

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Direktor Prof. Dr. M. Aepfelbacher

Genetische Charakterisierung der Bedeutung des PadR-like regulator SE1923 und des ABC-Transporter PmtH für die *Staphylococcus epidermidis* Biofilmbildung

Dissertation

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

vorgelegt von:

Joon Art Pitann aus Hamburg

Hamburg 2022

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 01.02.2022

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Pia Pogoda

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Holger Rohde

Inhalt

1	Einleitung	5
1.1	Nosokomiale Infektionen	5
1.2	Staphylokokken	6
1.2.1	Die Spezies <i>Staphylococcus epidermidis</i>	6
1.2.2	Vom Kommensalismus zur Infektion	7
1.3	Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i>	9
1.3.1	Bedeutung der Biofilmbildung als bakterielles Pathogenitätsprinzip.....	9
1.3.2	Phasen der Biofilmbildung.....	10
1.4	Adaptationsmöglichkeiten von <i>S. epidermidis</i> an sich ändernde Umweltbedingungen	13
1.4.1	<i>Staphylococcal accessory regulator</i> (Sar)A.....	14
1.4.2	<i>Accessory gene regulator</i> (Agr)-System.....	15
1.5	Einfluss von Serum auf die Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i>	16
1.6	<i>Phenolic acids decarboxylase regulator</i> (PadR)	17
1.7	<i>Phenol-soluble modulins</i> (PSM).....	17
1.8	ABC-Transporter Pmt in <i>S. aureus</i>	18
2	Zielsetzung dieser Arbeit	19
3	Material und Methoden	20
3.1	Material	20
3.1.1	Bakterienstämme und Phagen	20
3.1.2	Plasmide	22
3.1.3	Primer	24
3.1.4	Wachstumsmedien	25
3.1.5	Lösungen, Puffer und Reagenzien	26
3.1.6	Chemikalien	27
3.1.7	Antibiotika.....	28
3.1.8	Enzyme.....	28
3.1.9	Molekularbiologische Kits	28
3.1.10	Laborgeräte und Verbrauchsmaterial.....	29
3.1.11	Glas- und Plastikwaren, Verbrauchsartikel	30
3.1.12	Größenstandards für Agarose-Gel-Elektrophorese.....	31
3.1.13	Software	31
3.2	Methoden.....	31
3.2.1	Anzucht von Bakterien und Lagerung	31
3.2.2	Phänotypische Methoden	32
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	34

3.2.4	Herstellung einer Knockout-Mutante mittels Shuttle-Vektor pBASE6.....	40
3.2.5	Komplementation des Knockouts $\Delta I923/\Delta I923-1920$ mittels Shuttle-Vektor pRB473	43
3.2.6	Komplementation des Knockouts $\Delta pmtH$ mittels Shuttle-Vektor pHB3.....	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Analyse von <i>SE1923 (PadR-like regulator)</i> und downstream gelegenen ORF <i>SE1923-SE192045</i>	
4.1.1	Untersuchung zur Organisation der Transkription von <i>SE1923-SE1920</i>	45
4.1.2	Verifikation der Knockout-Mutante $\Delta I923/\Delta I923-1920$	46
4.1.3	Phänotypische Analyse von <i>S. epidermidis</i> 1457, 1585 sowie abgeleiteten <i>SE1923-</i> <i>SE1923-SE1920</i> -Mutanten	48
4.2	Analyse des <i>S. epidermidis</i> ABC-Transporters <i>SE1621-SE1624 (pmt-Homolog pmtH)</i>	52
4.2.1	Verifikation der Knockout-Mutante $\Delta pmtH$	52
4.2.2	Phänotypische Analyse von <i>S. epidermidis</i> 1457, 1585 sowie abgeleiteten <i>SE1621-SE1624</i> (<i>pmtH</i>)-Mutanten.....	54
5	Diskussion.....	61
5.1	Einfluss des <i>PadR-like</i>-Systems auf den Phänotyp von <i>S. epidermidis</i>	62
5.2	Einfluss des Knockouts von <i>SE1621-SE1624 (pmtH)</i> auf den Phänotyp von <i>S. epidermidis</i>	66
6	Zusammenfassung	71
7	Summary	72
8	Literaturverzeichnis	73
9	Danksagung.....	87
10	Lebenslauf	88
11	Eidesstattliche Erklärung	88

1 Einleitung

1.1 Nosokomiale Infektionen

Das Nationale Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen definiert eine solche als Infektion, die sich in direktem Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt oder dem Aufenthalt in einer medizinischen Einrichtung frühestens nach 48 Stunden manifestiert (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2017a). Nosokomiale Infektionen zählen zu den häufigsten Komplikationen einer Hospitalisierung und stellen eine erhebliche Herausforderung für das moderne Gesundheitssystem dar. Sie sind für erhöhte Morbidität und Mortalität betroffener Patient:innen verantwortlich. Sie führen zu verlängerter Liegedauer und machen zusätzliche Diagnostik sowie Behandlungen notwendig, die mit nicht unerheblichen, zusätzlichen Behandlungskosten verbunden sind (Darouiche 2004, Geffers et al. 2008, Otto 2009).

Im Jahr 2010 veranlasste das *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) eine Punkt-Prävalenz-Studie zur Erfassung nosokomialer Infektionen. Insgesamt nahmen 66 Krankenhäuser aus 23 Staaten der Europäischen Union an der Erhebung teil. Es zeigte sich, dass durchschnittlich 7,1 % hospitalisierter Patient:innen eine nosokomiale Infektion erlitten. Am höchsten war die Prävalenz auf Intensivstationen. Hier erlitten durchschnittlichen 28,1 % der Patient:innen eine nosokomiale Infektion (Zarb et al. 2012). Höhere Infektionsraten auf Intensivstationen sind im Allgemeinen darauf zurückzuführen, dass hier häufig invasive Prozeduren zum Einsatz kommen und bei diesem Patientenkollektiv häufig schwerere Grunderkrankungen vorliegen (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2017b).

Die Versorgung schwer erkrankter Patient:innen auf Intensivstationen macht häufig den Einsatz zentralvenöser Katheter (ZVK) notwendig, die neben ihren belegten Vorteilen für die Intensivtherapie kritisch kranker Patient:innen ein erhöhtes Risiko für Blutstrominfektionen mit sich bringen (Bell und O'Grady 2017, Rupp und Karnatak 2018). Katheter-assoziierte Blutstrominfektionen (*Catheter-related bloodstream infection*, CR-BSI) machen zusammen mit primären Blutstrominfektionen (*Primary bloodstream infection*, PBSI) fast ein Drittel aller nosokomialen Infektionen in der Intensivmedizin aus (Álvarez-Lerma et al. 2007). CR-BSI führen zu einer deutlichen Verlängerung der Liegedauer und stellen zusätzlich eine ökonomische Last für das Gesundheitssystem dar (Pittet et al. 1994, Aranaz-Andrés et al. 2008).

Eine 2013 veröffentlichte Fall-Kontroll-Studie basierend auf einer epidemiologischen Datenbank aus Spanien (ENVIN-HELICS) ergab, dass sich in 52,6 % aller CR-BSI Koagulase-negative Staphylokokken (KoNS) isolieren ließen. Auch hinsichtlich der PBSI waren KoNS mit 45,9 % die führende, isolierte Gruppe (Olaechea et al. 2013).

1.2 Staphylokokken

Im medizinischen Kontext kann die Gattung *Staphylococcus* in die Gruppen der Koagulase-positiven und -negativen Spezies eingeteilt werden (Sperber und Tatini 1975). In der Gruppe der Koagulase-positiven Staphylokokken stellt *Staphylococcus aureus* den humanmedizinisch relevantesten Vertreter dar. Die Spezies lässt sich in 20-40 % der Bevölkerung aus der nasalen Flora isolieren (Kloos und Bannerman 1994). *S. aureus* ist aufgrund einer umfangreichen Ausstattung mit Virulenzfaktoren in der Lage, neben Haut- und Weichteilinfektionen (McCaig et al. 2006) eine Vielzahl weiterer Infektionen zu verursachen. Zu nennen sind hier beispielsweise die nosokomiale Pneumonie, die Endokarditis und Sepsis (Lowy 1998). Laut bereitgestellten Referenzdaten des ITS-KISS Moduls des Nationalen Referenzzentrums für Surveillance von nosokomialen Infektionen war *S. aureus* in einem Zeitraum 01/2017 - 12/2018 mit 17,1 % der häufigste Verursacher nosokomialer Atemwegsinfektionen bei invasiv beatmeten Patient:innen auf deutschen Intensivstationen. Auch bei ZVK-assoziiertes Sepsis stellten Staphylokokken mit insgesamt 45 % die am häufigsten isolierten Erreger dar, allen voran die Spezies *Staphylococcus epidermidis* mit 24,5 % (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2019). *S. epidermidis* ist nachweislich der häufigste Verursacher einer Katheter-assoziiertes Infektion (Rogers et al. 2009).

1.2.1 Die Spezies *Staphylococcus epidermidis*

Bei der Spezies *S. epidermidis* handelt es sich um Gram-positive, fakultativ anaerobe, Katalase-positive, Oxidase-negative Haufenkokken. Sie haben einen Durchmesser von ein bis zwei Mikrometer und gehören der Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken (KoNS) an, welche insgesamt über 40 Spezies umfasst. Im Gegensatz zu *S. aureus* lässt sich *S. epidermidis* auf dem gesamten Integument sowie auf Teilen der Schleimhaut eines jeden Menschen nachweisen, besonders in den Axillae, auf dem Kopf und in der Nase (Kloos und Musselwhite 1975, Kloos und Bannerman 1994, Rogers et al. 2009, Kong et al. 2012). Für gewöhnlich existiert die Spezies in einer kommensalen Beziehung mit ihrem Wirt und scheint zudem die Kolonisation der Haut durch mögliche pathogene Erreger wie etwa *S. aureus* zu verhindern (Lai et al. 2009). Über viele Jahre führte der kommensale Charakter der Spezies zu der

Annahme, dass Nachweise von *S. epidermidis* in klinischen Materialien vor allem als Ausdruck einer Probenkontamination aufzufassen wären. In der Tat besitzt *S. epidermidis*, anders als *S. aureus*, keine spezifischen Virulenzdeterminanten, die eine Invasion in den Wirt unmittelbar unterstützen könnten. Zudem stellt eine Infektion für kommensale Bakterien eindeutig ein ungewöhnliches, wahrscheinlich nachteiliges Ereignis dar und der Begriff „zufälliger Erreger“ wurde in der Biologie von *S. epidermidis* als Bezeichnung für diesen Aspekt gewählt (Otto 2009). Es muss davon ausgegangen werden, dass *S. epidermidis* für das Verlassen seines natürlichen Lebensraumes und die erfolgreiche Etablierung der Infektion über flexible Mechanismen zur Anpassung neuer ökologischer Nischen verfügen muss (Didelot et al. 2016, Heilmann et al. 2019, Schröter und Dersch 2019). Bemerkenswert hierbei ist, dass die menschliche Haut selbst je nach Standort, Wirtsfaktoren und Umweltfaktoren, eine Vielzahl unterschiedlicher Lebensbedingungen repräsentiert. So ist *S. epidermidis* natürlicherweise einer Vielzahl von Herausforderungen ausgesetzt, die rasche Reaktionen auf Änderungen der Nährstoffversorgung, des pH-Werts und Interaktionen mit dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem erfordern (Grice und Segre 2011). Die Tatsache, dass *S. epidermidis* in der Lage ist, sich unter einer Vielzahl von Bedingungen zu etablieren, die von keinem anderen Hautbakterium erreicht wird, deutet auf sein herausragendes Anpassungspotenzial hin (Dengler Haunreiter et al. 2019, Brown und Horswill 2020, Both et al. 2021).

1.2.2 Vom Kommensalismus zur Infektion

Anfänglich als apathogenes, kommensales Hautbakterium eingestuft, wird *S. epidermidis* heutzutage eine bedeutende Rolle als opportunistischer Erreger und führender Verursacher nosokomialer Infektionen zugesprochen (Otto 2009, Vuong und Otto 2002). Bei den verursachten Infektionen handelt es sich nicht um fulminant verlaufende, hoch-febrile Infektionen wie etwa bei der eng verwandten Spezies *S. aureus*. Vielmehr haben die hervorgerufenen Krankheitsbilder einen sub-akut bis chronisch verlaufenden Charakter (Vuong und Otto 2002, Rohde et al. 2006, Otto 2009, Büttner et al. 2015). Wie bereits beschrieben, verfügt *S. epidermidis* im Gegensatz zu *S. aureus* nur über ein begrenztes Virulenzpotenzial und ruft für gewöhnlich nur Infektionen bei Vorliegen einer Prädisposition des Wirts hervor (parenteraler Drogenkonsum, Frühgeburtlichkeit, angeborener Immundefekt, maligner Grunderkrankung, HIV-Infektion oder Immunsuppression als Folge einer Chemotherapie oder Transplantation). Die Eintrittspforte der beschriebenen Infektionen stellen in der Regel eingebrachte Fremdmaterialien wie intravaskuläre Katheter dar (Domingo und Fontanet 2001, Tacconelli et al. 1997). Fremdmaterialien finden in der modernen Medizin zunehmend Einsatz und werden entweder temporär oder sogar permanent in den Körper der Patient:innen

implantiert. Beispielsweise sind künstliche Gelenkersätze, ventrikulo-peritoneale Shunts, künstliche Herzklappen oder allen voran periphere parenterale Zugänge und zentrale Venenkatheter (ZVKs) aus dem alltäglichen klinischen Gebrauch nicht mehr wegzudenken (Arciola et al. 2018). Eben diese medizinischen Fremdkörper stellen einen weiteren, entscheidenden, Patient:innen-unabhängigen Risikofaktor dar, wenn es um Infektionen durch *S. epidermidis* geht (Darouiche 2004, Mack et al. 2006, Otto 2008, Rogers et al. 2009, Zarb et al. 2012). Der tatsächliche Einfluss dieses Risikofaktors ist wiederum Stamm-spezifisch und abhängig von der Fähigkeit, Oberflächen von Implantaten in Form festhaftender Biofilme zu kolonisieren (Scherr et al. 2014, Becker et al. 2014). Meist erfolgt die Kontamination des Fremdkörpers während der Implantation, was auf die stetige Präsenz des Erregers auf der Hautoberfläche zurückzuführen ist (Uçkay et al. 2009).

