFA-96 aus VK-96-OD ausschließlich mit 1585hc, OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6. Adhärenzphase 9 Stunden, Medium wurde belassen, Ziegenserumexposition 17 Stunden. Nach Waschen und Trocknen wurden die angehefteten Zellen mit Gentianaviolett angefärbt (A) Es ist eine gleichmäßige Biofilmbildung bei 30 % Ziegenserum (54 µl Ziegenserum zu 180 µl TSB) und keine Biofilmbildung bei 0 % Ziegenserum zu sehen. Bei allen anderen Ziegenserumkonzentrationen findet Biofilmbildung unterschiedlicher Intensität statt. Dieser wirkt aber instabiler und rissiger als bei 30 %. (B) Photometrische Messung der Biofilmdichte von (A), welche den makroskopischen Eindruck einer homogenen Biofilmbildung nur bei 30 % Ziegenserum mit Messwerten von OD₆₀₀ = 3,0 (N = 4 für jede Säule) ohne Standardabweichung bestätigt. (C) Es ist eine gleichmäßige Biofilmbildung wieder nur bei 30 % Ziegenserum (30 µl Ziegenserum zu 100 µl TSB) zu sehen. Die Biofilmbildung in allen anderen Nöpfchen wie in (A). (D) Photometrische Messung der Biofilmdichte von (C), welche auch hier den makroskopischen Eindruck einer homogenen Biofilmbildung nur bei 30 % Ziegenserum mit Messwerten von OD₆₀₀ = 3,0 (N = 4 für jede Säule) ohne Standardabweichung bestätigt.

Um die Menge des Ziegenserums zu reduzieren sollte im ersten Schritt des Biofilmassays (Adhärenzphase) deutlich weniger TSB genutzt werden und das Serum

unverdünnt hinzugeben werden. Gleichzeitig sollte nochmals die geringste Biofilm-induzierende Serumkonzentration in diesem spezifischen experimentellen Setting bestimmt werden (Abbildung 23). Es zeigte sich, dass sowohl bei 180 μ l (Abbildung 23 A und B) wie auch 100 μ l (Abbildung 23 C und D) Adhärenzphasenkulturvolumen bei einer Ziegen Serumkonzentration von 30 %* eine starke und homogene Biofilmbildung induziert werden konnte. Auch bei 20 %* - 80 %* Serumkonzentration kam es zur Induktion der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 1585hc, aber nicht in der überzeugenden Gleichförmigkeit und Intensität der 30 %*. In Abwesenheit von Serum bildete sich kein Biofilm.

Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass für den Screeningversuch die Kultur von 1585hc in 100 μ l / Well TSB + 30 μ l / Well Ziegen Serum erfolgen sollte. Es sollte geprüft werden, ob es unter diesen Kulturbedingungen nach einer VK-96-OD auch in allen Vertiefungen einer 96-Well Nunclon Δ -Mikrotiterplatte verlässlich zu einer homogenen Biofilmbildung kommt. Tatsächlich zeigte sich eine einheitliche stabile Biofilmbildung in allen Nöpfchen mit geringer Standardabweichung in den Messungen der angefärbten Biofilme (Abbildung 24).

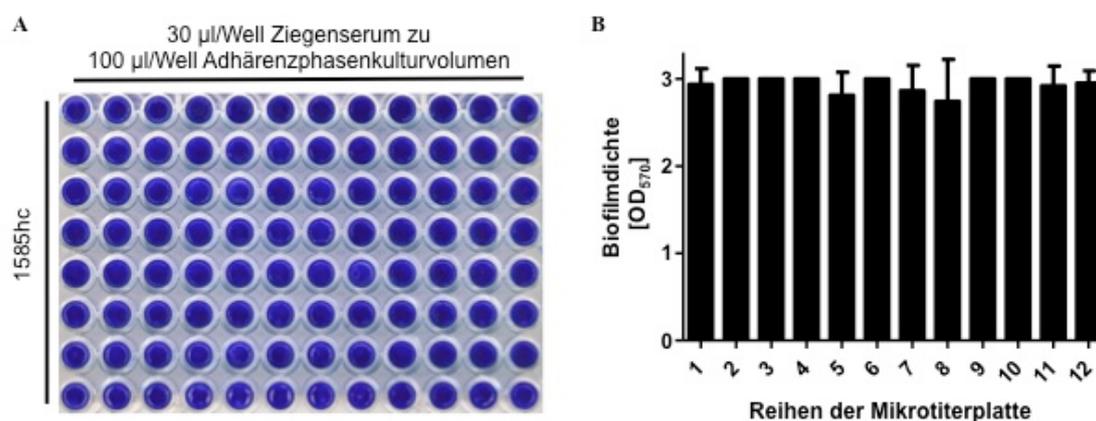


Abbildung 24: Biofilmassay unter Screeningbedingungen im 96-Well-Format mit *S. epidermidis* 1585hc. Kultur BFA-96 aus VK-96-OD, ausschließlich mit 1585hc, OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6. Kulturvolumen in der Adhärenzphase 100 μ l / Well, Hinzugabe von 30 μ l / Well Ziegen Serum. Adhärenzphase 5,5 Stunden, Medium wurde belassen, Ziegen Serumexposition 19 Stunden. Nach Waschen und Trocknen wurden die angehefteten Zellen mit Gentianaviolett angefärbt. (A) Es zeigt sich eine durchweg einheitliche Biofilmbildung in allen Wells der Mikrotiterplatte. (B) Die Extinktionsmessungen bestätigen den makroskopischen Eindruck aus (A) mit insgesamt sehr niedrigen oder nicht vorhandenen Standardabweichungen. N = 8 für jede Säule.

* Serumkonzentration im Gegensatz zu den Vorversuchen hier als Anteil gemessen am Adhärenzphasenkulturvolumen angegeben. Auf den gesamten Wellinhalt bezogen bedeuten die 30 % in beiden Fällen etwa 23 % (Abbildung 23 A und B: 54 μ l Serum von 234 μ l TSB, Abbildung 23 C und D: 30 μ l von 130 μ l gesamten Kulturvolumen)

Diese Kulturbedingungen wurden daher als Basis für den Biofilmassay-basierten Screen der Transposonmutantenbank festgelegt. Auch in diesem Screen ist eine parallele Verarbeitung von sechs 96-Well Mikrotiterplatten und damit 576 Mutanten pro Versuchsdurchlauf möglich. Ebenfalls können mehrere Versuchsdurchläufe versetzt nebeneinander laufen.

3.4.5 Versuchsprotokoll Biofilmassay-basierter Screen auf das Vorliegen einer verminderten Biofilmbildung durch Ziegenserum

Vorarbeit:

- Große Agarplatten gießen¹
- Für die Positiv- und Negativkontrolle 1585v und 1585-M135 in Einfriermedium resuspendieren
- Auf eine OD₆₀₀ = 0,1 einstellen
- Pro Well 100 µl in eine Greinermikrotiterplatte überführen
- Platte mit Folie verschließen
- Bei -80 °C einfrieren.

Tag 1:

- Sechs Mikrotiterplatten der Transposonmutantenbank sowie je der Positiv- und Negativkontrolle auftauen
- Inhalt der Nöpfchen resuspendieren
- Bakterienzellen mit Replika-Stempel auf eine ausreichend große BHI_{Erythromycin}-Agar-Platte² (Mutantenbank mit Tn917, sonst je Tn-Resistenz) übertragen
- Positiv- und Negativkontrolle mit Replika-Stempel nur auf BHI-Agar-Platte^{2,3} übertragen

¹ Platten nach dem Gießen mit der offenen Agarfläche nach unten für circa 2 - 3 Stunden in einem 30 °C-Inkubator trocknen. Bei Trocknen mit der Agarfläche nach oben, bei Raumtemperatur oder über einen längeren Zeitraum kann es zu Kontaminationen kommen.

² Die BHI-Platte der Positiv- und Negativkontrolle kann, bei 4 °C gelagert, für 12 Durchläufe (12 Reihen) benutzt werden, ohne die Kontrollen bei jedem Durchlauf neu auftauen zu müssen.

³ Die beimpften Agarplatten erst mit der Deckelseite nach oben inkubieren, bis die anfangs noch flüssigen Stempelabdrücke angetrocknet sind. Anschließend Platten wenden, da sich nach mehrstündiger Inkubation Kondenswasser unter dem Deckel bildet, welches auf die Agarplatte herunter tropfen kann und die Kolonien ineinander laufen lässt (Abbildung 14 C).

- Inkubation bei 37 °C statisch über Nacht³

Tag 2:

- Für die Vorkultur 400 µl / Well TSB_{Erythromycin} in sechs Deepwellplatten pipettieren
- Für die Positiv- und Negativkontrolle 400 µl / Well TSB nur in die Reihen 6 und 7 einer Deepwellplatte pipettieren
- Kolonien der BHI_{Erythromycin}-Platten von Tag 1 mit Replika-Stempel in die Deepwellplatten übertragen (Stempel etwas auf den Boden der Deepwellplatte klopfen)
- Für die Positiv- und Negativkontrolle je nur eine Reihe des Stempelabdrucks in je eine der Reihen 6 und 7 der Kontroll-Deepwellplatte übertragen
- Inkubation der Deepwellplatten über Nacht bei 300 rpm und 37 °C⁴

Tag 3:

- 360 µl / Well TSB_{Erythromycin} in sechs neue Deepwellplatten pipettieren
- 360 µl / Well TSB in Reihen 6 und 7 einer Deepwellplatte für die Positiv- und Negativkontrolle pipettieren
- Je 40 µl / Well aus den Vorkultur-Deepwellplatten in die neuen Deepwellplatten hinzu pipettieren
- Erneut bei 37 °C und 300 rpm dynamisch für circa 2,5 - 3 Stunden inkubieren, bis eine OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6⁵ erreicht ist (VK-96-OD-Platten)
- Aus den VK-96-OD-Deepwellplatten 100 µl / Well in NunclonΔ96-Mikrotiterplatten pipettieren
- Im gleichen Schritt weitere 100 µl / Well in Greinermikrotiterplatten pipettieren
- NunclonΔ96-Platten 6 Stunden bei 37 °C statisch inkubieren
- Aus den Greinermikrotiterplatten OD₆₀₀ messen (Wellenlänge = 600 nm, keine Reference, 25 Flashes). Ziel-OD₆₀₀ ist 0,4 – 0,6⁵

⁴ Inkubation wie in Abbildung 11. Die Platten sollten jeweils einzeln auf dem Boden mit Pflasterstreifen fixiert werden, da sie sich sonst bei der dynamischen Inkubation lösen. Die Drehzahl von 300 rpm ist sehr wichtig, siehe Kapitel 3.4.3.

⁵ Bei abweichenden OD₆₀₀-Werten Inkubationszeit von 2,5 – 3 Stunden anpassen, siehe Kapitel 3.4.3.

- Nebenher ab jetzt Ziegenserum bei 4 °C langsam auftauen lassen
- Nach der 6-stündigen Inkubationszeit 30 µl / Well Ziegenserum in die NunclonΔ96-Platten pipettieren
- 14 Stunden statisch bei 37 °C inkubieren

Tag 4:

- Kulturvolumina aus den NunclonΔ-Mikrotiterplatten abkippen
- Zweimal mit jeweils 150 µl / Well PBS-1 % spülen, jeweils abkippen und auf einem Tuch etwas ausschlagen
- Trocknen lassen
- Für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Gentianaviolett anfärben
- Unter dem Wasserhahn auswaschen und erneut trocknen lassen
- Im Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm, 25 Flashes messen
- Die Auswertung erfolgt über die Software GraphPad Prism5 per Säulendiagramm mit Standardabweichung

Anmerkung:

Das Screening kann versetzt mit mehreren Durchläufen durchgeführt werden.

3.4.6 Ergebnis nach Durchführung des Screens

Die Transposonmutantenbank in *S. epidermidis* 1585hc (Heinze 2012) wurde mit dem Biofilmassay-basierten Screen auf Transposonmutanten mit veränderter Biofilmbildung gescreent. Von den circa 4100 Transposonmutanten konnten 5 mit gewünschtem Phänotyp identifiziert werden. Diese wurden in einer weiteren Dissertation auf die Lokalisation der Transposoninsertionen untersucht (Wiechmann 2016).

