

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene  
Zentrum für Diagnostische Medizin

Leitung: Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher

## **Untersuchung zur Expressionsregulation des Small basic protein (Sbp) bei Biofilm-bildenden *Staphylococcus epidermidis***

**Dissertation**

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

vorgelegt von:

Christian Oluf Rasmus Krambeck  
aus Heidelberg

Hamburg, 2021

Die vorliegenden Experimente wurden von August 2016 bis Mai 2019 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Holger Rohde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.10.2021**

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

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp**

**Prüfungsausschuss, zweite Gutachter: Prof. Dr. Holger Rohde**

**ICH WIDME DIESE DOKTORARBEIT MEINEM VATER, MEINER MUTTER  
UND MEINER SCHWESTER ANNA.**

## Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG .....	6
1.1 Klinische Relevanz von <i>S. epidermidis</i> im Kontext Fremdmaterial-assoziiertes Infektionen .....	6
1.2 Biofilmbildung .....	7
1.2.1 Initiale Adhärenz .....	8
1.2.1.1 Serine-Aspartat Repeat Proteine (Sdr) .....	8
1.2.1.2 AltE, Aae und eDNA .....	9
1.2.2 Akkumulationsphase .....	9
1.2.2.1 Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) .....	9
1.2.2.1.1 Regulation von PIA .....	10
1.2.2.2 Extracellular matrix binding protein (Embp) .....	12
1.2.2.3 Accumulation associated protein (Aap) .....	12
1.2.2.4 Small Basic Protein (Sbp) .....	13
1.2.3 Biofilmreifung ( <i>detachment</i> ) .....	17
1.2.3.1 Phenol-soluble modulins (PSMs) .....	18
1.2.4 Regulation der Biofilmbildung .....	18
1.2.4.1 Das Agr-System .....	18
1.2.4.2 Sigma B ( $\sigma$ B) .....	21
1.2.4.3 Sar Gruppe .....	21
1.3 Fragestellung .....	23
2. MATERIAL UND METHODEN .....	24
2.1 MATERIAL .....	24
2.1.1 Laborgeräte .....	24
2.1.2 Software .....	25
2.1.4 Chemikalien .....	26
2.1.5 Medien und Antibiotika .....	27
2.1.6 Puffer .....	28
2.1.7 Enzyme .....	30
2.1.8 Kits .....	30
2.1.9 Stämme .....	30
2.1.10 Phagen .....	32
2.1.11 Primer .....	33
2.1.12 Plasmide .....	34
2.1.13 Antikörper .....	34
2.2 METHODEN .....	35
2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden .....	35

2.2.1.1 Anzucht von Bakterienstämmen und Stammhaltung .....	35
2.2.1.2 Differenzierung von Bakterien mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF).....	35
2.2.2 Phänotypische Analysen.....	35
2.2.2.1 Biofilm Test .....	35
2.2.3 Molekularbiologische Methoden .....	36
2.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse .....	36
2.2.3.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	36
2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von verdauten Plasmiden .....	37
2.2.4 Transformation von Bakterien .....	37
2.2.4.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	37
2.2.4.2 Chemische Transformation mittels Hitze-Impuls .....	38
2.2.4.3 Herstellung elektrokompenter <i>S. aureus</i> Zellen .....	38
2.2.4.4 Elektroporation .....	38
2.2.4.5 Phagengewinnung .....	39
2.2.4.6 Phagentitration.....	39
2.2.4.7 Phagentransduktion.....	40
2.2.5 RNA Präparation .....	40
2.2.5.1 Messung der RNA Konzentration .....	41
2.2.5.2 DNase Verdau.....	41
2.2.5.3 cDNA Synthese .....	41
2.2.5.4 Quantitative PCR (qPCR).....	42
2.2.6 PCR .....	43
2.2.7 Proteinchemische Methoden .....	44
2.2.7.1 Proteinpräparation .....	44
2.2.7.2 Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	44
2.2.7.3 Western Blot .....	46
2.2.7.4 Immundetektion.....	46
2.2.8 Durchflusszytometrie (FACS) .....	47
3. ERGEBNISSE .....	48
3.1 Nachweis der <i>S. epidermidis</i> Sbp-Produktion im Western Blot.....	48
3.1.1 Analyse der Sbp-Produktion in <i>S. epidermidis</i> 1585 und 1457 .....	48
3.1.2 Untersuchung der Sbp-Produktion in den Regulator-Mutanten <i>S. epidermidis</i> 1585 $\Delta$ <i>sarA</i> , 1457 $\Delta$ <i>sarA</i> und 1457 $\Delta$ <i>agr</i> .....	50
3.2 Quantitative Analyse der <i>sbp</i> -Transkription mittels real-time-PCR.....	52
3.2.1 Analyse der zeitlichen <i>sbp</i> -Transkription innerhalb <i>S. epidermidis</i> 1585 und 1457 ....	52
3.2.2 Vergleich der <i>sbp</i> -Transkription zwischen <i>S. epidermidis</i> 1457 und 1585.....	54
3.2.3 Vergleich der <i>sbp</i> -Transkription in <i>S. epidermidis</i> 1457 und 1585 mit den korrespondierenden Mutanten $\Delta$ <i>agr</i> und $\Delta$ <i>sarA</i> .....	56

<b>3.3 Untersuchung der <i>sbp</i>-Transkription in lebenden Biofilmen mittels eines Gfp-basierten Reportersystems.....</b>	<b>59</b>
<b>3.3.1 Erzeugung von Stämmen zur Untersuchung der <i>sbp</i>-Promotoraktivität mittels eines GFP-basierten Reporterassays .....</b>	<b>59</b>
<b>3.4 FACS Analyse zur Analyse der <i>sbp</i>-Expression auf Einzelzellebene.....</b>	<b>61</b>
<b>3.4.1 Vergleich der differentiellen <i>sbp</i>-Promotoraktivität in 1457 und 1585 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach statischer Biofilmkultur und Schüttelkultur .....</b>	<b>61</b>
<b>3.4.2 Einfluss von Mutationen der Regulatoren <i>agr</i> und <i>sarA</i> auf die differenzielle <i>sbp</i>-Promotoraktivität in <i>S. epidermidis</i> 1457 und 1585 .....</b>	<b>63</b>
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>65</b>
<b>4.1 Gibt es eine Wachstumsphasen-abhängige Steuerung der Sbp-Expression? .....</b>	<b>67</b>
<b>4.2 Ist die Produktion von Sbp unabhängig vom Anzuchtmodus? .....</b>	<b>68</b>
<b>4.3 Haben die globalen Regulatoren Agr und SarA Einfluss auf die Sbp-Expression? .....</b>	<b>69</b>
<b>4.4 Analyse der <i>sbp</i>-Expression auf Subpopulationsebene .....</b>	<b>71</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>73</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>75</b>
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>77</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>79</b>
<b>9. DANKSAGUNG.....</b>	<b>90</b>
<b>10. LEBENSLAUF .....</b>	<b>92</b>
<b>11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>93</b>

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Klinische Relevanz von *S. epidermidis* im Kontext Fremdmaterial-assoziiertes Infektionen

Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) besiedeln die Haut eines jeden Menschen. Die Spezies *Staphylococcus epidermidis* ist unter den KNS die am weitesten verbreitete Spezies und besiedelt sowohl feuchte, fettende und trockene Nischen der Haut (Otto, 2012, Oh et al., 2016). Als Bestandteil der Normalflora der Haut besitzt *S. epidermidis* schützende Eigenschaften, die am ehesten durch Konkurrenz mit potentiell hautpathogenen Erregern erwachsen. Beispielsweise konnten einige Studien einen protektiven Effekt von *S. epidermidis* gegenüber *Staphylococcus aureus* induzierter Hautinflammation bei Patienten mit atopischer Dermatitis nachweisen (Williams and Gallo, 2015).

Trotz der herausragenden Bedeutung von *S. epidermidis* als Bestandteil der physiologischen Hautflora, hat dieser in den letzten Jahrzehnten vor allem als Erreger nosokomialer Infektionen an Bedeutung gewonnen. Insbesondere die Entwicklung der modernen Intensivmedizin und Onkologie geht mit der Zunahme eines neuen, hoch-vulnerablen Patientenkollektivs einher, welches durch seine Grunderkrankung sowie invasive, Fremdmaterial-gestützte medizinische Maßnahmen einem besonderen Risiko für die Entwicklung nosokomialer Infektionen unterliegt (Horasan et al., 2011, Rubio et al., 1994, von Eiff et al., 2006, von Eiff et al., 2005, Becker et al., 2014). So entwickelten sich KNS und insbesondere *S. epidermidis* zu den häufigsten Erregern nosokomialer Blutstrominfektionen (BSI) (Hugonnet et al., 2004, Geffers and Gastmeier, 2011). Bei allogent-stammzelltransplantierten Kindern lag der Prozentsatz an *S. epidermidis* Blutstrominfektionen (ZVK-assoziierten Infektionen sog. CLABSI und BSI) in einer Studie bei 77.7% (Amancio et al., 2020). Schätzungen gehen von bis zu 414 000 jährlichen Fällen von nosokomialen BSI in Europa mit einer Mortalität von bis zu 32% aus (Goto and Al-Hasan, 2013). Zentralvenöse Katheter sind hier der häufigste Fokus (Johnston and Conly, 2005).

Neben zentralen und peripheren venösen Kathetern sind Fremdmaterialien, wie künstliche Herzklappen (Hill et al., 2006, Alonso-Valle et al., 2010), Liquorshunts (Scheithauer et al., 2009) und künstliche Gelenke (Zimmerli et al., 2004, Peel et al., 2012), häufige Foci schwerer, nosokomial erworbener Infektionen (Hoiby et al., 2015, Becker et al., 2014, Becker et al., 2020).

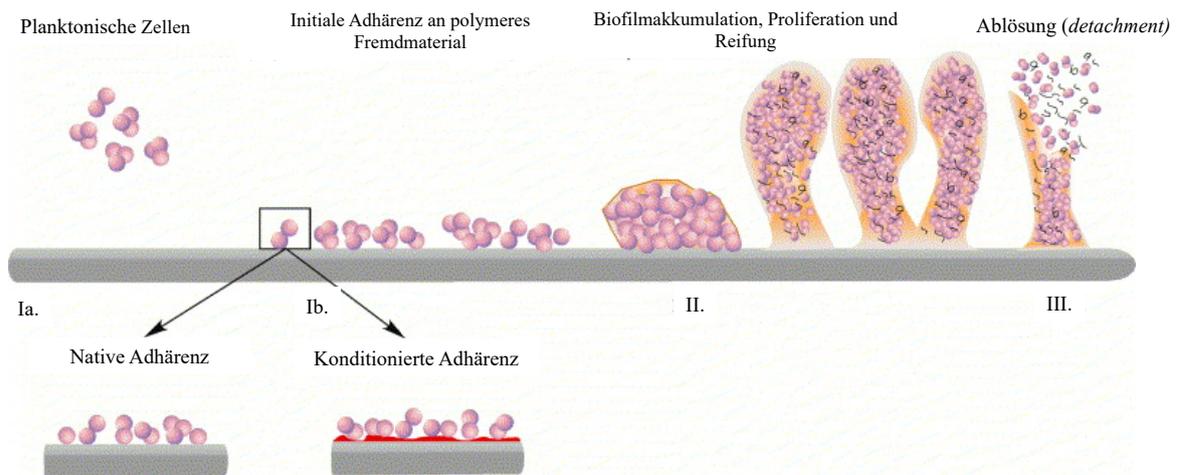
Beispielsweise erleiden bis zu 2.5 % der Patienten nach Implantation einer Hüft- oder Knieendoprothese im späteren Verlauf eine Infektion (15-18). Auch hier ist *S. epidermidis* einer der führenden Erreger mit einem Anteil von bis zu 30% (Tande and Patel, 2014).

Die besondere Bedeutung von *S. epidermidis* als Erreger dieser Infektionen erklärt sich einerseits aus seinem Standort auf der menschlichen Haut. Die Inokulation des Erregers auf das etwaige Fremdmaterial geschieht oft schon bei der primären Implantation (O'Toole et al., 2000, Otto, 2009). Andererseits ist seine Fähigkeit, Biofilme auf abiotischen Oberflächen zu bilden, von herausragender Bedeutung.

## **1.2 Biofilmbildung**

Biofilme sind residente bakterielle Populationen, welche durch eine komplexe extrazelluläre Matrix, bestehend aus Kohlenhydrat-basierten Molekülen, Proteinen und extrazellulärer DNA, aufgebaut werden. Innerhalb dieser Struktur liegt die einzelne Bakterienzelle in einem, im Vergleich zum planktonischen Lebensstil, veränderten Zustand eingebettet (Resch et al., 2005, Yao et al., 2005a). Innerhalb des Biofilms zeigen *S. epidermidis* Zellen eine erhöhte Toleranz gegenüber Antibiotikaexposition und sind zumindest zum Teil vor Phagozytose durch Makrophagen geschützt. Biofilmfaktoren, wie zum Beispiel PIA oder Aap (s. u.), reduzieren die Immunantwort von Makrophagen, sodass es zu einer signifikant niedrigeren Expression von NF- $\kappa$ B (um 88%) und Il-1 $\beta$  (um 68-83%) kam. Durch  $\gamma$ -Polyglutaminsäure (PGA) ist in *S. epidermidis* zusätzlich eine Biofilmbildung in toxischen, hyperosmolaren Umgebungen möglich (Schommer et al., 2011, Costerton et al., 1999, Kocianova et al., 2005, Foster, 2005). Der Schutz durch die Biofilmmatrix sowie die damit einhergehende Wachstumsform des Erregers erklären den chronischen Verlauf der meisten Biofilm-assoziierten Infektionen (Yao et al., 2005a).

Die Biofilmbildung lässt sich in mehrere, nacheinander ablaufende Phasen unterteilen: Initiale Adhärenz, Biofilmmakkumulation und Biofilmauflösung (*detachment*) (Abbildung 2). Diese Phasen sind nicht klar voneinander trennbar, sondern gehen fließend ineinander über (Becker et al., 2014, Mack et al., 2008, Otto, 2009, Rohde et al., 2010).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ablaufs der Biofilmbildung mit Beteiligung der jeweiligen Biofilmfaktoren von *S. epidermidis*.** Die einzelnen Phasen der Biofilmbildung gehen fließend ineinander über. Biofilmbildung wird durch die Adhärenz der frei im Blutstrom zirkulierenden Erreger (**Ia.**) an der zu besiedelnden Oberfläche/Fremdmaterial initiiert (**Ib.**). Hierbei wird die native (Besiedelung von Fremdmaterial wie Plastik/Polyethylen) von der konditionierten Adhärenz (Besiedelung von Fremdmaterialien, die mit einer Schicht extrazellulärer Matrix wie Fibronectin, Kollagen, Vitronectin etc. umschlossen sind) unterschieden. Hieran sind unspezifische physiko-chemische Mechanismen wie auch spezifische Faktoren (AtlE, Aae, Teichonsäuren) beteiligt. Danach beginnt unter Vermittlung von spezifischen Proteinen, Exopolysacchariden und eDNA die Akkumulation und Reifung des Biofilms (**II.**). Die Freisetzung von Bakterien aus dem Biofilm (*detachment*) (**III.**) erfolgt unter anderem durch spaltende Enzyme und Tenside (Vuong and Otto, 2002b). **Abbildung adaptiert von Vuong C und Otto M; 2004 (Vuong and Otto, 2002b)**

### 1.2.1 Initiale Adhärenz

In der ersten Phase der Adhärenz wird die Anhaftung von *S. epidermidis* auf artifiziellen (Plastik/Polyethylen), artifiziell-konditionierten (artifizielle Oberflächen bedeckt mit humaner extrazellulärer Matrix) und natürlichen Oberflächen (z.B. Knochen) hauptsächlich durch Protein-Faktoren und eDNA vermittelt. (Becker et al., 2014, Heilmann et al., 1997, Büttner et al., 2015, Rohde et al., 2010, Rohde et al., 2005, Rohde et al., 2007, Mack et al., 2008, Schaeffer et al., 2015, Büttner et al., 2020).

#### 1.2.1.1 Serine-Aspartat Repeat Proteine (Sdr)

Serine-Aspartat Repeat (Sdr) Proteine gehören zu der übergeordneten Gruppe der "Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules" (MSCRAMMs), welche mit ihrer LPXTG-Motif-Domäne kovalent in der Zellwand verankert sind und gleichzeitig an spezifische Komponenten der Extrazellulären Matrix des Biofilms binden (Adhärenz an artifizielle konditionierte Oberflächen) (Pei et al., 1999, Nilsson et al., 1998, Hartford et al., 2001). SdrG hat eine Bindedomäne für die  $\beta$ -Kette des Fibrinogens und wird

deshalb auch “Fibrinogen binding protein” (Fbe) genannt, SdrF bindet an Kollagen (Arrecubieta et al., 2007, Bowden et al., 2008). Neben den Sdr Proteinen spielt das 1 Mda “Extracellular matrix binding protein” (Embp) mit seiner Bindung am Fibronectin bei der initialen Adhärenz eine Rolle (Williams et al., 2002).

#### **1.2.1.2 AtlE, Aae und eDNA**

AtlE ist eine 115 kDa schwere Hydrolase und bindet zum einen direkt an Polyethylen (artifiziiell-konditionierten Oberflächen) und spaltet zum anderen als Hydrolase Zellwand-Peptidoglykane und führt damit zu einer Depolarisation der Zellwand (Otto, 2014, Biswas et al., 2006). Hierdurch wird das Anlagern an das unpolare Polyethylen, als auch die Freisetzung von extrazellulärer DNA (eDNA) begünstigt (Izano et al., 2008, Qin et al., 2007, Whitchurch, 2002). Extrazelluläre DNA (eDNA) spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der initialen Adhärenz. Das Hinzufügen von DNase führte in Versuchen dazu, dass Biofilme in *S. epidermidis* destabilisiert werden konnten. Extrazelluläre DNA wird in *S. epidermidis* unter anderem durch das Autolysin AtlE freigesetzt. Zusätzlich bindet AtlE direkt an Polyethylen sowie an den ECM-Bestandteil Vitronectin (Izano et al., 2008, Qin et al., 2007, Whitchurch, 2002). Ein weiteres Autolysin ist das 35 kDa Zellwand-assoziierte Autolysin und Adhäsine Aae, welches bakteriolytisch aktiv ist und ebenfalls an Vitronectin, Fibrinogen und Fibronectin bindet (Heilmann et al., 2003, Foster, 2020).

#### **1.2.2 Akkumulationsphase**

An die Phase der initialen Adhärenz schließt sich die Phase der Akkumulation an. In dieser steht die Reifung des Biofilms zu einem mehrschichten, komplexen Konsortium im Vordergrund. In der Akkumulationsphase werden interzelluläre Adhäsine exprimiert, und es entsteht durch Zell-Zellinteraktionen ein mehrschichtiger Biofilm (Costerton et al., 1995). Proteine, eDNA und das *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA) sind für die Akkumulation und Reifung des Biofilms von besonderer Bedeutung (Becker et al., 2020).

##### **1.2.2.1 Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA)**

*Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA) war einer der ersten spezifischen Faktoren, der biochemisch charakterisiert und für den eine unmittelbare Beteiligung an der *S. epidermidis* Biofilmbildung gezeigt werden konnte.

Die Bedeutung von PIA konnte im Ratten-ZVK-Infektionsmodell gezeigt werden, in welchem PIA-positive Stämme signifikant häufiger zu Abszessen führten oder ZVK-

Infektionen auslösten, als PIA-negative Stämme. Zugleich haben PIA-positive Stämme eine hohe klinische Prävalenz (73%) (Rohde et al., 2007), und man ging zeitweise davon aus, dass PIA für die Biofilmbildung unabdingbar sei (Rohde et al., 2007, Rupp et al., 1999, Mack et al., 1996). Es konnte jedoch später gezeigt werden, dass es auch klinisch relevante PIA-negative Stämme gibt, welche einen hauptsächlich Protein-basierten Biofilm ausbilden. Ein Beispiel ist der Stamm *S. epidermidis* 5179, bei welchem das Protein Aap eine bedeutende Rolle spielt (s. u.) (Rohde et al., 2005).

PIA kann nach Aufreinigung aus lebenden Biofilmen, mittels chromatographischer Methoden, in zwei biochemisch unterschiedliche Formen getrennt werden, welche als Polysaccharid I und Polysaccharid II benannt werden (Mack et al., 1994). Polysaccharid II macht 80% des gesamten PIAs aus (Mack et al., 1996). 80-85% des Polysaccharids II sind N-acetyliert und deshalb negativ geladen. 20% der nicht-acetylierten Enden sind positiv geladen und können mit den negativ geladenen Teichonsäuren, welche sich auf der Zellwandoberfläche der Bakterien befinden, elektrostatisch interagieren und somit die interzelluläre Adhärenz verstärken (Vuong et al., 2004, Kaplan et al., 2004, Becker et al., 2014). Zusätzlich wirkt PIA auch als Hämagglutinin, also als Virulenzfaktor, der Blutzellen verklumpen lässt (Fey et al., 1999). Die Synthese von PIA erfolgt durch das *icaADBC* Operon, wobei IcaA und IcaD Aminoglycan-Monomere enzymatisch elongieren und IcaC die entstandenen Ketten exportiert. IcaB ist für die Deacetylierung extrazellulär zuständig (Vuong et al., 2004, Otto, 2009). Die PIA-Synthese wird durch viele Regulatoren beeinflusst (z. B. IcaR, SarA, and  $\sigma^B$ ) (Sadykov et al., 2008).

#### **1.2.2.1.1 Regulation von PIA**

Die transkriptionelle Regulation des *icaADBC*-Operon wurde eingehend untersucht. Hierbei sind neben dem Tricarbonsäure (TCA)-Zyklus und weiteren Regulatoren vor allem SarA und der Stressfaktor Sigma B beteiligt (Knobloch et al., 2004).

*IcaR* ist der primäre Negativregulator von PIA, auf den viele globale Regulatoren wirken. Über ihn nimmt der TCA-Zyklus Einfluss auf die PIA-Synthese, genauso wie Sigma B. SarA bildet eine Ausnahme, da es direkt auf IcaA wirkt.

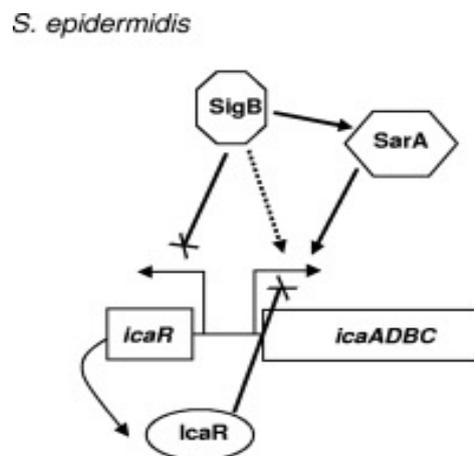
Der Tricarbonsäure (TCA)-Zyklus stellt eine direkte Verbindung zwischen PIA Produktion und dem Metabolismus des Bakteriums, bzw. dessen Umfeldes, dar. Wird dieser Zyklus durch Stress (Eisenmangel, Calciummangel etc.) deaktiviert, resultiert daraus eine starke

Enthemmung der PIA-Produktion (Abbildung 2) (Vuong et al., 2005, Sadykov et al., 2008, Mekalanos, 1992).

Sigma B ist ein weiterer Stressregulator, welcher zum Beispiel durch NaCl oder Alkohol aktiviert wird und dann zu einer verstärkten Biofilmbildung und PIA Produktion führt (Abbildung 2) (Vuong and Otto, 2002a, Knobloch et al., 2001, Wang et al., 2010).

Als dritter starker Effektor des *icaADBC*-Operon gilt SarA. SarA bindet hierbei nicht an *icaR*, den Hautregulator, sondern hat eine hohe Affinität zu *icaA*, ist also ein direkter Regulator (s. u.). SarA induziert die Transkription am *icaADBC*-Operon (Tormo et al., 2005). Zu der Gruppe der Sar Paralogen gehört neben SarA auch SarZ und SarX.

SarZ scheint die Biofilmbildung durch die Induktion des *icaADBC* Operons in *S. epidermidis* zu fördern, die genaue Interaktion konnte bisher noch nicht gezeigt werden (Wang et al., 2008a). SarZ steigert zusätzlich die Virulenz von *S. epidermidis*, wie im Ratten-Modell gezeigt werden konnte (Wang et al., 2010, Wang et al., 2008b). SarX wirkt direkt am *icaADBC* Operon und erhöht dort ebenfalls die Transkription (Rowe et al., 2011).



**Abbildung 2: Diagramm der Regulation von *icaR* und *icaADBC* in *S. epidermidis*.** Linien mit Pfeil stellen Aktivierungen da. Linien, die mit einem “x” enden stehen für Repression. Gestrichelte Linien zeigen eine geringe Aktivierung bzw. Repression (Cerca et al., 2008). **Abbildung entnommen aus Cerca et al. 2008 (Cerca et al., 2008)**

Neben den PIA-abhängigen Biofilmen gibt es ebenfalls PIA-unabhängige Biofilme. Bei diesen Protein-basierten Biofilmen spielen Faktoren wie AtlE (s.o.), Embp oder Aap und extrazelluläre DNA (s.o.) eine Rolle (Rohde et al., 2005, Christner et al., 2010, Büttner et al., 2020, Büttner et al., 2015).

### **1.2.2.2 Extracellular matrix binding protein (Embp)**

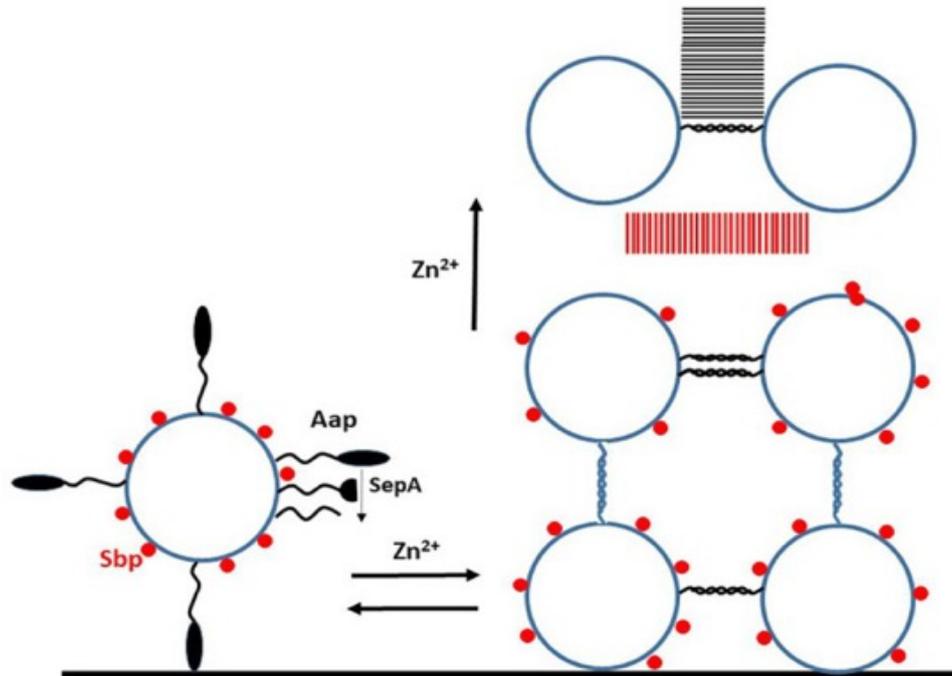
Das Extracellular matrix binding protein (Embp) ist ein 1 MDa großes Protein und besitzt 21 Found-In-Various-Architectures (FIVAR) und 38 G-related-albumin-binding (GA) Domänen (Christner et al., 2010). Embp nimmt auf die initiale Adhärenz und auf die Akkumulation Einfluss.

Die FIVAR- und GA-Domänen sind für die Bindung an Fibronectin verantwortlich und somit bedeutsam für die initiale Adhärenz (Christner et al., 2010). Fibronectin (250kDa) ist ein ubiquitär vorkommendes Protein der extrazellulären Matrix im menschlichen Körper. Bis jetzt wurden ca. 100 Fibronectin-bindende Proteine identifiziert und die Funktion von Embp als interzelluläres Adhäsion mit diesen konnte gezeigt werden (Christner et al., 2010, Prabhakaran et al., 2009, Büttner et al., 2020). Das externe Hinzufügen von FIVAR-GA Fragmenten erhöhte ebenfalls die interzelluläre Adhäsion und damit ebenfalls die Akkumulation (Christner et al., 2010, Büttner et al., 2020, Christner et al., 2012). Interessanterweise wird Embp nicht regelhaft unter Standardkulturbedingungen *in vitro* (z.B. im Kohlenstoff-reichen Tryptic Soy Medium) exprimiert, sondern erst in Anwesenheit von Serum (Christner et al., 2010). In Serum konnte erst durch die Inaktivierung von *sarA* in 1585 ein Biofilm-positiver Phänotyp erzeugt werden. SarA scheint somit ein Negativregulator von Embp zu sein (s.u.) (Christner et al., 2012). Mit Hilfe von Embp konnten klinische Isolate einen PIA-negativen und Aap-negativen Biofilm bilden (Christner et al., 2010).