Die Therapie derartiger Infektionen gestaltet sich in der Regel als kompliziert (Becker et al. 2014). Die zunehmende Prävalenz von Stämmen mit Resistenzen gegenüber den gebräuchlichen Antibiotika verkompliziert die Therapie der ohnehin schon schwierig zu therapierenden Fremdmaterial-assoziierten Infektionen (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018). In Krankenhäusern vorkommende (*healthcare-associated*) *S. epidermidis*-Stämme sind zunehmend multiresistent und zeigen in 75-90 % eine Unempfindlichkeit gegenüber Methicillin (Otto 2009, Becker et al. 2014). Zusätzlich zur Resistenz gegenüber β -Laktam-Antibiotika konnte ebenfalls eine abnehmende Empfindlichkeit klinischer Isolate gegenüber gängigen Wirkstoffen wie beispielsweise Erythromycin, Clindamycin, Ciprofloxacin und Gentamicin verzeichnet werden (Lyytikäinen et al. 1996, Kresken et al. 1999, Andrews et al. 2000). Zusätzlich zu den sich ausbreitenden Resistenzen gegenüber vielen Antibiotika führt die spezifische Organisation von mehrlagigen Erregerkonsortien durch *S. epidermidis* zur Persistenz der Erreger bei. Die Bakterien sind in einer eigens synthetisierten, extrazellulären Matrix gebettet, welche ein drei-dimensionales Polymer-Netzwerk darstellt und neben Zell-zu-Zell-Verbindungen auch die Bindung an Oberflächen vermittelt (Flemming und Wingender 2010). Diese Architektur schützt den Erreger zum einen vor einer Eradikation durch das wirtseigene Immunsystem und zum anderen vor einer antibiotischen Therapie (Costerton et al. 1999, Stewart und Costerton 2001, Foster 2005, Mack et al. 2009, Schommer et al. 2011). Bezüglich der antibiotischen Therapie Biofilm-assoziierten Infektionen stellt der Wirkstoff Rifampicin einen wirksamen Kombinationspartner dar, weshalb er in diesem Kontext regelmäßig Anwendung findet. Jedoch sollte die Therapie stets in Kombination mit einem weiteren Wirkstoff erfolgen, da es bei einer Monotherapie mit Rifampicin oft zu einem Versagen der Therapie und zu einer Resistenzbildung kommen kann

(Mandell und Moorman 1980, Zimmerli et al. 1998, Jørgensen et al. 2016). Im Rahmen Biofilm-assoziiierter Infektionen sind regelhaft der prolongierter Einsatz einer antibiotischen Therapie und die Entfernung des implantierten Fremdmaterials der einzig erfolgversprechende Therapieansatz (Darouiche 2004, Otto 2009). Neben der komplizierten Therapie führen Fremdmaterial-assoziierte Infektionen zu einem beachtlichen, ökonomischen Schaden. Hochrechnungen zufolge verursachen Infektionen orthopädischer Fremdkörper in den USA jährlich zusätzliche Kosten in Höhe von etwa 1,8 Milliarden US-Dollar (Haenle et al. 2012) und allein durch *S. epidermidis* verursachte, Katheter-assoziierte Blutstrominfektionen 2 Milliarden US-Dollar (Otto 2009).

1.3 Biofilmbildung von *S. epidermidis*

1.3.1 Bedeutung der Biofilmbildung als bakterielles Pathogenitätsprinzip

Anfänglich als „Schleim“ (Christensen et al. 1983) beschrieben, wird das dreidimensionale, mehrschichtige Agglomerat heutzutage Biofilm genannt (Costerton et al. 1995, Götz 2002). Grundsätzlich bestehen Biofilme aus Bakterien, welche in einer extrazellulären Matrix, die aus Bestandteilen wie extrazellulärer DNA (Rice et al. 2007), Proteinen (Schwartz et al. 2012) und Polysacchariden (Rohde et al. 2007) besteht, eingebettet sind (Peters et al. 1982). Sich in einem reifen Biofilm befindende Zellen zeichnen sich durch einen herabregulierten Stoffwechsel mit konsekutiv verlangsamtem Wachstum aus. Dies macht sie wiederum weniger empfindlich gegenüber antimikrobiell wirkenden Substanzen, ein Phänomen, welches auch als phänotypische Resistenz beschrieben wird (Lewis 2007, Otto 2009). Gleichzeitig bietet die Biofilmmatrix den Erregern durch ihre vor Phagozytose schützenden Eigenschaften Schutz vor dem wirtseigenen Immunsystem (Schommer et al. 2011). Die Bildung eines Biofilms kann grundsätzlich in mehrere Phasen untergliedert werden: Primäre Adhärenz, Akkumulation und Auflösung (Costerton et al. 1999, Büttner et al. 2015). Diese sind in **Abbildung 1** nachzuvollziehen und werden nachfolgend in ihren Grundzügen beschrieben.

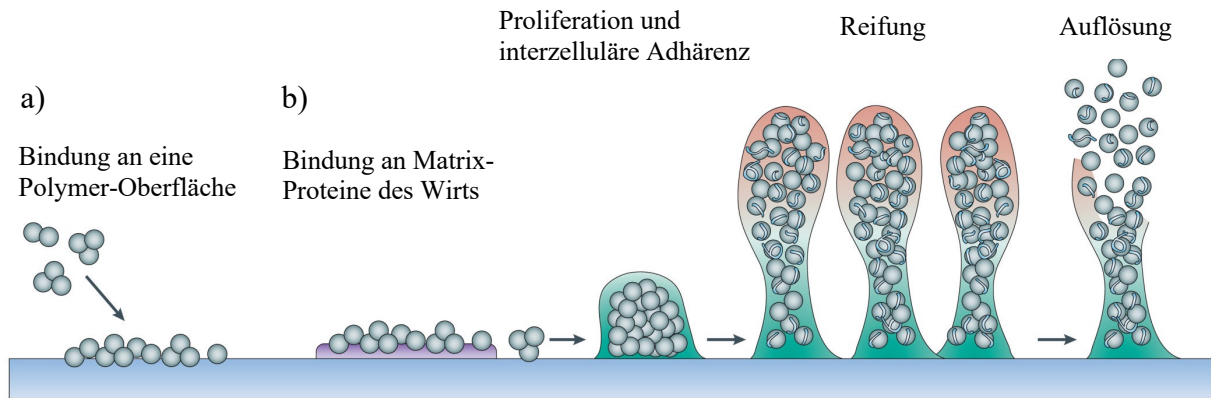


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Biofilmbildung von *S. epidermidis*. Die Phasen der Biofilmbildung gehen fließend ineinander über. Zu Beginn adhären Bakterien an einer Oberfläche. Diese ist entweder abiotisch (a) oder mit extrazellulären Matrixproteinen bedeckt (b). In der Akkumulationsphase kommt es zu einer Proliferation sowie zur Ausbildung interzellulärer Adhärenz. Der Biofilm erhält seine typische, mehrschichtige Struktur. Aus dem gereiften Biofilm lösen sich einzelne Bakterien und adhären an anderenorts (Adaptiert nach Otto 2009).

1.3.2 Phasen der Biofilmbildung

1.3.2.1 Primäre Adhärenz

Zu Beginn kommt es zur Adhärenz von Bakterien an eine Oberfläche (Otto 2009). Diese stellt im Rahmen einer Fremdmaterial-assoziierten Infektion einen entscheidenden Schritt dar (Büttner et al. 2015). Hierbei spielen zwei verschiedene Mechanismen eine wichtige Rolle. Zum einen wird die Adhärenz an eine polymere Oberfläche durch die hydrophobe Eigenschaft der bakteriellen Zellwand begünstigt (Vacheethasane et al. 1998). In Wesentlichen werden dafür das Autolysin AtlE (Heilmann et al. 1997) und mit der Zellwand verankerte Teichonsäuren (Gross et al. 2001) verantwortlich gemacht. Für AtlE konnte zudem gezeigt werden, dass es neben einer Adhärenz sogar die Aufnahme in Endothelzellen vermittelt (Hirschhausen et al. 2010). Auch unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen spielen eine Rolle (Becker et al. 2014). Zum anderen binden die Bakterien mit Hilfe von Zellwand-assoziierten Proteinen, sogenannten MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), an extrazelluläre Matrixstrukturen des Wirts wie etwa Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin und Kollagen (Josefsson et al. 1998). Dieser Vorgang scheint im Rahmen der Adhärenz einen wichtigen Schritt darzustellen, da implantiertes Fremdmaterial, nachdem es eingebracht wurde, umgehend mit extrazellulärer Matrix überzogen wird und so die bakterielle Adhärenz erleichtert (Arrecubieta et al. 2006, Mack et al. 2009). Somit können Biofilme grundsätzlich sowohl auf abiotischen Oberflächen eingebrachten Fremdmaterials als auch an nativen Strukturen des Wirts etabliert werden (Becker et al. 2014).

1.3.2.2 *Akkumulation*

Nachdem die Bakterien im ersten Schritt erfolgreich an eine biotische oder abiotische Oberfläche binden konnten, beginnen sie, zu proliferieren und diese in Form mehrschichtiger Zellaggregate zu kolonisieren. Die Akkumulation wird durch interzelluläre Adhäsine ermöglicht. Sowohl Polysaccharide als auch Proteine sind wesentlich an der Akkumulation beteiligt und wirken wie ein „Biofilm-Kleber“ (Büttner et al. 2015). Auch negativ geladene, extrazelluläre DNA (eDNA) interagiert mit positiv geladenen Polysacchariden und führt so zu einer Vernetzung und Stabilisierung des Biofilms (Whitchurch et al. 2002, Becker et al. 2014). Die Funktion von eDNA als interzelluläres Adhäsins scheint besonders in der frühen Phase der Akkumulation wichtig zu sein (Qin et al. 2007). In *S. aureus* besitzt sie insbesondere beim Übergang der Adhärenz- in die Akkumulationsphase eine entscheidende Funktion (Moormeier et al. 2014).

Einen prominenten, gut beschriebenen Vertreter der Polysaccharide stellt das *Polysaccharid intercellular adhesin* (PIA) dar. Es handelt sich dabei um ein Poly-N-acetylglucosamin (PNAG), das aus einem größeren Polysaccharid I (>80 %) und einem kleineren Polysaccharid II (<20 %) besteht, welche strukturell verbunden sind (Mack et al. 1996, Otto 2009). Am ehesten vermitteln positiv geladene, deacetylierte Glucosamin-Reste des PIA eine elektrostatische Interaktion mit Teichonsäuren, welche eine negative Ladung tragen (Kaplan et al. 2004). Die positive Ladung dieser Reste soll unter anderem zu der Eigenschaft von *S. epidermidis*, das wirtseigene Immunsystem zu umgehen, beitragen (Vuong et al. 2004b). So scheint PIA zu einer verminderten Phagozytose von Bakterien und einer verringerten Aktivierung von Makrophagen (J774A.1) zu führen (Schommer et al. 2011). Der Annahme, dass die Anwesenheit von PIA für die Ausbildung einer Biofilm-assoziierten Infektion entscheidend wäre (Li et al. 2005, Yao et al. 2005), konnte entgegengestellt werden, dass ein signifikanter Anteil klinischer Isolate, welche aus Biofilm-assoziierten Infektionen gewonnen wurde, *icaADBC*-negativ war (Frank et al. 2004, Koskela et al. 2009). Somit wurde geschlussfolgert, dass Polysaccharide für die Stabilisierung des Biofilms nicht essenziell sind. Vielmehr scheinen auch Proteinfaktoren funktionell als interzelluläre Adhäsine zu fungieren (Rohde et al. 2007, Christner et al. 2010). Hierzu zählen zum Beispiel das *Accumulation Associated Protein* (Aap) (Rohde et al. 2005) sowie das *Extracellular Matrix Binding Protein* (Embp) (Christner et al. 2010). Beide Proteine scheinen sowohl in der Akkumulations- als auch bereits in der Adhärenzphase eine Rolle zu spielen (Büttner et al. 2015, Büttner et al. 2020). Aap ist kovalent mit der Zellwand verbunden und besteht aus einer Domäne A und einer Domäne B (Rohde et al., 2005, Gruszka et al., 2012, Schaeffer et al., 2015). Damit Aap als

interzelluläres Adhäsion wirken kann, muss die Domäne A proteolytisch abgespalten werden. Diese Prozessierung kann entweder durch *S. epidermidis* oder wirtseigene Proteasen erfolgen. Die auf der Zelloberfläche verbleibende Domäne B vermittelt interzelluläre Adhärenz (Rohde et al. 2005), während die abgespaltene Domäne A eine Adhärenz an Polymeroberflächen und Epithelzellen vermittelt (Macintosh et al. 2009, Conlon et al. 2014, Schaeffer et al. 2015). Durch *intrans*-Expression der Domäne B ließ sich in dem *in vitro* Biofilm-negativen Stamm *S. epidermidis* 1585 sowie in der Spezies *S. carnosus* (TM300) ein Biofilm-positiver Phänotyp induzieren (Rohde et al. 2005).

Das 1 MDa Zellwand-assoziierte Embp stellt das bis dato größte, nachgewiesene Protein der Spezies dar (Christner et al. 2010). Unter klinischen *S. epidermidis*-Isolaten konnte das *embp*-Gen in einer Studie in über 90 % der Isolate nachgewiesen werden (Rohde et al. 2004, Rohde et al. 2005). Das Protein ist modular aufgebaut und beginnt mit einem N-terminalen Exportsignal, welches ein YSIRK-Motiv enthält. Anschließend findet sich ein Bereich ohne strukturelle Ordnung, dann mehrere FIVAR (*found in various architectures*)-Repeats sowie diverse GA (*Protein G-related albumin binding*)-Domänen. Am C-Terminus befinden sich vier Domänen unbekannter Funktion (DUF1542) und abschließend eine C-terminal gelegene, putative Transportdomäne (Christner et al. 2010). In dem *icaADBC*- und *aap*-negativen Stamm *S. epidermidis* 1585 konnte gezeigt werden, dass Embp allein für die Biofilmbildung ausreicht und sowohl interzellulär adhäsive als auch extrazelluläre Matrix-bindende Eigenschaften besitzt (Christner et al. 2010). Während der primären Adhärenz wirkt Embp durch Fibronectin-bindende Eigenschaft als Adhäsion (Büttner et al. 2020). Anfänglich wurden hierfür die FIVAR-GA-Einheiten verantwortlich gemacht (Williams et al. 2002). Durch weitergehende, biochemische Analysen konnte diese Annahme bestätigt und zudem erweitert werden. Bereits die FIVAR-Domänen sind ausreichend, um Fibronectin, welches auf einer Oberfläche anhaftet, zu binden (Christner et al. 2010, Büttner et al. 2020). Neben Fibronectin ist Embp in der Lage, weitere extrazelluläre Matrixbestandteile des Wirtes wie Plasminogen, Heparin und Hyaluronat zu binden (Williams et al. 2002). Darüber hinaus wird Embp eine Funktion in der interzellulären Adhärenz zugesprochen. Bei Passageexperimenten konnte der Stamm *S. epidermidis* 1585v isoliert werden. In diesem fand eine chromosomale Umlagerung statt, die eine Überexpression einer trunkeierten Embp-Isoform (Embpl) zur Folge hatte. Diese führte zu einem Biofilm-positiven Phänotyp unter Standardbedingungen, wodurch dem Protein Embp eine Biofilm-induktive Eigenschaft nachgewiesen werden konnte. Diese Erkenntnis konnte im Verlauf nach Einbringen eines Tetrazyklin-induzierbaren Promotors (*P_{xyt/tet}*) vor das *embp*-Gen des Wildtyps nachvollzogen werden (Christner et al. 2010).