3.5 Untersuchung zur Tigecyclin-induzierten Biofilmbiofilmbildung

3.5.1 Embp- und Biofilminduktion durch Tigecyclin bei 1585wt

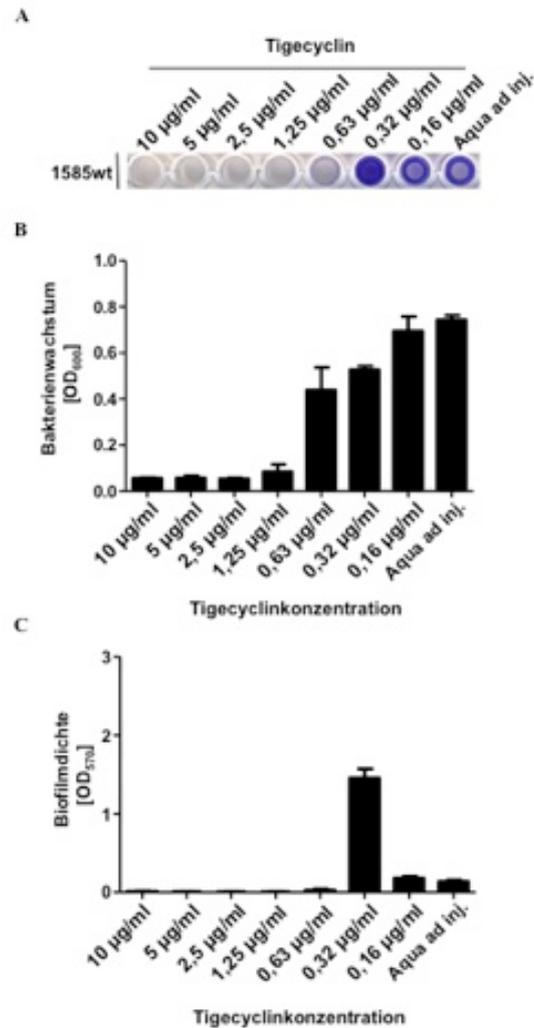


Abbildung 25: Tigecyclin-induzierte Biofilmbiofilmbildung von *S. epidermidis* 1585wt. Darstellung eines Biofilmassays in Nöpfchen einer Nunclon Δ -Mikrotiterplatte in Korrelation mit der subinhibitorischen Tigecyclinkonzentration. Kultur BFA-Basis aus VK-RG mit *S. epidermidis* 1585wt. Anschließend Waschen, Trocknen und Anfärben der angehefteten Zellen mit Gentianaviolett. (A) Es ist eine deutliche Biofilmbildung bei 0,32 µl / ml Tigecyclin zu erkennen. (B) Das Zellwachstum sinkt mit Zunahme der Tigecyclinkonzentration im Nährmedium. Dabei haben 0,16 µg / ml kaum einen Einfluss. 0,32 µg / ml und 0,63 µg / ml bilden den subinhibitorischen Bereich ab. Gänzlich inhibiert ist das Zellwachstum ab 2,5 µg / ml. N = 8 für jede Säule (C) Die photometrische Messung bestätigt den makroskopischen Eindruck von (A), dass die Biofilmbildung nur bei einer Tigecyclinkonzentration von 0,32 µg / ml statt gefunden hat. N = 8 für jede Säule.

Zusammen mit Weiser et al. 2016 konnte gezeigt werden, dass es bei *S. epidermidis* 1585 durch Tigecyclin zu einer Induktion der Embp-Expression und Biofilmbildung kommt. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend sollte in Nebenversuchen ein Screeningansatz validiert werden, mit dem es möglich sein sollte, genetische

Determinanten der Tigecyclin-vermittelten Embp Induktion und Biofilmbildung zu identifizieren.

Zu diesem Zweck wurde ein Biofilmassay mit der Kulturvariante BFA-Basis aus VK-RGs erstellt. Es zeigte sich, dass es bei der Kultur des Stamms 1585 in TSB zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der Biofilmbildung kam. Das Maximum der Biofilmausprägung fand sich bei einer Tigecyclinkonzentration von 0,32 µg/ml (Abbildung 25 A und C). Parallel wurde auch das bakterielle Wachstum durch Ermittlung der OD₆₀₀ charakterisiert. Hier zeigte sich, dass Tigecyclin bis zu einer Konzentration von 1,25 µg / ml das Wachstum von *S. epidermidis* 1585 hemmt. Bei niedrigeren Konzentrationen ist Wachstum nachweisbar, welches bei einer Konzentration von 0,16 µg / ml in etwa dem der Kultur ohne Tigecyclin entspricht. Somit ergibt sich ein Zusammenhang zwischen dem Wachstum in Gegenwart sub-inhibitorischer Tigecyclinkonzentrationen und der Induktion eines Biofilm-positiven Phänotyps bei *S. epidermidis* 1585.

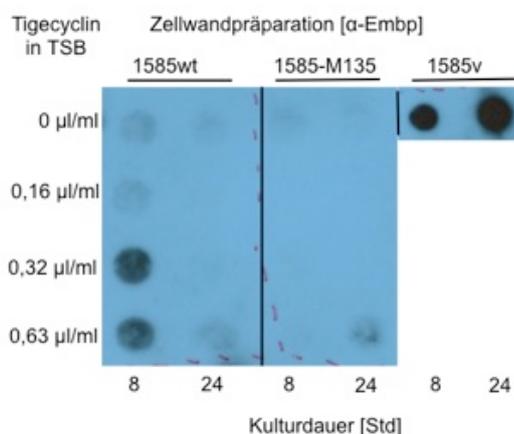


Abbildung 26: Tigecyclin-induzierte Embp Produktion von *S. epidermidis* 1585wt. Untersuchung der Embp Produktion nach Anzucht mit 0,0 µg / ml, 0,16 µg / ml, 0,32 µg / ml und 0,63 µg / ml Tigecyclin in TSB mittels Dot Blot Assay. Kultur DB-Basis aus VK-RGs. Probengewinnung nach 8 und 24 Stunden. Nach OD₆₀₀-Einstellung Zentrifugation. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in LDS-Puffer aufgenommen und aufgeköcht. Von jeder Probe wurden 10 µl auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Die Embp-Detektion erfolgte durch Inkubation mit anti-rEmbp6559 (1:10000), sowie einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen IgG (1:10000). Belichtungszeit 5 Minuten. Es ist ein positiver Embp-Nachweis bei 1585v nach 8- und 24-stündiger Inkubation ohne Tigecyclin sowie bei 1585wt nach 8-stündiger Inkubation mit je 0,63 µg / ml und 0,32 µg / ml Tigecyclin zu sehen. 1585v ist die Positivkontrolle, 1585wt ohne Tigecyclin und 1585-M135 (Mutante mit Embp-Defekt) mit und ohne Tigecyclin sind Negativkontrollen.

Um zu überprüfen, ob die Biofilmbildung bei 0,32 µg / ml Tigecyclin auch mit einer induzierten Embp-Expression korreliert, wurde ein Dot Blot Assay mit der

Kulturvariante DB-Basis aus VK-RGs erstellt (Abbildung 26). Auf dem Dot Blot bildet sich bei den Oberflächenproteinpräparationen des Stamms 1585 nach 8 stündiger Kultur in Gegenwart von 0,63 $\mu\text{g} / \text{ml}$ sowie 0,32 $\mu\text{g} / \text{ml}$ eine deutlich positive Chemolumineszenzreaktion ab. Da dieses Signal bei der isogenen Mutante 1585-M135 nicht nachweisbar war, spricht dies für eine Embp-Induktion durch Tigecyclin im getesteten Konzentrationsbereich.

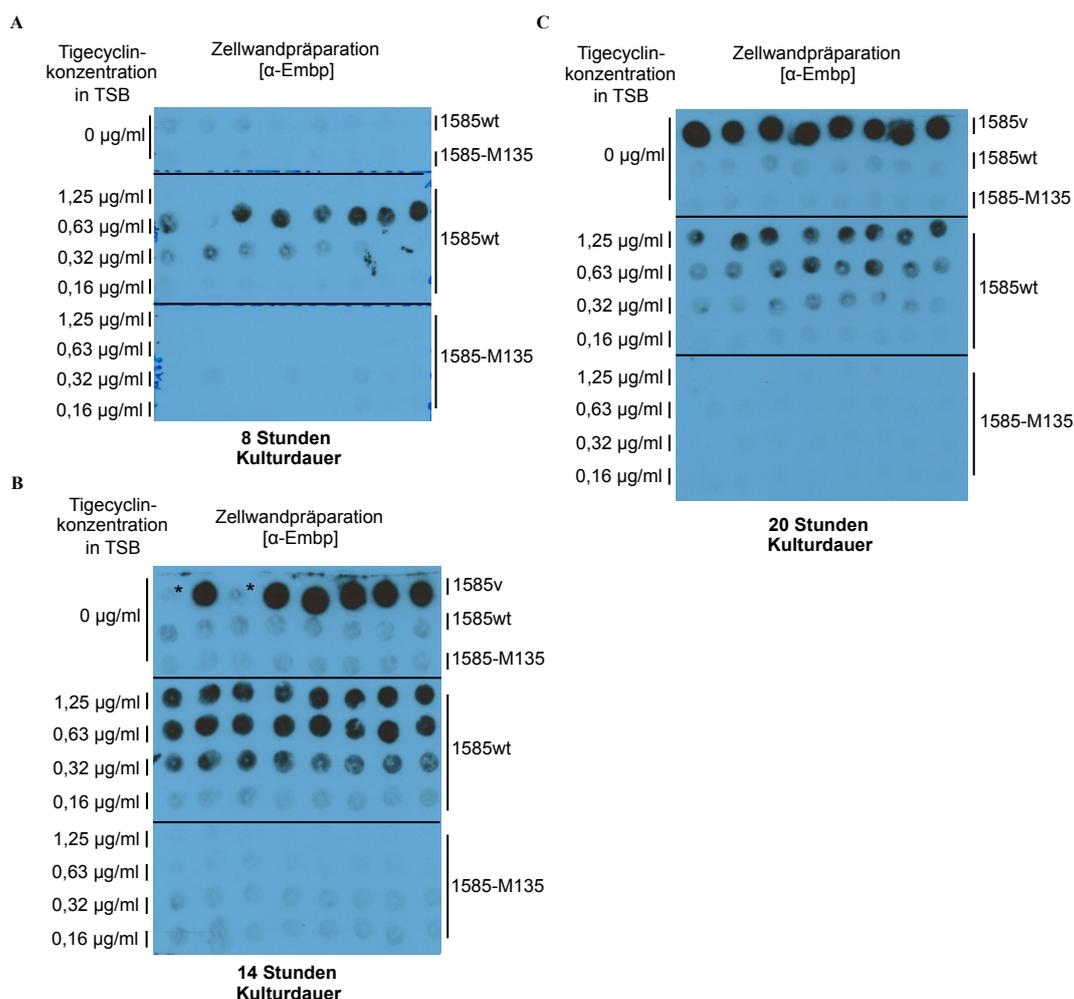


Abbildung 27: Test für eine Screenvariante basierend auf einem Tigecyclin integrierenden Dot Blot Assay. Versuchsaufbau analog zum Versuch aus Abbildung 12. Kultur DB-96-Test mit dem Inokulationsmuster von Abbildung 9 (Tigecyclin statt Serum) und dynamischer Inkubation unterschiedlicher Dauer bei 180 rpm und 37 °C wie in Abbildung 11. Anschließend wurden die Platten zentrifugiert, die Überstände verworfen, die Pellets in LDS-Puffer aufgenommen und aufgeköcht. Aus jedem Well wurden 9 μl auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Die Embp-Detektion erfolgte durch Inkubation mit anti-rEmbp6559 (1:10000) sowie einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen IgG (1:10000). Belichtungszeiten siehe (A), (B), (C). **(A)** Es ist ein positiver Embp Nachweis bei *S. epidermidis* 1585wt nach 8-stündiger Exposition mit 0,63 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Tigecyclin zu sehen. Belichtungszeit 10 Minuten. Embp-Nachweis der Positivkontrolle 1585v siehe (B) und (C). **(B)** Es ist ein positiver Embp Nachweis bei 1585wt nach 14-stündiger Exposition mit 1,25 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 0,63 $\mu\text{g} / \text{ml}$ und 0,32 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Tigecyclin sowie bei der Positivkontrolle 1585v zu sehen. Belichtungszeit 5 Minuten. * Markiert pipettierbedingte Ausfälle der Positivkontrolle. **(C)** Es ist ein positiver Embp Nachweis bei 1585wt mit 1,25 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 0,63 $\mu\text{g} / \text{ml}$ und angedeutet bei 0,32 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Tigecyclin sowie bei der Positivkontrolle zu sehen.