### **1.2.2.3 Accumulation associated protein (Aap)**

Das *Accumulation associated protein* (Aap) ist ein 140-kDa Oberflächenprotein mit LPXTG-Motif und damit fest an der Zellwand verankert (Heilmann et al., 1997). Es besteht aus zwei Domänen, der A- und der B-Domäne. Während der Adhärenzphase bindet Aap über die Domäne A an abiotischen Oberflächen (Conlon et al., 2014, Foster, 2020). Nach dem enzymatischen Abspalten der A-Domäne durch die Matrixmetalloprotease SepA in der Akkumulationsphase wird Aap zu einem funktionell aktiven, interzellulären Adhäsion (Abbildung 3) (Rohde et al., 2005, Paharik et al., 2017). Es zeigt sich, dass ein Biofilm-negativer Stamm durch *in-Trans* Expression der Domäne B Biofilm-positiv wurde (Rohde et al., 2005, Conrady et al., 2008, Geoghegan et al., 2010). Aap ist in der Lage, unabhängig von PIA und Embp, einen Biofilm zu bilden. Die A-Domäne scheint ebenfalls bei der initialen Adhärenz an Keratinozyten eine Rolle zu spielen und mit Sbp zu interagieren (s.u.)

(Macintosh et al., 2009, Decker et al., 2015). Eine weitere Interaktion besteht zwischen Aap und dem Small Basic Protein (Sbp) (Abbildung 3) (Decker et al., 2015).



**Abbildung 3: Interaktionen von Aap innerhalb der Biofilmbildung:** Die intakte A-Domäne ermöglicht die Adhärenz an abiotischen Oberflächen. In der Akkumulationsphase wird die Domäne A durch SepA abgespalten, sodass die Domäne-B als Adhäsion die Akkumulation fördert. Das Small Basic Protein (Sbp) fördert die Zink-abhängige Akkumulation zwischen den B-Domänen, sodass sich Amyloidfibrillen bilden (Foster, 2020). **Abbildung entnommen aus Foster 2020 (Foster, 2020)**

#### 1.2.2.4 Small Basic Protein (Sbp)

Das Small Basic Protein (Sbp) konnte erst kürzlich als weiterer funktioneller Faktor der *S. epidermidis* Biofilmbildung identifiziert werden (Decker et al., 2015). Sbp scheint hierbei eine pleiotrope Funktion zu besitzen, die in der Phase der Adhärenz wie auch der Akkumulation eine Rolle spielt. Das Protein kann somit ebenfalls in die Gruppe der multifunktionalen Biofilmproteine eingeordnet werden (Decker et al., 2015).

Bei Sbp handelt es sich um ein 18 kDa Protein mit einem N-terminalen Exportsignal.

Das 513nt kleine *sbp*-Gen lässt sich ubiquitär in klinischen und kommensalen *S. epidermidis* Isolaten nachweisen (Decker et al., 2015). So waren in 52/52 der klinischen Isolate aus Protheseninfektionen und in 40/40 Stämmen aus Nasenabstrichen das *sbp*-Gen nachweisbar (Rohde et al., 2004, Rohde et al., 2007).

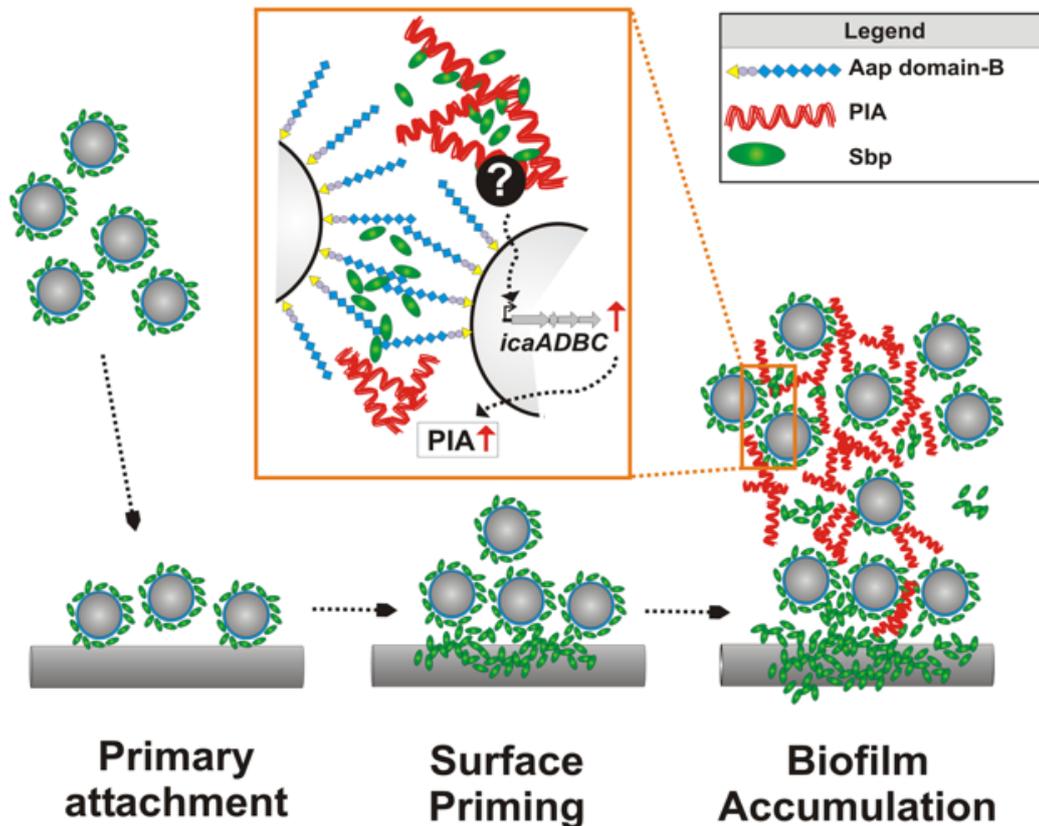
Die zentrale Rolle von Sbp in der Biofilm-abhängigen Pathogenese von *S. epidermidis* Fremdmaterialinfektionen konnte im Tiermodell nachgewiesen werden. Der *sbp*-positive und *icaADBC*-negative Stamm 1585 persistierte über sieben Tage im Maus-Venenkatheter-

Infektionsmodell, während der Sbp-knock-out Stamm 1585 $\Delta$ *sbp* keine Infektion etablieren konnte (Decker et al., 2015). Sbp ist somit essentiell für die Virulenz und die Entstehung von PIA-unabhängigen, Protein-basierten Biofilmen.

Die Untersuchung von Sbp in dem Stamm 1457, welcher einen hauptsächlich PIA-basierten Biofilm produziert, konnte weitere Erkenntnisse über die regulatorische Interaktion von Sbp mit anderen Bestandteilen des Biofilms erbringen.

Die Inaktivierung von *sbp* führt auf diesem genetischen Hintergrund zu einer Verminderung der Biofilmbildung *in vitro*. Die Reduktion der Biofilmbildung kann zumindest teilweise auf eine reduzierte PIA-Produktion in 1457 $\Delta$ *sbp* zurückgeführt werden (Decker et al., 2015). Die *in trans* Expression von *icaADBC* in 1457 $\Delta$ *sbp* unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors restituierte den Biofilm-Phänotyp. Zusätzlich war in 1457 $\Delta$ *sbp* das *icaADBC*-Operon signifikant niedriger exprimiert als in 1457. Sbp hat somit ebenfalls einen Einfluss auf die PIA-abhängige Biofilmbildung. Die genaue Interaktion von Sbp mit PIA und somit der genaue Einfluss auf die Akkumulation ist jedoch noch unbekannt (Abbildung 4) (Decker et al., 2015). Der Einfluss auf die PIA-abhängige Biofilmbildung durch Sbp ist jedoch wahrscheinlich eher indirekter Natur, und die regulatorischen Zusammenhänge bedürfen einer weiterführenden Analyse.

Zusätzlich spielt Sbp nicht nur während der Akkumulationsphase eine Rolle, sondern auch während der initialen Adhärenz und beim sogenannten „Surface Priming“. Unter Surface Priming versteht man das Anhaften von Sbp an Plastikoberflächen, um eine suffiziente Biofilmakkumulation zu gewährleisten (Abbildung 4). Sbp scheint die Adhärenz an Fremdmaterialien zu stabilisieren und in Knock-out Mutanten (1457 $\Delta$ *sbp*) durch das Hinzufügen von externen rekombinantem Sbp (rSbp) wieder herzustellen (Decker et al., 2015).



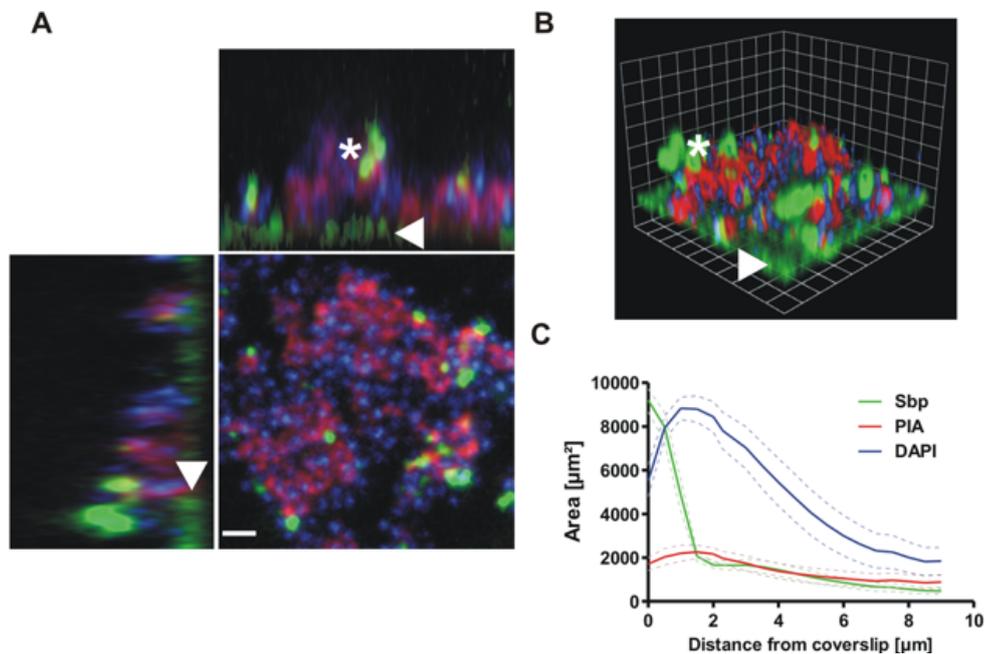
**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der einzelnen Funktionen von Sbp. Freie *S. epidermidis* mit zellwandgebundenen Sbp adhäreren an artifizierlicher Oberfläche. Beim “Surface Priming” stabilisiert Sbp die Bildung eines Biofilms als eine Verbindung zwischen Bakterien und Oberfläche. Während der “Biofilmmakкумуляtion” interagieren zwei Aap Moleküle über die Domäne B miteinander, wobei Sbp als Amyloidfibrille die nicht-kovalente Bindung zwischen den beiden Domänen erzeugt. Zusätzlich interagiert Sbp mit PIA auf bisher ungeklärte Weise (Decker et al., 2015). **Abbildung entnommen aus Decker et al. 2015 (Decker et al., 2015)**

Im weiteren Verlauf entdeckten Decker et al, dass Sbp mit der Domäne B von Aap interagiert, welche sowohl bei der Interaktion mit Keratinozyten (initiale Adhärenz) (Macintosh et al., 2009), wie auch als interzelluläres Adhäsion (Akkumulationsphase) eine Rolle spielt. Diese Beobachtung stützte die These des „Surface Priming (Phase zwischen initiale Adhärenz und Akkumulation) zusätzlich (Abbildung 4).

Biochemische Analysen zeigen, dass Sbp direkt mit der B-Domäne von Aap interagiert. Die B-Domäne von Aap ist funktional ein Zink-bindendes Protein, und die Bindung zu Sbp scheint durch Zink-Ionen begünstigt zu werden. Andere ebenfalls zweifach-positiv-geladene Ionen, wie Magnesium ( $Mg^{2+}$ ), weisen diesen Effekt nicht auf (Decker et al., 2015, Conrady et al., 2013). Die Bindung zwischen zwei B-Domänen von Aap wird somit durch Sbp ermöglicht, welches hierbei die Rolle von funktionellen Amyloidfibrillen übernimmt

und als Gerüstprotein fungiert (Wang et al., 2018, Decker et al., 2015). Somit hat Sbp zusätzlich Relevanz bei der Aap-abhängigen Biofilmbildung.

Decker et al. beobachten ebenfalls, dass die räumliche Verteilung von Sbp im Biofilm, anders als zum Beispiel bei PIA, nicht gleichmäßig ist, sondern dass es bestimmte Schichten im Biofilm gibt, in denen Sbp stärker vorhanden ist (Abbildung 5). In der Fluoreszenzmikroskopie von Sbp im Biofilm zeigt sich eine stärkere Anhäufung von Sbp in den tiefen, dem Plastik zugewandten Biofilmschichten, was vermuten lässt, dass Sbp bei der direkten Bindung an Fremdmaterialien eine Rolle spielt. Diese Beobachtung stützt noch einmal die Theorie des Surface Primings (Abbildung 3) (Decker et al., 2015).



**Abbildung 5: Verteilung von Sbp, PIA und *S. epidermidis* Bakterienzellen innerhalb des Biofilms.** Konfokale Laser Mikroskopie von einer *S. epidermidis* 1457 Übernachtskultur. Die Färbung der Bakterienzellen erfolgte mit dem ©-Farbstoff DAPI (blau), PIA und Sbp mit Hilfe von Alexa 568 wheat germ agglutinin (rot) und rabbit anti-rSbp / anti-rabbitIgG-Alexa488 (grün). Hierbei zeigt (A) die zweidimensionale Ansicht entlang der XY / XZ Achsen (Scale bar = 2 $\mu\text{m}$ ) und (B) die dreidimensionale Rekonstruktion (grid unit = 1.76 $\mu\text{m}$ ). (C) zeigt die Verteilung von PIA, DAPI (Zellzahl) und Sbp in Bezug zum Abstand zum Coverslip. Die Y-Achse gibt hierbei die jeweils bedeckte Fläche in  $\mu\text{m}^2$  an. Während PIA in jeder Schicht gleichmäßig verteilt ist, ist Sbp vor allem in den basalen, dem Coverslip zugewandten Schichten lokalisiert (Decker et al., 2015). **Abbildung entnommen aus Decker et al. 2015 (Decker et al., 2015)**

Dem Small Basic Protein (Sbp) scheint somit durch sein ubiquitäres Vorkommen, sowie der Beteiligung an der Biofilmbildung in PIA-positiven und PIA-negativen Stämmen als auch der aus seinem Fehlen entstehenden Biofilm-Negativität, eine zentrale Rolle in der Biofilmbildung zuzukommen. Trotz seiner Relevanz ist über die Zuordnung zu einzelnen Biofilmphasen oder über die Regulation von Sbp wenig bekannt.

### 1.2.3 Biofilmreifung (*detachment*)

Auf die Akkumulationsphase folgt die Ausbildung der endgültigen Struktur des muren Biofilms sowie die Herauslösung kleinerer Zellverbände aus dem Biofilm. Dieser Mechanismus, das Freisetzen von Erregern aus bereits etablierten Biofilmen, trägt zur

Streuung des Erregers im Wirt bei. Das *detachment* wird hauptsächlich über das Quorum Sensing System *agr* induziert, durch dessen Aktivierung die Synthese von Faktoren der Akkumulationsphase heruntergefahren werden und die Synthese von Exoproteine und PSMs hochgefahren wird. (s. u.)

### **1.2.3.1 Phenol-soluble modulins (PSMs)**

Ein wichtiger Bestandteil des *detachment* sind die Phenol-soluble Modulins (PSMs) (Becker et al., 2014). Phenol-soluble modulins (PSMs) sind amphiphil und wirken somit ähnlich wie Tenside, indem sie das Herauslösen von *S. epidermidis* aus der Biofilmmatrix ermöglichen (Vuong et al., 2004, Yao et al., 2005b). Zudem sind sie für die Struktur des reifen Biofilms von Bedeutung. Mutanten ohne PSMs bildeten einen unstrukturierten und größeren Biofilm, in welchem weniger Zellen aus dem Biofilmzellverband herausgelöst werden (Wang et al., 2011, Le et al., 2019). Reguliert werden die *psm*-Gene über das Quorum -Sensing System Agr (s.u.) (Queck et al., 2008).

## **1.2.4 Regulation der Biofilmbildung**

Alle drei Phasen der Biofilmbildung unterliegen der Regulation komplexer regulatorischer Netzwerke.

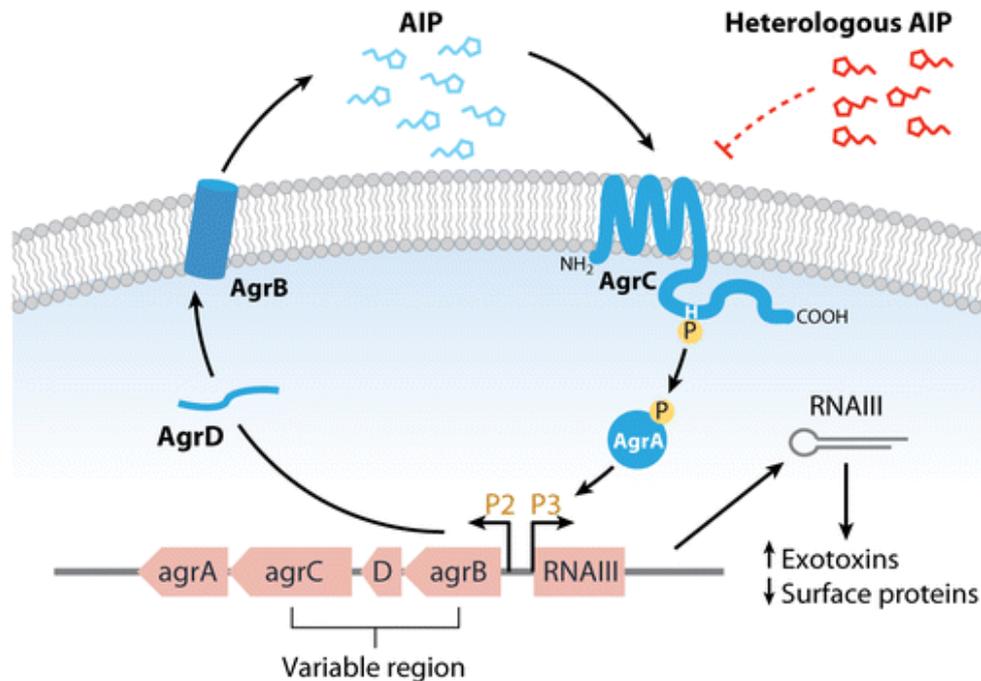
Es gibt Stressregulatoren, wie Sigma B oder SarA, welche bei bestimmten Umweltfaktoren Einfluss auf die Biofilmbildung nehmen oder Systeme die auf Mangelzustände (z. B. Eisenmangel) im Bakterienmetabolismus reagieren, wie der Tricarbonsäure (TCA)-Zyklus. Zusätzlich sind Quorum-Sensing Systeme von großer Bedeutung in der interzellulären Kommunikation innerhalb einer Population.

### **1.2.4.1 Das Agr-System**

Quorum-Sensing existiert in vielen bakteriellen Spezies und wurde zum Beispiel in *Streptococcus pyogenes* (Rgg2 und Rgg3), in *Pseudomonas aeruginosa* (LasR und RhII/RhIR), *Streptococcus pneumoniae* (Rgg/SH) und *Staphylococcus aureus* (Agr-System) eingehend charakterisiert (and and Bassler, 2001, Vuong et al., 2003, Junges et al., 2017, Kostylev et al., 2019). In *S. epidermidis* gibt es ein einziges Quorum-Sensing System, welches durch den *-BDCA* Locus codiert wird (Vuong et al., 2004). In *S. epidermidis* gibt es, je nach Stamm, insgesamt drei Agr-Systeme (Agr I-III), welche sich neuesten Erkenntnissen nach gegenseitig beeinflussen können (Olson et al., 2014).

Das Quorum-Sensing System "accessory gen regulator" (Agr) besteht aus *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* und der *rnaIII*. *RnaIII* ist der Effektor des Agr-Systems und stimuliert die Expression von extrazellulären Virulenzfaktoren, wie Enzymen, Toxinen und PSMs und reguliert die Expression von Adhärenzproteinen herunter (Abbildung 6) (Novick and Geisinger, 2008, Novick, 2003). Die Aktivität des Agr-Systems ist abhängig von der Konzentration an *autoinducing peptides* (AIPs). Diese AIP-Konzentration ist in der Adhärenzphase und zu Beginn der Proliferation niedrig und somit das Agr-System inaktiviert. Die *RnaIII* ist in dieser Phase folglich ebenfalls inaktiv, und somit werden die Proteine der Adhärenz nicht inhibiert und die Toxine als auch die PSMs, die für das Loslösen der Bakterienzellen verantwortlich sind, werden nicht synthetisiert. Es ist ausschließlich der Promotor 2 (P2) zur Transkription des von *agrBDCA* zur Synthese der AIPs aktiv (Abbildung 6) (and and Bassler, 2001, Novick, 2003, Olson et al., 2014).

Die Synthese der AIPs, bestehend aus 7-9 Aminosäuren sowie einem Thioacetolring, erfolgt in mehreren Schritten. *AgrD* kodiert für eine AIP-Vorstufe, welches anschließend von *AgrB*, einer membranständigen Peptidase, prozessiert und danach ausgeschleust wird. Die Detektion dieser AIPs erfolgt mit Hilfe der Histidinkinase *AgrC*, welche daraufhin bei AIP-Stimulation *AgrA* phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zum Ablesen vom Promotor P2 und P3. Dies führt zur Synthese der RNA III (P3) und zu einer gesteigerten homologen Synthese von AIPs (P2) (Abbildung 6) (and and Bassler, 2001, Novick, 2003, Olson et al., 2014).



**Abbildung 6 Das Quorum Sensing System Agr:** Sind wenige Bakterien in unmittelbarer Nähe zueinander, wird über P2 dauerhaft AgrA, AgrB, AgrC und AgrD transkribiert. Daraus entstehen bakterieneigene AIPs, welche die P2 dauerhaft als positive Rückkopplung verstärken. Nimmt mit zunehmender Zellzahl die Konzentration der fremden AIPs (Heterologous AIPs) zu, wird AgrC gehemmt, wodurch AgrA nicht mehr phosphoryliert wird. Dadurch wird die Transkription vom Promotor P3 induziert. Dies führt zur Transkription von RNA III, welche wiederum die Synthese von Toxinen induziert und die Synthese von Oberflächenproteinen hemmt (Novick and Geisinger, 2008). **Abbildung entnommen aus Novick; Geisinger 2008 (Novick and Geisinger, 2008)**

Steigt die Konzentration der AIPs in Folge der zunehmenden Zellzahl in der späten Akkumulationsphase im interzellularen Raum an, wird folglich AgrC aktiviert und dadurch AgrA phosphoryliert und somit neben dem Promotor P2 zusätzlich Promotor P3 aktiviert. Diese führt zur Synthese von RNA III und zu der Herunterregulierung von Adhäsinen, wie AtlE (Novick and Geisinger, 2008, Vuong et al., 2003). Nun leitet das Agr-System durch RNA III das *detachment* ein. Dieses geschieht unter anderem durch die Erhöhung der Expression von PSMs und Proteasen, wie AtlE und  $\delta$ -Toxin (siehe Abbildung: 6). Belegt wurde dies dadurch, dass das Ausschalten des Agr-Systems II in *S. epidermidis* 1457 zu einer verdichteten Biofilmarchitektur, ohne die Ausbildung der typischen turmförmigen Strukturen eines maturen Biofilms führte (Vuong et al., 2003). Die Mutante zeigte außerdem eine verstärkte Biofilmbildung sowie eine erhöhte Expression von AtlE. Die  $\delta$ -Toxin Synthese dagegen war reduziert (Vuong et al., 2003, Van Wamel et al., 1998).

#### 1.2.4.2 Sigma B ( $\sigma$ B)

Sigma B ist ein Stressregulator, welcher in vielen gram-positiven Bakterien, wie zum Beispiel *Bacillus cereus* oder *S. aureus*, gefunden wurde. Hier fördert Sigma B die Zelldifferenzierung und Biofilmformation (van Schaik et al., 2005, Gertz et al., 2000).

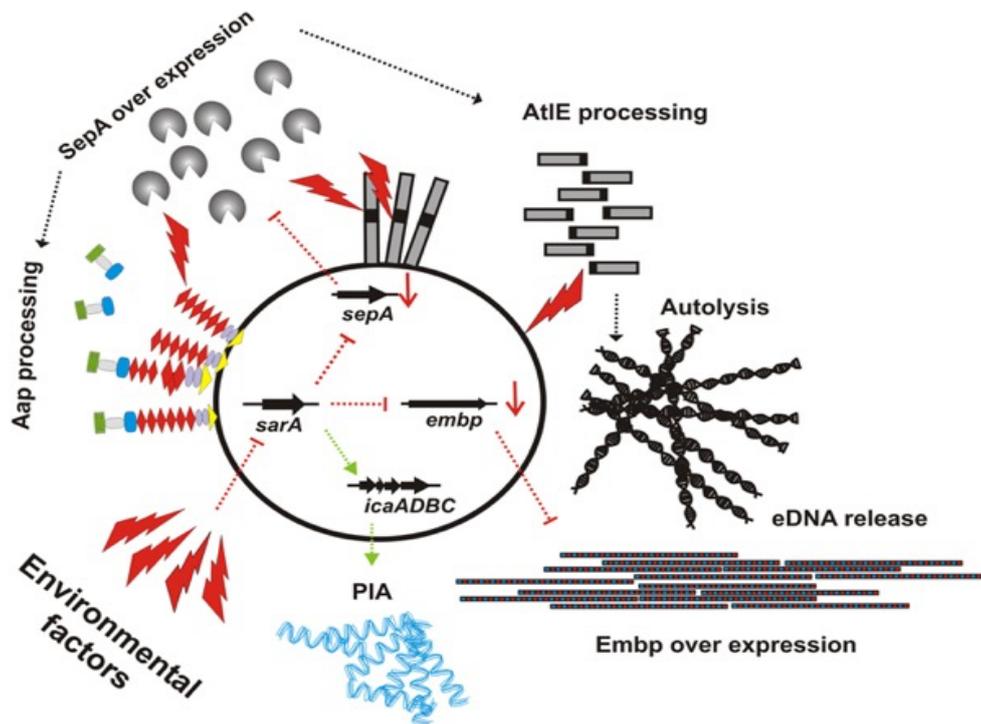
Aktiviert wird Sigma B durch Stress (z. B. Alkohol) und führt durch seine Aktivierung zu einer verstärkten Biofilmbildung und PIA Bildung in *S. epidermidis* (Vuong and Otto, 2002a, Knobloch et al., 2001, Wang et al., 2010). Zusätzlich hat Sigma B eine hemmende Wirkung auf Agr und somit auf das *detachment* (Schilcher and Horswill, 2020, O'Gara, 2007), jedoch einen induzierenden Effekt auf SarA (Knobloch et al., 2004, Tormo et al., 2005).

#### 1.2.4.3 Sar Gruppe

Die Sar Gruppe, erstmals in *S. aureus* erforscht, umfasst 12 Paralogen, welche dort maßgeblich für die Virulenz verantwortlich und an der Biofilmbildung beteiligt sind. Auch in *S. epidermidis* sind Vertreter der Sar Gruppe zu finden. Zu diesen gehören auch die oben genannten SarZ und SarX (siehe Regulation von PIA).

Ein weiterer wichtiger Regulator aus der Sar Gruppe ist SarA. Die Aminosäuresequenz von SarA in *S. epidermidis* stimmt zu 84% mit der in *S. aureus* überein, sodass sich Rückschlüsse zwischen den Spezies schließen lassen (Fluckiger et al., 1998, Tormo et al., 2005). In *S. aureus* induziert SarA die Synthese von Fibronektin- und Fibrinogen-bindenden Proteinen und Toxinen, während die Expression von Protein A und Proteasen supprimiert wird (Cheung et al., 2004).