1.3.2.3 Biofilmauflösung

Aus einem etablierten Biofilm können sich vereinzelt Bakterien oder Aggregate lösen, auf hämatogenem Wege disseminieren und an anderen Orten im Wirtsorganismus Metastasen bilden. Der Vorgang der Dissemination aus dem Biofilm scheint von mehreren, unterschiedlichen Faktoren beeinflusst (Becker et al. 2014). Diese Annahme ist nachvollziehbar, da die Biofilmbildung in *S. epidermidis*, wie bereits aufgezeigt, ebenfalls auf mehrere Faktoren zurückzuführen ist. Nach aktueller Auffassung scheinen extrazelluläre Enzyme sowie *Phenol-soluble modulins* (PSM) eine Rolle zu spielen, die formierte extrazelluläre Matrix aufzulösen (Rohde et al. 2007, Becker et al. 2014). Die Zugabe einer DNase I führte bei dem Stamm *S. epidermidis* 1457 zu einer Inhibierung der Biofilmbildung, jedoch nicht zur Auflösung bereits etablierter Biofilme, wie es bei *S. aureus* beobachtet wurde (Izano et al. 2008). So scheinen Nukleasen bei *S. epidermidis* eher die primäre Adhärenz zu verhindern und junge Biofilme aufzulösen (Becker et al. 2014). Darüber hinaus konnte in *S. aureus* die Beteiligung von Proteasen an der Ablösung von Bakterien aus einem Biofilm dargestellt werden (Boles und Horswill 2008). Mangels ausreichender Evidenz ließ sich dieser Effekt bis dato nicht auf *S. epidermidis*-Biofilme übertragen, wird jedoch vermutet (Becker et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass die von *S. epidermidis* sezernierte Serinprotease Esp in der Lage ist, Biofilme der Spezies *S. aureus* zu degradieren. Außerdem spaltet Esp Proteine wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin und scheint hierdurch die Interaktion zwischen Wirt und Bakterium zu beeinflussen (Iwase et al. 2010, Sugimoto et al. 2013).

1.4 Adaptationsmöglichkeiten von *S. epidermidis* an sich ändernde Umweltbedingungen

Die Biofilmbildung von *S. epidermidis* wird durch das Zusammenspiel einer Vielzahl verschiedener Faktoren ermöglicht (Hennig et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass klinisch relevante Stämme gleichzeitig Gene für vielzählige, interzelluläre Adhäsine aufweisen (Frebourg et al. 2000, Rohde et al. 2004, Arciola et al. 2012). Die Synthese der beschriebenen Faktoren geschieht dabei in unterschiedlichen klinischen Settings (Rohde et al. 2007), zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb derselben Infektion (Vandecasteele et al. 2003) oder gar zeitgleich, was eine reziproke Wirkungsverstärkung zur Folge hat (Stevens et al. 2008). Beispielsweise konnte ein Wechsel von einem PIA- auf einen Protein-basierten Biofilm bei *S. epidermidis* beobachtet werden (Hennig et al. 2007). Dies scheint weitestgehend adaptiv an die gebotenen Umweltbedingungen zu geschehen (Otto 2014). So erfolgt die Zusammensetzung und Struktur des Biofilms in Abhängigkeit von Umweltbedingungen wie Nährstoffvorkommen und mechanischem Stress (Kiedrowski und Horswill 2011). Überdies führen osmotischer Stress

oder ein Kontakt zum wirtseigenen Immunsystem konsekutiv zu einer Veränderung der Biofilmmorphologie (Otto 2014). PIA-abhängige Biofilme zeigten sich gegenüber Waschprozeduren, im Vergleich zu PIA-negativen Isolaten, deutlich widerstandsfähiger. Unter dem Mikroskop erscheinen Aap-abhängige Biofilme eher flach und unstrukturiert. Doch auch diese gewährleisten einen Schutz vor Phagozytose und eine Reduktion freigesetzter, proentzündlicher Faktoren, vergleichbar mit PIA-basierten Biofilmen (Schommer et al. 2011). Um sich wechselnden Umweltbedingungen entsprechend anpassen zu können, verfügen Staphylokokken über übergeordnete Regulatoren, wie etwa den *Staphylococcal accessory regulator* (Sar)A oder das *Accessory gene regulator* (Agr)- und *luxS/AI-2*-System, welche zwei Quorum-sensing (QS)-Systeme in *S. epidermidis* darstellen (Becker et al. 2014). Diese Arbeit beleuchtet ausschließlich den Regulator SarA und das Agr-System. Beide regulieren diverse Virulenzfaktoren wie etwa Hämolyse oder Fibronectin-bindende Proteine in Staphylokokken (Cheung und Projan 1994). Sie werden durch den Transkriptionsfaktor σ_B beeinflusst, welcher in der Stressantwort einen globalen Regulator darstellt (Becker et al. 2014).

1.4.1 *Staphylococcal accessory regulator* (Sar)A

Dem *Staphylococcal accessory regulator* (Sar)A kommt in der Steuerung der Biofilmbildung eine zentrale Funktion zu. Eine Hochregulation von *sarA* führt über die direkte Bindung an die *icaA*-Promotorregion zu einer Expression von *icaADBC* und konsekutiv über die Produktion von PIA zu einem PIA-abhängigen Biofilm, eine Herunterregulation hingegen zu einem PIA-unabhängigen Biofilm (Tormo et al. 2005, Handke et al. 2007, Christner et al. 2012). In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von *sarA* die Expression von *embp* nahezu vollkommen unterdrückt. Wiederum führt eine Inaktivierung von *sarA* zu einer starken Hochregulation der Expression von *embp*. In der *sarA*-negativen Mutante 1585 Δ *sarA* konnte die Notwendigkeit von Embp für die Biofilmbildung dargestellt werden (Christner et al. 2012). Durch die Zugabe von Serum wird die Expression von *sarA* herabreguliert und hierdurch die Expression von *embp* induziert (Christner et al. 2010). Somit hat SarA durch seine Regulation von Genen wie *icaADBC* oder *embp* einen direkten Einfluss auf die interzelluläre Aggregation (Büttner et al. 2015). Ferner konnte gezeigt werden, dass SarA post-translationale Effekte, durch die Regulation der Metalloprotease SepA, induziert, welche eine proteolytische Prozessierung und eine funktionelle Modifizierung der bereits erwähnten Oberflächenproteine AtlE (Christner et al. 2012) und Aap (Paharik et al. 2017) bewirken. So konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von *sarA* zu einer erhöhten Produktion von SepA und konsekutiv über eine verstärkte Prozessierung von Aap zu einer vermehrten Biofilmbildung führte (Paharik et al. 2017). In einer biochemischen Analyse konnte mittels Northern Blot dargestellt werden,

dass in *sarA*-negativen Mutanten die Menge an RNAIII bedeutend verringert oder vollkommen aufgehoben war. Hieraus wurde geschlussfolgert, dass *sarA* für eine optimale Expression des *agr*-Locus notwendig ist (Cheung und Projan 1994).

1.4.2 *Accessory gene regulator (Agr)-System*

Einen weiteren zentralen Regulator in *S. epidermidis* stellt das bereits erwähnte Agr-System dar, bei welchem es sich um ein quorum-sensing (QS)-System handelt. QS-Systeme ermöglichen eine bakterielle Zell-zu-Zell-Kommunikation, durch die Verwendung kleiner Pheromon-Peptide oder autoinduzierende Peptide (AIP). Die Konzentration der AIPs steigt proportional mit steigender Zelldichte an. Wird ein kritischer Grenzwert überschritten, meist zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase, wird das QS-System durch Aktivierung eines transkriptionellen Regulators aktiviert. Dieser transkriptionelle Regulator führt dann zu einer Expression spezifischer Zielgene (Becker et al. 2014). So übernehmen QS-Systeme in vielen pathogenen Bakterien eine wichtige Funktion in der Regulation von Virulenzfaktoren (Novick und Muir 1999). Ähnlich verhält es sich im Agr-System von Staphylokokken, welches sich durch eine Autoaktivierung aktiviert. Hierbei fungiert das durch AgrB sezernierte Peptid AgrD als AIP und bindet an die Transmembran-Rezeptor-Domäne von AgrC, welches sich als Agr-Signal-Rezeptor auf der Zelloberfläche befindet. AgrC aktiviert daraufhin über eine Phosphorylierung AgrA, welches wiederum an die zwei *agr*-Promotoren P2 und P3 bindet und die Transkription initiiert. Der Promotor P2 unterhält durch Expression des *agrBDCA*-Locus den Autoaktivierungskreislauf, während der P3 die Transkription einer RNAIII initiiert (Novick und Geisinger 2008). RNAIII stellt den Transkriptionsfaktor für Gene dar, die für Virulenzfaktoren wie Enzyme, Toxine oder die bereits beschriebenen PSM kodieren (Novick 2003) und kodiert zudem für das Gen (*hld*) des bereits beschriebenen δ -Toxins (PSM γ) in *S. epidermidis* (McKevitt et al. 1990).

Die meisten durch das Agr-System regulierten Exoproteine werden in *agr*-negativen Mutanten gar nicht oder in sehr geringem Maße synthetisiert, während die Expression von Oberflächenproteinen hochreguliert wird (Novick et al. 1993). Passend dazu konnte bezüglich des Einflusses des Agr-Systems auf die Biofilmbildung für *agr*-negative Stämme eine stärkere Adhärenz und verstärkte Biofilmbildung belegt werden (Vuong et al. 2000, Vuong et al. 2003). Auch zeigte sich eine verstärkte Adhärenz an Polystyrol und eine reduzierte Produktion extrazellulärer Enzyme wie Lipasen und Proteasen (Vuong et al. 2000, Yao et al. 2006, Batzilla et al. 2006). Wie bereits erwähnt, wird die Expression von PSM, die für die Auflösung eines Biofilms während einer Biofilm-assoziierten Infektion mitverantwortlich gemacht werden, über das Agr-System gesteuert (Wang et al. 2011). Insgesamt stellt das Agr-System neben

seiner Rolle als zentrales, regulatorisches Element in der Expression von Virulenzfaktoren ein Schlüsselement in der evolutionären Diversifizierung und Speziation dar (Wright et al. 2005).

1.5 Einfluss von Serum auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis*

Die Existenz adaptiver Prozesse ist seit längerer Zeit bekannt und beschrieben. Jedoch wurden regulative Ereignisse bisher fast ausschließlich unter Verwendung künstlicher Nährmedien untersucht. Erkennbar ist jedoch, dass gerade Komponenten des Wirtsorganismus nachweislich Einfluss auf die Genexpression von *S. epidermidis* nehmen können (Lai et al. 2007). Durch die Zugabe von Ziegenserum, ließ sich in dem *icaADBC*- und *aap*-negativen Stamm *S. epidermidis* 1585 durch eine Herunterregulation von *sarA* mit konsekutiver Expression von *embp* eine PIA-unabhängige Biofilmbildung induzieren (Christner et al. 2010). In *Trypticase Soy Broth* (TSB) wird *Embp* praktisch nicht exprimiert (Christner et al. 2012, Weiser et al. 2016). Um den Einfluss von Ziegenserum auf das Transkriptom des Stammes *S. epidermidis* 1585 zu analysieren, wurde in Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe die differentielle Expression mittels RNA-Seq in Ziegenserum im Vergleich zu künstlichen Nährmedien (TSB) untersucht und die gefundenen Unterschiede statistisch ausgewertet (**Tabelle 1**). Besonders stark reguliert sind die Gene *SE1923*, *SE1622* und *SE1624*, die in der Literatur in *S. epidermidis* bis dato noch nicht näher beschriebenen worden sind (Rohde unveröffentlicht). Nach Abgleich mit der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) scheint das Gen *SE1923* am ehesten einem DNA-bindenden transkriptionellen Regulator der PadR-Familie (PadR-ähnlicher Regulator) zuordenbar (https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?sep:SE1923, Stand: 28.08.2021). Die Gensequenz *SE1621-SE1624* zeigt eine starke Homologie mit dem in *S. aureus* beschriebenen Operon *pmtABCD*, welches für den Pmt ABC-Transporter kodiert (Chatterjee et al. 2013, Cheung et al. 2018).

Tabelle 1: Exemplarischer Auszug in Anwesenheit von Ziegenserum regulierter Gene in dem Stamm *S. epidermidis* 1585

Gen ID	Regulation*	p-Wert (adjustiert)**	Genprodukt (KEGG)
SE2287	2,4	<0,001	<i>pur</i> operon repressor
SE2285	2,9	0,002	regulatory protein SpoVG
SE1868	-1,3	0,005	<i>sarR</i>
SE1625	1,8	0,004	GntR family transcriptional regulator
SE2410	1,9	0,011	AcrR family transcriptional regulator
SE1269	2,2	0,023	heat-inducible transcriptional repressor
SE1248	2,3	0,004	RNA polymerase sigma factor RpoD
SE1923	4,1	<0,001	DNA-binding transcriptional regulator, PadR family
SE1624	1,5	0,009	ABC transporter ATP-binding protein

SE1622	1,7	<0,001	ABC transporter ATP-binding protein
SE1834	1,7	0,019	acriflavin resistance protein

* Log2-fach

**T test

1.6 *Phenolic acids decarboxylase regulator (PadR)*

Für viele Mikroorganismen stellen schwache Säuren den Hauptanteil natürlicher Toxizität dar (Barthelmebs et al. 2000), indem sie den bakteriellen pH senken und hierdurch das zelluläre Wachstum negativ beeinflussen (Lambert et al. 1997, Zaldivar und Ingram 1999). Mit dem *Phenolic acids decarboxylase* (Pad)-System sind Bakterien in der Lage, potenziell toxische Phenolsäuren, welche in pflanzlichen Zellwänden (de Vries et al. 1997) vorkommen und durch einige Pilze und Bakterien produziert werden (Christov und Prior 1993), in weniger toxische Derivate zu überführen (Barthelmebs et al. 2000).

Ursprünglich wurde PadR in Gram-positiven Bakterien wie etwa *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Bacillus cereus* und *Clostridium difficile* beschrieben (Barthelmebs et al. 2000, Gury et al. 2004, Lee et al. 2017). In *Bacillus subtilis* stellt PadR einen Repressor des Genes *padC* dar, welches für eine Phenolsäure-Decarboxylase kodiert. Diese überführt antimikrobiell aktive Phenolsäuren in Vinyl-Derivate. Es konnte gezeigt werden, dass Phenolsäuren *in vitro* über eine Inaktivierung von *padR* zu einer Transkription von *padC* führen (Tran et al. 2008). Auch für die Spezies *Lactobacillus plantarum* konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von *padR* zu einer Überexpression von *padA*, einem Ortholog von *padC*, führte. Dies untermauert die Hypothese, dass PadR einen Repressor des Genes *padA* darstellt. Ferner konnte gezeigt werden, dass *padR* zusammen mit einem *downstream* gelegenen *open reading frame* (ORF1) transkribiert wird, dessen Produkt zu einer Gruppe sogenannter *universal stress proteins* (Usp) gehören könnte (Gury et al. 2004).