Mit dem Ziel, analog zu dem Dot-Blot-basierten Screeningverfahren für 1585wt in Gegenwart von Ziegenserum eine Variante des Screens für die Identifikation von Transposonmutanten mit einer veränderten Tigecyclin-induzierten Embp-Produktion zu entwickeln, wurden Versuche im 96-Well-Format durchgeführt. Es wurde die Inkubation von 1585wt mit Tigecyclin in 96-Deepwellplatten mit demselben Versuchsaufbau wie aus Abbildung 12 (Ziegenserum) getestet. Hierzu wurden Dot Blot Assays mit DB-96-Test-Kulturen aus VK-RGs erstellt (Abbildung 27). Getestet wurden 1,25 µg / ml, 0,63 µg / ml, 0,32 µg / ml, 0,16 µg / ml und 0,0 µg / ml Tigecyclin nach 8, 14 und 20 Stunden Wachstum. Nach 8-stündiger Inkubation konnte Embp in Gegenwart von 0,63 µg / ml Tigecyclinkonzentration detektiert werden. Nach 14 h und 20 h war dies in Gegenwart von 1,25 µg / ml, 0,63 µg / ml und 0,32 µg / ml möglich (Abbildung 27).

Aus diesen Versuchen zusammen mit den Erfahrungen aus der Entwicklung der anderen beiden Screeningmethoden (Dot Blot Assay-basiert für 1585wt und Biofilmassay-basiert für 1585hc) kann ein Versuchsprotokoll für einen Dot Blot-basierten Screen zur Identifikation von *S. epidermidis* 1585wt-Transposonmutanten mit einer veränderten Embp-Produktion nach Induktion durch das Antibiotikum Tigecyclin abgeleitet werden.

3.5.2 Versuchsprotokoll Dot Blot-basierter Screen zur Identifikation von *S. epidermidis* 1585wt Transposonmutanten mit einer veränderten Tigecyclin-induzierten Embp Produktion

Vorarbeit:

- Große Agarplatten gießen¹
- Für die Positiv- und Negativkontrolle 1585v und 1585-M135 in Einfriermedium resuspendieren
- Auf eine OD₆₀₀ = 0,1 einstellen
- Pro Well 100 µl in eine Greinermikrotiterplatte überführen

¹ Platten nach dem Gießen mit der offenen Agarfläche nach unten für circa 2 - 3 Stunden in einem 30 °C-Inkubator trocknen. Bei Trocknen mit der Agarfläche nach oben, bei Raumtemperatur oder über einen längeren Zeitraum kann es zu Kontaminationen kommen.

- Platte mit Folie verschließen
- Bei -80 °C einfrieren

Tag 1:

- Sechs Mikrotiterplatten der Transposonmutantenbank sowie je der Positiv- und Negativkontrolle auftauen
- Inhalt der Nöpfchen resuspendieren
- Bakterienzellen mit Replika-Stempel auf eine ausreichend große BHI_{Erythromycin}-Agar-Platte (Mutantenbank mit pBTn, sonst je Tn-Resistenz) übertragen
- Positiv- und Negativkontrolle mit Replika-Stempel nur auf BHI-Agar-Platte² übertragen
- Inkubation bei 37 °C statisch über Nacht³

Tag 2:

- Für die Vorkultur 400 µl / Well TSB_{Erythromycin} in sechs Deepwellplatten pipettieren
- Für die Positiv- und Negativkontrolle 400 µl / Well TSB nur in die Reihen 6 und 7 einer Deepwellplatte pipettieren
- Kolonien der BHI_{Erythromycin}-Platten von Tag 1 mit Replika-Stempel in die Deepwellplatten übertragen (Stempel etwas auf den Boden der Deepwellplatte klopfen)
- Für die Positiv- und Negativkontrolle je nur eine Reihe des Stempelabdrucks in je eine der Reihen 6 und 7 der Kontroll-Deepwellplatte übertragen
- Inkubation der Deepwellplatten über Nacht bei 37°C bei 300 rpm und 37 °C⁴

Tag 3:

- 360 µl / Well TSB_{Erythromycin} in sechs neue Deepwellplatten pipettieren
- 360 µl / Well TSB in Reihen 6 und 7 einer Deepwellplatte für die Positiv- und Negativkontrolle pipettieren

³ Die BHI-Platte der Positiv- und Negativkontrolle kann, bei 4 °C gelagert, für 12 Durchläufe (12 Reihen) benutzt werden, ohne die Kontrollen bei jedem Durchlauf neu auftauen zu müssen.

² Die beimpften Agarplatten erst mit der Deckelseite nach oben inkubieren, bis die anfangs noch flüssigen Stempelabdrücke angetrocknet sind. Anschließend Platten wenden, da sich nach mehrstündiger Inkubation Kondenswasser unter dem Deckel bildet, welches auf die Agarplatte herunter tropfen kann und die Kolonien ineinander laufen lässt (Abbildung 14 C).

⁴ Inkubation wie in Abbildung 11. Die Platten sollten jeweils einzeln auf dem Boden mit Pflasterstreifen fixiert werden, da sie sich sonst bei der dynamischen Inkubation lösen. Die Drehzahl von 300 rpm ist sehr wichtig, siehe Kapitel 3.4.3.

- Je 40 μl / Well aus den Vorkultur-Deepwellplatten in die neuen Deepwellplatten hinzu pipettieren
- Erneut bei 37 °C und 300 rpm⁴ für circa 2,5 - 3 Stunden inkubieren, bis eine OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6 erreicht ist (= VK-96-OD-Platten)
- 180 ml TSB_{Erythromycin} mit einer Tigecyclinkonzentration von 0,63 μg / ml⁵ versetzen⁶
- Davon 300 μl / Well in sechs Deepwellplatten pipettieren (= Kultur-DB-96-Platten)⁶
- 6 ml TSB mit einer Tigecyclinkonzentration von 0,63 μg / ml versetzen⁵
- Davon 300 μl / Well in eine weitere Deepwellplatte in Reihe 6 und 7 für die Kontrollen pipettieren⁶
- Aus den VK-96-OD-Deepwellplatten 100 μl / Well in Greinermikrotiterplatten und im gleichen Schritt 5 μl / Well in die Kultur-DB-96-Deepwellplatten pipettieren
- Die Kultur-DB-96-Deepwellplatten für 14 Stunden bei 300 rpm und 37 °C inkubieren⁶
- Aus den Greinermikrotiterplatten OD₆₀₀ messen (Wellenlänge = 600 nm, keine Reference, 25 Flashes). Ziel-OD₆₀₀ ist 0,4 – 0,6⁷
- Die sechs Kultur-DB-96-Deepwellplatten sowie die Kontroll-Deepwellplatte 10 Minuten bei 3000 rcf, 4 °C zentrifugieren
- Medium verwerfen
- Pellets zwei Mal mit 500 μl PBS-1 % waschen
- 10 Minuten bei 3000 rcf, 4 °C zentrifugieren
- Überstand abkippen
- Pellets mit 30 μl / Well LDS-1x aufnehmen
- In eine PCR-Mikrotiterplatte pipettieren
- Im PCR-Cycler 5 Minuten bei 95 °C erhitzen

⁵ Entspricht dem Ergebnis aus (Abbildung 27 B) es erfolgten aber keine weiteren Tests. Die Inkubationszeit muss gegebenenfalls noch variiert werden.

⁶ Schritt nicht experimentell validiert, sondern abgeleitet.

⁷ Bei abweichenden OD₆₀₀-Werten Inkubationszeit von 2,5 – 3 Stunden anpassen, siehe Kapitel 3.4.3. Gegebenenfalls müsste für den Tigecyclinscreen analog zu Kapitel 3.4.3 untersucht werden, ob auch hier eine OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6 gut geeignet ist und die Inkubationszeit für die OD₆₀₀ – Einstellung eventuell variiert werden.

- PVDF-Membran in Methanol aktivieren und in PBS-1 % waschen und auf ein angefeuchtetes Filterpapier legen
- Mit der Mehrkanalpipette „5 – 100 µl“, Programm „Pip“, 9 µl der Proteinpräparation aus der PCR-Mikrotiterplatte auf die Membran pipettieren.⁸
- Über Nacht mit 3 % Milchpulver, 4 °C auf dem Kipptisch blocken

Tag 4:

- Die Membranen 4 x 8 Minuten mit PBS-1 %-T0,05 %, 200 rpm, Raumtemperatur waschen
- 1 Stunde mit 1.-Antiserum (Rabbit anti-rEmbp6599 Antiserum), 1:10000 in 30 ml PBS-1 % bei 200 rpm, Raumtemperatur inkubieren
- 4 x 8 Minuten mit PBS-1 % - T0,05 % bei 200 rpm, Raumtemperatur waschen
- 1 Stunde mit 2.-Antikörper (Peroxidase-coupled anti-Rabbit IgG), 1:10000 in 30 ml PBS-1 % bei 200 rpm, Raumtemperatur inkubieren
- 4 x 8 Minuten mit PBS-1 %-T0,05 % bei 200 rpm, Raumtemperatur waschen
- Für jede Membran in der Größe einer Mikrotiterplatte insgesamt 1000 µl Western Blotting-Reagenz also jeweils 500 µl der Lösungen 1 und 2 in einem Eppendorftube vorbereiten
- Membranen luftblasenfrei auf eine Folie legen
- 1000 µl Substrat darauf geben und etwas schwenken, bis die Membran sichtbar mit einem Film übergeben ist
- Die Folie luftblasenfrei auf die Membran umschlagen
- Eingeschlagene Membran in Zellstoff legen und das überflüssige Substrat vorsichtig aus der Folie herausstreichen
- 5 Minuten belichten⁵

⁸ Die genauen Pipetteneinstellungen sind wichtig, bei weniger als 9 µl bleibt der Tropfen an den Pipettenspitzen hängen. Für den Vorgang „up“ ist die Geschwindigkeit egal, 8 wurde genommen. Für „down“ ist die Einstellung 4 wichtig, weil die Probe sonst zu sehr rausspritzt und keine runden Dots entstehen.

3.6 Etablierung eines pBTn (*mariner*)-basierten Transposonmutagenesesystems in *S. epidermidis* 1585wt

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine Transposonmutanten-Bank in *S. epidermidis* 1585 zu etablieren. Diese sollte dann unter Verwendung des Dot Blot Assay-basierten Screens auf das Vorliegen von Mutanten mit aufgehobener Embp-Produktion nach Ziegenserum-Exposition untersucht werden. Um Nachteile bisher genutzter Transposonmutagenesesysteme wie zum Beispiel Tn917 (Christner et al. 2010) zu umgehen, sollte hier ein neuartiges Mariner-basiertes Transposonmutagenesesystem eingesetzt werden (Bae et al. 2004, Li et al. 2009).

Um pBTn in *S. epidermidis* einzubringen, wurde das Plasmid zunächst aus *E. coli* DH5a isoliert und in *S. aureus* RN4220 elektroporiert. Die resultierenden Klone wurden mittels spezifischer Spaltung der extrahierten Plasmide und Re-Transformation in *E. coli* auf Richtigkeit geprüft (Daten nicht gezeigt). PBTn-Präparationen aus *S. aureus* RN4220 wurden verwendet, um sie in *S. epidermidis* 1457-M12 zu elektroporieren. Nach Überprüfung der Richtigkeit dieser Klone (s.o., Daten nicht gezeigt) wurde pBTn durch Transduktion mittels Phagen A6C in die Zielstämme *S. epidermidis* 1585 und 1585hc eingebracht. Aus den resultierenden Klonen wurden Plasmide extrahiert und durch Restriktionsverdau unter Verwendung der Enzyme PstI und KpnI geprüft (Abbildung 28).

Nun sollte die optimale Eliminationstemperatur für das Plasmid pBTn identifiziert werden. Hierzu wurde der Stamm 1585xpBTn bei 30°C in Flüssigmedium und Gegenwart von Chloramphenicol angezüchtet. Ausgehend von dieser Kultur wurden geeignete Verdünnungen auf Blutagar und BHI-Agar + Chloramphenicol ausplattiert und bei 42 °C, 42,5 °C, 43,0 °C, 43,5 °C, 44,0 °C oder 44,5 °C inkubiert. Während bei einer Temperatur von 42 °C noch Wachstum auf Blutagar und BHI-Agar + Chloramphenicol zu beobachten war, fand sich bei 44,5 °C nur noch Wachstum auf Blutagar, nicht aber BHI-Agar + Chloramphenicol. Dieses Ergebnis zeigt, dass pBTn bei 44,5°C nicht repliziert und daher eliminiert wird.