In *S. epidermidis* gibt es in Bezug auf die Wirkung von SarA auf die Biofilmbildung Unterschiede zwischen dem PIA-negativen Stamm 1585 und dem PIA-positiven Stamm 1457. In *S. epidermidis* 1457 $\Delta$ sarA zeigt sich eine reduzierte Biofilmbildung im Vergleich zum Wildtyp. Im Stamm 1585 $\Delta$ sarA kommt es hingegen zu einer erhöhten Biofilmbildung.



**Abbildung 7: Einfluss von SarA auf die Biofilmbildung in *S. epidermidis*.** Die Inhibierung von SarA führt zu einer desinhibierten Transkription von *sepA* und *embp*, wodurch es zu einer Überexpression dieser Gene kommt und daraus resultierend zu mehr SepA, Aap und Embp. PIA wird hingegen über *icaADBC* inhibiert. Da 1585 *icaADBC*-negativ ist, führt hier die Inhibierung von SarA zu einer verstärkten Biofilmbildung. In 1457 findet die Biofilmbildung vor allem über PIA statt, wodurch hier die Inhibition von *sarA* zu einer reduzierten, Embp und Aap betonteren Biofilmbildung führt. Welche „enviromental Factors“ zur Aktivierung von SarA führen ist unbekannt (Büttner et al., 2015). **Abbildung entnommen aus Büttner et al. 2015 (Büttner et al., 2015)**

Ursächlich hierfür ist die negative Regulation von *sarA* in Bezug auf *embp* in 1585. Hierdurch kommt es zu einer gesteigerten *embp*-abhängigen Biofilmbildung in der Mutante. SarA scheint der Hauptregulator von *embp* zu sein (Christner et al., 2012).

In 1457 führte die Inaktivierung von SarA in der Mutante lediglich zu einer Änderung des Biofilmverhaltens, weg von einem PIA-abhängigen Biofilm und hin zu einem Protein- und eDNA-abhängigen Biofilm (Christner et al., 2012), da SarA durch die direkte Bindung an den *icaA* Promotor als positiver Regulator der PIA-Produktion fungiert (siehe oben) (Handke et al., 2007). SarA ist somit einer der wenigen Regulatoren, der sowohl auf PIA-positive als auch auf PIA-negative Biofilme Einfluss nimmt. Neben der erhöhten *embp* Expression konnte in den  $\Delta sarA$  Mutanten eine erhöhte Expression der Matrixmetalloprotease SepA und vermehrter eDNA Synthese festgestellt werden (Abbildung 7) (Handke et al., 2007, Christner et al., 2012). Welche äußeren Einflüsse zu einer Aktivierung oder Hemmung von SarA in *S. epidermidis* führen, ist weiterhin unbekannt (Büttner et al., 2015).

### 1.3 Fragestellung

Die Biofilmbildung ist das zentrale Pathogenitätsprinzip im Kontext Fremdmaterial-assoziiertes *S. epidermidis* Infektionen.

Während die Regulation vieler Faktoren der Biofilmbildung (PIA, Embp) bereits eingehend untersucht wurde, ist die transkriptionelle Steuerung anderer wichtiger Bestandteile des Biofilms wie Sbp noch weitgehend unbekannt. Die verminderte Wirksamkeit von Antibiotika, sowie die reduzierte Effektivität des Immunsystems in der Bekämpfung von in Biofilm-eingebetteten Bakterien tragen zur klinischen Relevanz der *S. epidermidis* Infektionen bei. Für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansatzpunkte zur Prävention und Behandlung Biofilm-assoziiertes Infektionen ist deshalb ein tiefgreifendes Verständnis der Biofilmentstehung von großer Bedeutung.

Das Small Basic Protein ist der erste bei *S. epidermidis* nachgewiesene Faktor, für den eine ortsabhängige Organisation innerhalb eines lebenden Biofilms dargestellt werden konnte. Das ubiquitäre Vorkommen in PIA-negativen und PIA-positiven Biofilmen und die essentielle Bedeutung für die Ausbildung eines stabilen Biofilms unterstreicht die Bedeutung von Sbp. Die spatiale Anordnung dieses Proteins weist dabei auf eine differentielle Expression innerhalb des Biofilms hin. Mögliche Einflussfaktoren auf die Expression umfassen die Wachstumsphase, die Zelldichte, den O<sub>2</sub> Partialdruck, den pH-Wert, die Substrat- und Metabolitkonzentrationen.

Ziel dieser Arbeit ist, die Regulation von Sbp im Hinblick auf Wachstumsphase, Wachstumsbedingungen und auf die Ausbildung von Subpopulationen mit verändertem Expressionsverhalten zu untersuchen. Hierbei wird ein besonderes Augenmerk auf den Einfluss der globalen Regulationssysteme Agr und SarA gelegt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, folgende Fragen zu beantworten:

Ist die Expression von Sbp abhängig von der Wachstumsphase?

Ändert sich die Expression von Sbp in Abhängigkeit von statischer und planktonischer Kultur?

Steht die Expression von Sbp unter der Kontrolle der Virulenzmasterregulatoren Agr und SarA?

Weist *sbp* eine differentielle Expression auf Subpopulationsebene auf?

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Biacore™ T100	GE Healthcare, München
Blotmodul	Invitrogen, Karlsruhe
Cycler	Peqlab-Biotechnologie, Erlangen
Elektrophorese-/SDS-PAGE- Kammer	Invitrogen, Karlsruhe
Elektrophorese-Kammer	MWG-Biotech, Ebersberg
Elektrophorese-Kammer (Mini-PROTEAN Tetra System)	BioRad, München
Elektrophorese/Agarosegelkammer	MWG-Biotech, Ebersberg
Elektroporationsküvetten	Peqlab, Erlangen
Elektroporator (GenePulser II)	BioRad, München
Entwicklergerät (Curix 60)	AGFA, Mortsel
Entwicklerkassette (X-Ray Cassette 13x18)	Fuji Film, Düsseldorf
Fluorometer (Tecan Infinite M200)	Tecan, Crailsheim
Gefrierschrank -80 °C	Kryotek, Hamburg
Gefrierschränke -20 °C	Liebherr, Biberach an der Riss
Geldokumentation (ChemiDoc XRS)	BioRad, München
Glasplatten (SpacerPlates und ShortPlates)	BioRad, München
Inkubatoren	Heraeus, Tuttingen
Kippschüttler	GFL, Burgwedel
Kühlschränke	Liebherr, Biberach an der Riss
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Netzgeräte (Electrophoresis Power Supply PS3002)	Invitrogen, Darmstadt
Netzgeräte (PowerPac 3000 Power Supply)	BioRad, Hercules, USA
Netzgeräte (PowerEase 500 Power Supply)	Invitrogen, Darmstadt
pH-Meter	Mettler-Toledo, Giessen
Photometer (SmartSpec 3000)	BioRad, München

Pinzette	Hartenstein, Würzburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Gilson, Den Haag, Niederlande
Pipettus (Accu-Jet Pro)	Brand, Wertheim
Scanner	Canon, Amsterdam, Niederlande
Sterile Werkbänke	Thermo Scientific Eppendorf
Thermoschüttler (Thermomixer 5436)	Hamburg Sartorius, Göttingen
Thermoschüttler Certomar BS-1)	Hamburg Sartorius, Göttingen
Tischzentrifugen (Centrifuge 5417R)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen (Centrifuge 5415D)	Eppendorf, Hamburg
Transfermembran (Immobilon-P)	Merck, Darmstadt
Ultraschallgerät (Digital Sonifier 250-D)	Branson, Danbury, USA
UV-Transilluminator	BioRad, München
Vortexer	IKA-Labortechnik, Staufen
Waagen (Kern ALS 120-4, Kern 572)	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad	Mettler-Toledo
Zentrifugen (Multifuge 1 S-R)	Heraeus, Osterode
Zentrifugen (Centrifuge 5415D, Centrifuge 5417R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen (SpeedVAC SC110)	Savant, Dreieich

### 2.1.2 Software

Volocity Quorum Technologies Ontario, USA

BD FACSDiva™, Becton Dickinson, New Jersey, USA

Prism5, GraphPad Software, Inc., USA

## 2.1.4 Chemikalien

Tabelle 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
DNA-Marker ( $\lambda$ DNA-HindIII/ $\Phi$ X- HaeIII)	Finnzymes, Espoo, Finnland
ECLTM Western Blot Developer Solution	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure (96%)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37 %)	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Immersionsöl	Carl Zeiss, Oberkochen
Kalium-di-Hydrogrnphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
LIFE/DEAD Farbstoff	Invitrogen, Carlsbad, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Mowiol Natriumchlorid (NaCl)	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Protein-Marker (PageRuler)	Fermentas, St. Leon-Rot
Tris	Merck, Darmstadt
Tween20	Merck, Darmstadt

## 2.1.5 Medien und Antibiotika

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Wachstumsmedien

Medium	Zusammensetzung
SOC-Medium	20 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	0,6 g/l NaCl
	0,2 g/l KCl
	10 mM/l MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O
	10 mM/l MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O
	20 mM/l Glukose
LB-Medium	10 g/l Bacto-Tryptone
	5 g/l Hefe-Extrakt
	10 g/l NaCl
BHI-Medium	30 g/l Brain Heart Infusion Broth
TSB	30 g/l TSB
B2-Brühe	10 g/l Caseinhydrolysat
	25 g/l Hefeextrakt
	1 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	5 g/l Glucose
	25 g/l NaCl
SOC-Flüssignährmedium	Invitrogen, Karlsruhe
NB2+Flüssignährmedium	Mack et al. 1994 (Mack et al., 1994)
BHI+Flüssignährmedium	Mack et al. 1994 (Mack et al., 1994)
Columbia-Blutagar	Becton Dickinson, Heidelberg
LB-Agar	10 g/L Tryptone
	5 g/L Hefeextrakt
	10 g/L Natriumchlorid
	12 g/L Agar
BHI-Agar	s.o. + 12g/l Agarose
ST-Agar (STA)	Mack et al. 1994 (Mack et al., 1994)
Softagar	Kayser et al.1972 (Kayser et al., 1972)

## Antibiotika

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin-Lösung (100 mg/mL in Methanol)	Sigma-Aldrich, München
Anhydrotetrazyklin-Lösung (1 mg/mL in Aqua ad ini.)	Sigma-Aldrich, München
Chloramphenicol-Lösung (10 mg/mL in Methanol)	Sigma-Aldrich, München
Erythromycin-Lösung (20 mg/mL in Methanol)	Sigma-Aldrich, München
Tetracyclin-Lösung (20 mg/mL in Methanol)	Sigma-Aldrich, München

## 2.1.6 Puffer

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendeten Puffern

Puffer	Zusammensetzung
Phosphate buffered saline (PBS), 20-fach	2,73 M NaCl
	53 mM KCl
	166 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	53 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	in Millipore™; pH=7,4
PBS/T	1-fach PBS mit Zusatz von 0,005% Tween-20
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4-fach)	Thermo Scientific, Dänemark
0,5fach-TBE-Puffer	25 mM Tris-HCl
	25 mM Borsäure
	1 mM EDTA in Millipore™
Fixierlösung	3,7% Formaldehyd in Millipore™
NuPAGE® MES SDS Laufpuffer (20-fach)	Thermo Scientific, Dänemark
Destain-Lösung	50 ml H <sub>2</sub> O
	40 ml Methanol
	10 ml Essigsäure (96 %)
Transferpuffer (20-fach)	500 mM Bicine,
	500 mM Bis-Tris,

	20 mM EDTA, 1 mM Chlorobutamol, in Millipore™ pH 7,2
TFB1	100mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> 30 mM K-acetate 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15% Glycerol (w/v) pH 5,8
TFB2	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerol (W/v) pH 6,8 (with KOH)
TE Puffer	PanReac AppliChem, Darmstadt
Transfer Puffer	25 ml 20x Transfer Puffer 50 ml Methanol 425 ml Millipore

## 2.1.7 Enzyme

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendeten Enzymen

Enzyme	Hersteller
EcoRI-High Fidelity (HF)	New England Biolabs
HindIII-High Fidelity (HF)	New England Biolabs
Lysostaphin	Sigma-Aldrich, München

## 2.1.8 Kits

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendeten Kits

Kits	Hersteller
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München
QIAGEN® Plasmid Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN® Rneasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
TaqMan	ThermoFischer, Roskilde Dänemark
ThermoFischer Scientific TURBO DNA-free™ Kit	ThermoFischer, Roskilde Dänemark

## 2.1.9 Stämme

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Stämme

Stämme	Eigenschaften	Referenz
<i>Staphylococcus aureus</i> RN4220	Restriktionsdefiziente Mutante von RN450	Kreiswirth et al. 1983 (Kreiswirth et al., 1983)
<i>S. epidermidis</i> 1457	klinisches Isolat	Mack et al. 1992 (Mack et al., 1992)
<i>S. epidermidis</i> 1457Δ <i>sbp</i>		Decker et al. 2015 (Decker et al., 2015)
<i>S. epidermidis</i> 1457Δ <i>sarA::tet(M)</i>		Handke et al. 2007 (Handke et al., 2007)

<i>S. epidermidis</i> 1457 $\Delta$ <i>agr</i> ::dhfR		Decker et al. 2015 (Decker et al., 2015)
<i>S. epidermidis</i> 1457 x pNFP: <i>sbp</i> :: <i>gfp</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Reporterplasmid <i>Psbp</i> :: <i>gfp</i> zur Darstellung der <i>sbp</i> Promotoraktivität	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1457 $\Delta$ <i>sbp</i> x pNFP: <i>sbp</i> :: <i>gfp</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 $\Delta$ <i>sbp</i> mit Reporterplasmid <i>Psbp</i> :: <i>gfp</i> zur Darstellung der <i>sbp</i> Promotoraktivität	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1457 $\Delta$ <i>sarA</i> ::tet(M) x pNFP: <i>sbp</i> :: <i>gfp</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 $\Delta$ <i>sarA</i> mit Reporterplasmid <i>Psbp</i> :: <i>gfp</i> zur Darstellung der <i>sbp</i> Promotoraktivität	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1457 $\Delta$ <i>agr</i> ::dhfR x pNFP: <i>sbp</i> :: <i>gfp</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 $\Delta$ <i>agr</i> mit Reporterplasmid <i>Psbp</i> :: <i>gfp</i> zur Darstellung der <i>sbp</i> Promotoraktivität	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1585	Isolat einer Port-Katheter-Infektion; Biofilm-, icaADBC-, aap-negativ	Christner et al. 2010 (Christner et al., 2010) Rohde et al. 2005 (Rohde et al., 2005)
<i>S. epidermidis</i> 1585 $\Delta$ <i>sbp</i>		Decker et al. 2015 (Decker et al., 2015)
<i>S. epidermidis</i> 1585 $\Delta$ <i>sarA</i> ::tet(M)		Christner et al. 2012 (Christner et al., 2012)
<i>S. epidermidis</i> 1585 $\Delta$ <i>agr</i> ::dhfR		Decker et al. 2015 (Decker et al., 2015)
<i>S. epidermidis</i> 1585 x pNFP: <i>sbp</i> :: <i>gfp</i>	<i>S. epidermidis</i> 1585 mit Reporterplasmid <i>Psbp</i> :: <i>gfp</i> zur Darstellung der <i>sbp</i> Promotoraktivität	Diese Arbeit

<i>S. epidermidis</i> 1585Δ <i>sbp</i> x pNFP: <i>sbp::gfp</i>	<i>S. epidermidis</i> 1585Δ <i>sbp</i> mit Reporterplasmid <i>Psbp::gfp</i> zur Darstellung der <i>sbp</i> Promotoraktivität	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1585Δ <i>sarA::tet(M)</i> x pNFP: <i>sbp::gfp</i>	<i>S. epidermidis</i> 1585Δ <i>sarA</i> mit Reporterplasmid <i>Psbp::gfp</i> zur Darstellung der <i>sbp</i> Promotoraktivität	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1585Δ <i>agr</i> :: <i>dhfR</i> x pNFP: <i>sbp::gfp</i>	<i>S. epidermidis</i> 1585Δ <i>agr</i> mit Reporterplasmid <i>Psbp::gfp</i> zur Darstellung der <i>sbp</i> Promotoraktivität	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 Chemisch kompetente Zellen	<i>E. coli</i> Wirt zur Klonierung von Plasmiden: F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) 0 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL</i> ( <i>StrR</i> ) <i>endA1</i> λ-	Invitrogen

### 2.1.10 Phagen

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Phagen

Phagen	Referenz
φA6C	(Rohde et al., 2005)

## 2.1.11 Primer

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Referenz
pCN57_MCS_for	5'- CCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC- 3'	
pCNDUF_term_rev	5'-GCAAAGGCGCCTGTCAC-3'	

## Taq Primer

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Primer für qPCR

Name	Sequenz	Tm	Länge	Optimale c	Effizienz
tpiA_for_taq	GTGTGCTCACGTACGTCA AACA	60,3	22	900	
tpiA_rev_taq	TGCACCTTCTAACAATTGT ACCAAATC	60,4	27	900	
tpiA_probe_taq	CGATGGCGCTCTTGTAGG TGGCGC	69,5	24	75	1,969
rho_taq_for	TCGATGAACCACCAGAAC ACCATG	62,7	24	300	
rho_taq_rev	CTTCAATGTTACGTGCTGC ACCGAA	63	25	300	
rho_taq_probe	ACGTACATTGTCAGGTGG GCTTGATCCCGC	70,9	30	100	1,976
gyrB_for_taq	TGGTCTGCGTTCATTTAC CAAGAC	63	25	300	
gyrB_rev_taq	CTTGCCGATGTTGATGGT GCACA	62,4	23	300	
gyrB_probe_taq	GGCGGCTGAGCAATATAA ACGTAGCCCGC	70,9	29	200	1,94

SBP_taq_f or	ACGTTAAGATAGGCGAAT CAATGAAGA			900	
SBP_taq_r ev	GTACACGACTTATAGCTTT ATGACCAAG			900	
SBP_taq_p robe	GCCCTTCATACAAAGCCG TAAAACAACA		150	1,895	

### 2.1.12 Plasmide

Tabelle 12: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Alle Plasmide wurden bei der Firma MWG Eurofins bestellt und synthetisiert.

<b>pNFP:<i>sbp::gfp</i></b>	Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) unter der Kontrolle des nativen <i>sbp</i> -Promotors
-----------------------------	---

### 2.1.13 Antikörper

Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-rabbit-IgG-Peroxidase Konjugat	Maus	Jackson ImmunoResearch (Pennsylvania, USA)
Anti-Sbp Antikörper	Kaninchen	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

## **2.2 METHODEN**

### **2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden**

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

Die verwendeten Bakterienstämme wurden mit Hilfe des Drei-Ösen-Ausstriches auf Agarplatten ausgestrichen. Stämme, die das pNFP:*sbp*::*gfp* Plasmid enthielten, wurden auf TSB-Agar mit Erythromycin (10 mg/l) ausplattiert. *Staphylococcus*-Stämme ohne Plasmid wurden auf Blut- oder TSB-Agar, *E. coli*-Stämme auf LB-Agar kultiviert. Inkubiert wurden die Stämme in der Regel für 16 Stunden bei 37 °C in einem Brutschrank (Fest-Medium-Kulturen) oder als Flüssig-Medium-Kultur in einem Schüttelinkubator bei 160 rpm für drei, fünf, sieben, 18 und 36 Stunden. Vorkulturen wurden über Nacht inkubiert und die Hauptkultur anschließend im Verhältnis 1:100 beimpft. Die dauerhafte Kryokonservierung erfolgte in Kryotubes bei -80 Grad.

#### **2.2.1.2 Differenzierung von Bakterien mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF)**

Die Differenzierung von Bakterien mittels Massenspektrometrie erfolgte nach Standardprotokoll. Erregeridentifizierung erfolgte ab einem MALDI Score von größer 2. Stämme mit MALDI Score unter 2 wurden verworfen.

Die Empfindlichkeitsprüfungen dienten vorrangig der orientierenden Erfolgskontrolle nach Phagentransduktion. Hierzu wurde eine Kultur mit Hilfe eines Wattetupfers in 1 ml sterilisiertem PBS gelöst und anschließend auf einer Agar-Platte ausgestrichen. Nachdem die Suspension getrocknet war, wurde die Platte mit dem Antibigrammstempel versehen. Nach 24 Stunden Inkubation im 37 °C Brutschrank konnte das Antibigramm abgelesen werden, indem die Hemmhöfe ausgemessen und nach EUCAST bewertet wurden.

### **2.2.2 Phänotypische Analysen**

#### **2.2.2.1 Biofilm Test**

Der Biofilmtest dient der phänotypischen Analyse des Biofilms durch Messung der Absorption nach Gram-Färbung.

Aus der Übernacht-Vorkultur wurden im Verhältnis 1:100 eine Nuclon Delta Surface 96 Well Platte (Thermo Fisher Scientific, Roskilde Dänemark) mit 200 µl Hauptkultur beimpft. Von jedem Stamm wurden biologische Quaduplikate angefertigt. Anschließend wurde die Platte für 20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach 20 Stunden wurde der Überstand verworfen

und dreimal mit 1x PBS gespült. Nach Verwerfen der letzten PBS-Spülung wurde der Biofilm getrocknet und danach mit Gentiana Violett gefärbt. Nach 15 Minuten wurde der Farbstoff dekantiert, der Biofilm dreimal mit Wasser gespült und danach wurde der Biofilmassay getrocknet. Nach abgeschlossener Trocknung wurde die Absorption im Infinite M200 (Tecan, Crailsheim) nachfolgenden Angaben gemessen:

**Tabelle 14: Angaben zur Absorption beim Biofilmtest**

Absorption:	
Messung	570 nm
Referenz	405 nm
Anzahl der Blitze	10 Stück

## **2.2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse**

Die Gewinnung des Plasmids erfolgt hierbei durch die alkalische Lyse der Bakterienzelle, gefolgt von einer Denaturierung und Präzipitation der chromosomalen DNA und Proteine, wohingegen die Plasmid-DNA in Lösung verbleibt.

Ausgangsmaterial für die Plasmid-Präparation waren 4-6 ml einer über Nacht beimpften Flüssig-Medium-Kultur, welcher ein Antibiotikum im Verhältnis 1:1000 zur Selektionierung zugesetzt wurde. Die Plasmidpräparationen wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde dem Lysepuffer, in dem die Staphylokokken gelöst werden, 3 µl Lysostaphin (Sigma-Aldrich, München) (1500 U/ml) hinzugefügt und diese Suspension bei 37 °C auf einem Schüttler für 60 Minuten inkubiert.

### **2.2.3.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Die Spaltung der DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen. Diese erkennen spezifische, pallindromische Sequenzen innerhalb eines DNA-Doppelstrangs und teilen beide Stränge an definierter Stelle. Zum Nachweis der Übereinstimmung der bei der Klonierung entstandenen Plasmide erfolgt ein Restriktionsverdau. Der Verdau des Plasmids pNFP:*sbp::gfp* erfolgte mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII (BioLabs, Ipswich), die Inkubation bei 37 °C für 12 bis 24 Stunden.

Tabelle 15: Exemplarisch ein Pipettierschema für einen 20 µl Restriktionsverdau.

Reagenz	Volumen
Plasmid-Präparation	2 µl
Restriktions-Enzym A	1 µl
Restriktions-Enzym B	1 µl
Puffer (passend zu A und B)	2 µl (10 % v/v)
Aqua ad. iniectabilia	15 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>

### 2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von verdauten Plasmiden

Zur Auftrennung der Plasmid- bzw. DNA-Fragmente wurde die horizontale Gelelektrophorese eingesetzt. Das Agarosegel fördert durch Poren unterschiedlicher Größe die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe und Ladung. Für das Gel würden 1g SeaKem LE Agarose (Lonza, Rockland USA) auf 100 ml 0,5-fach TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend mit 5 µl RedSafe (Intron Biotechnologie, Südkorea) versetzt.

Die Elektrophorese wurde in den dafür vorgesehenen Kammern (MWG-Biotech, Ebersberg; Owl Separation Systems Thermo Scientific, Roskilde Dänemark) bei 80 bis 120 V für 1-2 Stunden durchgeführt. Als Laufpuffer diente ebenfalls der 0,5-fach TBE-Puffer. Die Dokumentation erfolgte anschließend mit Hilfe eines UV-Transilluminator (BIO-RAD Laboratories, Segrate Mailand, Italien).

## 2.2.4 Transformation von Bakterien

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

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 250 ml LB-Medium (37 °C warm) mit einer frischen Vorkultur *E. coli* TOP10 im Verhältnis 1:100 beimpft und in einem Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 180 rpm für 60-90 Minuten bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600} \sim 0,5$  (0,4 - 0,6)) inkubiert. Nachdem die Kultur für 5 Minuten auf Eis gekühlt wurde, erfolgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 4000 rpm bei 4 °C Kühlung. Das *E. coli*-TOP10 Zellpellet wurde in 37,5 ml gekühlten TFB1-Puffer resuspendiert und anschließend erneut 90 Minuten auf Eis gestellt. Danach erfolgt eine erneute Zentrifugation. Nachdem das Pellet der gewaschenen Zellen in 5 ml eisgekühlten TFB2-Puffer aufgenommen wurde, konnte die Suspension aliquotiert und bei -80 °C gelagert werden.

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

Zur chemischen Transformation der hergestellten *E. coli*-TOP10 Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA vermischt. Nach leichtem Umrühren wurde die Zell-Plasmid-Suspension für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch den anschließenden Hitzeschock bei 42 °C, auf einem Heizblock (Labnet International Inc., Iselin New York) für 30 Sekunden, gelangt das Plasmid in das Bakterium. Danach wurden die Zellen erneut für zwei Minuten auf Eis gestellt, anschließend der Lösung 250 µl SOC-Medium beigefügt und eine Stunde bei 37 °C und ca. 200 rpm inkubiert. Danach wurden 100 µl Bakteriensuspension auf einer Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

#### **2.2.4.3 Herstellung elektrokompetenter *S. aureus* Zellen**

Die Transformation des Plasmids pNFP::*sbp*::*gfp* in Staphylokokken erfolgte mit Hilfe der Elektroporation. Hierfür werden elektrokompetente Zellen benötigt, die das Plasmid aufnehmen können.

Dazu wurden aus einer über Nacht inkubierten *S. aureus* RN4220- oder *S. aureus* PS187-Vorkultur ein Milliliter in 50 ml frische B2-Brühe gegeben. Diese Hauptkultur wurde in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,6 bis 0,8 angezüchtet. Die Bakteriensuspension wurde dann in ein 50 ml Falcon-Tube (Greiner, Kremsmünster) gegeben, für 15 Minuten auf Eis gestellt und danach für 15 Minuten bei 4332 x g und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde dreimal mit je 25 ml 4 °C, kaltem autoklavierten Millipor-Wasser gewaschen. Hiernach wurde das Pellet einmal mit 5 ml und einmal mit 2,5 ml 10 %igem Glycerin (in Millipor) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die elektro-kompetenten Staphylokokken, abhängig von der gemessenen optischen Dichte (OD<sub>600</sub>), in 600-800 µl zehnprozentiger, 4 °C kalter Glycerinlösung resuspendiert. Abschließend wurden die kompetenten Zellen à 70 µl aliquotiert und direkt verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

#### **2.2.4.4 Elektroporation**

Alle Phasen der Elektroporation erfolgten, sofern nicht anders beschrieben, auf Eis. In die Aliquots der elektrisch-kompetenten Zellen wurden 300-500 ng des zu transformierenden Plasmids hinzugefügt, durch Rühren mit der Pipettenspitze vermischt

und anschließend auf Eis gestellt. Nach 30 Minuten wurde die Lösung in eine gekühlte Elektroporationsküvette (1 mm, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) pipettiert und bei 100  $\Omega$  Widerstand und 25  $\mu$ F elektrischer Kapazität der Kondensatoren bei 2-2,5 kV Spannung elektroporiert. Danach wurden die Zellen unmittelbar in 390  $\mu$ l 37 °C warmer B2-Brühe aufgenommen, dann in ein 2 ml Eppendorf-Tube gegeben und für eine Stunde im Schüttelinkubator (37 °C, 200 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l der Suspension auf TSB-Agar Platten mit Erythromycin (10 mg/l) ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C für mindestens 24 Stunden inkubiert.