1.7 *Phenol-soluble modulins (PSM)*

PSM stellen in Staphylokokken einen wesentlichen Virulenzfaktor dar (Cheung et al. 2012). Sie sind in nahezu allen Staphylokokken nachzuweisen, insbesondere jenen mit humaner Pathogenität (Rautenberg et al. 2011). In KNS kommt ihnen bei Blutstrominfektionen und Sepsis eine wichtige Bedeutung zu (Da et al. 2017). Bei PSM handelt es sich um kurze, amphipathische Peptide mit einer α -Helix-Struktur (Wang et al. 2007). PSM werden in allen *S. epidermidis*-Stämmen exprimiert, mit Ausnahme solcher Stämme, in denen durch Punktmutationen funktionelle *agr*-negative Mutanten vorliegen (Vuong et al. 2004a, Miragaia et al. 2005), da ihre Expression der Kontrolle des *agr*-Locus unterliegt (Vuong et al. 2003). Die

Einteilung erfolgt anhand ihrer Länge in einen α -Typ (PSM α , PSM γ , PSM δ , PSM ϵ und PSM-mec, 20-25 Aminosäuren) und einen β -Typ (PSM β 1 und PSM β 2, 40-45 Aminosäuren) (Cheung et al. 2010).

PSM γ (25 Aminosäuren) ist ein δ -Toxin-ähnliches Peptid, welches sich von dem von *S. aureus* produzierten δ -Toxin in nur drei Aminosäuren unterscheidet und durch das Gen *hld* kodiert wird. Das Gen *hld* ist in das für RNAIII-kodierende Gen eingebettet und somit Bestandteil der genetischen Organisation des Agr-System (McKevitt et al. 1990, Novick et al. 1993, Vuong et al. 2003). Für *S. aureus* zeigte sich, dass δ -Toxin- und *agr*-negative Stämme vermehrt Biofilme bilden, woraus geschlossen wurde, dass PSM in der Verhinderung der Biofilmbildung eine Rolle spielen könnten (Vuong et al. 2004a). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Biofilmbildung durch die Zugabe von δ -Toxin verhindert werden konnte. Dies wird auf den amphipathischen Charakter der PSM zurückgeführt, die hierdurch eine Surfactant-ähnliche Wirkung zu haben scheinen und so die Auflösung eines Biofilms unterstützen (Yao et al. 2005). Dies scheint auch für PSM des β -Typ zu gelten. In einem Maus-Katheter-Modell konnte gezeigt werden, dass dieser Typ zu einer Strukturierung sowie zu einer Auflösung des Biofilms beitrug. Durch Zugabe von Antikörpern gegen PSM β konnte die Auflösung von Biofilmen von Fremdmaterial verhindert werden. So wurde geschlussfolgert, dass PSM vom β -Typ ebenfalls durch ihre Surfactant-ähnlichen Eigenschaften zu einer Reifung und zu einer Auflösung des Biofilms führen (Wang et al. 2011).

Neben ihrer strukturierenden Rolle in der Biofilmbildung konnten PSM weitere Funktionen nachgewiesen werden (Cheung et al. 2012). Im Gegensatz zu den gängigen Faktoren, welche eine Persistenz des Erregers durch Umgehung des Wirts-eigenen Immunsystems vermittelt (Otto 2009), haben PSM einen proinflammatorischen Effekt und könnten zur klinischen Ausprägung einer *S. epidermidis*-Sepsis beitragen (Becker et al. 2014). Über eine Aktivierung des N-Formylpeptidrezeptor-2 (Kretschmer et al. 2010) führen sie zu Chemotaxis, Priming und einer Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α (Vuong et al. 2004a, Wang et al. 2007, Rautenberg et al. 2011) und stimulieren die Produktion von NF- κ B in Makrophagen (Mehlin et al. 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass einige PSM in der Lage sind, humane, neutrophile Granulozyten (Wang et al., 2007) und Erythrozyten (Cheung et al. 2012) zu lysieren. Zudem scheinen sie andere Bakterien zu töten (Cogen et al. 2010, Joo et al. 2011).

1.8 ABC-Transporter Pmt in *S. aureus*

Auf der Suche nach dem Exportmechanismus der PSM konnte in *S. aureus* erstmals ein ABC-Transporter namens Pmt (*Phenol-soluble modulins transporter*) beschrieben werden. Gezeigt werden konnte, dass die Sekretion aller PSM-Klassen in *S. aureus* von diesem Transporter

abhängig ist. Somit stellt er einen entscheidenden Faktor für die Virulenz dar. Die zugehörigen Gene des Operon *pmtABCD* kodieren hierbei für zwei Transmembran-Domänen (PmtB, PmtD) und zwei Nukleotid-bindende Domänen (PmtA, PmtC) (Chatterjee et al. 2013). Ebenfalls Teil des Operon ist PmtR, welches als lösliches Transkription-regulierendes Protein interzelluläre PSM erkennt (Joo et al. 2016). Jüngst konnte gezeigt werden, dass PmtAB und PmtCD jeweils Homodimere bilden, wobei PmtCD alleine ausreicht, eine Sekretion von PSM α zu gewährleisten (Zeytuni et al. 2020). Bei der Generierung einer *pmt*-Mutante wurde deutlich, dass sich der Knockout ausschließlich in einem *agr*-negativen Hintergrund etablieren ließ, da es andernfalls zur Akkumulation der PSM im Zytoplasma mit konsekutivem Teilungsdefekt und Schaden an der zytoplasmatischen Membran kam. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Transporter Pmt neben dem Export der PSM auch für das Überleben der Zelle unter PSM-Produktion verantwortlich ist (Chatterjee et al. 2013). Darüber hinaus deuten neuere Erkenntnisse darauf hin, dass Pmt neben einem Transport von PSM auch für den Export Membran-schädigender Peptide wie antimikrobiellen Peptiden (AMP) verantwortlich zu sein scheint. Diese besitzen häufig eine ähnliche strukturelle Beschaffenheit wie PSM und haben einen hohen Stellenwert in der unspezifischen Immunantwort von Menschen und anderen lebenden Organismen (Agerberth und Guðmundsson 2006, Cheung et al. 2018). Dies macht Pmt zu einem wichtigen Exportsystem gegenüber Membran-schädigenden Peptiden des Wirts und den durch *S. aureus* eigens produzierten PSM (Cheung et al. 2018).

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte konnten bereits bedeutende Erkenntnisse zu den molekularen Grundlagen der Biofilmbildung der Spezies *Staphylococcus epidermidis* gewonnen werden. Vorarbeiten zu dieser Arbeit zeigen, dass *in vivo*-ähnliche Kulturbedingungen einen erheblichen Einfluss auf phänotypische Eigenschaften und Expressionsprofile von *S. epidermidis* nehmen.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es daher, genetische Determinanten der Anpassung von *S. epidermidis* an das Wachstum in Serum zu beschreiben. Um dieses Ziel zu erreichen sollten spezifische Knockout-Mutanten in *S. epidermidis* 1457 und 1585 etabliert werden. Hierbei sollten Gene inaktiviert werden, deren Regulation im Rahmen eines RNAseq Experiments als Serum-abhängig charakterisiert werden konnten. Konkrete Zielgene waren *SE1923* und *SE1621-SE1624*, welche für einen PadR-ähnlichen Regulator sowie einen in *S. aureus* beschriebenen ABC-Transporter namens Pmt kodieren. Die Mutanten sollten dann hinsichtlich ihrer phänotypischen Eigenschaften charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme und Phagen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden in Kryotubes (Mast Diagnostica, Reinfeld) bei -80 °C gelagert. Zur Anwendung wurden die Stämme auf Agarplatten mit selektivem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei 4 °C für maximal 14 Tage.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Anmerkung: Die Bezeichnung *pmtH* wurde im Prozess der Arbeit eingeführt. Zuvor galt die Bezeichnung *abc*. In beiden Fällen handelt es sich um das Operon *SE1621-SE1624*.

Stamm	Eigenschaft	Referenz
Bakterien		
<i>E. coli</i> TOP10	Chemisch Kompetente Zellen	Invitrogen (Carlsbad, USA) oder eigene Herstellung
<i>E. coli</i> x pSceIΔ1923	Enthält ursprüngliches Knockout-Plasmid pSceIΔ <i>SE1923</i>	AG Rohde
<i>E. coli</i> x pSceIΔ1923-1920	Enthält ursprüngliches Knockout-Plasmid pSceIΔ1923-1920 (<i>SE1923-SE1920</i>)	AG Rohde
<i>E. coli</i> x pSceIΔ <i>abc</i>	Enthält ursprüngliches Knockout-Plasmid pSceIΔ <i>abc</i> (<i>SE1621-SE1624</i>)	AG Rohde
<i>E. coli</i> DH5α x pBASE6	Enthält Plasmid pBASE6 Chloramphenicol-resistent (<i>cat</i>)	Bae und Schneewind 2006
<i>E. coli</i> x pHB3_E	Enthält Plasmid pHB3 Erythromycin-resistent	Büttner 2020
<i>E. coli</i> x pRB473	Enthält Plasmid pRB473 Chloramphenicol-resistent (<i>cat</i>)	Brückner 1992
<i>S. aureus</i> RN4220	Restriktionsdefizienter Stamm	Kreiswirth et al. 1984
<i>S. epidermidis</i> 1457	<i>icaADBC</i> -positiv, PIA- und Biofilm-positiv	Galac et al. 2017
<i>S. epidermidis</i> 1457-M10	<i>icaA::Tn917</i> , PIA- und Biofilm-negativ	Mack et al. 2000
<i>S. epidermidis</i> 1457-M12		Mack et al. 2000

<i>S. epidermidis</i> 1457Δ1923::tet(M)	SE1923-negativ Tetrazyklin-resistent (tet(M))	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1457Δ1923::tet(M) x pRB473::1923-1920	Komplementation SE1923-SE1920 Chloramphenicol-resistent (cat) Tetrazyklin-resistent (tet(M))	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1457Δ1923-1920::tet(M)	SE1923-SE1920-negativ Tetrazyklin-Resistent (tet(M))	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1457Δ1923-1920::tet(M) x pRB473::1923-1920	Komplementation SE1923-SE1920 Chloramphenicol-resistent (cat) Tetrazyklin-resistent (tet(M))	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1457ΔpmtH::tet(M)	SE1621-SE1624-negativ Tetrazyklin-resistent (tet(M))	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1457ΔpmtH::tet(M) x pHB3::P _{xy} pmtH	Komplementation SE1621-SE1624 Erythromycin-resistent Tetrazyklin-resistent (tet(M))	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1585	Isoliert aus einer Port-Infektion, <i>icaADBC</i> - und <i>aap</i> -negativ (Rohde 2005), <i>embp</i> -positiv (Christner 2010). Unter <i>in vitro</i> -Bedingungen Biofilm- negativ, Biofilm-positiv nach Inkubation in Ziegenserum (Christner 2010) oder unter Tigezyklin (Weiser 2016).	Rohde et al. 2005
<i>S. epidermidis</i> 1585Δ1923::tet(M)	SE1923-negativ Tetrazyklin-resistent (tet(M))	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1585Δ1923::tet(M) x pRB473::1923-1920	Komplementation SE1923-SE1920 Chloramphenicol-resistent (cat) Tetrazyklin-resistent (tet(M))	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1585Δ1923-1920::tet(M)	SE1923-SE1920-negativ Tetrazyklin-resistent (tet(M))	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1585Δ1923-1920::tet(M) x pRB473::1923-1920	Komplementation SE1923-SE1920 Chloramphenicol-resistent (cat) Tetrazyklin-resistent (tet(M))	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1585ΔpmtH::tet(M)	SE1621-SE1624-negativ Tetrazyklin-resistent (tet(M))	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1585Δabc::tet(M) x pHB3::P _{xy} pmtH	Komplementation SE1621-SE1624 Erythromycin-resistent Tetrazyklin-resistent (tet(M))	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1457Δagr	<i>agr</i> -negativ Spectinomycin-resistent	Vuong et al. 2004
<i>S. epidermidis</i> 1457ΔagrΔpmtH::tet(M)	<i>agr</i> -negativ SE1621-SE1624-negativ Tetrazyklin-resistent (tet(M))	Diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1457ΔagrΔpmtH::tet(M)	<i>agr</i> -negativ Komplementation SE1621-SE1624	Diese Arbeit

x pHB3::P _{xyI} <i>pmtH</i>	Erythromycin-resistent Tetrazyklin-resistent (<i>tet(M)</i>)
Phagen	
φA6C	Rohde et al. 2005

3.1.2 Plasmide

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmidname	Eigenschaft	Referenz
Backbone		
pBASE6 (Abbildung 2)	Chloramphenicol-Resistenz (<i>cat</i>) Restriktionsstelle für EcoRI	Bae und Schneewind 2006
pHB3 (Abbildung 3)	Erythromycin-Resistenz Restriktionsstelle für EcoRI	Büttner 2020
pRB473 (Abbildung 4)	Chloramphenicol-Resistenz (<i>cat</i>) Restriktionsstelle für EcoRI	Prax et al. 2013
Knockout		
pBASE6Δ1923:: <i>tet(M)</i>	Chloramphenicol-Resistenz (<i>cat</i>) Restriktionsstelle für EcoRI	Diese Arbeit
pBASE6Δ1923-1920:: <i>tet(M)</i>	Chloramphenicol-Resistenz (<i>cat</i>) Restriktionsstelle für EcoRI	Diese Arbeit
pBASE6Δ <i>pmtH</i> :: <i>tet(M)</i>	Chloramphenicol-Resistenz (<i>cat</i>) Restriktionsstelle für EcoRI	Diese Arbeit
Komplementation		
pHB3::P _{xyI} <i>pmtH</i>	Erythromycin-Resistenz Komplementation des <i>pmtH</i> -Knockout Restriktionsstelle für EcoRI	Diese Arbeit
pRB473::P _{wT} 1923-1920	Chloramphenicol-Resistenz Komplementation des <i>SE1923</i> -Knockout und des <i>SE1923-SE1920</i> -Knockout Restriktionsstelle für EcoRI	Diese Arbeit