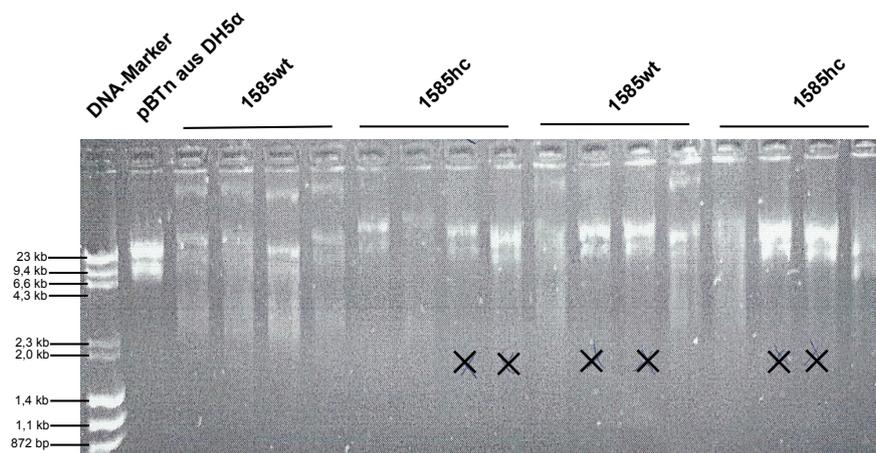


Abbildung 28: Plasmidanalyse durch Restriktionsverdau nach Isolierung aus *S. epidermidis* 1585 und 1585hc. Plasmide aus den pBTn-Transduktanten *S. epidermidis* 1585xpBTn und 1585hcxpBTn wurden über Nacht bei 37°C gespalten. Resultierende Fragmente wurden in einem 1 % Agarosegel getrennt und mittels RedSafe gefärbt. pBTn aus *E. coli* DH5α diente als Kontrolle. × markiert diejenigen Klone, die aufgrund des Bandenmusters als 1585wt x pBTn bzw. 1585hc x pBTn weiter verwendet wurden.

Im Folgenden sollte geprüft werden, ob unter permissiven Kulturbedingungen das Mariner-Transposon in das Genom von *S. epidermidis* integriert wird. Hierzu wurde die Zahl von Erythromycin-resistenten, Chloramphenicol-sensiblen Klonen nach Schüttelkultur bei 44,5 °C bestimmt. Es zeigte sich, dass bei Ausplattierung von 50 µl der 1:1000 verdünnten Kultur auf BHI-Agar + Erythromycin (BHI_{E10}) 176 Kolonien wuchsen (Tabelle 2). Bei BHI-Agar + Erythromycin und Chloramphenicol (BHI_{E10C10}) wuchsen jedoch nur 34 Kolonien. Somit kann abgeschätzt werden, dass etwa 2,8 % der Zellen das Mariner-Transposon chromosomal integriert hatten, während das Plasmid offenbar eliminiert worden war. Bei 0,7 % der Zellen muss von einer Anwesenheit des Plasmids ausgegangen werden.

Tabelle 2: Elimination des Plasmids und Ausbeute von Mariner-Integraten in *S. epidermidis* 1585.

Eingesetzte Verdünnung ^a	Blutagar	BHI _{E10} Agar	BHI _{E10C10} Agar
10 ⁻³	etwa 5000	176	34
10 ⁻⁴	etwa 2000	22	1
10 ⁻⁵	170	1	1
10 ⁻⁶	26	1	0
10 ⁻⁷	1	0	0

^a Ausplattierung einer Kultur nach 24-stündiger Inkubation bei 44,5°C. Die Kultur wurde wie angegeben in PBS verdünnt und 50 µl wurden jeweils auf Blutagar, BHI Agar + Erythromycin (BHI_{E10}) Agarplatten oder BHI-Agar + Erythromycin und Chloramphenicol (BHI_{E10C10}) ausplattiert.

Um zu zeigen, dass die auf BHI_{E10} gewachsenen Klone in der Tat zum Großteil pBTn eliminiert hatten, wurden 100 zufällig ausgewählte Kolonien jeweils auf BHI_{E10}- sowie BHI_{E10C10}-Platten kultiviert. 76 von 100 Klonen zeigten Wachstum auf BHI_{E10}, jedoch nicht auf BHI_{E10C10}. Diese 76 Klone wurden als putative Transposonmutanten betrachtet und weiter analysiert. Nach Aufreinigung von Plasmiden aus den putativen Klonen zeigte sich jedoch, dass trotz des passenden Resistenzphänotyps das pBTn weiterhin nachweisbar war (Abbildung 29, 30).

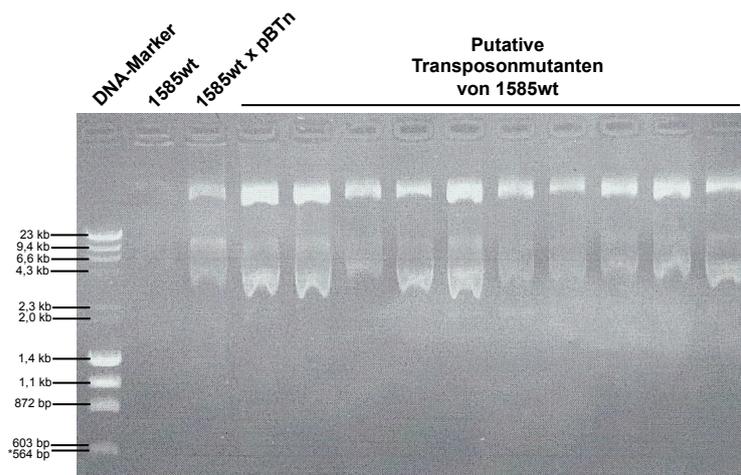


Abbildung 29: Plasmidanalyse von 10 der 76 putativen 1585 Transposonmutanten. Die Plasmidpräparation wurde direkt ohne Spaltung auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und mittels RedSafe gefärbt. Die jeweils ersten beiden Banden oberhalb von 23 kb wurden als pBTn gewertet. * markiert eine Bande, die bei üblicherweise verwendeten DNA-Mengen meist kaum zu erkennen ist.

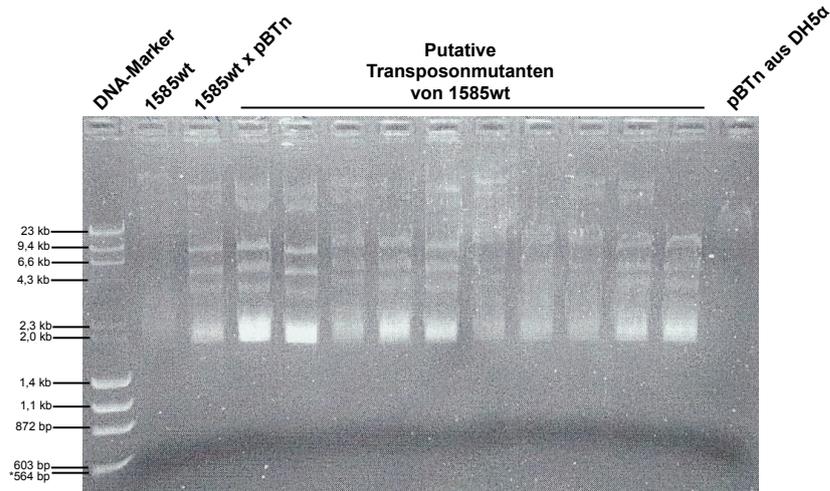


Abbildung 30: Plasmidanalyse durch Restriktionsverdau von 10 der putativen 76 Transposonmutanten Die Plasmide von 10 der putativen 76 Transposonmutanten wurden über Nacht bei 37 °C mit PstI und KpnI gespalten. Resultierende Fragmente wurden in einem 1 % Agarosegel getrennt und mittels RedSafe gefärbt. pBTn aus *E. coli* DH5α sowie aus 1585wtxpBTn dienten als Kontrolle. Die jeweils ersten beiden Banden oberhalb von 23 kb wurden als pBTn gewertet. * markiert eine Bande, die bei üblicherweise verwendeten DNA-Mengen meist kaum zu erkennen ist.

4. Diskussion

Die Biofilmbildung von Bakterien ist der zentrale Pathomechanismus bei fremdmaterialassoziierten Infektionen. *S. epidermidis* ist diesbezüglich einer der wichtigsten Erreger und die Referenzspezies für die Forschung an biofilmassoziierten Infektionen (Costerton et al. 1999, Otto 2009, Mack et al. 2009, Rohde et al. 2010, Becker et al. 2014, Büttner et al. 2015). Auch *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. difficile*, *Streptococcus spp*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Yersinia pestis* und *Bordetella spp.* bilden Biofilme und sind nosokomiale Erreger (Stewart und Costerton 2001, Otto 2008, Mack et al. 2009, Römling und Balsalobre 2012, Becker et al. 2014, ECDC 2013, 2015, Kapitel 1.1). Ausreichend gezielt biofilmwirksame Antibiotika fehlen, sodass in der Regel eine Explantation des infizierten Fremdmaterials in Kombination mit einer Langzeitantibiose notwendig ist (Widerström et al. 2012, Römling und Balsalobre 2012, Becker et al. 2014). Zur Biofilmbildung von *S. epidermidis* tragen unterschiedliche Faktoren wie die Proteine Embp und Aap, das Polysacchariden PIA, eDNA und Teichonsäuren bei (Hussain 1993, Mack 1996, Stewart 2001, Rohde et al. 2005, Sadovskaya 2005, Izano 2008, Schommer 2011, Becker et al. 2014, Büttner et al. 2015). Für die Forschung in diesem Gebiet ging es in dieser Arbeit um das *extracellular matrix binding protein* (Embp). Die Besonderheit von Embp ist, dass es nicht unter bisher etablierten Standard-*in vitro*-Bedingungen nachweisbar ist, sondern in Gegenwart von Ziegen Serum oder Tigecyclin exprimiert wird (Christner et al. 2010, Weiser et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass die Embp-Expression unter der Kontrolle von *sarA*, einem globalen Regulator der Virulenz bei Staphylokokken, steht (Christner et al. 2012). Die Determinanten der Embp-Expressionskontrolle sowie Signaltransduktionswege, die an der Steuerung der Expression beteiligt sind, sind unbekannt. Über die Etablierung neuer *high-throughput* Screeningmethoden für Transposonmutantenbanken, die die neuen Nachweisbedingungen für Embp integrieren, sollten regulatorische Mechanismen der Embp-Expression identifiziert werden.

Bisherige Screeningansätze wurden regelhaft unter Standard-*in vitro*-Bedingungen, also ohne Hinzugabe einer biofilminduzierenden Substanz, durchgeführt (Mack et al.

1994, Heilmann et al. 1996a, Mack et al. 2000, Christner et al. 2010, Wang et al. 2011). Mit dem Screen dieser Arbeit sollten Transposonmutanten mit einer erloschenen oder verminderten Embp-Expression mittels eines Immuno-Dot Blot Verfahrens identifiziert werden. Dafür musste zunächst ein Standard-Dot Blot-Protokoll um die Hinzugabe von Ziegen Serum erweitert werden. Hierbei stellte sich heraus, dass für den Embp Nachweis deutlich größere Proben für die Oberflächenproteinpräparation nötig sind als beim Standardprotokoll. Vermutlich ist bei dem verwendeten Ziegen Serumanteil von 50 % die Verfügbarkeit von Nährstoffen reduziert, sodass weniger hohe Zellzahlen in der Kultur erzielt werden können, was durch die Vergrößerung des Probenvolumens wieder kompensiert werden kann.

Nach erfolgreichem Embp-Nachweis in diesem Basis-Format des Dot Blot Assays, sollte die Durchführung aller Versuchsschritte im 96-Well-Plattenformat getestet werden. Dies sollte der Entwicklung einer Methode dienen, bei der viele Transposonmutanten gleichzeitig gescreent werden können. Bei einem anderen Screening einer Transposonmutantenbank in einem *S. aureus*-Stamm zur Darstellung unterschiedlicher Dermicidin-Interaktionen wurde zu diesem Zweck ein 96-Well-Plattenformat genutzt (Li et al. 2009). Außerdem war eine für das Screening bereit stehende Transposonmutantenbank in *S. epidermidis* 1585hc (Heinze 2012) in 96-Well-Mikrotiterplatten archiviert.

Bei der Übersetzung ins 96-Well-Format bestanden zwei wesentliche Schwierigkeiten. Dies waren zum einen der Transfer aller 96 Mutanten pro Mikrotiterplatte von der Reaktivierung bis zur Entwicklung der Signale auf dem Röntgenfilm ohne, dass es zu Kreuzkontaminationen kommen kann. Zum anderen war es die Limitation der Kulturvolumina (Mikrotiterplatte: 400 µl / Well).

Zum sicheren Transfer der Mutanten beziehungsweise deren Kulturen und Oberflächenproteinpräparationen wurden ein Replika-Stempel mit 96 Stäben und Mehrkanalpipetten eingesetzt. Eine besondere Rolle für die Effektivität der neuen Methode kommt der Form der Reaktivierung mittels Replikastempel zu. Die in Mikrotiterplatten archivierten Transposonmutanten wurden nach dem Auftauen zunächst auf große Agarplatten gestempelt, sodass jeder Transposonmutant eine Kolonie auf der Agarplatte bildet. Erst anschließend wurden daraus erneut mit dem Replika-Stempel Vorkulturen angeimpft. Durch dieses Vorgehen ist unmittelbar

sichtbar, ob eine gegebene Mutante anwachsen konnte oder nicht. Diejenigen, die nicht anwachsen, sind im späteren Screen auch Embp-negativ und würden einen Mutanten mit der gewünschten Transposoninsertion im *embp*-Gen vortäuschen. Da dieser Unterschied direkt sichtbar ist, entfällt eine aufwändige Charakterisierung. Die Platten können bei 4 °C gelagert werden und einzelne Mutanten so direkt zurückverfolgt sowie erneute Kulturen angefertigt werden. Die Handhabung großer Agarplatten für 6 Stempelabdrücke war weniger trivial als vermutet. Wegen schneller Kontaminationen und der Entwicklung von Kondenswasser bei Inkubationsschritten ergaben sich einige Details als Fehlerquellen.