#### **2.2.4.5 Phagengewinnung**

Eine Kolonie des Ausgangsstammes *Staphylococcus epidermidis* 1457 $\Delta$ agr mit dem Plasmid pNFP:*sbp::gfp* wurde für ca. vier Stunden bei 37 °C und 200 rpm in 3 ml NB2+Medium inkubiert.

Anschließend wurde die Kultur auf eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von ~ 0,1 eingestellt. Parallel wurden 0,5 ml einer Verdünnungsreihe von 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-6</sup> Phagenlysat mit NB2+Medium im Verhältnis 1:1 gemischt und in 3 ml ST-Softagar gegeben.

Danach wurde die Suspension auf ST-Agar-Platten gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml NB2+Medium auf die Agarplatten pipettiert und danach der Softagar abgenommen und in ein 50 ml Falcon Tube überführt.

Nach zehnstündigen Ultraschallpuls (70 % Amplitude) wurde die Suspension bei 4 °C und 5000 rpm für 15 min zentrifugiert. Dann wurde der Überstand steril filtriert und konnte bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

#### **2.2.4.6 Phagentitration**

Eine Kolonie des Ausgangsstammes wurde für ca. vier Stunden bei 37 °C und 200 rpm in 3 ml NB2+Medium inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von ~ 0,1 eingestellt. Parallel wurden 0,5 ml einer logarithmischen Verdünnungsreihe von 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-6</sup> Phagenlysat mit NB2+ Medium im Verhältnis 1:1 gemischt und mit drei Milliliter ST-Softagar überschichtet. Danach wurde die Suspension auf ST-Agar Platten verteilt und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die entstanden Plaques wurden anschließend ausgezählt, um die Aktivität des Phagenlysats zu bestimmen.

#### **2.2.4.7 Phagentransduktion**

In 5 ml NB2+ Medium wurde eine Suspension des Zielstamms bei einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von ~ 11 eingestellt. Dieses Phagenlysat (Aktivität bis mindestens 10<sup>9</sup> PBE/ml) wurde im Verhältnis 1:1 mit 1 ml der Suspension gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Adsorption des Phagen A6C wurde durch 40 µl 1 M Natriumcitrat-Lösung gestoppt. Daraufhin wurde die Lösung bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert, in BHI+ Medium resuspendiert und anschließend zweimal gewaschen. Dann wurde das Pellet in BHI-Medium mit Zusatz von Erythromycin aufgenommen und für 60 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 3 ml BHI-Softagar und das Ausplattieren auf entsprechendem Erythromycin Selektivnährboden. Dieser wurde nach dem Aushärten des Softagars für bis zu 48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

#### **2.2.5 RNA Präparation**

Alle Schritte der RNA Präparation erfolgten, sofern nicht anders beschrieben, auf Eis.

Die 25 ml Hauptkulturen (1:100 aus Vorkultur beimpft), wurden 6 oder 18 Stunden angezüchtet und anschließend aus den Erlenmeyerkolben in Falcon-Tubes (Sarstedt, Darmstadt) umgefüllt. Statische Biofilmkulturen wurden mit einem Cell Scraper (Sarstedt, Darmstadt) aus der Nuclon Delta Surface Platte (Thermo Scientific, Roskilde Dänemark) abgetragen und danach in ein Falcon-Tube überführt.

Die Kultur in den Falcon-Tubes wurde bei 6000 rpm für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach resuspendierte man das Pellet in 2 ml steril filtriertem PBS mittels Ultraschalles und ließ die Probe anschließen mit 3 ml RNA Protect (Qiagen, Hilden) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Dann wurde die Lösung erneut für 10 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 200 µl TE Puffer (PanReac AppliChem, Darmstadt) resuspendiert.

Handelte es sich um den Stamm *S. epidermidis* 1457, folgte erst ein weiterer Waschschrift mit 25 ml eiskaltem PBS und angeschlossener Ultraschallbehandlung für dreimal 30 Sekunden. Anschließend wurde die Lösung erneut bei 4°C bei 6000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und erst dann das Pellet in 200 µl TE-Puffer gelöst.

Nun wurde die Probe mit 20 µl Lysostaphin (Sigma-Aldrich, München) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die verdaute Suspension in ein Shredder Tube (Sarstedt, Darmstadt) mit 0,5 ml Schredder Beeds (Roth, Karlsruhe) überführt, mit 700 µl RLT Puffer und 10 µl Mercaptoethanol vermischt, und bei 6500 rpm dreimal 20 Sekunden für 5 min

geschreddert. Anschließend wurde die Lösung für eine Minute bei 13000 rpm (Raumtemperatur) zentrifugiert und der Überstand in ein Eppendorf Tube pipettiert. Die Weitere Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die RNA wurde mit 50 µl Wasser eluiert und danach bei -80°C eingefroren oder direkt weiterverwendet.

#### **2.2.5.1 Messung der RNA Konzentration**

Zur Ermittlung der RNA Konzentration wurde der Qubit Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad USA) genutzt, welcher mittels Fluoreszenz die RNA Konzentration misst. Hierfür wurde ein Mastermix angesetzt, der aus 199 µl „Qubit RNA HS Buffer“ und 1µl „Qubit RNA HS Reagent 200X Konzentrat“ besteht. Zu 199 µl dieses Mastermixes wurden 1 µl RNA hinzugefügt und nach zweiminütigem Inkubieren mittels Fluoreszenzmessung die RNA Konzentration ermittelt. Danach wurden die unterschiedlichen RNA-Konzentrationen auf dieselbe Konzentration durch Verdünnung mit RNA freiem Wasser angeglichen.

#### **2.2.5.2 DNase Verdau**

Der DNase Verdau wurde benötigt, um die DNA-Reste der RNA-Präparation zu eliminieren, damit diese nicht die Ergebnisse der späteren qPCR verfälschen.

Für den DNase Verdau wurde 1,5 µl Thermofischer DNase und 1 µl Thermofischer Puffer mit 7,5 µl verdünnter RNA für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde erneut 1 µl DNase hinzugefügt und erneut für 30 Minuten bei 37°C auf dem Schüttelinkubator Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg) verdaut.

Zur Enzyminaktivierung wurden 3 µl „DNase Inactivation Reagenz“ nach vorherigem fünfminütigem Vortexen der Probe hinzugefügt. Nach zweiminütigem Vortexen erfolgte eine Zentrifugation bei 10000 x g für 90 Sekunden. Der Überstand wurde dann in ein neues Eppendorf Tube pipettiert und konnte bei -80 °C eingefroren werden.

#### **2.2.5.3 cDNA Synthese**

Für die cDNA Synthese wurde das Bio-Rad iScript cDNA-Synthese Kit verwendet.

Dieser Schritt war erforderlich, da die „TaqMan Polymerase“ (Thermofischer Scientific, USA) der qPCR ausschließlich DNA vervielfältigen kann und deswegen die zuvor gewonnene RNA mittels der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden muss.

Hierbei wurden je Probe 4 µl „5x iScript Reaction Mix“, 10 µl RNA-freies Wasser und 1 µl „iScript Reverse Transkriptase“ im Mastermix angesetzt und mit 5 µl Template vermischt. Die eigentliche cDNA Synthese fand im Thermocycler (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) statt:

1. Heat Lid auf 110 °C
2. 5 Minuten bei 25 °C
3. 30 Minuten bei 42 °C
4. 5 Minuten bei 85 °C
5. Kühlen bei 4 °C

Danach konnte die Probe bei -4 °C eingefroren werden.

#### 2.2.5.4 Quantitative PCR (qPCR)

Die Quantitative PCR ist eine Methode, um die relative Transkription von Genen dazustellen.

In diesem Fall wurde die *sbp*-Transkription in Relation zu der Transkription der drei Housekeeping-Gene *gyrB*, *tpiA* und *rho* untersucht. Hierbei wurden jeweils Mastermixe für jedes einzelne Gen erstellt.

Tabelle 16: Pipettierschema für einen 15 µl Ansatz pro Well.

Reagenz	Volumen
Wasser	1,5 µl
Primer I (forward)	1,5 µl
Primer I (reverse)	1,5 µl
Probe	1,5 µl
TaqMan Polymerase	7,5 µl
Proben-cDNA	1,5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	15 µl

Der Mastermix wurde auf eine spezielle 96 Well Platte (Roche, Basel) aufgetragen und anschließend mit 1,5 µl cDNA versetzt und mit einer transparenten Folie (Roche, Basel)

verklebt, um Verdunstung und Vermischen der Proben zu verhindern. Zur Durchführung der qPCR wurde der LightCycler 480 (Roche, Basel) verwendet.

Von jeder Probe wurden technische Duplikate und biologische Triplikate erzeugt, um die Daten statistisch auswerten zu können.

Im ersten Schritt wurde der Mittelwert der technischen Replikate gebildet, danach erfolgte die Bildung des Mittelwerts der *housekeeping* Gene *gyrB*, *rho* und *tpiA*. Von diesem Wert wurde der Mittelwert von *sbp* abgezogen. Hieraus entstanden die  $\Delta Ct$  Werte. Mit diesen  $\Delta Ct$  Werten erfolgte die Durchführung von t-Tests und die anschließende Auftragung in Tabellen,

### 2.2.6 PCR

Ziel der PCR war, es die Plasmide nach erfolgreicher Phagentransduktion oder Elektroporation in den Zielstämmen nachzuweisen. Hierzu wurde das Phusion-High-Fidelity-PCR Kit (Thermo Scientific, Roskilde Dänemark) verwendet.

Tabelle 17: Ansatz der PCR

Ansatz bestehend aus:	Volumen
Puffer	4 $\mu$ l
dNTP's	0,4 $\mu$ l
Forward Primer	1 $\mu$ l
Reverse Primer	1 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l
Phusion Enzym	0,2 $\mu$ l
Aqua ad. Injectab.	12,4 $\mu$ l
Gesamt	20 $\mu$ l

Nach Hinzugabe der DNA wurde jeder einzelne Ansatz gevortext und zentrifugiert. Danach erfolgte eine PCR nach Standardprotokoll im PeQLab Cyler (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen):

**Tabelle 18: Darstellung des Ablaufs der Phusion PCR.**

	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	2 min
Zyklus	35 Mal	
1. Denaturierung	98°C	30 sek
2. Annealing	56°C	30 sek
3. Elongation	72°C	90 sek
Ende des Zyklus		
Finale Elongation	72°C	5 min

Die Produkte wurden danach mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese analysiert oder bei -20°C eingefroren.

## **2.2.7 Proteinchemische Methoden**

### **2.2.7.1 Proteinpräparation**

Die Anzucht der Bakterien erfolgte f als statische Biofilmkultur sowie als Schüttelkultur bei 37°C, entweder in Nuclon Delta Surface Platten (Thermo Scientific, Roskilde Dänemark) oder in Erlenmeyerkolben.

Die 25 ml Flüssig-Medium-Kultur wurde in 50 ml Falcon gegeben und bei 5000rpm für 15 Minuten zentrifugiert, danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 25ml 1x PBS resuspendiert. Hiernach erfolgte mit Hilfe des Photometers die Einstellung der Proben auf eine gleiche Zellzahl. Anschließend wurde die Probe erneut bei 5000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 200-300 µl 1x LDS Puffer (Invitrogen, Carlsbad USA) resuspendiert und anschließend 10 Minuten bei 72°C aufgeköcht. Nach erneutem Zentrifugieren konnte der Überstand in neue Eppendorf Tubes (Eppendorf, Hamburg) überführt und direkt auf das SDS Gel aufgetragen oder bei -80°C eingefroren werden.

### **2.2.7.2 Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Ein SDS-Gel besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Die Zusammensetzung kann der Tabelle 18 entnommen werden. Zuerst wurde das Trenngel in die vorgesehene Bio-Rad

Glasplatten (BioRad, München) gegossen und mit Isopropanol bedeckt, um Blasenbildung zu vermeiden. Nach 10-20 Minuten des Aushärtens wurde das Sammelgel darüber gegossen und ein Kamm eingesetzt, um damit Geltaschen für die Proben zu erzeugen. Es erfolgte eine erneut 10-20ige Aushärtung. Danach war das Gel direkt verwendbar, oder es bestand die Möglichkeit, das Gel feucht bei 4 °C zu lagern.

Tabelle 19: Zusammensetzung und einzelne Bestandteile von Trenn- und Sammelgel.

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

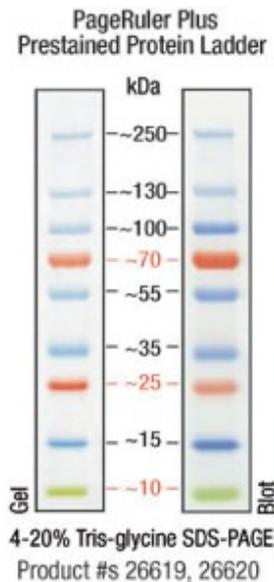


Abbildung 6: Standard-Markierung des Page Rulers + (Thermo Scientific, Roskilde Dänemark). Die Aufteilung erfolgt der Größe nach in Kilodalton (Scientific).

Beladen wurde die erste Gel Tasche mit einem 3,5 µl des Page Ruler + (Thermo Scientific, Roskilde Dänemark). In die darauffolgenden Taschen wurden je 20 µl Probe gegeben und das Gel läuft bei 150 Volt für 60 bis 90 Minuten.

### **2.2.7.3 Western Blot**

Ziel des Western Blots war die Detektion von Proteinen durch spezifische Antikörper, bzw. durch polyklonale Seren.

Die zuvor im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Elektroblot zur Anode auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Dazu wurde die PVDF-Membran (Transfer Membranes Immobilon-P, Thermo Scientific) zuerst mit Methanol aktiviert.

Beim Einlegen der Membran in die Western Blot Kammer wurden Filterpapier und Schwämme mit eingelegt, um die Anhaftung von SDS-Gel und PVDF Membran zu verbessern. Schließlich wurde der Transfer-Puffer der Kammer hinzugefügt. Nachdem die Proteine bei 25 V für eine Stunde auf die PVDF Membran gewandert war, wurden sie zur Fixierung über Nacht in 3% BSA geblockt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen.

### **2.2.7.4 Immundetektion**

Die Immundetektion hat den Zweck, spezifische Proteine mittels Antikörperbindung nachzuweisen.

Nachdem die PVDF-Membran mit 3% BSA über Nacht geblockt wurde, erfolgten zwei Waschschrte mit PBS-T (0,05%). Danach wurde die Membran für eine Stunde mit dem Primär-Antikörper (1:10000 in PBS-T) inkubiert. In diesem Fall wurde ein Maus-Anti-FLAG Antikörper oder ein Kaninchen-Anti-Sbp Antikörper verwendet.

Daraufhin folgten drei Waschschrte mit PBS-T für 15 Minuten, anschließend wurde die Membran für eine weitere Stunde mit dem Sekundäantikörper (1:10000 in PBS-T) inkubiert. Bei den Sekundäantikörpern handelte es sich entweder um einen Anti-Maus oder einen Anti-Kaninchen Antikörper, der an eine Horseradish Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Danach erfolgten erneut drei Waschschrte mit PBS-T für 15 Minuten.

Danach konnte die Immundetektion mittels Chemolumineszenz durch Zugabe einer 1:1 Mischung der Komponenten des verwendeten ECL-Western-Blotting-Kits (GE Healthcare, United Kingdom) durchgeführt werden. Die Auswertung der Immunreaktion erfolgte mittels Fotofilm (Fujifilm, Japan) in einer Röntgenkammer.

### 2.2.8 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie beschreibt eine Methode, bei welcher einzelne Zellen an einem Lichtstrahl vorbeifließen und je, nach Form oder Struktur, den Lichtstrahl unterschiedlich emittieren. Sind diese Zellen zusätzlich auch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, wird die Methode fluorescence-activated cell sorting, kurz FACS genannt. Mit dieser lassen sich Aussagen über Größe, Oberflächenstrukturen und intrazelluläre Reaktionen detektieren.

Man unterscheidet mehrere Qualitäten von Streulicht, welches durch das Bestrahlen der Zelle entsteht. Zum einen verwendet man den *Forward Scatter*, der der strahlenden Lichtquelle gegenüber liegt und für die Bestimmung des Volumens der Zelle verantwortlich ist. Zum anderen der *Side Scatter*, welcher orthogonal zur Lichtquelle liegt und durch das Detektieren des Seitenstreulichts die Dichte bzw. Granulierung der Zelle misst. In dieser Arbeit wurde das FACS Aria Fusion (BD, Heidelberg) unter einer S2 Arbeitswerkbank genutzt (Adan et al., 2017).

Es wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes LIVE/DEAD (Invitrogen, Carlsbad, USA) zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden. Dieser Farbstoff ist membranimpermeable und reagiert ausschließlich in Zellen mit kompromittierter Zellmembran mit intrazellulären Nukleinsäuren, sodass nur tote Bakterien bei einer Wellenlänge von 568nm detektierbar und von lebenden Zellen unterscheidbar sind. Die Quantifizierung der *sbp*-Promotoraktivität wurde mit Hilfe des Plasmids pNFP:*sbp::gfp* erreicht. Dadurch steht die Expression des extrachromosomalen GFP unter der Kontrolle des *sbp*-Promotors (siehe Tabelle: 8). Mit Hilfe dieses Plasmids konnte innerhalb der Population zwischen GFP<sup>high</sup>, GFP<sup>main</sup> und GFP<sup>low</sup> Bakterien unterschieden werden (Invitrogen, 2020).

In diesem Versuch wurden verschiedene *S. epidermidis* Stämme in Schüttelkultur (25ml TSB in Erlenmeyer Kolben) und statischer Biofilmkultur (25 ml in 10cm Kulturschalen) untersucht. Nach sechs bzw. 18 Stunden Wachstum wurden die statischen Biofilme zunächst mit Hilfe eines Zellschabers aus der Schale gelöst und zusammen mit den Schüttelkulturen jeweils in ein Falcon überführt und mittels Sonifizierung vereinzelt. Hierzu wurde ein Impuls für 30 Sekunden bei einer Amplitude von 35% benutzt und die Probe auf Eis behandelt. Im Anschluss wurden alle Suspensionen 1:10 verdünnt und mit 1 mM LIVE/DEAD Farbstoff für 60 min bei Raumtemperatur gefärbt. Die Analyse erfolgte am FACS AriaFusion (BD, Heidelberg) und die Datenprozessierung mit der FACS Diva<sup>TM</sup> Software (BD, Heidelberg).

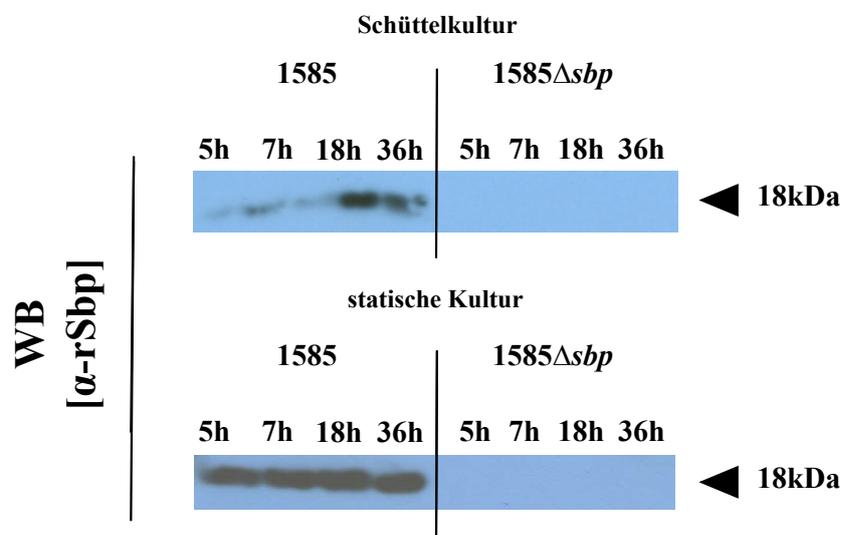
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Nachweis der *S. epidermidis* Sbp-Produktion im Western Blot

Ziel der Untersuchung war es, mittels Western Blot das auf der *S. epidermidis* Zelloberfläche lokalisierte Sbp zu detektieren sowie die Menge des dort gebundenen Proteins zu schätzen. Diese Aspekte sollten im zeitlichen Verlauf der bakteriellen Wachstumskinetik der *S. epidermidis* Stämme 1585 und 1457 analysiert werden.

Die Expression von Oberflächenproteinen wird bei *S. epidermidis* zentral durch die Masterregulatoren Agr und SarA gesteuert. Daher sollte neben der zeitlichen Dynamik der Sbp-Produktion auch der Einfluss dieser Regulatoren auf die zeitliche und quantitative Sbp-Produktion untersucht werden. Hierzu wurden im Verlauf des bakteriellen Wachstums Oberflächenproteine nach fünf (frühe exponentielle Wachstumsphase), sieben (späte exponentielle Wachstumsphase), 18 (stationäre Wachstumsphase) und 36 Stunden (Absterbephase) präpariert.

##### 3.1.1 Analyse der Sbp-Produktion in *S. epidermidis* 1585 und 1457

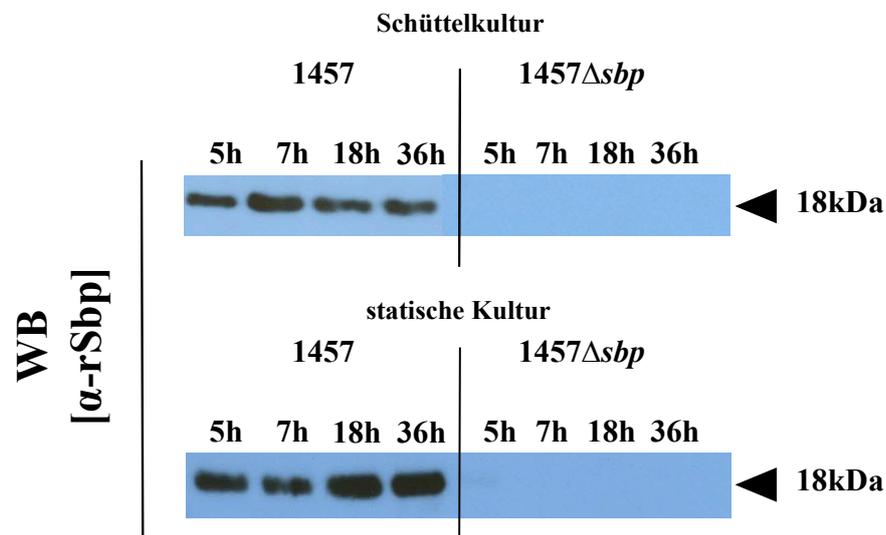


**Abbildung 8:** Western Blot Analyse von Oberflächenproteinpräparationen von *S. epidermidis* 1585. Die Kultur der Bakterien erfolgte in Schüttelkultur (oberes Panel) oder statischer Kultur (unteres Panel). Die Bakterien wurden fünf, sieben, 18 und 36 Stunden angezchtet. Nach Normalisierung der Zellzahl anhand der optischen Dichte wurden Zelloberflächenproteine durch Aufkochen in LDS-Puffer gelöst, anschließend auf einem SDS PAGE getrennt und auf eine PVDF Membran geblottet. Sbp wurde mittels eines polyklonalen Kaninchen anti-Sbp Antiserums und einem HRP konjugiertem anti Kaninchen IgG detektiert. 1585Δsbp fungierte als Negativkontrolle.

Kaninchen α-Sbp Antiserum: 1:10.000, Sekundärantikörper α-Kaninchen IgG gekoppelt mit HRP: 1:10.000. Belichtung: 60 Sekunden.

In der Western Blot Analyse zeigte sich, dass *S. epidermidis* 1585 sowohl in Schüttelkultur als auch in statischer Biofilmkultur zu jedem der untersuchten Zeitpunkte Sbp an der Oberfläche exprimiert. Die im Wesentlichen identische Intensität der Banden nach statischer Kultur zeigt, dass die Sbp-Produktion unabhängig von der Wachstumsphase als weitestgehend gleichbleibend betrachtet werden kann. Nach Wachstum in Schüttelkultur zeigten sich nach fünf und sieben Stunden Kultur schwache Sbp-spezifische Banden, während nach 18 Stunden Kultur eine Bande stärkerer Intensität zur Darstellung kam.

Insgesamt war die Bandenintensität in statischer Kultur zu jedem Zeitpunkt größer als in Schüttelkultur.



**Abbildung 9: Western Blot Analyse von Oberflächenproteinpräparationen von *S. epidermidis* 1457.** Die Kultur der Bakterien erfolgte in Schüttelkultur (oberes Panel) oder statischer Kultur (unteres Panel). Die Bakterien wurden fünf, sieben, 18 und 36 Stunden angezchtet. Nach Normalisierung der Zellzahl anhand der optischen Dichte wurden Zelloberflächenproteine durch Aufkochen in LDS-Puffer gelöst, anschließend auf einem SDS PAGE getrennt und auf eine PVDF Membran gebロットet. Sbp wurde mittels eines polyklonalen Kaninchen anti-Sbp Antiserums und einem HRP konjugiertem anti-Kaninchen IgG detektiert. 1457Δsbp fungierte als Negativkontrolle.

Kaninchen α-Sbp Antiserum: 1:10.000, Sekundärantikörper α-Kaninchen IgG gekoppelt mit HRP: 1:10.000. Belichtung: 60 Sekunden.

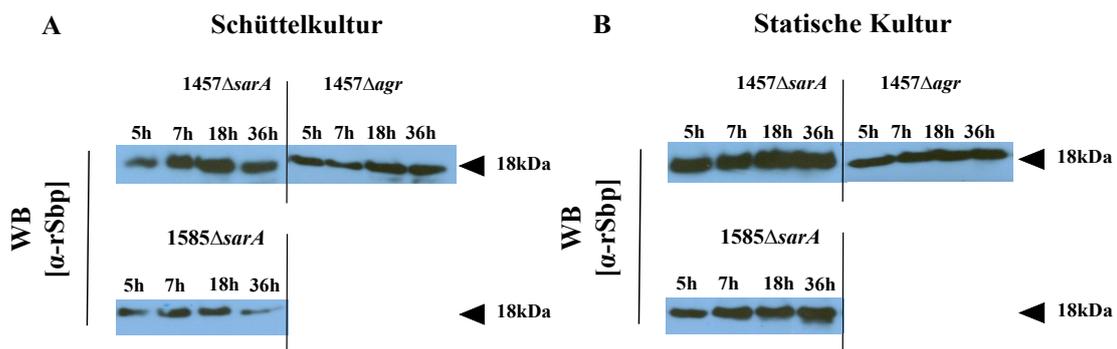
Bei der Analyse der *S. epidermidis* Stämme 1457 und 1457Δsbp konnte Sbp in *S. epidermidis* 1457 zu jedem untersuchten Zeitpunkt auf der Oberfläche dargestellt werden. Anders als bei *S. epidermidis* 1585 ist die Protein Expression im 1457, sowohl in

Schüttelkultur als auch in statischer Kultur, über die Zeit gleichbleibend. Hierbei zeigten sich allerdings in statischer Kultur stärker-intense Sbp-spezifische Banden. Dies kann als Hinweis auf eine unter diesen Kulturbedingungen stärkere Sbp-Produktion gewertet werden.

Vergleicht man die Stämme 1585 und 1457 miteinander, so ist die Intensität der Sbp-spezifischen Banden in *S. epidermidis* 1457 stärker als in *S. epidermidis* 1585. Dieser Unterschied ist akzentuiert beim Vergleich der Bandenintensitäten nach Kultur der Erreger in Schüttelkultur.

### 3.1.2 Untersuchung der Sbp-Produktion in den Regulator-Mutanten *S. epidermidis* 1585 $\Delta$ sarA, 1457 $\Delta$ sarA und 1457 $\Delta$ agr

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten sollte der Frage nachgegangen werden, ob die globalen Regulatoren SarA und Agr einen Einfluss auf die Produktion von Sbp in *S. epidermidis* 1457 und 1585 haben.



**Abbildung 10: Western Blot Analyse von Oberflächenproteinpräparationen von *S. epidermidis* 1585 $\Delta$ sarA, 1457 $\Delta$ sarA und 1457 $\Delta$ agr.** Die Kultur der Bakterien erfolgte in Schüttelkultur (oberes Panel) oder statischer Kultur (unteres Panel). Die Bakterien wurden fünf, sieben, 18 und 36 Stunden angezüchtet. Nach Normalisierung der Zellzahl anhand der optischen Dichte wurden Zelloberflächenproteine durch Aufkochen in LDS-Puffer gelöst, anschließend auf einem SDS PAGE getrennt und auf eine PVDF Membran geblottet. Sbp wurde mittels eines polyklonalen Kaninchen anti-Sbp-Antiserums und einem HRP konjugiertem anti Kaninchen -gG detektiert.