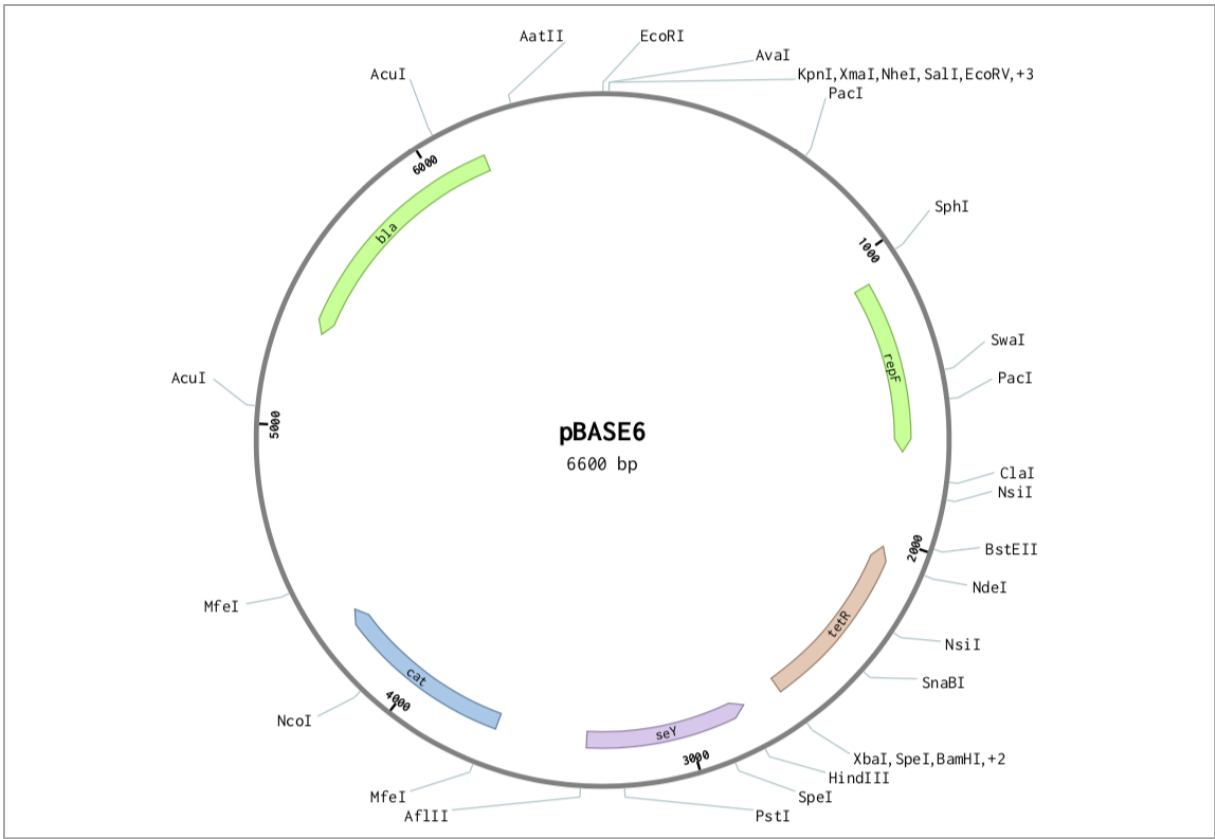


Abbildung 2: Backbone-Plasmid pBASE6

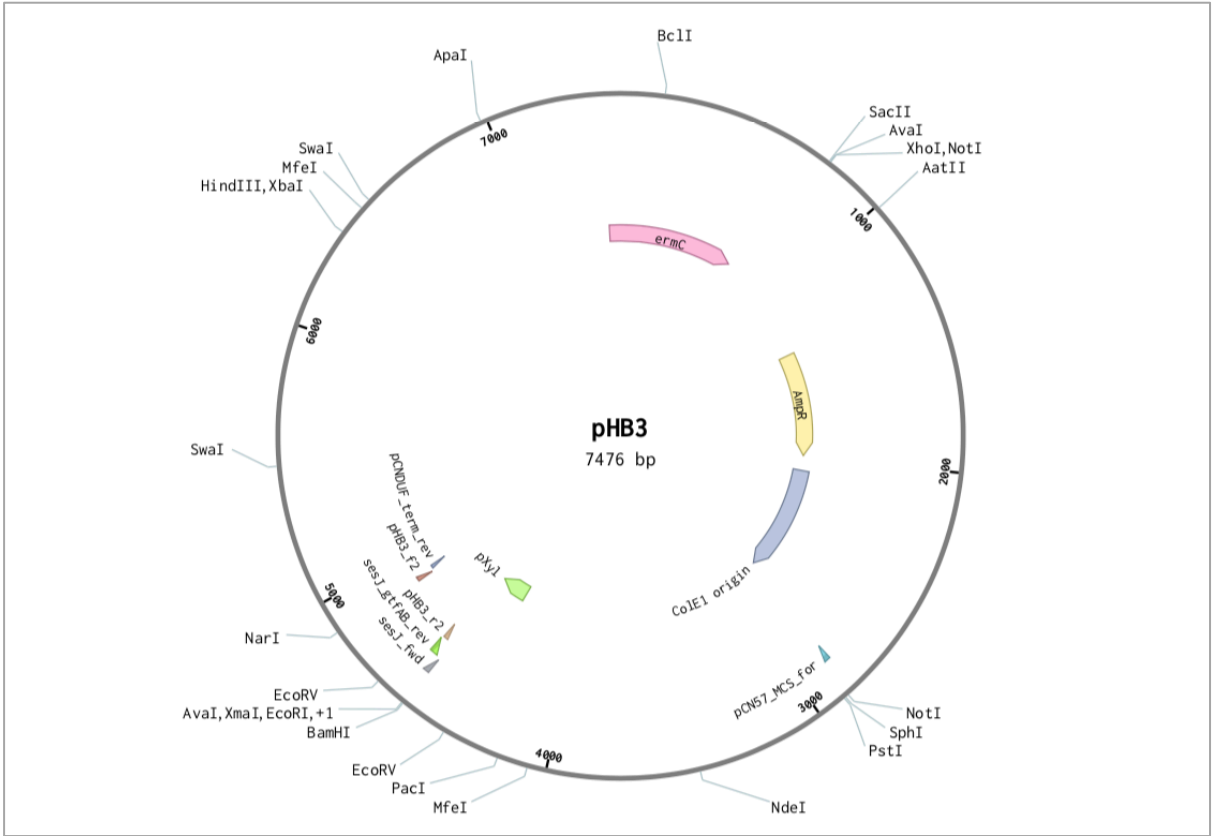


Abbildung 3: Backbone-Plasmid pHB3



Abbildung 4: Backbone-Plasmid pRB473

3.1.3 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden ausnahmslos über Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bestellt. Den Herstellerangaben gemäß erfolgte die Herstellung einer Stocklösung in ddH₂O, welche bei -20 °C gelagert wurde. Zur Verwendung wurden Aliquote mit einer Konzentration von 10 pmol/μl hergestellt.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Primer

Primer	Sequenz	Referenz
Knockout-Plasmid		
tet_M_for	5'-TCGATGTATTCAAGATTATCGC-3' ließt aus <i>tet(M)</i> in Richtung 3'	Diese Arbeit
tet_M_rev	5'-TAGGTATACAAAGCATACAGATATTCTC-3' ließt aus <i>tet(M)</i> in Richtung 5'	Diese Arbeit
SE1923::tetM_fwd	5'-CACTCATCGCAGTGCAGCGGAATTCGTAATGATTGATTGTATT CAACG-3' Amplifikation des Insert $\Delta 1923::tet(M)$ aus pScelI	Diese Arbeit
SE1923::tetM_rev	5'-GCCCGGGTACCGAGCTCCGGAATTCGCATTAGTTTTTAATATC TATGTTTTTAATATATTTAG-3' Amplifikation des Insert $\Delta 1923::tet(M)$ aus pScelI	Diese Arbeit
1923_tetM_1920_f	5'-CACTCATCGCAGTGCAGCGGAATTCGTAATGATTGATTGTATT CAACG-3' Amplifikation des Insert $\Delta 1923-1920::tet(M)$ aus pScelI	Diese Arbeit

1923_tetM_1920_r	5'-GCCCGGGTACCGAGCTCCGGAATTCATATGAAACATAATATT ACATTTTACATTTTTTTAG-3' Amplifikation des Insert $\Delta 1923-1920::tet(M)$ aus pSceI	Diese Arbeit
ABC::tetM_fwd	5'-CACTCATCGCAGTGCAGCGGAATTCCTTATCATTGTAAAAGG TATATCTATCTAATTTAATTTTC-3' Amplifikation des Insert $\Delta pmtH::tet(M)$ aus pSceI	Diese Arbeit
ABC::tetM_rev	5'-GCCCGGGTACCGAGCTCCGGAATTCCTGAGGTGAAATAAAT GAAAC-3' Amplifikation des Insert $\Delta pmtH::tet(M)$ aus pSceI	Diese Arbeit
Überprüfung chromosomaler Integrationsereignisse		
pBASE_3_rev	5'-ATCTCTAAATCGTCTGTACGCTG-3'	Diese Arbeit
pBASE_5_for	5'-TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG-3'	Diese Arbeit
tetM_for	5'-CAACACATGCTAGCCAAGAAATATTGAAGGCTAGTCAG-3'	AG Rohde
tetM_rev	5'-ATGTGTTGGCGGCCCTTTACAAATATGCTCTTACGTGC-3'	AG Rohde
3_Delt_1923_for2	5'-TCCCCTTCTTCATTACGAGTG-3'	Diese Arbeit
5_Delta_1923_f2	5'-AATATCACCTATTTGTTTCGCTCA-3'	Diese Arbeit
3_delta_1920_rev	5'-TCATTGAGCGATCATGGAATC-3'	Diese Arbeit
tetM_5_for	5'-TCCCGCTATCAAATTGACAG-3'	Diese Arbeit
tetM_3_for	5'-TAACAATCAAAGAGCCAGACG-3'	Diese Arbeit
5_Delta_ABC_rev	5'-GCAAACAATATTATATAAAGTGATGC-3'	Diese Arbeit
3_Delta_ABC_for	5'-ATGCCTTTAACCTTATGCGTT-3'	Diese Arbeit
Komplementations-Plasmide		
1920_1923_fwd	5'-CACTCATCGCAGTGCAGCGGAATTCCTATTATAGAAAGTGGT CGTATC-3'	Diese Arbeit
1920_1923_rev	5'-ATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCAATGAAATTCTGAATGA ACG-3'	Diese Arbeit
1921_1920_fwd	5'-AGGATCCCCGGGCGAGCTCGAATTCATTGAGGAGAGTGAGA ATG-3'	Diese Arbeit
1921_1920_rev	5'-CATTTAGAATAGGCGCGCCGAATTCATTATAGAAAGTGGTC GTATC-3'	Diese Arbeit
SE1621-1624_fwd	5'-AGGATCCCCGGGCGAGCTCGAATTCATGATTTATGAGGAGGA CG-3'	Diese Arbeit
SE1621-1624_rev	5'-CATTTAGAATAGGCGCGCCGAATTCCTATTTAAATATCCCTCT TTGATG-3'	Diese Arbeit
pRB473_MCS_for	5'-CCTCAAGCTAGAGAGTCATT-3' Sequenzierung des Insert in pRB473	AG Rohde
pRB473_MCS_rev	5'-GATTTGTTTCAGAACGCTCG-3'	AG Rohde
pHB3-296EcoRI_fo	5'-CTTTATTGGGTGGCACTTTAGC-3' Übergang aus pHB3 ins Insert	Diese Arbeit
pCN57_MCS_for	5'-CCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC-3' Übergang aus pHB3 ins Insert	AG Rohde
pCNDUF_term_rev	5'-GCAAAGGCGCCTGTCAC-3' Übergang aus pHB3 ins Insert	AG Rohde

3.1.4 Wachstumsmedien

Sämtliche Medien wurden in ddH₂O gelöst und anschließend durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert. Hitzelabile Bestandteile wie Antibiotika wurden nach dem Autoklavierprozess hinzugegeben. Zur Herstellung von Festmedien wurde dem Medium 12 g/l

und zur Herstellung von Soft-Agar 7 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) hinzugefügt. Wenn nicht anders angegeben, wurden Flüssigmedien bei Raumtemperatur und Agarplatten bei 4 °C gelagert.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Wachstumsmedien

Medium	Zusammensetzung	Bezug
Festmedien		
Columbia-Blutagar	-	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Müller-Hinton-Agar	-	OXOID, Wesel, Deutschland
Flüssigmedien		
B2	10 g/l Caseinhydrolysat 25 g/l Hefeextrakt 1 g/l K ₂ HPO ₄ 5 g/l Glucose 25 g/l NaCl	
Brain Heart Infusion	30 g/l Brain Heart Infusion Broth	OXOID, Wesel, Deutschland
Luria Bertani (LB)	10 g/l Bacto-Tryptone 5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl	
NB2+	20 g/l Nutrient Broth No 2 0,4 g/l CaCl ₂	OXOID, Wesel, Deutschland
TSB	30 g/l TSB	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
SOC	-	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
STA	20 g/l Nutrient Broth No 2 5 g/l NaCl 0,4 g/l CaCl ₂	OXOID, Wesel, Deutschland

3.1.5 Lösungen, Puffer und Reagenzien

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Lösungen, Puffer und Reagenzien

Lösung	Zusammensetzung / Hersteller
Agarose	SeaKem® LE Agarose (Lonza, Rockland, USA)
Sigma-Agarose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Basislösung (Pulsfeld- Gelelektrophorese)	40 ml 5 M NaCl 40 ml 0,5 M Na-EDTA

	600 µl 2 M Tris-HCL 400 mg Na-Desoxycholat 2 g Na-Lauroyl-Sarkosin 200 ml ddH ₂ O
DNA-Ladepuffer	50 ml Glycerin 250 mg Bromphenolblau 2 ml EDTA 0,5 M 100 ml ddH ₂ O
DNA-Nachweis	RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)
ES-Lösung (Pulsfeld-Gelelektrophorese)	1000 ml 0,5 M EDTA 10 g Laurylsarcosin
InstaGene Matrix	BioRad, München, Deutschland
PBS, 20x	2,73 M NaCl 53 mM KCl 166 mM Na ₂ HPO ₄ 53 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS-T	1 l PBS 0,5 ml Tween 20
RNAprotect Bacteria Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
SE-Puffer (Pulsfeld-Gelelektrophorese)	15 ml 5 M NaCl 50 ml 0,5 M Na-EDTA (pH 7,5) 1000 ml ddH ₂ O
TBE-Puffer, 5x	250 mM Tris 250 mM Borsäure 10 mM EDTA
TE-Puffer, 1x	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ziegen Serum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.6 Chemikalien

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien

Name	Firma
2-mercapto-Ethanol	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gentianaviolett	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

3.1.7 Antibiotika

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration	Lösungsmittel	Hersteller
Gelöste Antibiotika			
Ampicillin	100 mg/ml	Methanol	Sigma-Aldrich, München
Anhydrotetrazyklin	1 mg/ml	Aqua ad ini.	Sigma-Aldrich, München
Chloramphenicol	10 mg/ml	Methanol	Sigma-Aldrich, München
Erythromycin	20 mg/ml	Methanol	Sigma-Aldrich, München
Tetrazyklin	20 mg/ml	Methanol	Sigma-Aldrich, München
E-Teste			
Ciprofloxacin	0.002 – 32 µg/ml	-	Biomérieux, Marcy-l'Étoile
Daptomycin	0.016 – 256 µg/ml	-	Biomérieux, Marcy-l'Étoile
Erythromycin	0.016 – 256 µg/ml	-	Biomérieux, Marcy-l'Étoile
Oxacillin	0.016 – 256 µg/ml	-	Biomérieux, Marcy-l'Étoile
Vancomycin	0.016 – 256 µg/ml	-	Biomérieux, Marcy-l'Étoile