Wie auch bei den Versuchen im Basis-Format war eine Embp-Detektion mit geringem Kulturvolumen nicht möglich. Die Lösung bestand im Einsatz von Deepwellplatten (1000 µl / Well statt 400 µl / Well). Diese dürfen bei dynamischen Inkubationsschritten allerdings nur maximal mit 400 µl / Well befüllt werden, da sonst ein Ineinanderlaufen der Kulturen droht. Eine besondere Rolle kommt der dynamischen Inkubation der Kulturen in den Deepwellplatten in ausreichend hoher Drehzahl zu. Erst bei einer Drehzahl von 300 rpm wird gewährleistet, dass das Medium in den mittig liegenden Vertiefungen der Platten ausreichend in Bewegung gerät, sodass in allen Vertiefungen gleiche Wachstumsbedingungen vorherrschen. Die Kontrolle der einheitlichen Zellzahl in allen Nöpfchen der Deepwellplatten erfolgt durch OD₆₀₀-Messungen. Damit sehr viele Mutanten pro Versuchsdurchlauf gescreent werden können, wurde eine spezifische Fixierung mehrerer Platten auf der Motorplatte eines normalen Schüttelinkubators gewählt.

Der zusätzliche Versuchsschritt, die Bakteriendichte gemessen an der OD₆₀₀ während des Screens zu überprüfen, erhöht die Trennschärfe der Screeningmethode. Sie steigt an, da im Falle von biofilm- oder Embp-negativ gefilterten Transposonmutanten im Einzelfall nachvollziehbar ist, ob diese akzidentiell im Flüssigmedium nicht angewachsen sind (sehr niedrige OD₆₀₀ und damit falsch negativ) oder ob ein durch das Transposon verursachtes tatsächliches Defizit in Biofilmbildung und / oder Embp-Expression hoch wahrscheinlich ist (OD₆₀₀ vergleichbar mit den anderen biofilmpositiven Transposonmutanten). Durch diese Verfeinerung werden im Screen außerdem Mutanten mit nur eingeschränkter Embp-, beziehungsweise Biofilmbildung

statt gänzlich erloschener Embp-Bildung oder Biofilmbildung zuverlässiger identifiziert.

Zusammenfassend konnte das Dot Blot-basierte Screeningverfahren etabliert werden, Es integriert die Embp-induzierenden Wachstumsbedingungen mit Ziegenserum und erlaubt die parallele Verarbeitung von 6 x 96 – Well – Mikrotiterplatten, also 576 Mutanten pro Versuchsdurchlauf. Es dient der Identifikation von *S. epidermidis*-1585wt-Transposonmutanten mit einer veränderter ziegenseruminduzierten Embp-Produktion.

Auch bei *S. epidermidis* 1585hc ist es möglich, durch Wachstum in Ziegenserum die Expression von Embp im Basis-Dot Blot-Format zu induzieren. Allerdings war dies nicht mit dem Dot Blot-basierten Screeningassay möglich. Daher wurde für diesen Stamm ein Biofilmassay-basiertes Screeningsystem aufgebaut. Die Ursache für die nicht ausreichende Embp-Induktion bei *S. epidermidis* 1585hc ist wahrscheinlich in den spezifischen Versuchsbedingungen des Screening-Assays zu finden. So ist es denkbar ist, dass es durch die dynamische Inkubation und das damit verbundene planktonische Wachstum, anders als bei *S. epidermidis* 1585, zu keiner ausreichend starken Embp-Produktion kommt. Letztendlich konnte der Biofilmassay-basierte Screen erfolgreich etabliert werden. Das Verfahren erlaubt, die biofilminduzierenden Wachstumsbedingungen mit Ziegenserum zu integrieren und ebenfalls eine parallele Verarbeitung von 6 x 96 – Well – Mikrotiterplatten, also 576 Mutanten pro Versuchsdurchlauf durchzuführen. Es dient der Identifikation von *S. epidermidis*-1585hc-Transposonmutanten mit einer veränderten ziegenseruminduzierten Biofilmbildung.

Dieser Screen wurde erfolgreich auf die Transposonmutantenbank in 1585hc (Heinze 2012) angewendet. Es konnten 5 von etwa 4100 Transposonmutanten mit einem biofilm-negativen Phänotyp identifiziert werden (M25, M26, M55, M66 und M151). Durch Sequenzierung des Genoms dieser Mutanten konnte die Transposoninsertion bei vier der Mutanten (M25, M55, M66 und M151) im 13165 bp großen offenen Leserahmen SERP0157 lokalisiert werden (Wiechmann 2016). SERP0157 konnte in die Familie der GntR-like Transkriptionsfaktoren eingeordnet werden und wurde als *serum response regulator (srr)* bezeichnet. GntR-like Transkriptionsfaktoren werden

mit der Adaptation von Bakterien an ihre Umgebung assoziiert (DiRusso und Nyström 1998, Hänsler et al. 2007 aus Wiechmann 2016).

Während beide Verfahren, der Dot Blot- und der biofilmbasierte Screen, sich gut für das schnelle Screening großer Mutantenbanken eignen, birgt das Dot Blot-basierten Screeningverfahren den Vorteil, dass direkt die veränderte Embp-Bildung nachgewiesen wird. Theoretisch ist es möglich, dass im Falle eines biofilmbasierten Screens die Biofilmbildung auch über andere, möglicherweise noch unbekannte Faktoren abläuft. Somit muss im Anschluss an den biofilmbasierten Screen mit den biofilmnegativ identifizierten Mutanten ein Dot Blot auf Embp nachgeholt werden, um nachzuweisen, dass die veränderte Fähigkeit zur Biofilmbildung auch mit einer erloschenen oder verminderten Embp-Expression korreliert. Andererseits liegt der Vorteil des biofilmbasierten Screens darin, dass er theoretisch auch auf andere *S. epidermidis*-Stämme angewendet werden könnte, um ganz neue, Embp-unabhängige Faktoren zu suchen, deren Expression auch durch Ziegenserum induziert wird. Die Voraussetzung für die Durchführung wäre, dass die anderen *S. epidermidis*-Stämme eine durch Ziegenserum induzierbare Biofilmbildung aufweisen.

Ebenfalls sollte in dieser Arbeit eine Transposonmutantenbank im *S. epidermidis* Wildtypstamm 1585wt mit dem Transposon *himar1-mariner* aus dem Plasmid pBTn erstellt werden. Die *S. epidermidis*-1585wt- Transposonmutanten sollten mit dem Dot Blot-basierten Screen auf eine veränderte Embp-Produktion untersucht werden. Die Transposonmutagenese in 1585wt war jedoch nicht erfolgreich.

Als Ursache wurde eine zu niedrig gewählte nicht permissive Inkubationstemperatur für das Plasmid pBTn von 43 °C vermutet. Nach Ausplattieren und Inkubieren von 1585wt x pBTn bei unterschiedlichen Temperaturen erschien 44,5 °C als die Temperatur, bei der pBTn nicht mehr repliziert wird. Dennoch war pBTn nach einem Transposonmutagenese-Versuch mit dieser nicht permissiven Inkubationstemperatur (44,5 °C) trotz passenden Antibigramms der putativen Transposonmutanten weiterhin nachweisbar. Die nicht permissive Temperatur könnte in Folgeversuchen auf > 44,5 °C erhöht werden.

Transposonmutagenese-Experimente mit pBTn sind erstmals durch Wang et al. 2011 in einem *S. epidermidis*-Stamm durchgeführt worden (*S. epidermidis* 1457). Sonst finden sich Versuche mit *S. aureus*-Stämmen (Li et al. 2009, Xia et al. 2010) und Streptokokken (Nilsson et al. 2014). Im Vergleich mit dieser Arbeit weichen die Antibiotikakonzentrationen während der Temperaturshifts teilweise voneinander ab. In dieser Arbeit wurden die Inkubationen mit 2,5 µg / ml Erythromycin und 10 µg / ml Chloramphenicol durchgeführt. Abweichend davon wurden bei Wang et al. 2011 20 µg / ml Chloramphenicol genutzt und bei Li et al. 2009 5 µg / ml Erythromycin. Außerdem wurde bei Li et al. 2009 sowie bei Xia et al. 2010 ein Zyklus der Temperaturshifts ohne Antibiotikum durchgeführt. In Folgeversuchen könnten die Antibiotikakonzentrationen entsprechend variiert werden und ein Zyklus der Temperaturshifts ohne Antibiotika erfolgen.

Der Plasmid-Transfer von pBTn in den Stamm 1585wt via Elektroporation und Phagentransduktion gestaltete sich in dieser Arbeit schwierig, es waren mehrere Versuchsanläufe notwendig. Plasmid-DNA-Übertragungen bei *S. epidermidis*-Stämmen sind bekanntermaßen schwierig, wohingegen die Methoden für *S. aureus* zum gut funktionierenden Standard gehören (Monk et al. 2012, Winstel et al. 2015, Winstel et al. 2016). Ein häufiges Problem ist, dass genetische Barrieren in KNS wie zum Beispiel Restriktions-Modifikations-Systeme oder *clustered regularly interspaced palindromic repeat* (CRISPR/Cas) den horizontalen Gentransfer behindern, die Plasmid-DNA wird häufig im Akzeptor-Stamm inaktiviert (Winstel et al. 2013, Winstel et al. 2015, Winstel et al. 2016). Um dieses Problem zu umgehen, wird, wie auch in dieser Arbeit, oft der restriktions-defiziente *S. aureus*-Stamm RN4220 genutzt, aus dem sich Fremd-DNA verhältnismäßig gut in weniger eng verwandte *S. aureus*- und *S. epidermidis*- Stämme via Elektroporation oder Phagentransduktion transferieren lässt (Monk et al. 2012). Dieser Weg des horizontalen Gentransfers wurde auch bei Wang et al 2011 genutzt. pBTn wurde in *S. aureus* RN4220 und anschließend in den Zielstamm 1457 elektroporiert. In dieser Arbeit wurde pBTn von *S. aureus* RN4220 in *S. epidermidis* 1457-M12 elektroporiert und anschließend per Phagentransduktion (Phage A6C) in *S. epidermidis* 1585 eingebracht (Rohde et al. 2005). Allerdings waren für beide Plasmid-Transfers viele Anläufe notwendig, bis die gewünschten Ergebnisse erzielt werden konnten.

In Bezug auf dieses Problem konnte kürzlich gezeigt werden, dass Phagentransduktionen mit dem Phagen 187 von dem *S. aureus*-Stamm PS187 in diverse KNS suffizient gelungen sind (Winstel et al. 2015). Es wurde ein Protokoll erstellt, das prinzipiell mit jedem bei Staphylokokken geeignetem Plasmid anwendbar ist, so auch pBTn (Winstel et al. 2016). *S. aureus* PS187 wurde anstelle von *S. aureus* RN4220 eingesetzt. Der Transfer von Plasmid-DNA speziell in den *S. epidermidis*-Stamm 1585 wurde nicht getestet (Winstel et al. 2016). Es wäre aber möglich, den Transposonmutagenese-Versuch dieser Arbeit inklusive der vorangehenden Plasmid-DNA-Transfers entsprechend der Ergebnisse aus Winstel et al. 2015 und 2016 neu zu gestalten. Dazu könnte man pBTn aus *E. coli* DH5 α in *S. aureus* PS187 elektroporieren und anschließend versuchen, pBTn via Phagentransduktion mit dem Phagen 187 von *S. aureus* PS187 direkt in *S. epidermidis* 1585wt zu transferieren. Sollte dies nicht funktionieren, könnte man pBTn aus *S. aureus* PS187 auch erst wieder in *S. epidermidis* 1457-M12 transferieren (siehe Winstel et al. 2013) und dann erst in 1585wt. Möglicherweise entstehen so stabilere 1585wt x pBTn – Klone und eine Transposonmutagenese ist besser möglich und erfolgreich.