Kaninchen  $\alpha$ -Sbp Antiserum: 1:10.000, Sekundärantikörper  $\alpha$ -Kaninchen IgG gekoppelt mit HRP: 1:10.000. Belichtung: 60 Sekunden.

In den Western Blot Analysen der Stämme *S. epidermidis* 1585 $\Delta$ sarA, 1457 $\Delta$ sarA und 1457 $\Delta$ agr zeigte sich, dass die untersuchten Stämme zu jedem der analysierten Zeitpunkte Sbp produzieren. In statischer Biofilmmkultur konnte gefunden werden, dass sich die Intensität der Banden über die untersuchten Zeitpunkte hinweg nicht wesentlich veränderte. Auch in Schüttelkultur scheint die Sbp Oberflächenexpression relativ konstant zu bleiben.

Lediglich in *S. epidermidis* 1585 $\Delta$ *sarA* und 1547 $\Delta$ *sarA* fand sich in Schüttelkultur eine Abnahme nach sechs Stunden (1457), beziehungsweise nach sechs und 36 Stunden (1585). Die Intensität der Sbp-spezifischen Banden ist, wie auch schon bei der Untersuchung der Wildtypen dargestellt, in statischer Kultur höher als in Schüttelkultur. Lediglich im Stamm 1457 $\Delta$ *agr* ist keine Änderung der Sbp Oberflächenexpression bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen erkennbar.

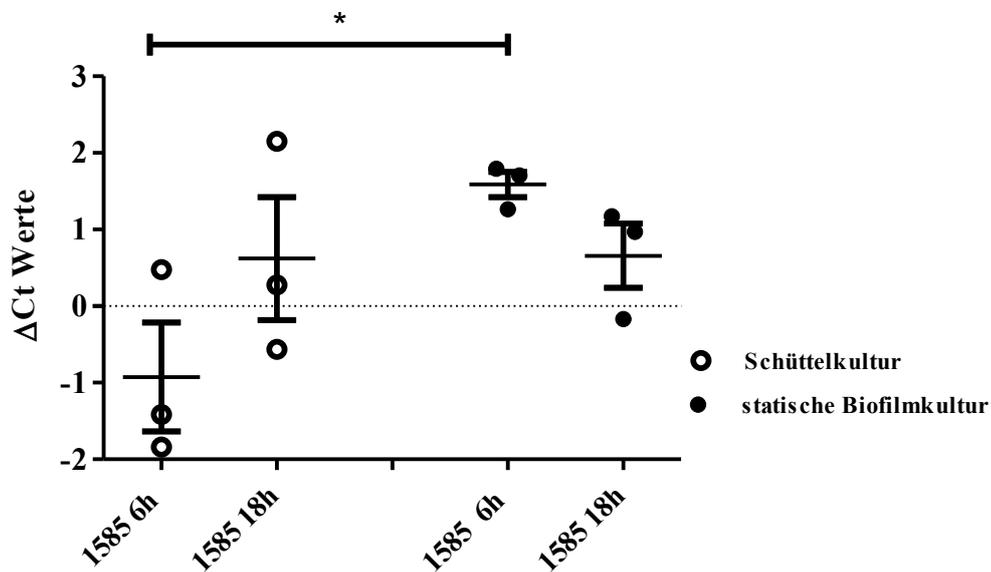
Insgesamt können die gewonnenen Daten dahingehend interpretiert werden, dass in *Agr* und *SarA* keinen Einfluss auf die Sbp-Produktion in *S. epidermidis* 1585 und 1457 nehmen.

### **3.2 Quantitative Analyse der *sbp*-Transkription mittels real-time-PCR**

Ziel der quantitativen Transkriptionsanalyse von *sbp* war es, mögliche Unterschiede der *sbp*-Transkription in Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen (Schüttelkultur versus statische Biofilmkultur) und Wachstumsphase (exponentielles versus stationäres Wachstum) zu detektieren. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde RNA nach sechs und 18 Stunden Wachstum, unter den genannten Kulturbedingungen, gewonnen. Die *sbp*-Transkription wurde im relativen Verhältnis zur Transkription von drei *housekeeping* Genen (*rho*, *tpiA* und *gyrB*) quantifiziert. Die daraus entstehenden  $\Delta\text{Ct}$  Werte dienten dazu, Unterschiede bezüglich der *sbp*-Transkription zu quantifiziert und wurden auf Graphen aufgetragen. Hierbei gilt, je niedriger die  $\Delta\text{Ct}$  Werte sind, desto höher ist die *sbp*-Transkription im Vergleich zu ihren jeweiligen *housekeeping* Genen. Anschließend wurde mittels Student's *t*-Test die Signifikanz dieser Unterschiede ermittelt und das Signifikanzniveau mittels Sternchen in den Grafiken markiert [\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ].

#### **3.2.1 Analyse der zeitlichen *sbp*-Transkription innerhalb *S. epidermidis* 1585 und 1457**

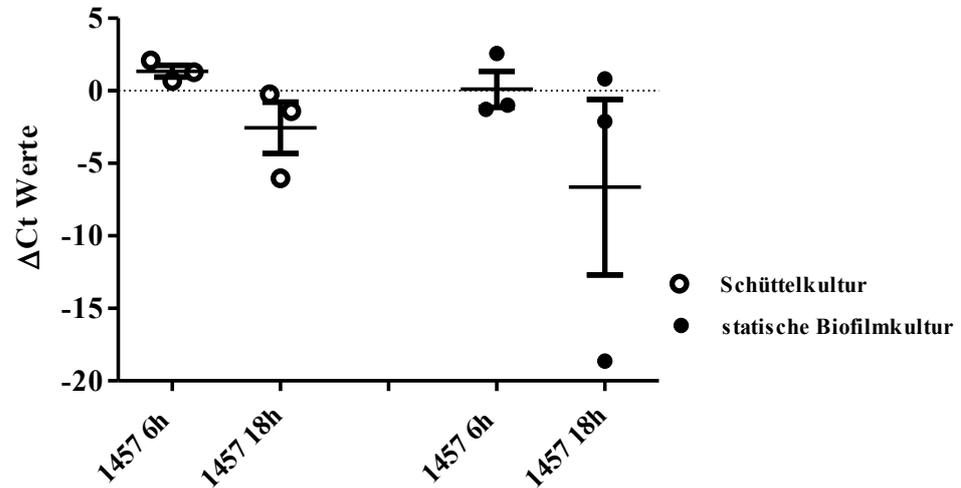
Die Analyse der Sbp-Produktion im zeitlichen Verlauf der Wachstumskurve im Western Blot hatte keine Hinweise auf eine signifikante Abhängigkeit von der Wachstumsphase erbracht. Dieser Befund sollte durch Untersuchung der *sbp*-Transkription mittels qPCR validiert werden.



**Abbildung 11: Darstellung der relativen *sbp*-Transkription ( $\Delta\text{Ct}$ ) in *S. epidermidis* 1585 im Scatter Plot.** Ausgefüllte Punkte repräsentieren  $\Delta\text{Ct}$  Werte nach Kultur unter statischen Bedingungen, offene Kreise zeigen die Werte nach Kultur in Schüttelkultur. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert der  $\Delta\text{Ct}$  Werte aus jeweils 2 technischen Replikaten. Insgesamt wurden 3 Proben pro Stamm erstellt ( $n=3$ ). Je niedriger die  $\Delta\text{Ct}$  Werte desto höher ist die relative *sbp*-Transkription. Die Ergebnisse wurden mittel t-Test auf mögliche statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. (\* =  $p < 0,05$ )

Hierbei zeigte sich, dass es beim Stamm *S. epidermidis* 1585 weder nach Kultur unter statischen noch dynamischen Bedingungen signifikante Unterschiede in der *sbp*-Transkription zwischen den Zeitpunkten sechs Stunden und 18 Stunden gibt (Abbildung 11). Der gleiche Befund wurde auch bei der Analyse des Stamms *S. epidermidis* 1457 gemacht (Abbildung 12). Interessanterweise ergab sich beim Vergleich der *sbp*-Transkription zwischen statischer und dynamischer Kultur im Stamm *S. epidermidis* 1585 der Nachweis einer 5,5-fach höheren *sbp*-Transkription in statischer Kultur ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}=5,56$ ). Dieser Befund ließ sich im Stamm *S. epidermidis* 1457 nicht reproduzieren. Es muss jedoch darauf verwiesen werden, dass aufgrund einer großen inter-Assay Varianz valide Aussagen zur *sbp*-Transkription nach 18 Stunden statischer Kultur nur bedingt gemacht werden können (Abbildung 12).

## 1457 Wildtyp nach 6 bzw. 18 Stunden Wachstum in Schüttelkultur und in statischer Biofilmkultur



**Abbildung 12:** Darstellung der relativen *sbp* Transkription ( $\Delta Ct$ ) in *S. epidermidis* 1457 im Scatter Plot. Ausgefüllte Punkte repräsentieren  $\Delta Ct$  Werte nach Kultur unter statischen Bedingungen, offene Kreise zeigen die Werte nach Kultur in Schüttelkultur. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert der  $\Delta Ct$  Werte aus jeweils zwei technischen Replikaten. Insgesamt wurden 3 Proben pro Stamm erstellt ( $n=3$ ). Je niedriger die  $\Delta Ct$  Werte desto höher ist die relative *sbp*-Transkription. Die Ergebnisse wurden mittel t-Test auf mögliche statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. (\* =  $p < 0,05$ )

### 3.2.2 Vergleich der *sbp*-Transkription zwischen *S. epidermidis* 1457 und 1585

Bei Betrachtung der *sbp*-Transkriptionsanalyse in *S. epidermidis* 1585 und 1457 ergaben sich Hinweise auf mögliche transkriptionelle Unterschiede zwischen diesen beiden Stämmen. Aus diesem Grund wurde die *sbp*-Transkription in beiden Stämmen direkt verglichen.

### 1457 Wildtyp vs. 1585 Wildtyp in Schüttelkultur und statischer Biofilmkultur

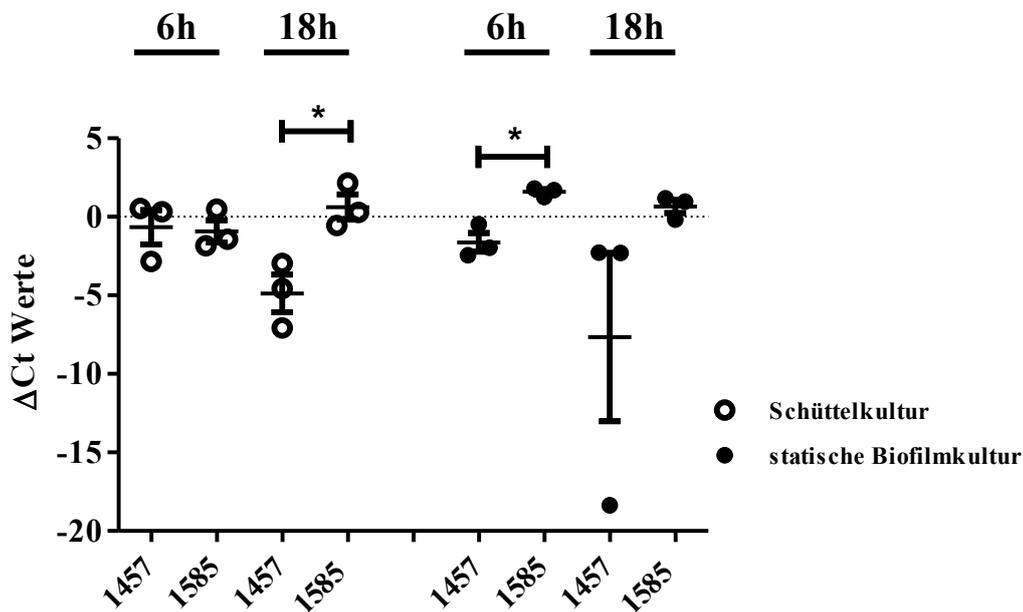


Abbildung 13: Vergleich der relativen *sbp* Expression ( $\Delta Ct$ ) zwischen *S. epidermidis* 1585 und 1457. Symbole repräsentieren die relative *sbp*-Transkription, dargestellt als  $\Delta Ct$  Wert. Jedem Symbol liegt der Mittelwert der Ct Werte aus zwei technischen Replikaten zugrunde. Insgesamt wurden 3 Proben pro Stamm erstellt ( $n=3$ ). Je niedriger die  $\Delta Ct$  Werte desto höher ist die relative *sbp*-Transkription. Die Ergebnisse wurden mittels t-Test auf mögliche statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. (\* =  $p < 0,05$ )

Tatsächlich konnte festgestellt werden, dass es nach 18 Stunden in dynamischer, wie auch nach sechs Stunden in statischer Kultur, statistisch signifikante Unterschiede in der Transkription von *sbp* zwischen den untersuchten Stämmen gab. So war die *sbp*-Transkription in *S. epidermidis* 1585 nach 18 Stunden dynamischer Kultur um den Faktor 45 niedriger als in *S. epidermidis* 1457 ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,0221$ ) (Abbildung 13). Nach sechs Stunden statischer Kultur konnte im Vergleich zu *S. epidermidis* 1457 in *S. epidermidis* 1585 eine um den Faktor 9 erniedrigte *sbp*-Transkription nachgewiesen werden ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 9,30$ ). Eine abschließende Bewertung möglicher transkriptioneller Unterschiede von *sbp* wird durch die Varianz der ermittelten  $\Delta Ct$  Werte beim Stamm *S. epidermidis* 1457 erschwert (Abbildung 13).

### 3.2.3 Vergleich der *sbp*-Transkription in *S. epidermidis* 1457 und 1585 mit den korrespondierenden Mutanten $\Delta agr$ und $\Delta sarA$

Eine weitere Frage war, inwiefern des Quorum Sensing System Agr sowie SarA Einfluss auf die Transkription von *sbp* nehmen. Zu diesem Zweck wurde ebenfalls die *sbp*-Transkription dieser Stämme miteinander verglichen.

#### 1457 Wildtyp vs. 1457 $\Delta agr$ und 1457 $\Delta sarA$ in Schüttelkultur

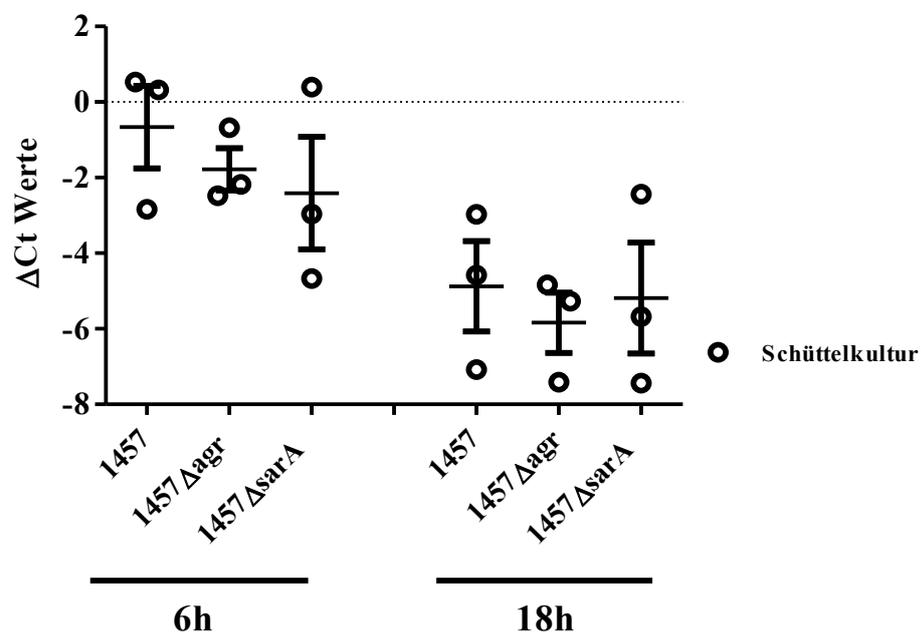
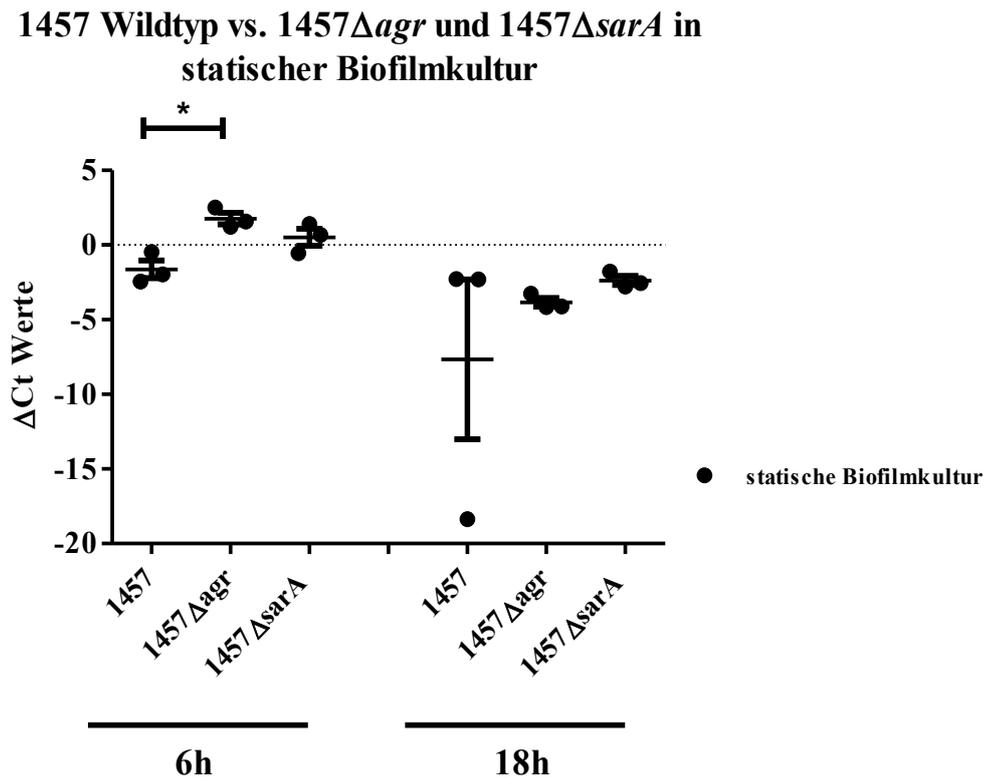


Abbildung 14: Darstellung der relativen *sbp*-Transkription ( $\Delta Ct$ ) in *S. epidermidis* 1457 und der Mutanten  $\Delta agr$  und  $\Delta sarA$  im Scatter Plot. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert der  $\Delta Ct$  Werte aus jeweils zwei technischen Replikaten. Insgesamt wurden 3 Proben pro Stamm erstellt ( $n=3$ ). Je niedriger die  $\Delta Ct$  Werte desto höher ist die relative *sbp*-Transkription. Die Ergebnisse wurden mittel t-Test auf mögliche statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. (\* =  $p < 0,05$ )

In der durchgeführten Untersuchung konnte kein differentieller Einfluss von Agr auf die *sbp*-Transkription im Stamm *S. epidermidis* 1457 gezeigt werden. In Schüttelkultur zeigt sich in zu keinem der beiden untersuchten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied in der *sbp*-Transkription (Abbildung 14). Anders ist dies in statischer Biofilmkultur (Abbildung 15), hier scheint Agr in 1457 nach sechs Stunden Wachstum einen Sbp induzierenden Effekt zu haben. Die Transkription in der Mutante ist um den Faktor 10,55 reduziert ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,09$ ). Eine abschließende Bewertung möglicher transkriptioneller Unterschiede von *sbp* wird

durch die Varianz der ermittelten  $\Delta\text{Ct}$  Werte beim Stamm *S. epidermidis* 1457 erschwert (Abbildung 14 und 15).

Im Hinblick auf die *sarA* lässt sich für den Stamm 1457 feststellen, dass *sarA* weder in Schüttelkultur noch in statische Biofilmkultur einen Einfluss auf die *sbp*-Transkription zu haben scheint. Auch hier muss erwähnt werden, dass eine große inter-Assay Varianz vorliegt (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Darstellung der relativen *sbp*-Transkription ( $\Delta\text{Ct}$ ) in *S. epidermidis* 1457 und der Mutanten  $\Delta$ *agr* und  $\Delta$ *sarA* im Scatter Plot.** Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert der  $\Delta\text{Ct}$  Werte aus jeweils zwei technischen Replikaten. Insgesamt wurden 3 Proben pro Stamm erstellt ( $n=3$ ). Je niedriger die  $\Delta\text{Ct}$  Werte desto höher ist die relative *sbp*-Transkription. Die Ergebnisse wurden mittel t-Test auf mögliche statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. (\* =  $p < 0,05$ )

### Vergleich der *sbp*-Transkription zwischen den Stämme *S. epidermidis* 1585 und seiner Mutante 1585 $\Delta$ *sarA*

Die sich anschließende Frage war, ob *sarA* bei dem PIA-negativen Stamm *S. epidermidis* 1585 einen Einfluss auf die *sbp*-Transkription hat.

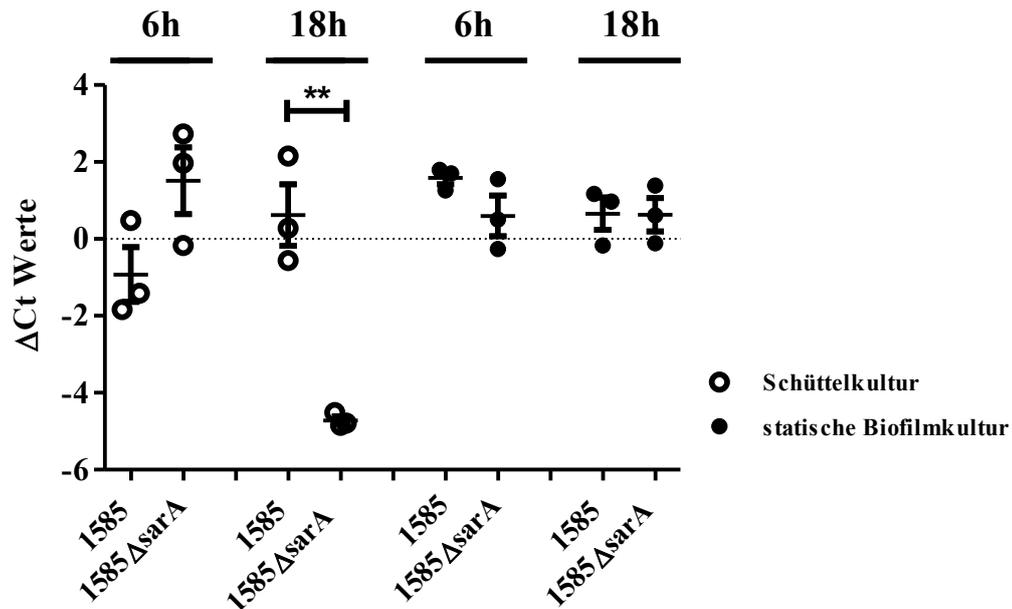


Abbildung 16: Darstellung der relativen *sbp*-Transkription ( $\Delta Ct$ ) in *S. epidermidis* 1585 und der Mutanten 1585 $\Delta sarA$  im Scatter Plot. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert der  $\Delta Ct$  Werte aus jeweils zwei technischen Replikaten Insgesamt wurden 3 Proben pro Stamm erstellt (n=3). Je niedriger die  $\Delta Ct$  Werte desto höher ist die relative *sbp*-Transkription. Die Ergebnisse wurden mittel t-Test auf mögliche statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. (\* =  $p < 0,05$ )

Der Stamm 1585 $\Delta sarA$  weist nach 18 Stunden Wachstum in Schüttelkultur eine signifikant höhere *sbp*-Transkription um den Faktor 40 auf. *SarA* scheint hier einen inhibierenden Effekt auf die Transkription von *sbp* in 1585 zu haben (Abbildung 16).

Ansonsten führt die Inaktivierung von *sarA* in *S. epidermidis* 1585 und 1457 zu keinen signifikanten Änderungen der *sbp*-Transkription. Weder im Stamm 1585 noch im Stamm 1457 (Abbildung 14 und 15) ist ein Unterschied zu einem Zeitpunkt signifikant. Dies deckt sich ebenfalls mit den Western Blot Ergebnissen in statischer Biofilmkultur.

### **3.3 Untersuchung der *sbp*-Transkription in lebenden Biofilmen mittels eines Gfp-basierten Reportersystems**

Die Analyse der *sbp*-Expression mittels Western Blot und qPCR weist den Methoden-inhärenten Nachteil auf, dass stets unselektiv die gesamte Population der *S. epidermidis* Zellen analysiert wird. Dementsprechend entgehen diesen Methoden mögliche differenzielle Expressionsereignisse, die sich auf Subpopulationsniveau abspielen. Um dieses Problem zu adressieren, sollte ein System aufgebaut werden, das die Untersuchung der *sbp*-Transkription auf Einzelzellebene ermöglichen sollte. Zu diesem Zweck wurde in Vorarbeiten das Reporter-Plasmid pNFP<sub>*sbp*</sub>::*gfp* etabliert, in welchem die Gfp-kodierende Sequenz (*gfp*) unter Kontrolle des nativen *sbp*-Promotor (*P<sub>sbp</sub>*) gebracht worden war.

#### **3.3.1 Erzeugung von Stämmen zur Untersuchung der *sbp*-Promotoraktivität mittels eines GFP-basierten Reporterassays**

Ziel war es, das Plasmid pNFP<sub>*sbp*</sub>::*gfp* in die Stämme *S. epidermidis* 1585, 1585Δ*sbp*, 1585Δ*sarA* und 1585Δ*agr* sowie *S. epidermidis* 1457, 1457Δ*sbp*, 1457Δ*sarA* und 1457Δ*agr* zu transduzieren und somit die Synthese von Gfp unter die Kontrolle des *sbp*-Promotors zu stellen, um damit eine Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit zur Sbp-Synthese zu generieren.

Die Transformation des Plasmids in die Zielstämme erfolgte im ersten Schritt über die Elektroporation in den Stamm *S. aureus* RN4220 und anschließend in den Stamm *S. epidermidis* 1457Δ*agr*. Aus diesem konnte mittels Phagentransduktion das Plasmid in die oben genannten Stämme transduziert werden. Der Nachweis der erfolgreichen Phagentransduktion erfolgte mittels einer Erregerdifferenzierung durch MALDI-TOF mit der Überprüfung der antibiotischen Empfindlichkeit im Agardiffusionstest (Antibiogramm). Im Antibiogramm war nach Transduktion eine zusätzliche Makrolidresistenz in allen Stämmen nachweisbar, welche durch ein auf dem Plasmid kodiertes, genetisches Element vermittelt wird. Die endgültige Bestätigung der erfolgreichen genetischen Manipulation erfolgte durch PCR-Detektion des auf pNFP<sub>*sbp*</sub>::*gfp* lokalisierten *gfp* sowie durch Restriktionsanalysen der aus den Transduktanten isolierten Plasmide.

Schließlich wurden die neu generierten Transduktanten im Biofilmassay in Bezug auf ihren Biofilmpheänotyp untersucht.