3.1.8 Enzyme

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Restriktions-Endonukleasen	
EcoRI	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
EcoRI-FD (<i>fast-digest</i>)	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
EcoRI-HF (<i>high-fidelity</i>)	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
SmaI	Roche, Basel, Schweiz
Weitere Enzyme	
Lysostaphin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Lysozym	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

3.1.9 Molekularbiologische Kits

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete molekularbiologische Kits

Prozedur	Kitname / Hersteller
cDNA-Synthese	iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad, München, Deutschland)
DNase Behandlung & Entfernung	DNA-free™ Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Gibson Assembly	Gibson Assembly Cloning Kit (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland)
PCR-/DNA-Aufreinigung	NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren)

PCR-DyNAzyme Polymerase-Kit	Thermo Scientific DyNAzyme II DNA Polymerase (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland)
PCR-Phusion Polymerase-Kit	Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland)
Plasmid-Präparation	QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
Real-time PCR TaqMan Assay	TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™, Waltham, USA)
RNA-Präparation	RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
Quantifizierung von RNA-Proben	Quant-iT™ Qubit RNA BR Assaykit (Invitrogen, Carlsbad, Deutschland)

3.1.10 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Name / Hersteller
Brutschrank / Inkubator	Heraeus, Tuttlingen, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Elektroporator	Gene Pulser XCell (BioRad, München, Deutschland)
Fluorometer	Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Gefrier- und Kühlschränke	4 °C - Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland -20°C - Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland -80°C - Kryotek, Hamburg, Deutschland
Gel-Dokumentation	ChemiDoc XRS (BioRad, München, Deutschland)
Homogenisator	Precellys® 24 (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
Light Cycler	LightCycler® 480 Instrument (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
Magnetrührer	Gerhardt, Bonn, Deutschland
Mikroplatten-Leser	Infinite 200 PRO Microplate Reader (Tecan, Männedorf, Schweiz)
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Photometer	Nano Drop ND-1000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) SmartSpec™ 3000 (BioRad, München, Deutschland)
Pipetten	PIPETMAN Classic (Gilson, Middleton, USA)
Pipettierhilfen	Accu-Jet Pro (BRAND, Wertheim, Deutschland) PIPETBOY acu 2 (INTEGRA Biosciences, Biebertal, Deutschland)
Pipettiersystem	MagNA Pure 96 Instrument (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
Pulsfeld-Gelelektrophorese-System	Cooling Module (BioRad, München, Deutschland) Electrophoresis Cell (BioRad, München, Deutschland) GenePath™ System (BioRad, München, Deutschland) Variable Speed Pump (BioRad, München, Deutschland)

Schüttelinkubatoren	Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Sonifizierer	Digital Sonifier® (Branson, Danbury, USA)
Sterile Werkbank	Thermo Fisher, Waltham, USA
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417R, Centrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Thermocycler	peqSTAR 96X Universal (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
UV-Transilluminator	BioRad, München, Deutschland
UV-Dokumentationsstation	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Vortex	Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)
Waagen	Präzisionswaage 572 (Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland) Präzisionswaage PCB (Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland) Analytical Plus (Ohaus, Nänikon, Schweiz)
Zentrifugen	Multifuge 1 S-R (Heraeus, Hanau, Deutschland) 3-18K (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) Megafuge 3.0R (Heraeus, Hanau, Deutschland)

3.1.11 Glas- und Plastikwaren, Verbrauchsartikel

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
96-Well-Platte – Cellstar	Greiner, Kremsmünster, Deutschland
96-Well-Platte – Nunclon Delta-Oberfläche	Nunc/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DNA LoBind-Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektroporationsküvetten	1 mm Elektroden-Abstand (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon-Tubes	Greiner, Kremsmünster, Deutschland
Glaskügelchen	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Kanülen	Braun, Melsungen, Deutschland
Kryokonserven	Mast Diagnostika, Reinfeld, Deutschland
Mikro-Schraubröhre	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen	Nunc/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Photometer- Küvetten	Labsolute, Renningen, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
Sterilfilter	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

3.1.12 Größenstandards für Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Proben mittels Gel-Elektrophorese wurde der DNA-Größenstandard λ DNA-HindIII/ Φ X174-HaeIII (Finnzymes, Espoo, Finnland) verwendet (Abbildung 5).

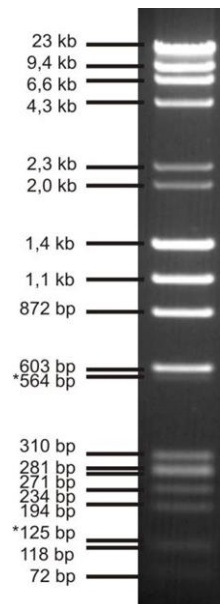


Abbildung 5: Laufmuster des DNA-Molekulargewichtstandards λ DNA-HindIII/ Φ X174-HaeIII (Finnzymes, Espoo, Finnland)

3.1.13 Software

Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Software

Software
CLC Main Workbench 8 (8.0.1)
GraphPad Prism 5 (5.01)
i-control™ (2.0)
LightCycler® 480 Software (1.5.1.)
Microsoft Office Professional Plus 2013
NanoDrop 1000 (3.7.1)

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht von Bakterien und Lagerung

Die genutzten Bakterien-Stämme wurden zur regelhaften Verarbeitung durch einen Drei-Ösen-Ausstrich auf Agarplatten ausplattiert, welchen zu Selektionszwecken ein Antibiotikum zugefügt wurde. Staphylokokken wurden auf Blut-, BHI-, oder TSB-Agar, *E. coli*-Stämme auf LB-Agar kultiviert. Die Inkubation erfolgte regelhaft über Nacht bei 37 °C in einem

Brutschrank (Festkulturen) oder einem Schüttelinkubator bei 180-200 UpM (Flüssigkultur). Vorkulturen wurden entweder für 6 Stunden oder über Nacht inkubiert und anschließend hieraus die Hauptkultur in einem Verhältnis von 1:100 beimpft. Die permanente Aufbewahrung der Stämme erfolgte in Kryotubes bei -80 °C.

3.2.2 Phänotypische Methoden

3.2.2.1 Biofilm-Test

Der Biofilm-Test ist eine phänotypische *in vitro*-Methode, die es ermöglicht, verschiedene Bakterienstämme oder genetisch modifizierte Klone eines Stammes hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Biofilm zu bilden, miteinander zu vergleichen.

Zur Anfertigung wurden 2 ml TSB aus einer Vorkultur beimpft und hieraus 4 Well einer Nunclon Delta 96-Well-Platte mit je 200 µl befüllt. Daraufhin erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 20 Stunden im Brutschrank. Je nach Versuchsaufbau und Fragestellung wurde das Medium gegebenenfalls nach 6 Stunden gewechselt oder Reagenzien wie Ziegenserum oder Natriumchlorid hinzugegeben. Nach abgelaufener Zeit wurde initial die OD₆₀₀ bestimmt, um Informationen über das Wachstum zu erhalten. Daraufhin wurde die Platte ausgeschlagen und 3-mal mit je 200 µl 1x PBS vorsichtig gewaschen, um diese von freien Zellen und dem restlichen Überstand zu reinigen. Anschließend wurde die Platte bei 30 °C zum Trocknen in den Brutschrank gelegt. Der getrocknete Biofilm wurde dann für 10 Minuten mit Gentianaviolett gefärbt, anschließend gründlich unter fließendem Wasser gespült und erneut getrocknet. Abschließend erfolgte die photometrische Dichtemessung des gefärbten Biofilms in einem Wellenlängenbereich zwischen 405-570 nm. Aus vier ermittelten Replikaten wurde der Mittelwert gebildet und der Standardfehler bestimmt. Ab einem Wert von 0,1 wurde dieser als Biofilm-positiv angesehen. Unter 0,1 galt ein Ergebnis als Biofilm-negativ.

3.2.2.2 Wachstumskurven

Mittels einer Wachstumskurve lässt sich das bakterielle Wachstum gegen die Zeit graphisch veranschaulichen. Hierbei wird im stündlichen Abstand die OD₆₀₀ gemessen.

Zur Anfertigung wurden 2 ml TSB aus einer Vorkultur 1:100 beimpft und hieraus 4 Well einer Greiner 96-Well-Platte mit je 200 µl befüllt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C im Mikroplatten-Leser mit stündlicher Bestimmung der OD₆₀₀. Neben dem Wachstum in TSB wurde in dieser Arbeit zudem das Wachstum unter 4%-Natriumchlorid (osmotischer Stress auf die Zelle) und in 70%-Ziegenserum untersucht.

3.2.2.3 Antibiogramm mittels Agardiffusionstest

Die Anfertigung eines Antibigramms mit Hilfe des Agardiffusionstest erfolgte entsprechend der DIN58940. Anhand der ISO20776-1 erfolgte eine Einteilung in „resistent“ oder „sensibel“. Es wurde sich an den Grenzwerten der aktuellen Empfehlungen der *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) orientiert.

3.2.2.4 Hämolyse-Test

Wie Eingangs beschrieben, lysieren PSM Erythrozyten (Cheung et al. 2012). Das bei der Hämolyse freiwerdende Hämoglobin kann photometrisch bei 541 nm gemessen werden und so die Hämolyse-Aktivität bestimmt werden.

Zur Durchführung wurden aus einer Vorkultur 100 µl in 10 ml TSB mit 4%-Xylose beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15 Minuten, bei 3.500 UpM und 4 °C. Der Überstand wurde mit einer serologischen Pipette in ein kleines Falcon-Tube überführt. An dieser Stelle ist eine Lagerung bei -20 °C möglich. Als Positivkontrolle wurde TSB mit 1%-Tween verwendet. Es wurden drei technische Replikate angefertigt. Für einen Ansatz wurden 100 µl 2%-Hammel-Erythrozyten mit 100 µl Überstand/Kontrolle in ein 1,5 ml-Eppendorf-Tube pipettiert und für 1 Stunde bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 13.000 UpM für 5 Minuten. Aus dem Überstand wurden 150 µl in eine Greiner-Platte mit flachem Boden pipettiert und die Absorption bei 541 nm im Mikroplatten-Leser gemessen.

3.2.2.5 Gradientendiffusionstest

Mit einem Gradientendiffusionstest (Epsilon (E)-Test) lässt sich die minimale Hemmkonzentration (MHK) eines Antibiotikums für einen zu untersuchenden Bakterienstamm bestimmen.

Zur Anfertigung wurde eine Kolonie des zu untersuchenden Bakteriums mit einem sterilen Wattestäbchen angetippt und 2 ml 1x-PBS bis zu einem standardisierten McFarland von 0,5 beimpft (McFarland 1907). Anschließend wurde das Inokulum mit Hilfe eines neuen sterilen Wattestäbchens auf eine Müller-Hinton-Agarplatte in zwei Richtung flächendeckend aufgetragen. Nachdem die Agarplatte beimpft wurde, wurde vorsichtig ein Teststreifen aufgelegt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 24 Stunden. Am Folgetag erfolgte die Bestimmung der MHK.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurde eine Vorkultur in 2 ml TSB beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Präparation erfolgte mittels *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) den Angaben des Herstellers gemäß. Zur Elution wurde anstelle des im Kit enthaltenen Elutions-Puffers herkömmliches Aqua ad iniectabilia verwendet. Das gewonnene Eluat wurde zur Klonierung, zur Sequenzierung oder zur Restriktionsanalyse verwendet.

Bei der Plasmid-Präparation aus Staphylokokken wurden dem Lysepuffer des Herstellers zusätzlich 5 µl Lysostaphin (1500 U/ml) beigefügt. Die erzeugte Suspension wurde zusätzlich für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Präparation dem vorgegebenen Protokoll gemäß fortgeführt.

3.2.3.2 Präparation von chromosomaler DNA

Für die Gewinnung chromosomaler DNA wurde eine isolierte Kolonie mittels Impföse von einer Agarplatte gepickt und in 200 µl InstaGene Matrix (BioRad, München, Deutschland) resuspendiert. Im Vorfeld wurde die InstaGene Matrix mittels Magnetrührer gemischt. Handelte es sich bei der Präparation um Staphylokokken, wurde der Suspension 5 µl Lysostaphin (1500 U/ml) zugefügt und diese vorerst für 45 Minuten bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Daraufhin folgte die Inkubation für weitere 15-30 Minuten bei 56 °C im Heizblock. Anschließend wurde die Probe für 10 Sekunden gevortext und für 8 Minuten bei 100 °C im Heizblock inkubiert. Nach erneutem Vortexen folgte die Zentrifugation für 2-3 Minuten bei 12.000 UpM. Der gewonnene Überstand wurde bei -20 °C gelagert oder direkt für eine Polymerase-Kettenreaktion verwendet.

3.2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration und Reinheit einer DNA-Probe wurde mittels *NanoDrop ND-1000* Spektrometer (Peqlap, Erlangen, Deutschland) photometrisch bestimmt. Hierzu wurde 1 µl Probe auf eine Kontaktstelle zwischen zwei Glasfaserkabel pipettiert. Laut dem Hersteller-Manual der Firma Thermo Fisher (<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>) stellt die Probe Kontakt zwischen den Enden der beiden fiberoptischen Kabel her. Mittels einer gepulsten Xenon-Lichtquelle wird Licht durch die Probe geleitet, photometrisch gemessen (OD₂₆₀) und anhand einer Software analysiert.

3.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, kurz PCR) dient dazu, eine definierte DNA-Sequenz mit Hilfe einer DNA-Polymerase enzymatisch zu amplifizieren. Durch eine repetitive Abfolge von Temperatur-Zyklen kommt es abwechselnd zu einer Denaturierung der DNA, gefolgt von einem Anlagern (Annealing) gegenläufiger (*forward* und *reverse*) Oligonukleotide an die gegenläufigen Einzelstränge der DNA. Diese Oligonukleotide, genannt Primer, bilden den Startpunkt der Reaktion und ermöglichen der DNA-Polymerase, an einen Einzelstrang zu binden und fortlaufend den komplementären Strang zu synthetisieren (Elongation). Die Produkte aus einem abgelaufenen Zyklus stehen der Reaktion im folgenden Zyklus ebenfalls zur Verfügung. Somit kommt es konsekutiv zu einer Vervielfältigung des DNA-Abschnittes.

Tabelle 14: Programm für die Amplifikation mit der Phusion-Polymerase

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Funktion
	110	-	Vorheizen des Deckels
	98	120	Initiale Denaturierung
30 x	98	10	Denaturierung
	55 *	10	Annealing der Primer
	72	30 **	Elongation
	72	180	Elongation
	4	-	Lagerung

* Primer können abweichende Annealing-Temperaturen haben.

** Die Phusion-Polymerase besitzt eine Verlängerungsrate von 15-30 Sekunden pro 1000 Basenpaare. Ist ein zu amplifizierendes Fragment länger, muss die Elongationszeit gegebenenfalls angepasst werden.

Tabelle 15: Pipettierschema für einen PCR-Ansatz (50 µl *)

Reagenz	Phusion-Polymerase [µl]	DyNAzyme-Polymerase [µl]
Template-DNA	1	1
Polymerase	0,5	0,5
Puffer	10	5
Forward Primer	1,5	1,5
Reverse Primer	1,5	1,5
dNTP	1	1
Aqua ad iniectabilia	34,5	39,5

* Wurden keine 50 µl Produkt benötigt, wurde der gesamte Ansatz halbiert.