Zusammen mit Weiser et al. 2016 konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit einer subinhibitorischen Konzentration des Antibiotikums Tigecyclin die Biofilmbildung sowie die Embp-Expression von *S. epidermidis* 1585 induziert. Dieser Umstand ist von besonderer klinischer Relevanz, da er bedeuten kann, dass eine Unterdosierung von Antibiotika zu einer Verschlechterung von katheterassoziierten Infektionen führen kann. Zuvor konnte eine Biofilminduktion durch Tigecyclin bei *ica*-positiven *S. epidermidis*-Stämmen gezeigt werden (Kaplan et al. 2011a). Die weiterten Untersuchungen konnten unter anderem die Wichtigkeit von Embp für die Tigecyclin-induzierte Biofilmbildung sowie für die Evasion des Immunsystems nachweisen (Weiser et al. 2016).

In Nebenversuchen dieser Arbeit wurde ein weiteres Versuchsprotokoll für einen Dot Blot-basierten Screen zur Identifikation von *S. epidermidis*-1585wt-Transposonmutanten mit einer veränderten Embp Produktion erstellt. Damit könnte die Transposonmutantenbank in 1585wt aus der Weiterführung der Versuche zur Transposonmutagenese gescreent werden, um Aufschluss über den genetischen

Hintergrund der Tigecyclin-induzierten Embp-vermittelten Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 1585wt zu erlangen. Hierbei ist zu beachten, dass dieses Protokoll keinen kompletten Testdurchlauf erfahren hat, sondern einige wenige Schritte aus den Erfahrungen der Entwicklung der Dot Blot- und biofilmbasierten Screeningmethoden mit Ziegenserum für je *S. epidermidis* 1585wt und 1585hc abgeleitet wurden.

Darüber hinaus könnte auch eine biofilmbasierte Variante des Screens analog zum biofilmbasierten Screen für 1585hc erstellt werden. Mit diesem Screen könnte man generell Transposonmutantenbanken in *S. epidermidis*-Stämmen screenen, die grundsätzlich eine durch Tigecyclin induzierbare Biofilmbildung aufweisen, ohne, dass der zu Grunde liegende Faktor bekannt ist. Diese unbekannt Faktoren könnten damit identifiziert werden.

Der Umstand, dass lange Zeit Untersuchungen unter Standard-*in vitro*-Bedingungen, also ohne Zusatz einer bestimmtem biofilminduzierenden Substanz, statt gefunden haben ist ein Hauptgrund dafür, dass Embp lange nicht identifiziert werden konnte, obwohl es im Nachhinein in vielen klinisch signifikanten *S. epidermidis*-Stämmen nachzuweisen war (Christner et al. 2010, Christner et al. 2012). Hypothetisch dürften noch viele weitere bisher unbekannt Faktoren in der bakteriellen Biofilmbildung eine Rolle spielen, die ebenfalls erst nach Induktion durch zum Beispiel Serum, Antibiotika oder andere Substanzen exprimiert werden. Diese induzierbare Biofilmbildung sollte der tatsächlich stattfindenden Biofilmbildung *in vivo* bei Biofilm-assoziierten Infektionen am nächsten kommen. Die weitere Untersuchung der Embp-basierten Biofilmbildung, aber auch generell der induzierbaren Biofilmbildung ist daher interessant. Ein wichtiger Schritt dabei ist, etablierte *in vitro*-Standardverfahren zu überdenken und zu erneuern. In Bezug auf die Integration von Ziegenserum und Tigecyclin stehen veränderte Verfahren sowie neue Screeningmethoden durch diese Arbeit zur Verfügung. Gegebenenfalls kann nach besserem Verständnis der induzierbaren Biofilmbildung eine andere Empfehlung der antibiotischen Therapie für Fremdmaterial-assoziierte Infektionen durch *S. epidermidis* und andere Pathogene resultieren. Daher ist die Fortführung der Resultate dieser Arbeit zur weiteren Abklärung der Embp-basierten Biofilmbildung von *S. epidermidis* sinnvoll.

5. Zusammenfassung

Die Biofilmbildung von *S. epidermidis* spielt eine zentrale Rolle im Pathomechanismus von Fremdmaterial-assoziierten Infektionen. Diese sind im klinischen Alltag sehr häufig und die Behandlung ist meist aufwändig und problematisch. Die Biofilmforschung befasst sich damit, über welche Mechanismen und Faktoren Biofilme gebildet werden. Dadurch können potentielle Zielstrukturen für die Entwicklung biofilmwirksamer Antibiotika gefunden werden.

Zur Untersuchung der Biofilmbildung gibt es Standardmethoden, die den *in vitro*-Nachweis der Biofilmbildung und beteiligter Faktoren erlauben. Sie berücksichtigen in der Regel aber nicht das Bakterienwachstum in Gegenwart Biofilm-induzierender Substanzen wie beispielsweise Blutserum oder Antibiotika. Ein Faktor, der erst nach einer solchen Exposition exprimiert wird, ist das Protein *extracellular matrix binding protein* (Embp) von *S. epidermidis*. Daher müssen zum Nachweis solcher induzierbarer Faktoren bisherige Versuchsprotokolle modifiziert werden. Damit soll ermöglicht werden, die *in vivo* stattfindende Biofilmbildung besser zu verstehen.

Das wesentliche Ziel dieser Arbeit war der Aufbau einer neuen Screeningmethode zum Nachweis von *S. epidermidis* Transposonmutanten mit einer veränderten Embp Produktion und Biofilmbildung. Aufbauend auf diesen Ergebnissen können anhand von Transposonmutanten mit verändertem Phänotyp essentielle Gene für die Embp Bildung identifiziert werden.

Es wurden drei Screeningvarianten etabliert. Zwei weisen direkt eine veränderte Embp Produktion nach, die eine umfasst das Bakterienwachstum in Gegenwart von Ziegen Serum, die andere das in Gegenwart vom Antibiotikum Tigecyclin. Die dritte Methode weist eine veränderte Biofilmbildung nach Wachstum in Gegenwart von Ziegen Serum nach. Mit diesem Verfahren wurde eine Transposonmutantenbank gescreent, hierbei wurden fünf Mutanten mit verminderter Biofilmbildung gefunden.

Die Screeningmethoden zum Nachweis einer veränderten Embp Produktion können zukünftig verwendet werden, um gezielt Determinanten der Embp Bildung von *S. epidermidis* zu suchen. Das Verfahren zum Nachweis einer veränderten Biofilmbildung kann weiterhin verwendet werden, um noch unbekannte Faktoren der Ziegen Serum-induzierten Biofilmbildung von *S. epidermidis* zu identifizieren.

6. Summary

Biofilm formation by *S. epidermidis* plays a central role in the pathogenesis of device-associated infections. In clinical routine they are very common and the treatment is complex and often difficult. The main goal of scientific research concerning biofilm biology is thus to identify the mechanisms and factors of its formation. Detailed knowledge of these processes is the pre-requisite for the development of antibiotics, which are able to potently attack biofilms.

Standard methods are used to detect factors of biofilm formation *in vitro*. Usually, however, these standard assays are inapt to assess bacterial growth in the presence of certain substances, which are known inducers of biofilm formation, like serum or antibiotics. One important factor, which is expressed only after such exposition, is the protein *extracellular matrix binding protein* (Embp) of *S. epidermidis*. Hence, existing assay protocols need to be modified, in order to allow for detection of such inducible factors, too. In consequence, this would enable us, to gain a better understanding of *in vivo* biofilm formation.

The main objective of this thesis was, to develop a new screening method to detect transposon mutants of *S. epidermidis*, which show a modified Embp production and altered biofilm formation. These results would provide a basis for identification of essential gene loci for Embp expression by analysing the identified transposon mutants.

We thus established three novel screening variants. Two of them directly detect Embp expression. One assay analyses the bacterial growth in the presence of goat serum and the other in the presence of the antibiotic Tigecyclin. The third method detects a modified biofilm formation after bacterial growth in the presence of goat serum. Using this third method, we screened a transposon mutant library. Five mutants with a decreased ability of biofilm formation were identified.

The screening methods, that detect a modified Embp production, will be of future use to specifically look for determinants of Embp expression of *S. epidermidis*. Also the third method, which detects a modified biofilm formation, can be helpful in the future to identify yet unknown factors of biofilm formation by *S. epidermidis*, which are inducible by goat serum.

6. Abkürzungsverzeichnis

Aap	Accumulation associated protein
<i>agr</i>	Accessory gene regulator
AIP	Auto-inducing peptide von <i>S. epidermidis</i>
AtlE	Zelloberflächen-assoziiertes <u>A</u> uto <u>l</u> ysin/Adhäsिन von <i>S. epidermidis</i>
BSA	Kälberserumalbumin
BSI	Blood stream infection / Blutstrominfektion
CAUTI	Catheter associated urinary tract infection
CDC/NHSN	Centre of Disease Control and Prevention / National Healthcare Safety Network
CLABSI	Central line associated blood stream infection
Clp	Bakterielle ATP-abhängige Protease
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
Cm ^r	Chloramphenicolresistenz
Cn	Kollagen
CRISPR/Cas	Clustered regularly interspaced palindromic repeat-Lokus
CWA	Cell wall anchored
DA-HAI	Device-associated healthcare-associated infection
DUF1542	Domains of unknown function
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ECM	Extracellular matrix
eDNA	Extrazelluläre Desoxyribonukleinsäure
Embp	Extracellular matrix binding protein
<i>ermB</i>	Ein 1,45-kb großes Fragment für eine Erythromycinresistenz
Erm ^r	Erythromycinresistenz
Fg	Fibrinogen
FIVAR-Domäne	Found In Various Architectures-Domäne
FN	Fibronectin
GA-Domäne	G-related Albumine-binding-Domäne
HAI	Healthcare-associated infection
<i>icaADCB</i> -Locus	PIA kodierendes Gen
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IgG	Immunglobulin G
INICC	International Nosocomial Infection Control Consortium
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken

KPS	Koagulase-positive Staphylokokken
LDS	Lithium Dodecyl Sulfate
LPSN	List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature
LPXTG	Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin, X = variable Aminosäure
MRSA	Methicillinresistenter <i>S. aureus</i>
MRSE	Methicillinresistenter <i>S. epidermidis</i>
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
NI	Nosokomiale Infektion
OD ₆₀₀	Optische Dichte bestimmt bei einer Wellenlänge von 600nm
ORF	Open reading frame
PBP2a	Penicillinbindende Protein
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin
PNAG	poly-N-acetylglucosamine
PSM	Phenol-Soluble Modulin
QS-System	Quorum-Sensing-System
rcf	Relative centrifuge force
RKI	Robert Koch Institut
rpm	Revolutions per minute
<i>sar</i>	Staphylococcal accessory regulator-Lokus
SCC	Staphylococcus Cassette Chromosome
SCV	Small colony variant
SdrG	Serin-Aspartat-Repeat-beinhaltendem Protein g
SepA	Metalloprotease zur AtlE-Prozessierung
$\sigma^B = \text{SigB}$	Bakterieller globaler Regulator für Stressantworten
SSI	Surgical site infection
TEP	Totale Endoprothese
TM-Domäne	<i>trans</i> -Membrandomäne
VAI	<i>V. fischeri</i> autoinducer
Vn	Vitronektin
vWF	von Willebrandfaktor
WTA	Wall teichoic acid
YSIRK	Aminosäuresequenz eines Proteinexportsignals bei Staphylokokken

7. Literaturverzeichnis

Arrecubieta C, Lee MH, Macey A, Foster TJ, Lowy FD. SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, binds type I collagen. J Biol Chem. 2007 Jun 29;282(26):18767-76.

Bae T, Schneewind O. The YSIRK-G/S motif of staphylococcal protein A and its role in efficiency of signal peptide processing. J Bacteriol. 2003 May;185(9):2910-9.

Bae T, Banger AK, Wallace A, Glass EM, Aslund F, Schneewind O, Missiakas DM. *Staphylococcus aureus* virulence genes identified by bursaaurealis mutagenesis and nematode killing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Aug 17;101(33):12312-7.

Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev. 2014 Oct;27(4):870-926.

Behnke M, Hansen S, Leistner R, Diaz LA, Gropmann A, Sohr D, Gastmeier P, Piening B. Nosocomial infection and antibiotic use: a second national prevalence study in Germany. Dtsch Arztebl Int. 2013 Sep;110(38):627-33.

Biswas R, Voggu L, Simon UK, Hentschel P, Thumm G, Götz F. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. FEMS Microbiol Lett. 2006 Jun;259(2):260-8.

Bowden MG, Visai L, Longshaw CM, Holland KT, Speziale P, Hook M. Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? J Biol Chem. 2002 Nov 8;277(45):43017-23.

Büttner H, Mack D, Rohde H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. Front Cell Infect Microbiol. 2015 Feb 17;5:14.

Calà C, Amodio E, Di Carlo E, Virruso R, Fasciana T, Giammanco A. Biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* strains, isolated from the skin of hospitalized patients: genetic and phenotypic characteristics. New Microbiol. 2015 Oct;38(4):521-9.