## Biofilmtest

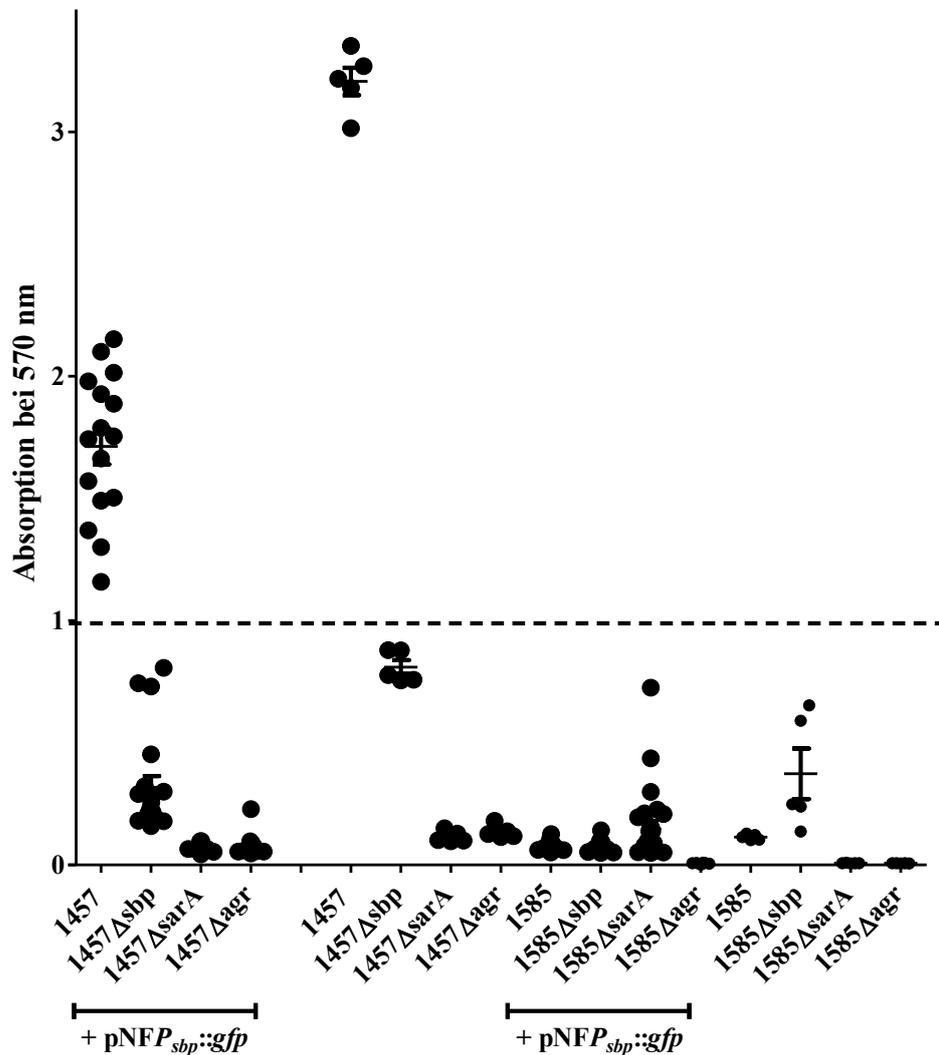


Abbildung 17: Biofilmtest der Stämme 1585, 1585Δsbp, 1585ΔsarA und 1585Δagr sowie 1457, 1457Δsbp, 1457ΔsarA und 1457Δagr ohne und mit dem Plasmid pNFP<sub>sbp</sub>::gfp. Jeder Punkt repräsentiert einen Biofilmtestmesswert. Ab einer Absorption von 1 ist geht man von einer Oberflächen-assozierten Biofilmorganisation aus. Nach vorrangegangenem dreimaligem Spülen mit 1x PBS wurde die Lösung mit Gentiana Violett gefärbt, getrocknet und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

Bei der Auswertung der Biofilmtests der Stämme *S. epidermidis* Stämme 1585 und 1457 ohne Plasmid fiel auf, dass bis auf 1457 kein Stamm klar Biofilm-positiv war. Dies war zu erwarten und deckte sich mit vorherigen Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe. Ebenfalls fiel auf, dass die Mutanten mit Plasmid, im Hinblick auf die Biofilmbildung, sich ähnlich wie ihre Ausgangsstämme verhielten. Somit waren die Transduktaten dafür geeignet, Rückschlüsse auf das Verhalten der Ausgangsstämme zu ziehen. Lediglich die 1585ΔsarA x

pNFP<sub>sbp</sub>::gfp zeigte anders als der Stamm Ausgangsstamm, jetzt eine leichte Biofilmbildung. Diese phänotypische Varianz muss bei der Auswertung berücksichtigt werden. Die so neu generierten Mutanten mit dem Plasmid pNFP<sub>sbp</sub>::gfp wurden nun mit Hilfe von FACS untersucht.

### **3.4 FACS Analyse zur Analyse der sbp-Expression auf Einzelzellebene**

Nachdem die erfolgreiche Transformation der *S. epidermidis* Stämme 1457, 1585 und abgeleiteter Mutanten mit Plasmid pNFP<sub>sbp</sub>::gfp dokumentiert worden war, wurden die Stämme mittels FACS analysiert. In bisherigen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten sich unterschiedliche Sbp-Expressionsintensitäten, je nach Bakterienlokalisierung innerhalb des Biofilms (Decker et al., 2015). Es konnte in diesen Experimenten eine vermehrte Sbp-Expression an den basalen, am Fremdmaterial befindlichen Schichten gezeigt werden (Decker et al., 2015). Auch bei unseren Mutanten zeigten sich in der Mikroskopie einzelne Inseln mit stärkerer und schwächerer Sbp-Expression (Abbildungen nicht dargestellt).

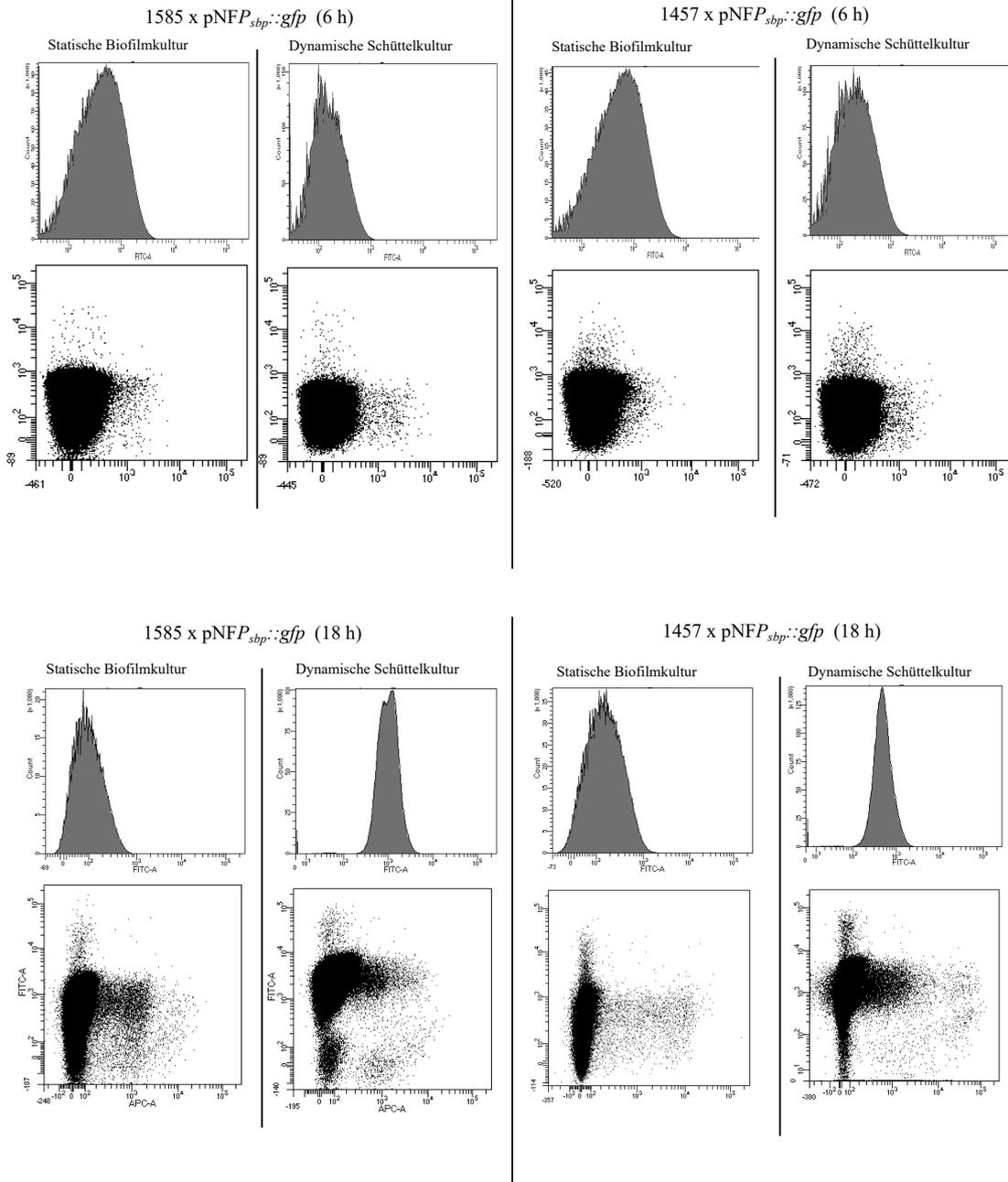
Es stellte sich auf der Grundlage dieser Beobachtungen die Frage, ob es je nach Wachstumsbedingung, Wachstumszeitpunkt und genetischem Hintergrund zu unterschiedlich starken Sbp-Expressionen in Subpopulationen kommt bzw. ob sich diese quantifizieren lassen.

Die große Varianz im Hinblick auf die Sbp-Expressionsintensitäten zwischen den einzelnen Stämmen, welche sich bereits in der qPCR gezeigt hatten, erschwerte die Bestimmung klarer Grenzwerte der Fluoreszenzintensität. Daher wurde auf die Definition von klaren Fluoreszenzintensitätswerten verzichtet und die Subpopulationen in Bezug zur Hauptpopulation definiert:

Die Hauptpopulation musste über 75 % aller Zellen enthalten und wurde als GFP<sup>main</sup> definiert. Populationen mit einer sbp-Promotoraktivität unterhalb GFP<sup>main</sup> wurden als GFP<sup>low</sup> bezeichnet. Populationen mit einer stärkeren sbp-Promotoraktivität als GFP<sup>main</sup> wurden als GFP<sup>high</sup> bezeichnet.

#### **3.4.1 Vergleich der differentiellen sbp-Promotoraktivität in 1457 und 1585 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach statischer Biofilmkultur und Schüttelkultur**

Im ersten Schritt wurde die sbp-Promotoraktivität in *S. epidermidis* 1457 und 1585 untersucht und miteinander verglichen.



**Abbildung 18: Analyse der *sbp*-Promotoraktivität in 1457 und 1585. *S. epidermidis* Stämme wurden nach 6 Stunden und 18 Stunden als Biofilm- beziehungsweise Schüttelkultur mittels Ultraschallbehandlung vereinzelt, mit LIVE/DEAD Farbstoff gefärbt und im FACS Aria hinsichtlich GFP Emission untersucht. Die obere Abbildung zeigt das Histogramm (x-Achse: FITC-A Kanal (grün); y-Achse: Zellzahl (count)). Die untere Abbildung zeigte die Verteilung im grün-roten Kanal (x-Achse: APC-A-Kanal (Tod Farbstoff: Tod ab 10<sup>3</sup>); y-Achse: FITC-A Kanal (grün)). Es wurden 2-6 Replikate mit der FACS DICA Software analysiert. Je biologisches Replikate wurden 10<sup>6</sup> Zellen aufgenommen.**

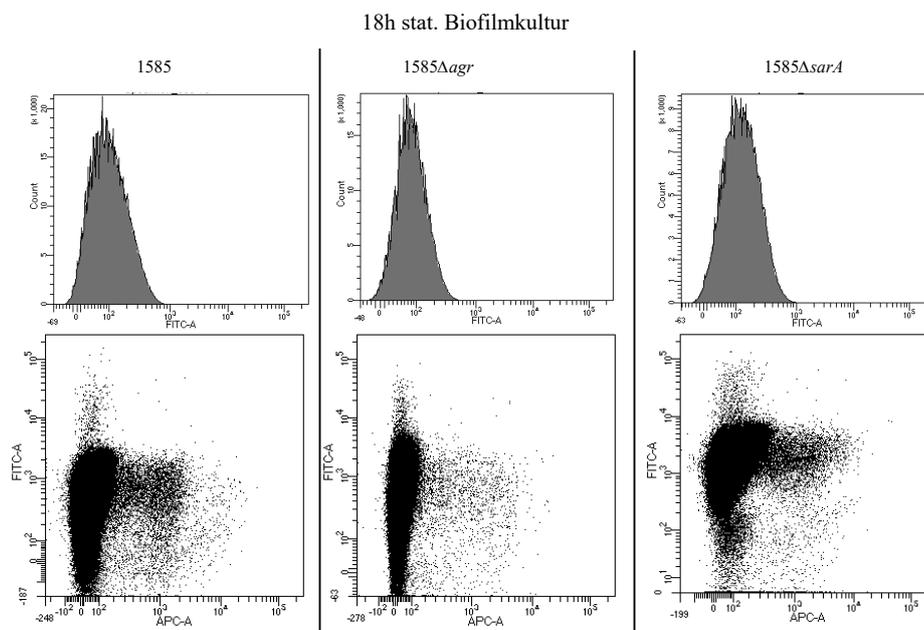
Die Auswertung zeigte, dass beinahe alle Bakterienzellen (99,5-96,5%) sich der Hauptpopulation GFP<sup>main</sup> mit durchschnittlicher *sbp*-Promotoraktivität zuordnen ließen. Nach sechs Stunden kategorisierten sich in 1457 und 1585 in beiden

Wachstumsbedingungen lediglich 0,1-0,3% der Bakterien zu GFP<sup>low</sup>, wohingegen nach 18 Stunden sich keine GFP<sup>low</sup> Subpopulation bestimmen ließ.

Eine GFP<sup>high</sup> Population war in keinem der Stämme zu finden. Der Großteil der Bakterien bewegte sich hinsichtlich der *sbp*-Expression innerhalb der Normalverteilung von GFP<sup>main</sup>, sodass eine Bildung von Subpopulationen in diesen Versuchen nicht gezeigt werden konnte.

### 3.4.2 Einfluss von Mutationen der Regulatoren *agr* und *sarA* auf die differenzielle *sbp*-Promotoraktivität in *S. epidermidis* 1457 und 1585

In statischer Biofilmkultur und Schüttelkultur konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Mutanten ( $\Delta sarA$  und  $\Delta agr$ ) und 1457 bzw. 1585 aufgezeichnet werden. Auf die Darstellung aller dieser fast identischen Graphen wurde deshalb verzichtet.



**Abbildung 19:** Analyse der *sbp*-Promotoraktivität in 1585 und deren Mutanten  $\Delta agr$  und  $\Delta sarA$ : *S. epidermidis* Stämme wurden nach 6 Stunden und 18 Stunden als Biofilm- beziehungsweise Schüttelkultur mittels Ultraschallbehandlung vereinzelt, mit LIVE/DEAD Farbstoff gefärbt und im FACS Aria hinsichtlich GFP Emission untersucht. Die obere Abbildung zeigt das Histogramm (x-Achse: FITC-A Kanal (grün); y-Achse: Zellzahl (count)). Die untere Abbildung zeigte die Verteilung im grün-roten Kanal (x-Achse: APC-A-Kanal (Tod Farbstoff: Tod ab  $10^3$ ); y-Achse: FITC-A Kanal (grün)). Es wurden 2-6 Replikate mit der FACS DICA Software analysiert. Je biologisches Replikat wurden  $10^6$  Zellen aufgenommen.

Bei der Analyse von *S. epidermidis* 1585 und 1457 und der korrespondierenden *agr* und *sarA* Mutanten (Abbildung 19) zeigten sich in statischer Biofilmkultur und Schüttelkultur

keine Unterschiede zu 1547 und 1585. Die entsprechenden Graphen zur Schüttelkultur und zum Zeitpunkt 6h sind nicht dargestellt.

Zusammenfassend konnte in diesen Experimenten die Bildung von Subpopulationen nicht gezeigt werden. In allen Stämmen zeigte sich eine Normalverteilung.

#### 4. DISKUSSION

*S. epidermidis* spielt im klinischen Alltag als Verursacher nosokomialer, meist Fremdmaterial-assoziierten Infektionen eine bedeutende Rolle. Infektionen durch *S. epidermidis* sind damit wesentlich mit Krankenhausaufenthalt-assoziiierter Morbidität und hieraus resultierender ökonomischer Mehrbelastung für das Gesundheitssystem assoziiert (Becker et al., 2020). *S. epidermidis* ist regulärer Bestandteil der humanen, Haut-assoziierten Mikrobiota (Grice and Segre, 2011, Naik et al., 2012, Zhou et al., 2020). Der evident apathogene Charakter kontrastiert mit dem invasiven Potential des Erregers im Kontext nosokomialer Infektionen. Forschungsaktivitäten der vergangenen 30 Jahre konnten zweifelsfrei nachweisen, dass *S. epidermidis* über ein spezifisches pathogenes Potential verfügt, welches fast ausschließlich nach Implantation von Fremdmaterialien entsteht. Diese Assoziation beruht maßgeblich auf der Fähigkeit des Erregers, auf der Oberfläche von implantierten Fremdmaterialien mehrlagige Biofilme auszubilden (Becker et al., 2020).

Das Small basic protein (Sbp) ist funktionell an der *S. epidermidis* Biofilmbildung beteiligt (Decker et al., 2015). Sbp ist ein 18 kDa große Protein und ist bei nahezu allen *S. epidermidis* Stämmen nachweisbar (Decker et al., 2015). Sbp ist direkt und indirekt in zentrale Mechanismen der *S. epidermidis* Biofilmbildung integriert. So interagiert Sbp direkt mit dem Zelloberflächenprotein Aap und ist hierdurch an der Aap-vermittelten Biofilmbildung beteiligt (Decker et al., 2015). Andererseits moduliert die Sbp-Expression über bislang nicht aufgeklärte Regulationsmechanismen die Produktion von PIA. Damit ist Sbp in der Lage, die interzellulär adhäsiven Eigenschaften von *S. epidermidis* indirekt zu modulieren.

Besonders charakteristisch für die Anordnung von Sbp in lebenden Biofilmen ist die Akkumulation des Proteins an der Grenzfläche zwischen Bakterium und der besiedelten Oberfläche (Decker et al., 2015, Wang et al., 2018). Diese Organisation ist funktionell relevant, da die Oberflächenbindung von Sbp die Adhärenz von *S. epidermidis* an künstlichem Materialien verstärkt, die selbst die Bindung von Bakterien nur in geringem Umfang unterstützen (Decker et al., 2015). Die Mechanismen, über welche *S. epidermidis* diese signifikante räumliche Organisation realisiert, sind derzeit unbekannt. So könnte Sbp inhärente Eigenschaften aufweisen, die zur Assemblierung an der Grenzfläche beitragen. Diese Annahme wird durch die kürzlich publizierte Beobachtung unterstützt, dass Sbp zur Ausbildung von großen Amyloid-Strängen in der Lage ist (Wang et al., 2018). Des Weiteren scheint es möglich, dass spezifische Regulationsmechanismen dazu führen, dass Sbp präferentiell in *S. epidermidis* Zellen am Boden der Biofilmstruktur exprimiert wird. In der

Tat ist die räumliche und zeitliche Steuerung der Genexpression in *S. aureus* Biofilmen am Beispiel des *cid*-Operons gut beschrieben (Moormeier et al., 2014).

In Staphylokokken wird die Expression von Proteinen und Biofilmfaktoren massgeblich durch die einzelnen Phase der Biofilmbildung reguliert und lässt sich dadurch in der Regel einer bestimmten Phase zuordnen (Keinhörster et al., 2019, Bronner et al., 2004, O'Gara, 2007). So wird AtlE vor allem zu Beginn in der Adhärenzphase als Adhärenzfaktor für die Bindung an Polyethylen und Vitronektin und als Protease benötigt, im Weiteren Verlauf der Biofilmbildung wird AtlE jedoch herunterreguliert (Otto, 2009, Hoiby et al., 2010).

Die Wachstumsphasen-abhängige Expression von Sbp war bislang nicht bekannt. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit eine Sbp-Expression im Verlauf der Wachstumsphase erstmalig untersucht.

Um mögliche Unterschiede der Genexpressionskontrolle in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund zu erfassen, wurden die Analysen in zwei voneinander unabhängigen klinischen *S. epidermidis* Isolaten (*S. epidermidis* 1457 und 1585) durchgeführt.

Klinische und kommensale *S. epidermidis* sind durch relevante Unterschiede in ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung gekennzeichnet. So können in klinischen Materialien sowohl Biofilm-positive, wie auch Biofilm-negative Stämme (*in-vitro*) isoliert werden (Both et al., 2021, Rohde et al., 2007, Ziebuhr et al., 1997, Liu et al., 2020, Post et al., 2017, Harris et al., 2016, Fredheim et al., 2015). Darüberhinaus unterliegt die Expression eines Biofilm-positiven Phänotyps einer differentiellen Expression. Diese macht es *S. epidermidis* möglich, den Biofilmphänotyp dynamisch zu steuern und sich hierdurch an veränderte Umweltbedingungen anzupassen (Schilcher and Horswill, 2020, Lerch et al., 2019, Schoenfelder et al., 2019, Hoang et al., 2019).

So bildet eine Variante des Stamms 1585 einen PIA-negativen proteinbasierten Biofilm, wohingegen der Stamm 1457 einen Polysaccharid (PIA)-abhängigen Biofilm bildet. Je nach genetischem Hintergrund sind unterschiedliche Faktoren für die Ausprägung des Biofilmphänotyps von unterschiedlicher Bedeutung. So zeigte sich in *S. epidermidis* in einem PIA-negativen, Biofilm-positiven Stamm, dass die Deletion des Fibrinogen-bindenden Oberflächenproteins *fbe* zu einer signifikant niedrigeren Biofilmbildung führte (Pei et al., 1999). Diese erheblichen Unterschiede in der relativen Expression von Genen und Gengruppen konnte erst kürzlich auch in klinischen *S. epidermidis* Isolaten aus Protheseninfektionen dokumentiert werden (Both et al., 2021). Besonders erstaunlich in dieser Untersuchung war der Befund, dass innerhalb einer Infektion auf Einzelzellebene parallel unterschiedliche Sub-Populationen eines Klons mit zum Teil erheblich

unterschiedlichen Transkriptomen existieren (Both et al., 2021). Diese aktuellen Befunde zeigen, dass eine globale Analytik der Sbp-Produktion und ihrer Determinanten notwendig ist, wobei auch die Möglichkeit von Unterschieden der Sbp-Produktion auf der Ebene einzelner Subpopulationen innerhalb eines Biofilms in Betracht gezogen werden muss. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war daher, die Wachstumsphasen-abhängige Expression von Sbp sowohl auf Populations-, als auch auf Subpopulationsebene zu untersuchen.

#### **4.1 Gibt es eine Wachstumsphasen-abhängige Steuerung der Sbp-Expression?**

Die durchgeführten Experimente, in welchen die Sbp-Produktion auf Populationsebene anhand von Zelloberflächenproteinpräparationen und RNA-Präparation mittels Western Blot und qPCR untersucht wurde, zeigten keine Wachstumsphasen-abhängige Expression des Proteins.

Somit ist ein zentrales Ergebnis dieser experimentellen Arbeit, dass es sich bei *sbp* um ein Wachstumsphasen-unabhängiges, also konstitutiv exprimiertes Gen handelt. Die konstitutive Expression von *sbp* wurde durch Beobachtungen in der FACS Analyse validiert. Der konstitutive Charakter der *sbp*-Expression unterscheidet das Protein von vielen anderen Faktoren der Staphylokokken Biofilmbildung (Martínez and Vadyvaloo, 2014, Baldry et al., 2020). So ist bekannt, dass beispielsweise Oberflächenproteine, welche die Bindung der Bakterienzellen an die Oberfläche eines Implantats unterstützen, typischerweise in der Lag- (Anlaufphase) und der frühen Log-Phase (exponentielle Phase) produziert werden (Weiss et al., 2016, McCourt et al., 2014). In der stationären Phase hingegen lässt sich vor allem die Expression von Mechanismen darstellen, die die Persistenz des Erregers durch zum Beispiel Abwehr von Immuneffektormechanismen und Aufnahme von Kohlenstoffquellen sicherstellen (Windham et al., 2016, Moche et al., 2015). Eine Ursache für die konstitutive Expression von *sbp* könnte darin liegen, dass Sbp in verschiedenen Phasen der Biofilmbildung spezifische Funktionen übernehmen kann. So macht die Eigenschaft der Oberflächenmodifikation mit daraus resultierender optimierter Bindung der *S. epidermidis* Zellen eine Produktion in einer frühen Phase der Fremdmaterial-Kolonisation notwendig. Unabhängig von dieser Funktion spielt Sbp jedoch auch eine Rolle als Interaktionspartner für Aap und unterstützt hierdurch die Aap-abhängige *S. epidermidis* Biofilmbildung (Banner et al., 2007, Rohde et al., 2005). Hierfür ist jedoch auch eine Expression in der akkumulativen Phase der *S. epidermidis* Biofilmbildung notwendig. Unabhängig von der Bedeutung bei der Biofilmbildung, scheint Sbp auch für die Integrität der *S. epidermidis*

Zellwand Bedeutung zu haben. Diese Inaktivierung von *sbp* führt zu einem schnelleren Absterben der Zellen (Autolyse) und einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin (Rohde, nicht publizierte Daten). Orientierende Transkriptom-Analysen zeigen, dass im Vergleich zum Wildtyp eine *sbp*-Mutante in *S. epidermidis* 1457 eine starke Aktivierung der stringent response zeigt, passend zu einer Destabilisierung der Zellwand (Corrigan et al., 2016) (Rohde, nicht publizierte Daten). Diese basale Bedeutung von Sbp für die bakterielle Zellwandphysiologie könnte den konstitutiven Expressionsmodus erklären.

#### **4.2 Ist die Produktion von Sbp unabhängig vom Anzuchtmodus?**

Im Rahmen der ersten Charakterisierung von Sbp konnte mittels mikroskopischer Methoden gezeigt werden, dass Sbp eine ungewöhnliche Anordnung innerhalb eines *S. epidermidis* Biofilms aufweist (Decker et al., 2015). Diese Anordnung ist dadurch charakterisiert, dass Sbp an der Grenzfläche zwischen der Oberfläche und der basalen Bakterien-schicht des Biofilms akkumuliert. Weitere Experimente zeigten, dass durch diese Sbp Ablagerung die Oberfläche in einer Weise verändert wird, welche die Bindung der Staphylokokken unterstützt (Decker et al., 2015). Erkenntnisse aus der Analyse von *Vibrio cholerae* deuten darauf hin, dass viele Bakterien spezifische Mechanismen nutzen, um die Eigenschaften von Oberflächen zu modifizieren und hierdurch die bakterielle Besiedlung zu begünstigen (Absalon et al., 2011). Da ein solches Priming möglicherweise besonders relevant wird, wenn die Bakterien statisch (also in sessiler Form) angezüchtet werden, wurde hier die Hypothese verfolgt, dass der Wachstumsmodus (statische versus geschüttelte Kultur) die quantitative Expression von Sbp modulieren könnte. Diese Hypothese wurde durch Befunde in anderen Organismen (Enterokokken, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*) unterstützt (Lim et al., 2017, Jean-Pierre et al., 2016, Bironi et al., 2014). Die hier für *S. epidermidis* erhobenen Daten zeigen, dass es keinen generellen Einfluss von statischen oder agitierten Wachstumsbedingungen auf die Expression von Sbp gibt. So fand sich in *S. epidermidis* 1457 weder unter Verwendung von qPCR, noch vom Western Blot ein Hinweis darauf, dass Sbp unter einer der genannten Bedingungen verstärkt produziert wird. Dem gegenüber steht der Befund in *S. epidermidis* 1585, in dem mittels qPCR eine im Vergleich zur statischen Kultur signifikant höhere *sbp*-Transkription in Schüttelkultur nachgewiesen werden konnte. Dieser Befund ließ sich allerdings im Western Blot nicht nachvollziehen. Während offenbar Stamm-abhängige Unterschiede in der Expressionskontrolle von *sbp* existieren, können

diese Unterschiede in Bezug auf die Anzucht, auf Basis der hier erhobenen Daten, nicht zurückgeführt werden.

### **4.3 Haben die globalen Regulatoren Agr und SarA Einfluss auf die Sbp-Expression?**

Eine mögliche Ursache für die beobachtete differentielle Verteilung von Sbp in einem lebenden Biofilm könnte eine spezifische *sbp* Transkription in den basalen Abschnitten des Biofilms sein. In der Tat unterliegen fast alle an der *S. epidermidis* Biofilmbildung beteiligten Faktoren einer strengen, durch Umwelteinflüsse modulierbaren Expressionskontrolle (Mack et al., 2000, Mack et al., 2004, Mack et al., 2002). Diese ist exemplarisch am Beispiel der Kontrolle des für die PIA Synthese maßgeblichen *icaADBC* Operons analysiert worden. Hierbei zeigte sich, dass zum Beispiel 4 % NaCl die Expression von *icaADBC* induzieren. An dieser Regulation ist der alternative Sigma Faktor Sigma B entscheidend beteiligt (Knobloch et al., 2004, Knobloch et al., 2001). Sigma B wiederum ist jedoch in *S. epidermidis* in übergeordnete regulatorische Kontexte integriert, die zumindest modulierend die Aktivität von Sigma B beeinflussen (Büttner et al., 2015). Mindestens zwei übergeordnete regulatorische Systeme sind in Staphylokokken zweifelsfrei identifiziert worden.

Bei diesen handelt es sich zum einen um den sogenannten *accessory gene regulator* (Agr), zum anderen um den *staphylococcal accessory regulator* SarA (Kavanaugh and Horswill, 2016, Le and Otto, 2015).