3.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, Nukleinsäure-Stränge mittels einer elektrischen Spannung anhand ihrer Größe aufzutrennen und durch den Abgleich mit DNA-Größenstandards ihre Größe zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde meist ein 1%-Gel hergestellt. Hierzu wurde 1 g Agarosepulver in 100 ml 0,5%-TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurden der Lösung 5 µl eines UV-fluoreszierenden Stains-all-Puffers (*RedSafe Nucleic Acid Staining Solution*, iNtRON Biotechnology, Korea), der anionische Moleküle färbt, zugefügt. Danach wurde die heiße Lösung in eine Gießvorrichtung gegossen und Steckkämme mit der gewünschten Taschengröße (25 oder 50 µl) in die Vorrichtung gesteckt. Durch Abkühlen entsteht ein Gel der Agarose. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 0,5%-TBE-Puffer verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden im Vorfeld mit Probenpuffer (*GelPilot*, Qiagen, Hilden, Deutschland) versetzt und anschließend vorsichtig in je eine Tasche pipettiert. Als Referenz wird der DNA-Größenstandard in eine Tasche pipettiert. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung werden die negativ geladenen Nukleinsäuren abhängig ihrer Größe in Richtung der Anode gezogen. Kleine Fragmente wandern schneller durch das Agarose-Gel, größere langsamer. Mit der Zeit gelingt hierdurch die Auftrennung der Nukleinsäure-Stränge anhand ihrer Größe. Durch den Einsatz von UV-Licht fluoreszieren die Banden und können fotodokumentiert werden. Ist eine weitere Arbeit mit den DNA-Fragmenten geplant, wird die UV-Bestrahlung so kurz wie möglich gehalten, um eine Schädigung der DNA zu verhindern. Die Banden werden dann aus dem Gel ausgeschnitten, in einem Puffer gelöst und aufgereinigt.

3.2.3.6 Restriktionsverdau mittels Endonukleasen

Für das „Schneiden“ oder „Öffnen“ von Plasmiden wurden in dieser Arbeit Restriktions-Endonukleasen verwendet, welche den Doppelstrang an einer spezifischen Restriktionsstelle mittels Hydrolyse öffnen. Für den Verdau wurden 10 µl Plasmid, 2 µl Puffer, 1 µl Restriktions-Endonuklease und 7 µl ddH₂O in einer Reaktion angesetzt und anschließend bei 37 °C für mindestens 1 Stunde inkubiert. Folgte dem Restriktionsverdau eine Klonierung, wurden *High-Fidelity*-Endonukleasen mit zugehörigem Puffer verwendet und die Inkubation über Nacht bei 37 °C vollzogen. Für eine Restriktionsanalyse wurden aus Gründen der Zeitersparnis meist *Fast-Digest*-Endonukleasen verwendet und die Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C vollzogen. Anschließend wurden eine oder mehrere der zu vergleichende Proben per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktions-Endonukleasen sind in **Tabelle 9** zusammengefasst.

3.2.3.7 *Gel-Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten*

Zur Extraktion eines PCR-Produktes oder Plasmides aus einem Agarose-Gel wurde die spezifische Bande unter schwachem UV-Licht mit einem Skalpell behutsam aus dem Gel herausgetrennt und in ein 2 ml-Eppendorf-Tube überführt. Zur Aufreinigung wurde das Kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) genutzt. Pro 100 mg Gel wurden 200 µl des im Kit enthaltenen NTI-Puffers hinzugegeben und das Gel bei 50 °C im Schüttelinkubator oder Wasserbad für 5-10 Minuten gelöst. Zur Aufreinigung eines PCR-Produktes wurden 100 µl des PCR-Produktes in 200 µl des NTI-Puffers resuspendiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung auf eine Silica-Ionenaustauschsäule aufgetragen und entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls aufgereinigt. Die Elution erfolgte abweichend in 50 µl Aqua ad iniectabilia nach 3-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur.

3.2.3.8 *Ligations-Reaktion mittels Gibson Assembly*

Für Legierungs-Reaktionen wurde das *Gibson Assembly Cloning Kit* (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Im Vorfeld wurde das Vektor-*backbone* präpariert und mittels *High-Fidelity*-Endonukleasen über Nacht bei 37 °C verdaut. Das zu integrierende Insert wurde mittels PCR amplifiziert und in einer Gelelektrophorese nachgewiesen. Beide Proben, das Vektor-*backbone* als auch das Insert, wurden vor der Legierungs-Reaktion im *NanoDrop ND-1000* photometrisch gemessen und anschließend aufgereinigt. Zur Berechnung der benötigten Konzentration und des richtigen Verhältnisses von Plasmid, Insert sowie des *Gibson Assembly Master Mix* wurde der von NEB online bereitgestellte *NEBioCalculator* (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) und das im Cloning-Kit enthaltene Reaktionsprotokoll verwendet.

Die Reaktion wurde auf Eis angesetzt und anschließend für 15 Minuten bei 50 °C im Thermocycler inkubiert. Nach der Legierungs-Reaktion erfolgte die Transformierung des frisch legierten Vektors in chemisch kompetente *E. coli* TOP10, welche im Kit enthalten sind. Hierzu wurden 2 µl Probe zu den Zellen pipettiert, vorsichtig resuspendiert und die Suspension anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach abgelaufener Zeit erfolgte der Heat Shock bei 42 °C für 30 Sekunden, gefolgt von einer 2-minütigen Ruhephase auf Eis und der Zugabe von 950 µl SOC-Medium (Raumtemperatur). Daraufhin wurden die Zellen für 60 Minuten bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert, anschließend 100 µl auf entsprechende Selektivagarplatten pipettiert und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.3.9 Chemische Transformation von *E. coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten, chemisch kompetenten *E. coli*-Stämme wurden entweder durch Invitrogen (Carlsbad, USA) bezogen oder im Vorfeld präpariert. Die Transformation klonierter Plasmide in kompetente *E. coli*-Stämme wurde entweder dazu genutzt, diese zu verifizieren, zu vermehren oder eine langfristige Lagerung bei -80 °C zu ermöglichen.

Hierzu wurden chemisch kompetente *E. coli* TOP10 vorsichtig auf Eis aufgetaut und daraufhin eine gewünschte Menge (meist 1-2 µl einer Plasmidpräparation) aufzunehmender DNA hinzugefügt. Nach behutsamem Resuspendieren erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Mittels Heat-Shock (42 °C für 30 Sekunden) sollte das DNA-Produkt über Poren der Zellmembran ins Zellinnere gelangen. Darauf wurden die Zellen für 2 Minuten erneut auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Raumtemperatur) folgte die Inkubation bei 37 °C für 1 Stunde unter leichtem Schütteln im Heizblock. Nach abgelaufener Zeit folgte das Ausplattieren von meist 100 µl auf Ampicillin-haltigen Selektivagarplatten (1:1000 Ampicillin). Aufgrund einer Plasmid-kodierten Antibiotika-Resistenz gelang die selektive Anzucht von Bakterien, welche das Plasmid aufgenommen hatten bei 37 °C im Brutschrank über Nacht.

3.2.3.10 Elektroporation

Bei der Elektroporation gelangt das zu transformierende DNA-Produkt mittels Anlage einer elektrischen Spannung in die Zielzelle. Da Staphylokokken anders als *E. coli*-Bakterien über eine wesentlich stärkere Zellwand verfügen, ist eine chemische Transformation nicht erfolgsversprechend. Somit wurde in dieser Arbeit die Elektroporation verwendet, um DNA-Produkte in Staphylokokken-Stämme zu transformieren. Um eine möglichst hohe Transformationsrate zu erzielen, empfiehlt es sich, die elektro-kompetenten Bakterien unmittelbar vor Durchführung der Elektroporation herzustellen. Jedoch wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass auch die Elektroporation von gelagerten elektro-kompetenten Zellen oftmals erfolgreich war.

Zur Gewinnung elektro-kompetenter Staphylokokken wurden 50 ml frisch angesetzter B2-Brühe mit 750 µl einer über Nacht gewachsenen Vorkultur des Zielstammes beimpft. Die resultierende Hauptkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 bei 37°C und 180-200 UpM inkubiert. Die anschließende Lagerung der Zellen erfolgte auf Eis, um einen weiteren Wachstumsprozess zu unterbinden. Nach Überführung der Kultur in ein 50 ml fassendes Falcon-Tube, wurde diese in einer 4 °C kalten Zentrifuge für 15 Minuten bei 4332 g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde 3-malig mit je 25 ml eiskaltem Millipore-Wasser und anschließend mit 10 ml sowie 5 ml eiskalter 10%-Glycerin-Lösung gewaschen. Zwischen

jedem Waschschrift erfolgte eine weitere Zentrifugation. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das residuale Zellpellet in 600-800 µl (in Abhängigkeit der initial gemessenen OD₆₀₀) eiskalter 10%-Glycerin-Lösung resuspendiert. Abschließend erfolgte eine Aliquotierung in je 70 µl.

Ein frisch hergestelltes Aliquot mit elektro-kompetenten Zellen wurde mit 1-4 µl des zu transformierenden DNA-Produkts resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in den Spalt einer Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einem Widerstand von 100 Ohm, einer Spannung von 2,0 kV, und einer Kapazität von 25 µF. Unmittelbar nach dem Puls wurden die transformierten Zellen in 390 µl B2-Medium resuspendiert und in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube bei 37 °C, 200 UpM in einem Schüttelinkubator für 1 Stunde inkubiert. Durch die Inkubation erfolgte die Expression Plasmid-kodierter Resistenzgene, welche eine Anzucht auf Selektionsmedien ermöglichen. In diesem Fall wurden BHI-Agarplatten mit Chloramphenicol (10 mg/ml) verwendet. Regelmäßig wurden die Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.3.11 Transduktion von DNA durch Bakteriophagen

Neben der chemischen Transformation genetischen Materials sowie dem Verfahren der Transformation mittels Elektroporation stellt die Transduktion durch Bakteriophagen eine sehr effiziente Methode zur Bewegung genetischen Materials zwischen Bakterienstämmen dar. Bei der unspezifischen Transduktion dienen Phagen als Vektor von Bakterien-DNA. Während der Phagenvermehrung innerhalb der infizierten Wirtszelle kommt es vor, dass Phagen Bruchstücke der fragmentierten bakteriellen DNA aufnehmen und in ihr Genom integrieren. Wird im Verlauf ein anderes Bakterium infiziert, kann es wiederum passieren, dass die zuvor aufgenommene DNA in das Bakteriengenom integriert wird. Wird hierbei beispielsweise auch eine Resistenz-Kassette transduziert und integriert, ermöglicht dies eine Selektion. Die Durchführung einer Phagen-Transduktion setzt sich aus drei Arbeitsschritten zusammen: der Titration, der Anreicherung und der eigentlichen Transduktion.

Für die Bestimmung des Phagentiters wurde zu Beginn eine Vorkultur des Bakteriums, welches das zu transduzierende DNA-Material beinhaltet, in NB2+-Brühe angelegt. Während der Inkubation wurde parallel eine Verdünnungsreihe des Phagen in NB2+-Brühe hergestellt (10^3 - 10^8). Anschließend wurden 500 µl der Vorkultur mit 500 µl der entsprechenden Phagen-Verdünnung in ein kleines Falcon-Tube überführt, 3 ml flüssiger STA-Soft-Agar beigefügt und der Ansatz umgehend auf eine STA-Agarplatte gegossen, da der STA-Soft-Agar schnell abkühlt und fest wird. Die Platten wurden für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend

erfolgte die Auszählung der Plaques und die Berechnung des Phagentiters. Eine Plaque stellt einen Hof innerhalb des gewachsenen Bakterienrasen dar, der durch Lyse entstanden ist.

Zur Anreicherung von Phagen, welche das zu transduzierende DNA-Material beinhalten, wurden 3,5 ml NB2+-Brühe auf die Oberfläche der bewachsenen STA-Agarplatte pipettiert und der Soft-Agar vorsichtig mit einem Drigalskispatel abgetragen, zerkleinert und die Bruchstücke in ein großes Falcon-Tube überführt. Daraufhin wurden die Bruchstücke durch starkes Schütteln des Falcon-Tubes weiter zerkleinert, bis sich makroskopisch keine größeren Bruchstücke mehr ausmachen ließen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30-45 Minuten bei 5.000 UpM und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Falcon-Tube überführt und für weitere 15 Minuten zentrifugiert. Abschließend wurde das gewonnene Lysat steril filtriert.

Zur Vorbereitung der Transduktion wurde am Vortag der Zielstamm mit einem sterilen Wattetupfer flächendeckend auf einer Agarplatte ausgestrichen, um möglichst viel Bakterienmaterial zu erhalten. Der über Nacht gewachsene Bakterienrasen wurde dann mit einer Impföse abgetragen und in 5 ml NB2+-Brühe resuspendiert, bis eine OD₆₀₀ von 6-8 erreicht war. Anschließend wurde 1 ml der Bakteriensuspension mit der gleichen Menge des zuvor gewonnenen Phagenlysates gemischt und das Gemisch für 30 Minuten bei 37 °C statisch inkubiert. Um anschließend die Adsorption der Phagen zu stoppen, wurde dem Ansatz 40 µl 1 M Natriumcitrat zugefügt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 5.000 UpM und 4 °C. Das erhaltene Pellet wurde 2-mal in BHI mit 20 mM Natriumcitrat resuspendiert und zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet in 3 ml BHI mit 20 mM Natriumcitrat resuspendiert und für 1 Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Dann wurden 3 ml flüssiger BHI-Soft-Agar zugefügt und der Ansatz umgehend auf eine BHI-Agarplatte gegossen, welche ein Antibiotikum zu Selektionszwecken enthielt. Bei einer zu hoher Transduktionseffizienz wurde der Ansatz 1:100 verdünnt. Es erfolgte die Inkubation für 24-48 Stunden bei 37 °C.

3.2.4 Herstellung einer Knockout-Mutante mittels Shuttle-Vektor pBASE6

Zur Herstellung eines Knockouts musste zu Beginn ein Knockout-Plasmid kloniert werden. Als Vektor-*backbone* diente das Plasmid pBASE6 (**Abbildung 2**), welches eine Chloramphenicol-Resistenz (*cat*) und eine Restriktionsstelle für EcoRI enthält. Das Prinzip des Knockouts basiert auf einer homologen Rekombination. Als Insert, welches später das *Gene of interest* ersetzen sollte, wurde eine *tet(M)*-Kassette verwendet, die eine Selektion durch Zugabe von Tetrazyklin ermöglicht. Damit das Insert während des allelen Genaustausches das *Gene of interest* ersetzen konnte, wurden der *tet(M)*-Kassette an beiden Enden etwa 1000 Basenpaare angefügt, welche

im Chromosom des Wildtyps *upstream* und *downstream* der auszuschaltenden Sequenz gelegen sind und mittels PCR aus dem Wildtyp-Chromosom vervielfältigt wurden (**Abbildung 6**).