Chen HW, Liu PF, Liu YT, Kuo S, Zhang XQ, Schooley RT, Rohde H, Gallo RL, Huang CM. Nasal commensal *Staphylococcus epidermidis* counteracts influenza virus. Sci Rep. 2016 Jun 16;6:27870.

Cheung GY, Rigby K, Wang R, Queck SY, Braughton KR, Whitney AR, Teintze M, DeLeo FR, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. PLoS Pathog. 2010 Oct 7;6(10):e1001133.

- Christner M, Franke GC, Schommer NN, Wendt U, Wegert K, Pehle P, Kroll G, Schulze C, Buck F, Mack D, Aepfelbacher M, Rohde H. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol Microbiol*. 2010 Jan;75(1):187-207.
- Christner M, Heinze C, Busch M, Franke G, Hentschke M, Bayard Dühring S, Büttner H, Kotasinska M, Wischniewski V, Kroll G, Buck F, Molin S, Otto M, Rohde H. 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 Oct;86(2):394-410.
- Chu VH, Woods CW, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Pappas PA, Federspiel J, Athan E, Stryjewski ME, Nacinovich F, Marco F, Levine DP, Elliott TS, Fortes CQ, Tornos P, Gordon DL, Utili R, Delahaye F, Corey GR, Fowler VG Jr; International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study Group. Emergence of coagulase-negative staphylococci as a cause of native valve endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan 15;46(2):232-42.
- Clarke SR, Harris LG, Richards RG, Foster SJ. Analysis of Ebh, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2002 Dec;70(12):6680-7.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999 May 21;284(5418):1318-22.
- Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med*. 2004 Apr 1;350(14):1422-9.
- de Château M, Holst E, Björck L. Protein PAB, an albumin-binding bacterial surface protein promoting growth and virulence. *J Biol Chem*. 1996 Oct 25;271(43):26609-15.
- DeDent A, Bae T, Missiakas DM, Scheewind O. Signal peptides direct surface proteins to two distinct envelope locations of *Staphylococcus aureus*. *EMBO J*. 2008 Oct 22;27(20):2656-68.
- DiRusso CC, Nyström T. The fats of *Escherichia coli* during infancy and old age regulation by global regulators, alarmones and lipid intermediates. *Mol Microbiol*. 1998 Jan;27(1):1-8.
- Du X, Zhu Y, Song Y, Li T, Luo T, Sun G, Yang C, Cao C, Lu Y, Li M. Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. *PLoS One*. 2013 May 13;8(5):e62742.
- Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, Greenland T, Novick RP, Bes M, Etienne J, Lina G. High genetic variability of the agr locus in *Staphylococcus* species. *J Bacteriol*. 2002 Feb;184(4):1180-6.

Duggirala A, Kenchappa P, Sharma S, Peeters JK, Ahmed N, Garg P, Das T, Hasnain SE. High-resolution genome profiling differentiated *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients with ocular infections and normal individuals. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Jul;48(7):3239-45.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Summary: Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European hospitals 2011–2012, Stockholm, 2 July 2013.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. Stockholm: ECDC; 2015.

Euzéby J. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published, Validation List no. 132 *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010, 60, 469–472.

Fairbrother RW. Coagulase production as a criterion for the classification of the staphylococci. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1940, 50(1), 83-88.

Fairweather N, Kennedy S, Foster TJ, Kehoe M, Dougan G. Expression of a cloned *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin determinant in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 1983 Sep;41(3):1112-7.

Fluckiger U, Wolz C, Cheung AL. Characterization of a sar homolog of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*. 1998 Jun;66(6):2871-8.

Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Dec;3(12):948-58.

Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Jan;12(1):49-62.

François P, Vaudaux P, Lew PD. Role of plasma and extracellular matrix proteins in the physiopathology of foreign body infections. *Ann Vasc Surg*. 1998 Jan;12(1):34-40.

Fukunaga M, Goya M, Nagashima M, Hiroshima K, Yamada T, An Y, Hayashi K, Makihara Y, Ohe M, Ichihashi K, Ohtsuka M, Miyazaki H, Ando K. Identification of causative organism in cardiac implantable electronic device infections. *J Cardiol*. 2017 Apr 25. pii: S0914-5087(17)30093-X. doi: 10.1016/j.jjcc.2017.03.006. [Epub ahead of print].

Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*. 1994 Jan;176(2):269-75.

- Gandelman G, Frishman WH, Wiese C, Green-Gastwirth V, Hong S, Aronow WS, Horowitz HW. Intravascular device infections: epidemiology, diagnosis, and management. *Cardiol Rev*. 2007 Jan-Feb;15(1):13-23.
- García-Vázquez E, Fernández-Rufete A, Hernández-Torres A, Canteras M, Ruiz J, Gómez J. When is coagulase-negative *Staphylococcus* bacteraemia clinically significant? *Scand J Infect Dis*. 2013 Sep;45(9):664-71.
- Gastmeier P, Schwab F, Behnke M, Geffers C. [Less blood culture samples: less infections?]. [Article in German]. *Anaesthesist*. 2011 Oct;60(10):902-7.
- Gastmeier P, Behnke M, Breier AC, Piening B, Schwab F, Dettenkofer M, Geffers C. [Healthcare-associated infection rates: measuring and comparing. Experiences from the German National Nosocomial Infection Surveillance System (KISS) and from other surveillance systems]. [Article in German]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2012 Nov;55(11-12):1363-9.
- Götz F. Staphylococci in colonization and disease: prospective targets for drugs and vaccines. *Curr Opin Microbiol*. 2004 Oct;7(5):477-87.
- Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Apr;9(4):244-53.
- Gross M, Cramton SE, Götz F, Peschel A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun*. 2001 May;69(5):3423-6.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983 Jun 5;166(4):557-80.
- Hashimoto W, Miki H, Nankai H, Sato N, Kawai S, Murata K. Molecular cloning of two genes for beta-D-glucosidase in *Bacillus* sp. GL1 and identification of one as a gellan-degrading enzyme. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Dec 1;360(1):1-9
- Hänssler E, Müller T, Jessberger N, Völzke A, Plassmeier J, Kalinowski J, Krämer R, Burkovski A. FarR, a putative regulator of amino acid metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007 Sep;76(3):625-32.
- Heilmann C, Gerke C, Perdreau-Remington F, Götz F. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilmformation. *Infect Immun*. 1996a Jan;64(1):277-82.
- Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol*. 1996b Jun;20(5):1083-91.
- Heilmann C, Hussain M, Peters G, Götz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol*. 1997 Jun;24(5):1013-24.

Heilmann C, Thumm G, Chhatwal GS, Hartleib J, Uekötter A, Peters G. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*. 2003 Oct;149(Pt 10):2769-78.

Heilmann C. Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv Exp Med Biol*. 2011;715:105-23.

Heinze C. 2012. Erzeugung und Charakterisierung von Biofilm bildenden *Staphylococcus-epidermidis*-Transposonmutanten. Medizinische Dissertation. Universität Hamburg 2012.

Hellmark B, Söderquist B, Unemo M, Nilsson-Augustinsson Å. Comparison of *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections and commensal isolates in regard to antibiotic susceptibility, agr type, biofilm production, and epidemiology. *Int J Med Microbiol*. 2013 Jan;303(1):32-9.

Herrmann M, Lai QJ, Albrecht RM, Mosher DF, Proctor RA. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to surface-bound platelets: role of fibrinogen/fibrin and platelet integrins. *J Infect Dis*. 1993 Feb;167(2):312-22.

Herrmann M, Hartleib J, Kehrel B, Montgomery RR, Sixma JJ, Peters G. Interaction of von Willebrand factor with *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 1997 Oct;176(4):984-91.

Hitzenbichler F, Simon M, Salzberger B, Hanses F. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci other than *S. epidermidis* blood stream isolates at a tertiary care hospital. *Infection*. 2017 Apr;45(2):179-186.

Holland LM, Conlon B, O'Gara JP. Mutation of tagO reveals an essential role for wall teichoic acids in *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *Microbiology*. 2011 Feb;157(Pt 2):408-18.

Hughes JM. Study on the efficacy of nosocomial infection control (SENIC Project): results and implications for the future. *Chemotherapy*. 1988;34(6):553-61.

Hussain M, Hastings JG, White PJ. Comparison of cell-wall teichoic acid with high-molecular-weight extracellular slime material from *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol*. 1992 Dec;37(6):368-75.

Hussain M, Wilcox MH, White PJ. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev*. 1993 Apr;10(3-4):191-207.

Hussain M, Herrmann M, von Eiff C, Perdreau-Remington F, Peters G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun*. 1997 Feb;65(2):519-24.

Hussain M, Heilmann C, Peters G, Herrmann M. Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb Pathog.* 2001 Dec;31(6):261-70.

Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, Agata T, Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature.* 2010 May 20;465(7296):346-9.

Infektionsschutzgesetz vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das durch Artikel 4 Absatz 20 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S. 1666) geändert worden ist. §2 „Begriffsbestimmungen“ Punkt 8.

Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Jan;74(2):470-6.

Kaplan JB, Rangunath C, Velliyagounder K, Fine DH, Ramasubbu N. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jul;48(7):2633-6.

Kaplan JB, Jabbouri S, Sadovskaya I. Extracellular DNA-dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Res Microbiol.* 2011a Jun;162(5):535-41. Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs.* 2011b Sep;34(9):737-51.

Klevens RM, Edwards JR, Andrus ML, Peterson KD, Dudeck MA, Horan TC; NHSN Participants in Outpatient Dialysis Surveillance. Dialysis Surveillance Report: National Healthcare Safety Network (NHSN)-data summary for 2006. *Semin Dial.* 2008 Jan-Feb;21(1):24-8.

Kloos WE, Musselwhite MS. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol.* 1975 Sep;30(3):381-5.

Kloos WE. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu Rev Microbiol.* 1980;34:559-92.

Komatsuzawa H, Ohta K, Sugai M, Fujiwara T, Glanzmann P, Berger-Bächi B, Suginaka H. Tn551-mediated insertional inactivation of the *fntB* gene encoding a cell wall-associated protein abolishes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Apr;45(4):421-31.

Kou Y, Pagotto F2, Hannach B1, Ramirez-Arcos S1. Fatal false-negative transfusion infection involving a buffy coat platelet pool contaminated with biofilm-positive *Staphylococcus epidermidis*: a case report. *Transfusion.* 2015 Oct;55(10):2384-9.

- Kresken M, Becker K, Seifert H, Leitner E, Körber-Irrgang B, von Eiff C, Löschmann PA; Study Group. Resistance trends and in vitro activity of tigecycline and 17 other antimicrobial agents against Gram-positive and Gram-negative organisms, including multidrug-resistant pathogens, in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Sep;30(9):1095-103.
- Lamers RP, Muthukrishnan G, Castoe TA, Tafur S, Cole AM, Parkinson CL. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. *BMC Evol Biol*. 2012 Sep 6;12:171.
- Lampe DJ, Akerley BJ, Rubin EJ, Mekalanos JJ, Robertson HM. Hyperactive Transposase mutants of the Himar1 mariner transposon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28;96(20):11428-33.
- Lepointeur M1, Royer G, Bourrel AS, Romain O, Duport C, Doucet-Populaire F, Decousser JW. Prevalence of resistance to antiseptics and mupirocin among invasive coagulase-negative staphylococci from very preterm neonates in NICU: the creeping threat? *J Hosp Infect*. 2013 Apr;83(4):333-6.
- Li H, Xu L, Wang J, Wen Y, Vuong C, Otto M, Gao Q. Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infect Immun*. 2005 May;73(5):3188-91.
- Li M, Rigby K, Lai Y, Nair V, Peschel A, Schitteck B, Otto M. *Staphylococcus aureus* mutant screen reveals interaction of the human antimicrobial peptide dermcidin with membrane phospholipids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Oct;53(10):4200-10.
- Linnes JC, Ma H, Bryers JD. Giant extracellular matrix binding protein expression in *Staphylococcus epidermidis* is regulated by biofilm formation and osmotic pressure. *Curr Microbiol*. 2013 Jun;66(6):627-33.
- Ma XX, Wang EH, Liu Y, Luo EJ. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci (CoNS): emergence of teicoplanin-non-susceptible CoNS strains with inducible resistance to vancomycin. *J Med Microbiol*. 2011 Nov;60(Pt 11):1661-8.
- Macintosh RL, Brittan JL, Bhattacharya R, Jenkinson HF, Derrick J, Upton M, Handley PS. The terminal A domain of the fibrillar accumulation-associated protein (Aap) of *Staphylococcus epidermidis* mediates adhesion to human corneocytes. *J Bacteriol*. 2009 Nov;191(22):7007-16.
- Mack D, Nedelmann M, Krokotsch A, Schwarzkopf A, Heesemann J, Laufs R. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun*. 1994 Aug;62(8):3244-53.

- Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R. 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 Jan;178(1):175-83.
- Mack D, Rohde H, Dobinsky S, Riedewald J, Nedelmann M, Knobloch JK, Elsner HA, Feucht HH. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun.* 2000 Jul;68(7):3799-807.
- Mack D, Bartscht K, Fischer C, Rohde H, de Grahl C, Dobinsky S, Horstkotte MA, Kiel K, Knobloch JK. Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Methods Enzymol.* 2001;336:215-39.
- Mack D, Rohde H, Harris LG, Davies AP, Horstkotte MA, Knobloch JK. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs.* 2006 Apr;29(4):343-59.
- Mack D, Davies AP, Harris LG, Knobloch JK, Rohde H. *Staphylococcus epidermidis* Biofilms: Functional Molecules, Relation to Virulence, and Vaccine Potential. *Top Curr Chem.* 2009;288:157-82.
- Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE, Fridkin SK; Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med.* 2014 Mar 27;370(13):1198-208.
- McCrea KW, Hartford O, Davis S, Eidhin DN, Lina G, Speziale P, Foster TJ, Höök M. The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.* 2000 Jul;146 (Pt 7):1535-46.
- McKevitt AI, Bjornson GL, Mauracher CA, Scheifele DW. Amino acid sequence of a deltalike toxin from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 1990 May;58(5):1473-5.
- Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, Raad II, Rijnders BJ, Sherertz RJ, Warren DK. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009 Jul 1;49(1):1-45.
- Molina J, Peñuela I, Lepe JA, Gutiérrez-Pizarraya A, Gómez MJ, García-Cabrera E, Cordero E, Aznar J, Pachón J. Mortality and hospital stay related to coagulase-negative Staphylococci bacteremia in non-critical patients. *J Infect.* 2013 Feb;66(2):155-62.

- Monk IR, Shah IM, Xu M, Tan MW, Foster TJ. Transforming the untransformable: application of direct transformation to manipulate genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. MBio. 2012 Mar 20;3(2). pii: e00277-11.
- Nilsson M, Frykberg L, Flock JI, Pei L, Lindberg M, Guss B. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun. 1998 Jun;66(6):2666-73.
- Nilsson M, Christiansen N, Høiby N, Twetman S, Givskov M, Tolker-Nielsen T. A mariner transposon vector adapted for mutagenesis in oral streptococci. Microbiologyopen. 2014 Jun;3(3):333-40.
- Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol Microbiol. 2003 Jun;48(6):1429-49.
- Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. Annu Rev Genet. 2008;42:541-64.
- Ogston A. Micrococcus Poisoning. J Anat Physiol. 1882 Oct;17(Pt 1):24-58.
- Olaechea PM, Alvarez-Lerma F, Palomar M, Insausti J, López-Pueyo MJ, Martínez-Pellús A, Cantón ML; Grupo ENVIN-HELICS. [Impact of primary and intravascular catheter-related bacteremia due to coagulase-negative staphylococci in critically ill patients]. [Article in Spanish]. Med Intensiva. 2011 May;35(4):217-25.
- Oogai Y, Matsuo M, Hashimoto M, Kato F, Sugai M, Komatsuzawa H. Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in serum. Appl Environ Microbiol. 2011 Nov;77(22):8097-105.
- Otto M. Staphylococcal biofilms. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;322:207-28.
- Otto M. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol. 2009 Aug;7(8):555-67.
- Pajunen MI, Rasila TS, Happonen LJ, Lamberg A, Haapa-Paananen S, Kiljunen S, Savilahti H. Universal platform for quantitative analysis of DNA transposition. Mob DNA. 2010 Nov 26;1(1):24.
- Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu Rev Microbiol. 1994;48:585-617.
- Pei L, Palma M, Nilsson M, Guss B, Flock JI. Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun. 1999 Sep;67(9):4525-30.
- Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat Rev Microbiol. 2006 Apr;4(4):295-305.

Prusseit J, Simon M, von der Brelie C, Heep A, Molitor E, Volz S, Simon A. Epidemiology, prevention and management of ventriculoperitoneal shunt infections in children. *Pediatr Neurosurg*. 2009;45(5):325-36.

Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, Qu D. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*. 2007 Jul;153(Pt 7):2083-92.

Ramasubbu N, Thomas LM, Ragunath C, Kaplan JB. Structural analysis of dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Mol Biol*. 2005 Jun 10;349(3):475-86.

Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med*. 2012 Dec;272(6):541-61.

Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK, Zander AR, Mack D. 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 Dec;42(12):5614-9.

Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, Knobloch JK, Heilmann C, Herrmann M, Mack D. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol*. 2005 Mar;55(6):1883-95.

Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, Scherpe S, Davies AP, Harris LG, Horstkotte MA, Knobloch JK, Ragunath C, Kaplan JB, Mack D. 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 Mar;28(9):1711-20.

Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U, Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol*. 2010 Jan;89(1):103-11.

Rosenstein R, Götz F. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie*. 2000 Nov;82(11):1005-14.

Rosenthal VD, Maki DG, Mehta Y, Leblebicioglu H, Memish ZA, Al-Mousa HH, Balkhy H, Hu B, Alvarez-Moreno C, Medeiros EA, Apisarnthanarak A, Raka L, Cuellar LE, Ahmed A, Navoa-Ng JA, El-Kholy AA, Kanj SS, Bat-Erdene I, Duszynska W, Van Truong N, Pazmino LN, See-Lum LC, Fernández-Hidalgo R, Di-Silvestre G, Zand F, Hlinkova S, Belskiy V, Al-Rahma H, Luque-Torres MT, Bayraktar N, Mitrev Z, Gurskis V, Fisher D, Abu-Khader IB, Berechid K, Rodríguez-Sánchez A, Horhat FG, Requejo-Pino O, Hadjieva N, Ben-Jaballah N, García-Mayorca E, Kushner-Dávalos L, Pasic S, Pedrozo-Ortiz LE, Apostolopoulou E, Mejía N, Gamar-Elanbya MO, Jayatilleke K, de Lourdes-Dueñas M, Aguirre-Avalos G;

International Nosocomial Infection Control Consortium. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007-2012. Device-associated module. *Am J Infect Control*. 2014 Sep;42(9):942-56.

Sadovskaya I, Vinogradov E, Li J, Jabbouri S. Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus epidermidis* RP62A, a reference biofilm-positive strain. *Carbohydr Res*. 2004 Jun 1;339(8):1467-73.

Sadovskaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G, Jabbouri S. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun*. 2005 May;73(5):3007-17.

Saleem BR, Meerwaldt R, Tielliu IF, Verhoeven EL, van den Dungen JJ, Zeebregts CJ. Conservative treatment of vascular prosthetic graft infection is associated with high mortality. *Am J Surg*. 2010 Jul;200(1):47-52.

Schommer NN, Christner M, Hentschke M, Ruckdeschel K, Aepfelbacher M, Rohde H. *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. *Infect Immun*. 2011 Jun;79(6):2267-76.

Sellman BR, Howell AP, Kelly-Boyd C, Baker SM. Identification of immunogenic and serum binding proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*. 2005 Oct;73(10):6591-600.

Shahrooei M, Hira V, Stijlemans B, Merckx R, Hermans PW, Van Eldere J. Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by rabbit polyclonal antibodies against the SesC protein. *Infect Immun*. 2009 Sep;77(9):3670-8.

Siméon S, Flécher E, Revest M, Niculescu M, Roussel JC, Michel M, Leprince P, Tattevin P. Left ventricular assist device-related infections: a multicentric study. *Clin Microbiol Infect*. 2017 Mar 18. pii: S1198-743X(17)30174-X. doi: 10.1016/j.cmi.2017.03.008. [Epub ahead of print]

Stackebrandt E, Koch C, Gvozdiak O, Schumann P. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int J Syst Bacteriol*. 1995 Oct;45(4):682-92.

Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1997 47.2:479-491.

Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001 Jul 14;358(9276):135-8.

Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. J Bacteriol. 2013 Apr;195(8):1645-55.

Tokars JJ. Predictive value of blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: implications for patient care and health care quality assurance. Clin Infect Dis. 2004 Aug 1;39(3):333-41.

Tormo MA, Martí M, Valle J, Manna AC, Cheung AL, Lasa I, Penadés JR. SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. J Bacteriol. 2005a Apr;187(7):2348-56.

Tormo MA, Knecht E, Götz F, Lasa I, Penadés JR. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? Microbiology. 2005b Jul;151(Pt 7):2465-75.

van Griethuysen A, Bes M, Etienne J, Zbinden R, Kluytmans J. International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2001 Jan;39(1):86-9.

von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect Dis. 2002 Nov;2(11):677-85.

Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. Microbes Infect. 2002 Apr;4(4):481-9.

Wang C, Li M, Dong D, Wang J, Ren J, Otto M, Gao Q. Role of ClpP in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. Microbes Infect. 2007 Sep;9(11):1376-83.

Wang X, Niu C, Sun G, Dong D, Villaruz AE, Li M, Wang D, Wang J, Otto M, Gao Q. ygs is a novel gene that influences biofilm formation and the general stress response of *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun. 2011 Mar;79(3):1007-15.

Weiser J, Henke HA, Hector N, Both A, Christner M, Büttner H, Kaplan JB, Rohde H. Sub-inhibitory tigecycline concentrations induce extracellular matrix binding protein Embp dependent *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and immune evasion. Int J Med Microbiol. 2016 Sep;306(6):471-8.

Welch WH. CONDITIONS UNDERLYING THE INFECTION OF WOUNDS. The American Journal of the Medical Sciences. 1891 102.5: 439-464.

Widerström M, Wiström J, Sjöstedt A, Monsen T. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Jan;31(1):7-20.

Wiechmann, C. 2016. *Staphylococcus epidermidis* Biofilmbildung in Gegenwart von Serum: genetische Charakterisierung funktioneller Determinanten. Veterinärmedizinische Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover 2016.

Williams RJ, Henderson B, Sharp LJ, Nair SP. Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun. 2002 Dec;70(12):6805-10.

Winstel V, Liang C, Sanchez-Carballo P, Steglich M, Munar M, Bröker BM, Penadés JR, Nübel U, Holst O, Dandekar T, Peschel A, Xia G. Wall teichoic acid structure governs horizontal gene transfer between major bacterial pathogens. Nat Commun. 2013;4:2345.

Winstel V, Kühner P, Krismer B, Peschel A, Rohde H. Transfer of plasmid DNA to clinical coagulase-negative staphylococcal pathogens by using a unique bacteriophage. Appl Environ Microbiol. 2015 Apr;81(7):2481-8.

Winstel V, Kühner P, Rohde H, Peschel A. Genetic engineering of untransformable coagulase-negative staphylococcal pathogens. Nat Protoc. 2016 May;11(5):949-59.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis. 2004 Aug 1;39(3):309-17.

Xia G, Maier L, Sanchez-Carballo P, Li M, Otto M, Holst O, Peschel A. Glycosylation of wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* by TarM. J Biol Chem. 2010 Apr 30;285(18):13405-15.

Xu L, Li H, Vuong C, Vadyvaloo V, Wang J, Yao Y, Otto M, Gao Q. Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun. 2006 Jan;74(1):488-96.

Yao Y, Sturdevant DE, Otto M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. J Infect Dis. 2005 Jan 15;191(2):289-98.

Zarb P, Coignard B, Griskeviciene J, Muller A, Vankerckhoven V, Weist K, Goossens M, Vaerenberg S, Hopkins S, Catry B, Monnet D, Goossens H, Suetens C; National Contact Points for the ECDC pilot point prevalence survey; Hospital Contact Points for the ECDC pilot point prevalence survey. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. Euro Surveill. 2012 Nov 15;17(46). pii: 20316.

8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Martin Aepfelbacher für die Möglichkeit, diese Dissertation im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchführen zu dürfen sowie für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Gerätschaften.

Für die Bereitstellung des Themas, der wissenschaftlichen Unterstützung und die Betreuung dieser Arbeit möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Holger Rohde danken.

Insbesondere möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die tolle Zusammenarbeit und Stimmung bedanken. Mein besonderer Dank für die ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung gilt Frau Gesche Kroll, deren Hilfe vor allem für die Durchführung des Screenings maßgeblich war. Bei Herrn Dr. med. Henning Büttner möchte ich mich für die intensive Einarbeitungshilfe bedanken.

Für eine besondere persönliche Unterstützung gilt mein Dank meinem Freund Oliver Steinmetz, der mir immer den nötigen Rückhalt gab. Meiner Mutter Gerda Hector möchte ich ganz besonders für das hingebungsvolle Kümmern um unsere Tochter während der letzten Phase der Arbeit danken, wodurch sie mir den nötigen zeitlichen Freiraum verschafft hat. Auch bei allen Freunden, die für mich da waren, möchte ich mich bedanken.

9. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

10. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Nina Hector, Oktober 2018, Hamburg