Das Quorum Sensing System Agr ist sowohl in *S. aureus* als auch in *S. epidermidis* der zentrale Regulator der Biofilmbildung. In *S. aureus* nimmt Agr maßgeblich Einfluss auf die Virulenz, durch die Regulation von Exotoxinen (Novick and Geisinger, 2008, Novick, 2003). In *S. epidermidis* wird über Agr neben der Regulation von anderen Biofilmfaktoren auch indirekt die Expression von PIA reguliert (Novick and Geisinger, 2008). Anders als erwartet, führte die Deletion des *agr*-Lokus jedoch nicht zu einer geringeren, sondern vielmehr zu einer stärkeren Biofilmbildung in *S. epidermidis* 1457. Dieser Befund konnte dadurch erklärt werden, dass ein phenol soluble modulin Hld, Agr-abhängig exprimiert wird. Hld besitzt durch seine Struktur amphiphile Eigenschaften und ist in der Lage, durch detergensartige Mechanismen einen Biofilm zu destabilisieren (Novick and Geisinger, 2008, Novick, 2003, Le et al., 2014).

Ein zweiter zentraler Regulator der Biofilmbildung ist der Stressregulator SarA. Zum einen nimmt dieser Stressregulator über die Bindung an Agr direkt Einfluss auf das Quorum

Sensing und zum anderen, über die Bindung an den Promotor von *icaADBC*, direkt Einfluss auf die PIA-Synthese. Zusätzlich reguliert SarA die Embp Expression, was die Bedeutung von SarA in PIA-negativen Stämmen unterstreicht (Christner et al., 2012, Büttner et al., 2015). Aufgrund der bekannten, zentralen Funktion von SarA und Agr bei der Steuerung der *S. epidermidis* Biofilmbildung sollte in der vorliegenden Arbeit desweiteren untersucht werden, ob eine Beeinflussung der Sbp-Produktion vorliegt.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde die Sbp Produktion in spezifischen Knock-out Mutanten, in welchen *agr* oder aber *sarA* deletiert worden waren, auf der Ebene der Transkription sowie der Proteinsynthese analysiert. Hierbei zeigte sich weder in *S. epidermidis* 1457, noch in *S. epidermidis* 1585 ein belastbarer Hinweis auf eine Beeinflussung der Sbp-Produktion durch Agr. Im Gegensatz dazu konnte in *S. epidermidis* 1585 festgestellt werden, dass im Vergleich zum Wildtyp 1585 in der *sarA* Mutante 1585 $\Delta$ *sarA* nach 18 und 36 Stunden in Schüttelkultur eine stärkere Sbp-Expression in der qPCR, wie auch im Western Blot dargestellt werden konnte. Diese Beobachtungen konnten jedoch in *S. epidermidis* 1457 und der korrespondierenden Mutante 1457 $\Delta$ *sarA* nicht nachvollzogen werden. Die SarA-abhängige Regulation der Sbp-Expression scheint dementsprechend durch den jeweiligen klonalen Hintergrund moduliert zu werden.

Wie oben beschrieben, ist SarA ein Regulator der *S. epidermidis* Biofilmbildung. Neben der positiven Beeinflussung von Biofilm-assoziierten Faktoren konnte gezeigt werden, dass SarA auch Biofilm-supprimierende Einflüsse aufweist. So zeigte sich, dass die Inaktivierung von *sarA* in *S. epidermidis* 1585 zur Induktion eines Biofilm-positiven Phänotyps führt. Als Ursache hierfür konnte gezeigt werden, dass SarA ein negativer Regulator der Embp-Expression ist. Durch die Inaktivierung von *sarA* kommt es in einer *sarA*-Mutante zu einer verstärkten Embp Produktion mit nachfolgender Biofilmbildung. Zusätzlich steuert SarA auch die Expression von Exoproteasen. In der *sarA*-Mutante 1585 $\Delta$ *sarA* kommt es zu einer Überexpression von Proteasen, die wiederum zu einer Spaltung und nachfolgend funktionellen Aktivierung des Autolysins E führen. Hierdurch wird im Zuge der verstärkten Autolyse eDNA freigesetzt, und diese unterstützt zusätzlich zu Embp die *S. epidermidis* Biofilmbildung in einer *sarA*-Mutante (Christner et al., 2012). Basierend auf diesen Beobachtungen, kann festgestellt werden, dass SarA gleichsam einem molekularen Schalter entspricht, der es *S. epidermidis* ermöglicht, zwischen verschiedenen Mechanismen der Biofilmbildung zu wählen. Die Befunde dieser Arbeit geben Hinweise dafür, dass auch Sbp in dieses differentielle Regulationsnetz integriert ist. Zukünftige Arbeiten müssen klären, ob

die Co-Regulation von Sbp und anderer Mechanismen in der *S. epidermidis* Biofilmbildung eine funktionelle Relevanz aufweist.

#### **4.4 Analyse der *sbp*-Expression auf Subpopulationsebene**

Traditionelle Methoden zur Analyse von Gentranskriptom und Proteinproduktion basieren auf der Analyse von ganzen Bakterienpopulationen. Neben technischen Limitierungen lag dieser Strategie die Annahme zugrunde, dass eine Bakterienpopulation weitestgehend durch nahezu identische Einzelzellen gekennzeichnet ist (Ma et al., 2019). Heute weiß man, dass eine bakterielle Population durch eine zum Teil ausgeprägte Populationsheterogenität gekennzeichnet ist. Diese prägt sich auf Ebene des Transkriptoms, des Proteoms und nachgeschaltet der gesamten Physiologie einer individuellen Zelle aus (Elowitz et al., 2002). Die Ursachen dieser Heterogenität sind vielgestaltig und im Detail noch nicht verstanden. So können stochastische Fluktuationen zur zufälligen Diversifikation einer Population beitragen (Huh and Paulsson, 2011, Elowitz and Leibler, 2000, Amir and Balaban, 2018), jedoch auch zum Beispiel spezifische Bedingungen des Mikromilieus innerhalb einer Kultur eine Heterogenität bedingen (Tan et al., 2009, Martins and Locke, 2015, Fu et al., 2018). Ein Biofilm stellt aufgrund seiner dreidimensionalen Struktur ein prototypisches Modell für die Entwicklung bakterieller Populationsheterogenität dar, denn es ist gut dokumentiert, dass es innerhalb eines Biofilms zu massiven lokalen Begrenzungen von Nährstoffen, Sauerstoff und Kommunikationsmolekülen kommt, während es zum Beispiel durch Behinderungen der Diffusion zur erheblichen Akkumulation von sekundären Metaboliten kommen kann (Murugesan et al., 2017, Kohanski et al., 2010, Ackermann, 2015). CLSM-basierte Untersuchung der Verteilung von Sbp in lebenden *S. epidermidis* Biofilmen hatte gezeigt, dass das Protein eine charakteristische Akkumulation an der Grenzfläche zwischen Oberfläche und der basalen Zellebene des Biofilms zeigt (Decker et al., 2015). Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass es innerhalb eines *S. epidermidis* Biofilms zur Ausprägung einer *sbp*-Transkriptionsheterogenität kommt, die durch eine spezifische Expression von Sbp in Zellebenen nahe der besiedelten Oberfläche gekennzeichnet wäre. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde ein Plasmid in *S. epidermidis* eingebracht, in welchem die Expression von Gfp unter die Kontrolle des *sbp*-Promotors gestellt worden war. Dieses Konstrukt erlaubt es, die Gfp Produktion als Maß für die *sbp*-Promotoraktivität zu verwenden. Um einen ersten Anhalt für eine mögliche Heterogenität der *sbp*-Transkription zu erhalten, wurden *S. epidermidis* 1457 x pNFP<sub>*sbp*</sub>::*gfp* und 1585 x pNFP<sub>*sbp*</sub>::*gfp* nach statischer und geschüttelter Kultur mittels FACS analysiert. Hierbei konnte festgestellt

werden, dass sowohl nach 6 wie auch 18 h ein Großteil der *S. epidermidis* Population *sbp*-Promotor Aktivität aufwies. Auch die Analyse der *sbp*-Promotoraktivität in *sarA* und *agr*-Mutanten der Stämme *S. epidermidis* 1457 und 1585 änderte an diesem Befund nichts. Dementsprechend ergab sich in der FACS-Analyse kein Anhalt für eine ausgeprägte Heterogenität der *sbp*-Promotoraktivität. Dies schließt allerdings die Möglichkeit, dass die lokale Akkumulation von Sbp durch eine differentielle *sbp*-Expression induziert wird, nicht aus. Aus diesem Grund wird es notwendig sein, zukünftig die Verteilung von Zellen mit unterschiedlich starker *sbp*-Promotoraktivität auch orts aufgelöst zu analysieren. Hierzu stehen mikroskopische Methoden wie die konfokale Laserscanningmikroskopie zur Verfügung (Ma et al., 2019). Auch bei Verwendung mikroskopischer Methoden muss allerdings beachtet werden, dass die Maturations- wie auch Abbaudynamik der hier genutzten Gfp-Isoform (superfolder [s]Gfp) erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse nimmt. Es ist bekannt, dass sGfp innerhalb von 10 min eine funktionale Konformation einnimmt und daher die Induktion von Promotoraktivität gut überwacht werden kann. Jedoch ist derzeit nicht bekannt, wie schnell sGfp in *S. epidermidis* abgebaut wird. Für eine andere Gfp-Isoform (Gfp<sub>mut3.1</sub>) konnten Halbwertszeiten von etwa sieben Stunden bestimmt werden (Franke et al., 2007). Hieraus ergibt sich, dass die alleinige Betrachtung der Gfp-Intensität nicht geeignet ist, um Fluktuationen in der *sbp*-Promotoraktivität mit ausreichender Sensitivität zu erfassen. Aus diesem Grund sollten zukünftig unabhängige Technologien genutzt werden, um die *sbp*-Promotoraktivität orts aufgelöst zu erfassen. Hierzu erscheint es besonders lohnenswert zu sein, Fluoreszenzreporter mit extrem verkürzter Halbwertszeit zu verwenden (Houser et al., 2012).

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

*S. epidermidis* ist der häufigste Erreger Fremdmaterial-assoziiierter Infektionen. Fremdmaterial-assoziierte Infektionen, wie zum Beispiel Infektionen von Gelenkendoprothesen, intravasalen Kathetern oder künstlichen Herzklappen, gehen mit einer substantiellen Morbidität und Mortalität einher. Die hohe Inzidenz dieser Erkrankungen führt außerdem zu einer signifikanten ökonomischen Mehrbelastung des Gesundheitssystems.

Die Behandlung von *S. epidermidis* Fremdmaterial-assoziierten Infektionen wird durch die Biofilmbildung, dem Hauptpathogenitätsfaktor des Erregers, erschwert. Die Einbettung des Erregers in bakterielle extrazelluläre Matrix erschwert den Zugriff der Wirtsimmunität und vermittelt eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika.

Der Aufbau der komplexen Architektur des Biofilms läuft in mehreren Phasen unter der Beteiligung von Polysaccharid- und Proteinfaktoren (EmbP, PIA, Aap, AtlE und Sbp) sowie extrazellulärer DNA ab. Die Phasen werden unter anderem über Masterregulatoren wie SarA und Agr reguliert.

Diese Doktorarbeit widmet sich der Untersuchung der Regulation des ubiquitären und für die Biofilmbildung essentiellen Faktors des Small basic protein (Sbp) in Abhängigkeit von Kulturbedingungen, lokaler Anordnung im Biofilm und dem bakteriellen genetischen Hintergrund.

Es zeigte sich, dass Sbp, anders als viele andere Biofilmfaktoren, zu jedem Wachstumszeitpunkt exprimiert wird. Eine klare Zuordnung zu einer bestimmten Phase der Biofilmbildung konnte weder auf Protein Ebene (Western Blot) noch auf der Ebene der Genexpression (qPCR) nachgewiesen werden. Auch hat die Art der Anzucht (planktonische Schüttelkultur oder statische Biofilmbildung) keinen Einfluss auf die Sbp-Expression. Der Einfluss des bakteriellen genetischen Hintergrunds wurde anhand von zwei *S. epidermidis* Stämmen untersucht. Der Stamm 1457 bildet einen starken, hauptsächlich Polysaccharid-basierten Biofilm, während der Stamm 1585 einen schwächeren, rein Protein-basierten Biofilm bildet. Sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Expressionsebene zeigte der Stamm 1457 eine erhöhte Sbp-Expression.

Der Knock-Out der zwei großen Masterregulatoren Agr und SarA hatte in beiden Stämmen keinen Einfluss auf die Sbp-Expression.

In der mikroskopischen Untersuchung von *S. epidermidis* Biofilmen mit Fluoreszenzmarkiertem Sbp zeigte sich eine differentielle räumliche Verteilung des Proteins mit einer erhöhten Konzentration nahe der Basis des Biofilms auf dem Fremdmaterial. Diese räumlich

ungleichmäßige Verteilung eines Biofilmfaktors ist bisher für *S. epidermidis* Biofilmfaktoren nicht beschrieben worden. Auf dem Boden dieser Beobachtung stellte sich deshalb die Frage, ob es innerhalb der Gesamtpopulation einzelne Subpopulationen gibt, welche eine stärkere oder eine geringere Sbp-Expression aufweisen?

Hierfür wurde eine FACS Analyse der *S. epidermidis* Stämme 1585 und 1457 mit jeweiligem Knock-out der Masterregulatoren Agr und SarA auf die unter der Kontrolle des *sbp*-Promotors stehenden GFP Fluoreszenz (Plasmid: pNFP<sub>*sbp*</sub>::*gfp*) in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase, sowohl unter planktonischen und als auch unter statischen Wachstumsbedingungen untersucht.

Bei der Auswertung dieser Ergebnisse zeigte sich, dass mindestens 96% aller Bakterienzellen eine durchschnittliche Sbp-Expression (GFP<sup>main</sup>) aufwiesen. Dabei konnten keine klaren Subpopulationen detektiert werden.

Zusammenfassend zeigte sich während der *S. epidermidis* Biofilmbildung eine Wachstumsphasen-unabhängige Sbp-Expression sowohl in planktonischer, als auch stationärer Kultur. Es konnte kein Einfluss der Hauptregulatoren der Biofilmbildung Agr und SarA festgestellt werden. Geringe Unterschiede zeigten sich zwischen den beiden untersuchten Wildtypstämmen 1457 und 1585. Eine regulatorische Grundlage der differentiellen räumlichen Verteilung innerhalb des Biofilms konnte nicht zeigen werden und bedarf weiterer Experimente.

## 6. SUMMARY

*S. epidermidis* is the most prevalent pathogen of foreign material-associated infections. Foreign-material-associated infections, such as prosthetic joint infections, infections of intravascular catheters or infections of artificial heart valves, are associated with substantial morbidity and mortality. The high incidence of these diseases results in a significant additional economic burden on the healthcare system.

Treatment of *S. epidermidis* foreign material-associated infections is complicated by biofilm formation, the main pathogenic factor of the pathogen. Embedding of the pathogen in bacterial extracellular matrix impedes access of host immunity and mediates decreased sensitivity to antibiotics.

The assembly of the complex architecture of the biofilm proceeds in several phases involving polysaccharide and protein factors (Embp, PIA, Aap, AtlE, and Sbp) and extracellular DNA. These phases are regulated by master regulators such as SarA and Agr. This thesis investigates the regulation of the essential and ubiquitous factor “small basic protein” (Sbp), depending on culture conditions, local arrangement in the biofilm and the bacterial genetic background.

It was shown that Sbp, unlike many other biofilm factors, is expressed at every growth time point. A clear assignment to a specific phase of biofilm formation could not be demonstrated in either the protein level (Western blot) or the gene expression level (qPCR). Also, the type of cultivation (planktonic shake culture or static biofilm culture) did not influence sbp-expression. The influence of bacterial genetic background was investigated using two *S. epidermidis* strains. Strain 1457 forms a strong, mainly polysaccharide-based biofilm, whereas strain 1585 forms a weaker, purely protein-based biofilm. At both the mRNA and protein expression levels, strain 1457 showed increased sbp-expression.

Knock-out of the two major master regulators Agr and SarA had no effect on sbp-expression in either strain.

Microscopic examination of *S. epidermidis* biofilms with fluorescently labeled Sbp revealed a differential spatial distribution of the protein with an increased concentration near the base of the biofilm on the foreign material. This spatially non-uniform distribution of a biofilm factor has not been previously described for *S. epidermidis* biofilm factors. On the basis of this observation, the question therefore arose as to whether there are individual subpopulations within the overall population that exhibit stronger or lower Sbp expression? For this purpose, FACS analysis of *S. epidermidis* strains 1585 and 1457 with respective knock-out of the master regulators Agr and SarA for GFP fluorescence (plasmide:

pNFP<sub>sbp::gfp</sub>) under the control of the *sbp*-promoter was investigated in exponential and stationary growth phase, both under planktonic and static growth conditions.

Analysis of these results showed that at least 96% of all bacterial cells had average Sbp expression (GFP<sup>main</sup>). No clear subpopulations could be detected.

In summary, during *S. epidermidis* biofilm formation, growth phase-independent *sbp*-expression was evident in both planktonic and stationary culture. No influence of the main regulators of biofilm formation Agr and SarA could be detected. Minor differences were shown between the two wild-type strains 1457 and 1585 studied. A regulatory basis of the differential spatial distribution within the biofilm could not be shown and requires further experiments.

## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	
Aap	Accumulation associated protein
Abb.	Abbildung
AIP	autoinducing Peptides
AltE	
AP	Alkalische Phosphatase
B	
BHI	Brain Heart Infusion
C	
D	
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	
E.	Escherichia
eDNA	extrazelluläre DNA
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Embp	Extracellular matrix binding protein
F	
Fbe	Fibrinogen binding protein
FIVAR	Found in various Architectures
G	
Gfp	grün-fluoreszierenden Protein
H	
h	Stunde
I	
IL-8	Interleukin 8
ini. (Aqua ad ini.)	Wasser zu Injektionszwecken
J	
K	
KISS	Krankenhaus Infektions Surveillance System
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
L	
LB	Luria Bertani
M	
MALDI	Massenspektrometrie
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
min	Minute
MSCRAMM	Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule
N	
O	

P	
PBS	Phosphate buffered saline
PBS/T	PBS mit 0,005 % Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIA	Polysaccharide Intercellular Adhesin
PJI	Prosthetic Joint Infection
PSM	Phenol-soluble Modulins
PVDF-Membran	Polyvinylidendifluorid-Membran
Q	
qPCR	Quantitative PCR
R	
RE	Restriktionsendonuklease
rpm	rounds per minute
rSbp	rekombinantes Sbp
S	
S.	Staphylococcus
sbp	Small basic Protein
Sbp	Small Basic Protein
Sdr	Serine-Aspartat Repeat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sek	Sekunde
T	
TA	Teichonsäuren
Tab.	Tabelle
TM	Transmembranregion
TSB	Trypticase Soy Broth
TSST-1	Toxic Shock Syndrom Toxin -1
U	
UV	Ultraviolett
V	
V	Volt
W	
X	
Y	
Z	
ZVK	Zentralvenöser Katheter
$\alpha$ -	Antikörper (gegen-)
$\lambda$	Wellenlänge (in nm)

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- ABSALON, C., VAN DELLEN, K. & WATNICK, P. I. 2011. A communal bacterial adhesin anchors biofilm and bystander cells to surfaces. *PLoS Pathog*, 7, e1002210.
- ACKERMANN, M. 2015. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, 13, 497-508.
- ADAN, A., ALIZADA, G., KIRAZ, Y., BARAN, Y. & NALBANT, A. 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 37, 163-176.
- ALONSO-VALLE, H., FARIÑAS-ALVAREZ, C., GARCÍA-PALOMO, J. D., BERNAL, J. M., MARTÍN-DURÁN, R., GUTIÉRREZ DÍEZ, J. F., REVUELTA, J. M. & FARIÑAS, M. C. 2010. Clinical course and predictors of death in prosthetic valve endocarditis over a 20-year period. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 139, 887-93.
- AMANCIO, L., GARCIA GIAMBERARDINO, H. I., FERREIRA, E., MATUCHESKI, B. & LUISA GARCIA GIAMBERARDINO, A. 2020. Epidemiological surveillance of healthcare-associated infections in a pediatric hematopoietic stem cell transplantation unit in south Brazil. *Transpl Infect Dis*, e13532.
- AMIR, A. & BALABAN, N. Q. 2018. Learning from Noise: How Observing Stochasticity May Aid Microbiology. *Trends Microbiol*, 26, 376-385.
- AND, M. B. M. & BASSLER, B. L. 2001. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165-199.
- ARRECUBIETA, C., LEE, M. H., MACEY, A., FOSTER, T. J. & LOWY, F. D. 2007. SdrF, a Staphylococcus epidermidis surface protein, binds type I collagen. *J Biol Chem*, 282, 18767-76.
- BALDRY, M., BOJER, M. S., NAJARZADEH, Z., VESTERGAARD, M., MEYER, R. L., OTZEN, D. E. & INGMER, H. 2020. Phenol-Soluble Modulins Modulate Persister Cell Formation in Staphylococcus aureus. *Front Microbiol*, 11, 573253.
- BANNER, M. A., CUNNIFFE, J. G., MACINTOSH, R. L., FOSTER, T. J., ROHDE, H., MACK, D., HOYES, E., DERRICK, J., UPTON, M. & HANDLEY, P. S. 2007. Localized tufts of fibrils on Staphylococcus epidermidis NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J Bacteriol*, 189, 2793-804.
- BECKER, K., BOTH, A., WEISSELBERG, S., HEILMANN, C. & ROHDE, H. 2020. Emergence of coagulase-negative staphylococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 18, 349-366.
- BECKER, K., HEILMANN, C. & PETERS, G. 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, 27, 870-926.
- BISWAS, R., VOGGU, L., SIMON, U. K., HENTSCHEL, P., THUMM, G. N. & GÄRTZ, F. 2006. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiology Letters*, 259, 260-268.
- BOTH, A., HUANG, J., QI, M., LAUSMANN, C., WEISSELBER, S., BÜTTNER, H., LEZIUS, S., FAILLA, A. V., CHRISTNER, M., STEGGER, M., GEHRKE, T., BAIG, S., CITAK, M., ALAWI, M., AEPFELBACHER, M. & ROHDE, H. 2021. Distinct clonal lineages and within-host diversification shape invasive Staphylococcus epidermidis populations. *PLoS Pathog*, 17, e1009304.
- BOWDEN, M. G., HEUCK, A. P., PONNURAJ, K., KOLOSOVA, E., CHOE, D., GURUSIDDAPPA, S., NARAYANA, S. V. L., JOHNSON, A. E. & HÖÖK, M. 2008. Evidence for the “Dock, Lock, and Latch” Ligand Binding Mechanism of the Staphylococcal Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) SdrG. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 638-647.
- BRONNER, S., MONTEIL, H. & PRÉVOST, G. 2004. Regulation of virulence determinants in Staphylococcus aureus: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev*, 28, 183-200.

- BURONI, S., MATTHIJS, N., SPADARO, F., VAN ACKER, H., SCOFFONE, V. C., PASCA, M. R., RICCARDI, G. & COENYE, T. 2014. Differential roles of RND efflux pumps in antimicrobial drug resistance of sessile and planktonic *Burkholderia cenocepacia* cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 7424-9.
- BÜTTNER, H., MACK, D. & ROHDE, H. 2015. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5.
- BÜTTNER, H., PERBANDT, M., KOHLER, T., KIKHNEY, A., WOLTERS, M., CHRISTNER, M., HEISE, M., WILDE, J., WEISSELBER, S., BOTH, A., BETZEL, C., HAMMERSCHMIDT, S., SVERGUN, D., AEPFELBACHER, M. & ROHDE, H. 2020. A Giant Extracellular Matrix Binding Protein of *Staphylococcus epidermidis* Binds Surface-Immobilized Fibronectin via a Novel Mechanism. *mBio*, 11.
- CERCA, N., BROOKS, J. L. & JEFFERSON, K. K. 2008. Regulation of the intercellular adhesin locus regulator (*icaR*) by *SarA*, *sigmaB*, and *IcaR* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 190, 6530-3.
- CHEUNG, A. L., BAYER, A. S., ZHANG, G., GRESHAM, H. & XIONG, Y. Q. 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 40, 1-9.
- CHRISTNER, M., FRANKE, G. C., SCHOMMER, N. N., WENDT, U., WEGERT, K., PEHLE, P., KROLL, G., SCHULZE, C., BUCK, F., MACK, D., AEPFELBACHER, M. & ROHDE, H. 2010. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol Microbiol*, 75, 187-207.
- CHRISTNER, M., HEINZE, C., BUSCH, M., FRANKE, G., HENTSCHE, M., BAYARD DUHRING, S., BUTTNER, H., KOTASINSKA, M., WISCHNEWSKI, V., KROLL, G., BUCK, F., MOLIN, S., OTTO, M. & ROHDE, H. 2012. *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*, 86, 394-410.
- CONLON, B. P., GEOGHEGAN, J. A., WATERS, E. M., MCCARTHY, H., ROWE, S. E., DAVIES, J. R., SCHAEFFER, C. R., FOSTER, T. J., FEY, P. D. & O'GARA, J. P. 2014. Role for the A domain of unprocessed accumulation-associated protein (Aap) in the attachment phase of the *Staphylococcus epidermidis* biofilm phenotype. *J Bacteriol*, 196, 4268-75.
- CONRADY, D. G., BRESCIA, C. C., HORII, K., WEISS, A. A., HASSETT, D. J. & HERR, A. B. 2008. A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 19456-61.
- CONRADY, D. G., WILSON, J. J. & HERR, A. B. 2013. Structural basis for Zn<sup>2+</sup>-dependent intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E202-11.
- CORRIGAN, R. M., BELLOWS, L. E., WOOD, A. & GRÜNDLING, A. 2016. ppGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E1710-9.
- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R. & LAPPIN-SCOTT, H. M. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49, 711-45.
- COSTERTON, J. W., STEWART, P. S. & GREENBERG, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-22.
- DECKER, R., BURDELSKI, C., ZOBIAK, M., BUTTNER, H., FRANKE, G., CHRISTNER, M., SASS, K., ZOBIAK, B., HENKE, H. A., HORSWILL, A. R.,

- BISCHOFF, M., BUR, S., HARTMANN, T., SCHAEFFER, C. R., FEY, P. D. & ROHDE, H. 2015. An 18 kDa scaffold protein is critical for *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *PLoS Pathog*, 11, e1004735.
- ELOWITZ, M. B. & LEIBLER, S. 2000. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 403, 335-8.
- ELOWITZ, M. B., LEVINE, A. J., SIGGIA, E. D. & SWAIN, P. S. 2002. Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 297, 1183-6.
- FEY, P. D., ULPHANI, J. S., GOTZ, F., HEILMANN, C., MACK, D. & RUPP, M. E. 1999. Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis*, 179, 1561-4.
- FLUCKIGER, U., WOLZ, C. & CHEUNG, A. L. 1998. Characterization of a sar homolog of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*, 66, 2871-8.
- FOSTER, T. J. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol*, 3, 948-58.
- FOSTER, T. J. 2020. Surface Proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Front Microbiol*, 11, 1829.
- FRANKE, G. C., DOBINSKY, S., MACK, D., WANG, C. J., SOBOTTKA, I., CHRISTNER, M., KNOBLOCH, J. K., HORSTKOTTE, M. A., AEPFELBACHER, M. & ROHDE, H. 2007. Expression and functional characterization of gfpmut3.1 and its unstable variants in *Staphylococcus epidermidis*. *J Microbiol Methods*, 71, 123-32.
- FREDHEIM, E. G. A., FLÆGSTAD, T., ASKARIAN, F. & KLINGENBERG, C. 2015. Colonisation and interaction between *S. epidermidis* and *S. aureus* in the nose and throat of healthy adolescents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34, 123-129.
- FU, X., KATO, S., LONG, J., MATTINGLY, H. H., HE, C., VURAL, D. C., ZUCKER, S. W. & EMONET, T. 2018. Spatial self-organization resolves conflicts between individuality and collective migration. *Nat Commun*, 9, 2177.
- GEFFERS, C. & GASTMEIER, P. 2011. Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System). *Dtsch Arztebl Int*, 108, 87-93.
- GEOGHEGAN, J. A., CORRIGAN, R. M., GRUSZKA, D. T., SPEZIALE, P., O'GARA, J. P., POTTS, J. R. & FOSTER, T. J. 2010. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 192, 5663-73.
- GERTZ, S., ENGELMANN, S., SCHMID, R., ZIEBANDT, A. K., TISCHER, K., SCHARF, C., HACKER, J. & HECKER, M. 2000. Characterization of the sigma(B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 182, 6983-91.
- GOTO, M. & AL-HASAN, M. N. 2013. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*, 19, 501-9.
- GRICE, E. A. & SEGRE, J. A. 2011. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*, 9, 244-53.
- HANDKE, L. D., SLATER, S. R., CONLON, K. M., O'DONNELL, S. T., OLSON, M. E., BRYANT, K. A., RUPP, M. E., O'GARA, J. P. & FEY, P. D. 2007. SigmaB and SarA independently regulate polysaccharide intercellular adhesin production in *Staphylococcus epidermidis*. *Can J Microbiol*, 53, 82-91.
- HARRIS, L. G., MURRAY, S., PASCOE, B., BRAY, J., MERIC, G., MAGEIROS, L., WILKINSON, T. S., JEEVES, R., ROHDE, H., SCHWARZ, S., DE LENCASTRE, H., MIRAGAIA, M., ROLO, J., BOWDEN, R., JOLLEY, K. A., MAIDEN, M. C., MACK, D. & SHEPPARD, S. K. 2016. Biofilm Morphotypes and Population Structure among *Staphylococcus epidermidis* from Commensal and Clinical Samples. *PLoS One*, 11, e0151240.

- HARTFORD, O., O'BRIEN, L., SCHOFIELD, K., WELLS, J. & FOSTER, T. J. 2001. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology (Reading)*, 147, 2545-2552.
- HEILMANN, C., HUSSAIN, M., PETERS, G. & GÖTZ, F. 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Molecular Microbiology*, 24, 1013-1024.
- HEILMANN, C., THUMM, G., CHHATWAL, G. S., HARTLEIB, J., UEKÖTTER, A. & PETERS, G. 2003. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology (Reading)*, 149, 2769-2778.
- HILL, E. E., HERIJGERS, P., HERREGODS, M. C. & PEETERMANS, W. E. 2006. Evolving trends in infective endocarditis. *Clin Microbiol Infect*, 12, 5-12.
- HOANG, T. M., ZHOU, C., LINDGREN, J. K., GALAC, M. R., COREY, B., ENDRES, J. E., OLSON, M. E. & FEY, P. D. 2019. Transcriptional Regulation of *icaADBC* by both *IcaR* and *TcaR* in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol*, 201.
- HOIBY, N., BJARNSHOLT, T., GIVSKOV, M., MOLIN, S. & CIOFU, O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, 35, 322-32.
- HOIBY, N., BJARNSHOLT, T., MOSER, C., BASSI, G. L., COENYE, T., DONELLI, G., HALL-STOODLEY, L., HOLA, V., IMBERT, C., KIRKETERP-MOLLER, K., LEBEAUX, D., OLIVER, A., ULLMANN, A. J., WILLIAMS, C., BIOFILMS, E. S. G. F. & CONSULTING EXTERNAL EXPERT WERNER, Z. 2015. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect*, 21 Suppl 1, S1-25.
- HORASAN, E. S., ERSOZ, G., TOMBAK, A., TIFTIK, N. & KAYA, A. 2011. Bloodstream infections and mortality-related factors in febrile neutropenic cancer patients. *Med Sci Monit*, 17, Cr304-9.
- HOUSER, J. R., FORD, E., CHATTERJEA, S. M., MALERI, S., ELSTON, T. C. & ERREDE, B. 2012. An improved short-lived fluorescent protein transcriptional reporter for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 29, 519-30.
- HUGONNET, S., SAX, H., EGGIMANN, P., CHEVROLET, J.-C. & PITTET, D. 2004. Nosocomial Bloodstream Infection and Clinical Sepsis. 10, 76-81.
- HUH, D. & PAULSSON, J. 2011. Non-genetic heterogeneity from stochastic partitioning at cell division. *Nat Genet*, 43, 95-100.
- INVITROGEN. 2020. *Invitrogen™ Molecular Probes™ LIVE/DEAD™* [Online]. Invitrogen.com. Available: <https://www.fishersci.de/shop/products/molecular-probes-live-dead-viability-cytotoxicity-kit-mammalian-cells/10237012> [Accessed].
- IZANO, E. A., AMARANTE, M. A., KHER, W. B. & KAPLAN, J. B. 2008. Differential Roles of Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 470-476.
- JEAN-PIERRE, F., TREMBLAY, J. & DÉZIEL, E. 2016. Broth versus Surface-Grown Cells: Differential Regulation of *RsmY/Z* Small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by the *Gac/HptB* System. *Front Microbiol*, 7, 2168.
- JOHNSTON, B. & CONLY, J. 2005. What do central venous catheter-associated bloodstream infections have to do with bundles?g. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 16, 215-8.
- JUNGES, R., SALVADORI, G., SHEKHAR, S., ÅMDAL, H. A., PERISELNERIS, J. N., CHEN, T., BROWN, J. S. & PETERSEN, F. C. 2017. A Quorum-Sensing System That Regulates *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Formation and Surface Polysaccharide Production. *mSphere*, 2.

- KAPLAN, J. B., RAGUNATH, C., VELLIYAGOUNDER, K., FINE, D. H. & RAMASUBBU, N. 2004. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 2633-6.
- KAVANAUGH, J. S. & HORSWILL, A. R. 2016. Impact of Environmental Cues on Staphylococcal Quorum Sensing and Biofilm Development. *J Biol Chem*, 291, 12556-64.
- KAYSER, F. H., FELIX, M. & WUST, J. 1972. [Chromosomal and extrachromosomal resistance markers in methicillin-resistant staphylococci]. *Pathol Microbiol (Basel)*, 38, 27-8.
- KEINHÖRSTER, D., GEORGE, S. E., WEIDENMAIER, C. & WOLZ, C. 2019. Function and regulation of *Staphylococcus aureus* wall teichoic acids and capsular polysaccharides. *Int J Med Microbiol*, 309, 151333.
- KNOBLOCH, J. K., BARTSCHT, K., SABOTTKE, A., ROHDE, H., FEUCHT, H. H. & MACK, D. 2001. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J Bacteriol*, 183, 2624-33.
- KNOBLOCH, J. K., JÄGER, S., HORSTKOTTE, M. A., ROHDE, H. & MACK, D. 2004. RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene icaR. *Infect Immun*, 72, 3838-48.
- KOCIANOVA, S., VUONG, C., YAO, Y., VOYICH, J. M., FISCHER, E. R., DELEO, F. R. & OTTO, M. 2005. Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Invest*, 115, 688-94.
- KOHANSKI, M. A., DWYER, D. J. & COLLINS, J. J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*, 8, 423-35.
- KOSTYLEV, M., KIM, D. Y., SMALLEY, N. E., SALUKHE, I., GREENBERG, E. P. & DANDEKAR, A. A. 2019. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 7027-7032.
- KREISWIRTH, B. N., LOFDAHL, S., BETLEY, M. J., O'REILLY, M., SCHLIEVERT, P. M., BERGDOLL, M. S. & NOVICK, R. P. 1983. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature*, 305, 709-12.
- LE, K. Y., DASTGHEYB, S., HO, T. V. & OTTO, M. 2014. Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. *Front Cell Infect Microbiol*, 4, 167.
- LE, K. Y. & OTTO, M. 2015. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front Microbiol*, 6, 1174.
- LE, K. Y., VILLARUZ, A. E., ZHENG, Y., HE, L., FISHER, E. L., NGUYEN, T. H., HO, T. V., YEH, A. J., JOO, H. S., CHEUNG, G. Y. C. & OTTO, M. 2019. Role of Phenol-Soluble Modulins in *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation and Infection of Indwelling Medical Devices. *J Mol Biol*, 431, 3015-3027.
- LERCH, M. F., SCHOENFELDER, S. M. K., MARINCOLA, G., WENCKER, F. D. R., ECKART, M., FÖRSTNER, K. U., SHARMA, C. M., THORMANN, K. M., KUCKLICK, M., ENGELMANN, S. & ZIEBUHR, W. 2019. A non-coding RNA from the intercellular adhesion (ica) locus of *Staphylococcus epidermidis* controls polysaccharide intercellular adhesion (PIA)-mediated biofilm formation. *Mol Microbiol*, 111, 1571-1591.
- LIM, S. Y., TEH, C. S. J. & THONG, K. L. 2017. Biofilm-Related Diseases and Omics: Global Transcriptional Profiling of *Enterococcus faecium* Reveals Different Gene Expression Patterns in the Biofilm and Planktonic Cells. *Omics*, 21, 592-602.

- LIU, Q., LIU, Q., MENG, H., LV, H., LIU, Y., LIU, J., WANG, H., HE, L., QIN, J., WANG, Y., DAI, Y., OTTO, M. & LI, M. 2020. Staphylococcus epidermidis Contributes to Healthy Maturation of the Nasal Microbiome by Stimulating Antimicrobial Peptide Production. *Cell Host Microbe*, 27, 68-78.e5.
- MA, Z., CHU, P. M., SU, Y., YU, Y., WEN, H., FU, X. & HUANG, S. 2019. Applications of single-cell technology on bacterial analysis. *Quantitative Biology*, 7, 171-181.
- MACINTOSH, R. L., BRITTAN, J. L., BHATTACHARYA, R., JENKINSON, H. F., DERRICK, J., UPTON, M. & HANDLEY, P. S. 2009. The terminal A domain of the fibrillar accumulation-associated protein (Aap) of Staphylococcus epidermidis mediates adhesion to human corneocytes. *J Bacteriol*, 191, 7007-16.
- MACK, D., BECKER, P., CHATTERJEE, I., DOBINSKY, S., KNOBLOCH, J. K., PETERS, G., ROHDE, H. & HERRMANN, M. 2004. Mechanisms of biofilm formation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int J Med Microbiol*, 294, 203-12.
- MACK, D., DAVIES, A. P., HARRIS, L. G., KNOBLOCH, J. K. M. & ROHDE, H. 2008. Staphylococcus epidermidis Biofilms: Functional Molecules, Relation to Virulence, and Vaccine Potential. Springer Berlin Heidelberg.
- MACK, D., FISCHER, W., KROKOTSCH, A., LEOPOLD, K., HARTMANN, R., EGGE, H. & LAUFS, R. 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol*, 178, 175-83.
- MACK, D., NEDELMANN, M., KROKOTSCH, A., SCHWARZKOPF, A., HEESEMANN, J. & LAUFS, R. 1994. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing Staphylococcus epidermidis impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun*, 62, 3244-53.
- MACK, D., ROHDE, H., DOBINSKY, S., RIEDEWALD, J., NEDELMANN, M., KNOBLOCH, J. K., ELSNER, H. A. & FEUCHT, H. H. 2000. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun*, 68, 3799-807.
- MACK, D., SABOTTKE, A., DOBINSKY, S., ROHDE, H., HORSTKOTTE, M. A. & KNOBLOCH, J. K. 2002. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative Staphylococcus epidermidis transposon mutant classes. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 178-83.
- MACK, D., SIEMSEN, N. & LAUFS, R. 1992. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent Staphylococcus epidermidis: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun*, 60, 2048-57.
- MARTÍNEZ, L. C. & VADYVALOO, V. 2014. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. *Front Cell Infect Microbiol*, 4, 38.
- MARTINS, B. M. & LOCKE, J. C. 2015. Microbial individuality: how single-cell heterogeneity enables population level strategies. *Curr Opin Microbiol*, 24, 104-12.
- MCCOURT, J., O'HALLORAN, D. P., MCCARTHY, H., O'GARA, J. P. & GEOGHEGAN, J. A. 2014. Fibronectin-binding proteins are required for biofilm formation by community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain LAC. *FEMS Microbiol Lett*, 353, 157-64.
- MEKALANOS, J. J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol*, 174, 1-7.

- MOCHE, M., SCHLÜTER, R., BERNHARDT, J., PLATE, K., RIEDEL, K., HECKER, M. & BECHER, D. 2015. Time-Resolved Analysis of Cytosolic and Surface-Associated Proteins of *Staphylococcus aureus* HG001 under Planktonic and Biofilm Conditions. *J Proteome Res*, 14, 3804-22.
- MOORMEIER, D. E., BOSE, J. L., HORSWILL, A. R. & BAYLES, K. W. 2014. Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *mBio*, 5, e01341-14.
- MURUGESAN, N., DHAR, P., PANDA, T. & DAS, S. K. 2017. Interplay of chemical and thermal gradient on bacterial migration in a diffusive microfluidic device. *Biomicrofluidics*, 11, 024108.
- NAIK, S., BOULADOUX, N., WILHELM, C., MOLLOY, M. J., SALCEDO, R., KASTENMULLER, W., DEMING, C., QUINONES, M., KOO, L., CONLAN, S., SPENCER, S., HALL, J. A., DZUTSEV, A., KONG, H., CAMPBELL, D. J., TRINCHIERI, G., SEGRE, J. A. & BELKAID, Y. 2012. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science*, 337, 1115-9.
- NILSSON, M., FRYKBERG, L., FLOCK, J. I., PEI, L., LINDBERG, M. & GUSS, B. 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*, 66, 2666-73.
- NOVICK, R. P. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*, 48, 1429-49.
- NOVICK, R. P. & GEISINGER, E. 2008. Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet*, 42, 541-64.
- O'GARA, J. P. 2007. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 270, 179-88.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B. & KOLTER, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 54, 49-79.
- OH, J., BYRD, A. L., PARK, M., KONG, H. H. & SEGRE, J. A. 2016. Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. *Cell*, 165, 854-66.
- OLSON, M. E., TODD, D. A., SCHAEFFER, C. R., PAHARIK, A. E., VAN DYKE, M. J., BÜTTNER, H., DUNMAN, P. M., ROHDE, H., CECH, N. B., FEY, P. D. & HORSWILL, A. R. 2014. *Staphylococcus epidermidis* agr quorum-sensing system: signal identification, cross talk, and importance in colonization. *J Bacteriol*, 196, 3482-93.
- OTTO, M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* — the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 555-567.
- OTTO, M. 2012. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Seminars in Immunopathology*, 34, 201-214.
- OTTO, M. 2014. *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis. *Methods Mol Biol*, 1106, 17-31.
- PAHARIK, A. E., KOTASINSKA, M., BOTH, A., HOANG, T. N., BÜTTNER, H., ROY, P., FEY, P. D., HORSWILL, A. R. & ROHDE, H. 2017. The metalloprotease SepA governs processing of accumulation-associated protein and shapes intercellular adhesive surface properties in *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol*, 103, 860-874.
- PEEL, T. N., CHENG, A. C., BUISING, K. L. & CHOONG, P. F. 2012. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 2386-91.

- PEI, L., PALMA, M., NILSSON, M., GUSS, B. & FLOCK, J. I. 1999. Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*, 67, 4525-30.
- POST, V., HARRIS, L. G., MORGENSTERN, M., MAGEIROS, L., HITCHINGS, M. D., MÉRIC, G., PASCOE, B., SHEPPARD, S. K., RICHARDS, R. G. & MORIARTY, T. F. 2017. Comparative Genomics Study of *Staphylococcus epidermidis* Isolates from Orthopedic-Device-Related Infections Correlated with Patient Outcome. *J Clin Microbiol*, 55, 3089-3103.
- PRABHAKARAN, S., LIANG, X., SKARE, J. T., POTTS, J. R. & HOOK, M. 2009. A novel fibronectin binding motif in MSCRAMMs targets F3 modules. *PLoS One*, 4, e5412.
- QIN, Z., OU, Y., YANG, L., ZHU, Y., TOLKER-NIELSEN, T., MOLIN, S. & QU, D. 2007. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 153, 2083-2092.
- QUECK, S. Y., JAMESON-LEE, M., VILLARUZ, A. E., BACH, T. H., KHAN, B. A., STURDEVANT, D. E., RICKLEFS, S. M., LI, M. & OTTO, M. 2008. RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell*, 32, 150-8.
- RESCH, A., ROSENSTEIN, R., NERZ, C. & GOTZ, F. 2005. Differential Gene Expression Profiling of *Staphylococcus aureus* Cultivated under Biofilm and Planktonic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2663-2676.
- ROHDE, H., BURANDT, E. C., SIEMSEN, N., FROMMELT, L., BURDELSKI, C., WURSTER, S., SCHERPE, S., DAVIES, A. P., HARRIS, L. G., HORSTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, J. K., RAGUNATH, C., KAPLAN, J. B. & MACK, D. 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*, 28, 1711-20.
- ROHDE, H., BURDELSKI, C., BARTSCHT, K., HUSSAIN, M., BUCK, F., HORSTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, J. K., HEILMANN, C., HERRMANN, M. & MACK, D. 2005. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol*, 55, 1883-95.
- ROHDE, H., FRANKENBERGER, S., ZAHNINGER, U. & MACK, D. 2010. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol*, 89, 103-11.
- ROHDE, H., KALITZKY, M., KROGER, N., SCHERPE, S., HORSTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, J. K., ZANDER, A. R. & MACK, D. 2004. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol*, 42, 5614-9.
- ROWE, S. E., MAHON, V., SMITH, S. G. & O'GARA, J. P. 2011. A novel role for SarX in *Staphylococcus epidermidis* biofilm regulation. *Microbiology (Reading)*, 157, 1042-1049.
- RUBIO, M., PALAU, L., VIVAS, J. R., DEL POTRO, E., DIAZ-MEDIAVILLA, J., ALVAREZ, A., MARTINEZ, R. & PICAZO, J. J. 1994. Predominance of gram-positive microorganisms as a cause of septicemia in patients with hematological malignancies. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 15, 101-4.
- RUPP, M. E., ULPHANI, J. S., FEY, P. D., BARTSCHT, K. & MACK, D. 1999. Characterization of the Importance of Polysaccharide Intercellular

- Adhesin/Hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the Pathogenesis of Biomaterial-Based Infection in a Mouse Foreign Body Infection Model. *Infection and Immunity*, 67, 2627-2632.
- SADYKOV, M. R., OLSON, M. E., HALOUSKA, S., ZHU, Y., FEY, P. D., POWERS, R. & SOMERVILLE, G. A. 2008. Tricarboxylic acid cycle-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J Bacteriol*, 190, 7621-32.
- SCHAEFFER, C. R., WOODS, K. M., LONGO, G. M., KIEDROWSKI, M. R., PAHARIK, A. E., BÜTTNER, H., CHRISTNER, M., BOISSY, R. J., HORSWILL, A. R., ROHDE, H. & FEY, P. D. 2015. Accumulation-Associated Protein Enhances *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation under Dynamic Conditions and Is Required for Infection in a Rat Catheter Model. 83, 214-226.
- SCHEITHAUER, S., BÜRCEL, U., RYANG, Y. M., HAASE, G., SCHIEFER, J., KOCH, S., HÄFNER, H. & LEMMEN, S. 2009. Prospective surveillance of drain associated meningitis/ventriculitis in a neurosurgery and neurological intensive care unit. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80, 1381-5.
- SCHILCHER, K. & HORSWILL, A. R. 2020. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84, e00026-19.
- SCHOENFELDER, S. M. K., LANGE, C., PRAKASH, S. A., MARINCOLA, G., LERCH, M. F., WENCKER, F. D. R., FÖRSTNER, K. U., SHARMA, C. M. & ZIEBUHR, W. 2019. The small non-coding RNA RsaE influences extracellular matrix composition in *Staphylococcus epidermidis* biofilm communities. *PLoS Pathog*, 15, e1007618.
- SCHOMMER, N. N., CHRISTNER, M., HENTSCHE, M., RUCKDESCHEL, K., AEPFELBACHER, M. & ROHDE, H. 2011. *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. *Infect Immun*, 79, 2267-76.
- SCIENTIFIC, T. Page Ruler +
- TAN, C., MARGUET, P. & YOU, L. 2009. Emergent bistability by a growth-modulating positive feedback circuit. *Nat Chem Biol*, 5, 842-8.
- TANDE, A. J. & PATEL, R. 2014. Prosthetic Joint Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27, 302-345.
- TORMO, M. A., MARTI, M., VALLE, J., MANNA, A. C., CHEUNG, A. L., LASA, I. & PENADES, J. R. 2005. SarA Is an Essential Positive Regulator of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Development. 187, 2348-2356.
- VAN SCHAIK, W., ZWIETERING, M. H., DE VOS, W. M. & ABEE, T. 2005. Deletion of the sigB gene in *Bacillus cereus* ATCC 14579 leads to hydrogen peroxide hyperresistance. *Appl Environ Microbiol*, 71, 6427-30.
- VAN WAMEL, W. J. B., VAN ROSSUM, G., VERHOEF, J., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E. & FLUIT, A. C. 1998. Cloning and characterization of an accessory gene regulator (agr)-like locus from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiology Letters*, 163, 1-9.
- VON EIFF, C., ARCIOLA, C. R., MONTANARO, L., BECKER, K. & CAMPOCCIA, D. 2006. Emerging *Staphylococcus* species as new pathogens in implant infections. *Int J Artif Organs*, 29, 360-7.
- VON EIFF, C., JANSEN, B., KOHNEN, W. & BECKER, K. 2005. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs*, 65, 179-214.

- VUONG, C., GERKE, C., SOMERVILLE, G. A., FISCHER, E. R. & OTTO, M. 2003. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis*, 188, 706-18.
- VUONG, C., KIDDER, J. B., JACOBSON, E. R., OTTO, M., PROCTOR, R. A. & SOMERVILLE, G. A. 2005. *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin production significantly increases during tricarboxylic acid cycle stress. *J Bacteriol*, 187, 2967-73.
- VUONG, C., KOCIANOVA, S., VOYICH, J. M., YAO, Y., FISCHER, E. R., DELEO, F. R. & OTTO, M. 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem*, 279, 54881-6.
- VUONG, C. & OTTO, M. 2002a. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect*, 4, 481-9.
- VUONG, C. & OTTO, M. 2002b. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*, 4, 481-489.
- WANG, C., FAN, J., NIU, C., WANG, C., VILLARUZ, A. E., OTTO, M. & GAO, Q. 2010. Role of *spx* in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 59, 152-60.
- WANG, L., LI, M., DONG, D., BACH, T. H., STURDEVANT, D. E., VUONG, C., OTTO, M. & GAO, Q. 2008a. *SarZ* is a key regulator of biofilm formation and virulence in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis*, 197, 1254-62.
- WANG, L., LI, M., DONG, D., THANH-HUY, DANIEL, VUONG, C., OTTO, M. & GAO, Q. 2008b. *SarZ* Is a Key Regulator of Biofilm Formation and Virulence in *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 197, 1254-1262.
- WANG, R., KHAN, B. A., CHEUNG, G. Y., BACH, T. H., JAMESON-LEE, M., KONG, K. F., QUECK, S. Y. & OTTO, M. 2011. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J Clin Invest*, 121, 238-48.
- WANG, Y., JIANG, J., GAO, Y., SUN, Y., DAI, J., WU, Y., QU, D., MA, G. & FANG, X. 2018. *Staphylococcus epidermidis* small basic protein (*Sbp*) forms amyloid fibrils, consistent with its function as a scaffolding protein in biofilms. *J Biol Chem*, 293, 14296-14311.
- WEISS, A., BROACH, W. H. & SHAW, L. N. 2016. Characterizing the transcriptional adaptation of *Staphylococcus aureus* to stationary phase growth. *Pathog Dis*, 74.
- WHITCHURCH, C. B. 2002. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science*, 295, 1487-1487.
- WILLIAMS, M. R. & GALLO, R. L. 2015. The Role of the Skin Microbiome in Atopic Dermatitis. *Current Allergy and Asthma Reports*, 15.
- WILLIAMS, R. J., HENDERSON, B., SHARP, L. J. & NAIR, S. P. 2002. Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*, 70, 6805-10.
- WINDHAM, I. H., CHAUDHARI, S. S., BOSE, J. L., THOMAS, V. C. & BAYLES, K. W. 2016. *SrrAB* Modulates *Staphylococcus aureus* Cell Death through Regulation of *cidABC* Transcription. *J Bacteriol*, 198, 1114-22.
- YAO, Y., DANIEL & OTTO, M. 2005a. 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. *The Journal of Infectious Diseases*, 191, 289-298.
- YAO, Y., STURDEVANT, D. E., VILLARUZ, A., XU, L., GAO, Q. & OTTO, M. 2005b. Factors characterizing *Staphylococcus epidermidis* invasiveness determined by comparative genomics. *Infect Immun*, 73, 1856-60.

- ZHOU, W., SPOTO, M., HARDY, R., GUAN, C., FLEMING, E., LARSON, P. J., BROWN, J. S. & OH, J. 2020. Host-Specific Evolutionary and Transmission Dynamics Shape the Functional Diversification of *Staphylococcus epidermidis* in Human Skin. *Cell*, 180, 454-470.e18.
- ZIEBUHR, J., HEUSIPP, G. & SIDDELL, S. G. 1997. Biosynthesis, purification, and characterization of the human coronavirus 229E 3C-like proteinase. *J Virol*, 71, 3992-7.
- ZIMMERLI, W., TRAMPUZ, A. & OCHSNER, P. E. 2004. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med*, 351, 1645-54.

## **9. DANKSAGUNG**

Nach vier Jahren intensiver, experimenteller wissenschaftlicher Arbeit habe ich meine Dissertation abschließen können. Auf diesem Weg haben mich viele Menschen unterstützt und mir geholfen, denen ich an dieser Stelle ausdrücklich meinen Dank aussprechen möchte.

Zuerst gilt mein Dank dem Leiter des Zentrums für Medizinische Diagnostik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Herrn Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher, für seine Bereitschaft, die erforderlichen Geräte und Räumlichkeiten am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene zur Verfügung zu stellen. Entsprechend richtet sich mein Dank an die Leitung und die Ansprechpartner der Anlage zur Campus Forschung des UKE, dem UKE Microscopy Imaging Facility (umif), für die Bereitstellung der lichtoptischen Mikroskope, einschließlich Einweisung in die Systeme.

Eine exzellente technische Betreuung erhielt ich durch Frau Gesche Kroll, Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des UKE, welche mich in die benötigten Techniken während der experimentellen Phase meiner Arbeit im Labor mit ihrem breitem Kenntnisreichtum aus der Staphylokokkenforschung eingearbeitet hat und auch im Verlauf der Fertigstellung mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Des weiteren habe ich Frau Samira Weißelberg, Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Institutes, zu danken, für die wissenschaftliche Unterstützung, mit ihrem weiten Wissensschatz und ihrem guten Humor hat sie mir sehr geholfen.

Herr Dr. med. Henning Büttner, Arzt und ehemaliger Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Institutes, war mir ein wertvoller Gesprächspartner, sowohl in der Phase der experimentellen Untersuchungen als auch in der Phase der Umsetzung der Ergebnisse in die wissenschaftliche Form des Schreibens, ihm danke ich für seine Ratschläge.

Frau Dr. med. Anna Both, Ärztin und wissenschaftlicher Mitarbeiterin des Institutes, welche sich immer wieder Zeit genommen hat für die Fragen bezüglich der Auswertung von qPCR Daten, sowie für das Gegenlesen von wissenschaftlichen Texten. Von ihrer hohen wissenschaftlichen Kompetenz konnte ich grade gegen Ende der Arbeit stark profitieren, was ich sehr zu schätzen weiß.

Auch den Mitdoktoranden Herrn Joon Pitann und Herrn Benjamin Hilpert sei gedankt für den aufmunternden Zuspruch während meiner experimentellen Arbeit im Labor, der uns über die Zeit zu guten Freunden werden ließ.

An bedeutendster Stelle jedoch möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Holger Rhode für seine herausragende Betreuung danken, sein geduldiges Zuhören, sein Erklären und Beantworten meiner Fragen zu den komplexen experimentellen Sachverhalten und Methoden in der Staphylokokkenforschung.

Durch seinen gesunden Optimismus und seine im richtigen Moment platzierten Späße entstand ein persönliches Grundvertrauen, welches mich ermutigt hat, am Ball zu bleiben. Sein mir vermitteltes Vertrauen in die Fertigstellung der Arbeit und seine Gelassenheit haben dazu geführt, dass mir in seiner Arbeitsgruppe auch das Präsentieren von Misserfolgen nicht schwerer fiel, als es fallen sollte.

Zum Abschluss der Dissertation gilt mein tiefer Dank seiner persönlichen Betreuung, wie ich sie in dieser Form nur selten erleben konnte, als auch insbesondere seiner wissenschaftlichen Betreuung, welche es mir ermöglichte, sehr lehrreiche und sehr positive Erfahrungen in der experimentellen Forschung der Mikrobiologie zu gewinnen.

## **10. LEBENSLAUF**

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## **11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

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

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

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

Unterschrift: .....

Christian Oluf Rasmus Krambeck

11.5.2021