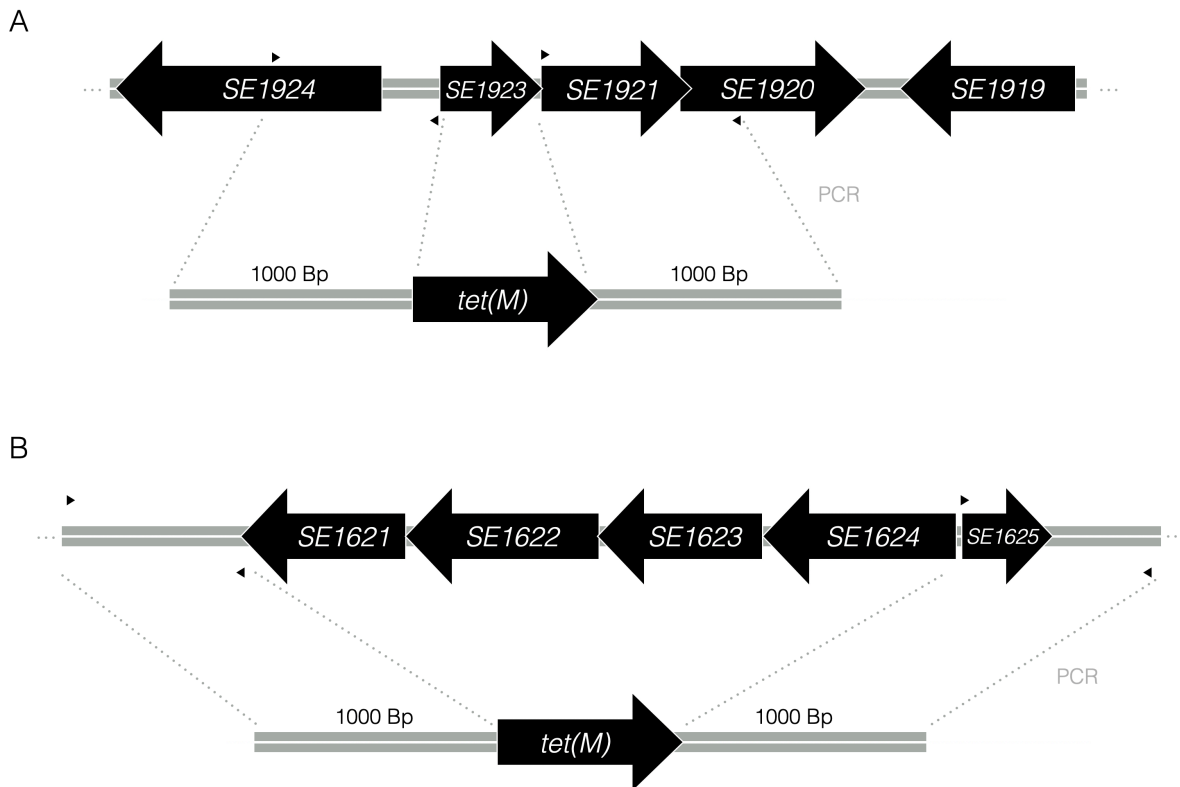


Abbildung 6: Schematische Darstellung der chromosomalen Organisation der Gene (A) *SE1923-SE1920* und (B) *SE1621-SE1624*. Gezeigt wird auch das Insert bestehend aus der *tet(M)*-Kassette mit den flankierenden Bereichen, welche mittels PCR amplifiziert wurden. Die kleinen, schwarzen Dreiecke markieren jeweils die Position der Primer. Auf die schematische Darstellung der flankierenden Bereiche des Knockouts von *SE1923-SE1920* wurde verzichtet.

Zu Beginn dieser Arbeit existierten bereits die benötigten Inserts inklusive flankierende Bereiche, sodass diese ausschließlich via PCR amplifiziert und mittels *Gibson Assembly* in die *EcoRI*-Schnittstelle des Vektor-*backbone* pBASE6 kloniert werden mussten. Da die generierten Knockout-Plasmide aufgrund einer bestehenden Restriktionsbarriere nicht direkt in die Stämme *S. epidermidis* 1457 und 1585 transformiert werden konnten, mussten sie vorher in weitere Stämme transformiert werden, welche diese zusätzlich modifizierten. Nach Präparation aus *E. coli* TOP10 mit anschließender Sequenzierung erfolgte die Elektroporation in *S. aureus* RN4220. Hierauf folgte die Elektroporation in den Stamm *S. epidermidis* 1457-M12. Anschließend erfolgte die Transduktion in *S. epidermidis* 1457 mit Hilfe des Phagen ϕ A6C. In 1457 wurde dann entsprechend der oben aufgeführten Vorgehensweise der allele Genaustausch vollendet. Nach Verifikation des Knockouts durch Sequenzierung erfolgte eine weitere

Transduktion in die Stämme *S. epidermidis* 1457 und 1585. In diesen wurde anschließend der allele Genaustausch vollzogen.

3.2.4.1 Alleler Genaustausch

Der allele Genaustausch kann grundlegend in zwei Rekombinationsereignisse unterteilt werden. Ziel der ersten Rekombination ist die Integration des vorab in die Zelle eingeschleusten Knockout-Plasmides in das Wirtschromosom. Hierzu wurden die Plasmid-tragenden Bakterien in 10 ml TSB über Nacht bei 30 °C und 200 UpM angezogen. Anschließend erfolgte eine Verdünnung 10^{-2} - 10^{-3} in TSB oder sterilem Wasser. Die hergestellten Verdünnungen wurden mit je 100 µl auf Selektivagarplatten (TSA) entsprechend der Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenz ausplattiert. Anschließend erfolgte die Inkubation bei nicht-permissiver Temperatur (45 °C) für 48 Stunden. Gewachsene Kolonien wurden gepickt, ausplattiert und erneut bei 45 °C über Nacht inkubiert.

Die Grundannahme des ersten Selektionsschrittes ist, dass ausschließlich Zellen, die das Plasmid in ihr Chromosom integriert haben, bei nicht-permissiven Temperaturen auf dem Selektivnährmedium anwachsen können (Bae und Schneewind 2006).

Nach erfolgtem PCR-Nachweis der Integration des Plasmides in das Wirtschromosom kann der zweite Rekombinationsschritt durchgeführt werden. Hierzu wurden orientierend an Fitzgerald 2007 Kulturen in 20 ml TSB für 12 Stunden bei 30 °C und 200 UpM angezogen. Anschließend wurde die Temperatur auf 45 °C für weitere 12 Stunden angehoben. Danach wurde der Ansatz 1:100 in frisches Medium verdünnt und die beiden Temperaturschritte wiederholt. Insgesamt wurden drei Zyklen über einen Zeitraum von 72 Stunden durchgeführt. Zuletzt wurden 100 µl in den Verdünnungsstufen 10^{-4} - 10^{-8} auf TSA-Platten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C im Brutschrank sind Kolonien gewachsen bei denen die Resistenzkassette (in dieser Arbeit *tet(M)*) das auszuschaltende *Gene of interest* ersetzt hat. In **Abbildung 7** ist der allele Genaustausch schematisch dargestellt.

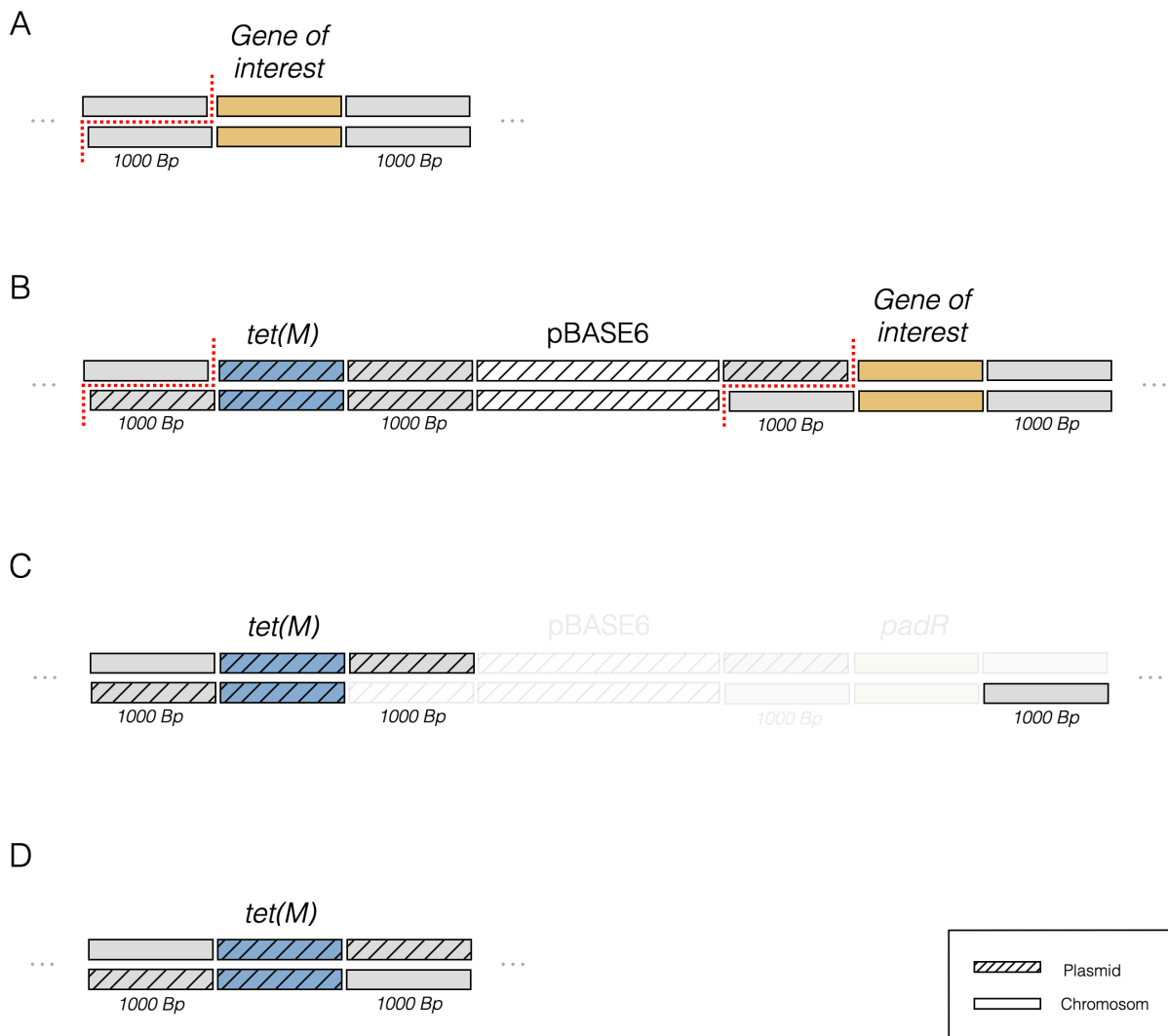


Abbildung 7: Schematische Darstellung des allelen Genaustausches. Abbildungsteil A zeigt die chromosomale Organisation im Wildtyp. An den 3'- oder 5'-gelegenen, flankierenden Bereichen (etwa 1000 Basenpaare) des *Gene of interest* kommt es zu einer Öffnung des Doppelstranges entsprechend der roten Markierung. In die freigewordene Bindungsstelle können so die komplementären Sequenzen aus dem Knockout-Plasmid binden, wodurch dieses in das Chromosom integriert wird (B). Kommt es im zweiten Schritt zu einer zufälligen Exzision des Plasmides entsprechend Abbildungsteil C, wird hier auch das *Gene of interest* mit entfernt. Abbildungsteil D zeigt die neu entstandene chromosomale Organisation. Die integrierte Resistenzkassette *tet(M)* verbleibt im Chromosom. Das *Gene of interest* wurde erfolgreich eliminiert.

3.2.5 Komplementation des Knockouts $\Delta 1923/ \Delta 1923-1920$ mittels Shuttle-Vektor pRB473

Zur Komplementation der Knockouts der Gene *SE1923* (*PadR-like regulator*) und *SE1923-SE1920* wurde als Vektor-backbone das Plasmid pRB473 (Abbildung 4) verwendet, welches eine Chloramphenicol-Resistenz (*cat*) und eine Restriktionsstelle für EcoRI enthält. Mittels der Primer *SE1920_1923_fwd* und *SE1920_1923_rev* wurde der Genabschnitt *SE1923-SE1920* aus

dem Wildtyp des Stammes *S. epidermidis* 1457 amplifiziert, aufgereinigt und mit Hilfe des *Gibson Assembly* in das mit EcoRI verdaute und anschließend aufgereinigte Plasmid pRB473 kloniert. Nach Präparation aus *E. coli* TOP10 und anschließender Sequenzierung wurden das Plasmid pRB473::P_{wt}1923-1920 via Elektroporation in den Stamm *S. aureus* RN4220 transformiert. Aus diesem erfolgte daraufhin die Elektroporation in *S. epidermidis* 1457Δ*agr* und aus diesem die Transduktion in die zuvor generierten Knockout-Mutanten 1457Δ1923, 1457Δ1923-1920, 1585Δ1923 und 1585Δ1923-1920.

3.2.6 Komplementation des Knockouts Δ*pmtH* mittels Shuttle-Vektor pHB3

Zur Klonierung einer Komplementation des Pmt_H-Knockouts wurde als Vektor-*backbone* das Plasmid pHB3 (**Abbildung 3**) verwendet, welches neben einem Xylose-induzierbaren Promotor (P_{xyI}), eine Erythromycin-Resistenz und eine Restriktionsstelle für EcoRI enthält. Mittels der Primer *SE1621-1624_fwd* und *SE1621-1624_rev* wurde der Genabschnitt *SE1621-SE1624* aus dem Wildtyp 1457 amplifiziert, aufgereinigt und mit Hilfe des *Gibson Assembly* in das mit EcoRI-verdaute, aufgereinigte Plasmid pHB3 kloniert. Nach Präparation aus *E. coli* TOP10 und anschließender Sequenzierung wurde das Plasmid pHB3::P_{xyI}*pmtH* via Elektroporation in *S. aureus* RN4220 transformiert. Hieraus erfolgte ferner die Elektroporation in den Stamm 1457Δ*agr* und aus diesem die Transduktion in die Mutanten 1457Δ*pmtH*, 1585Δ*pmtH* und 1457Δ*agr*Δ*pmtH*.

3.2.6.1 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Aus über Nacht bei 37 °C angewachsen 5 ml Flüssigkultur wurden nach Vortexen 800 µl in ein Eppendorf-Tube überführt. Diese wurde für 2 Minuten bei 12.000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend 2-mal in 1 ml SE-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 500 µl SE-Puffer resuspendiert.

Zur Herstellung der Bakterienblöckchen wurde ein 1,6%-Low-melting-point-Agarose hergestellt und bei 50 °C im Heizblock gelagert. Vor dem Mischen mit der vorbereiteten Bakteriensuspension wurden der Agarose eine kleine Spatelspitze Lysozym und 10 µl Lysostaphin beigefügt und die Suspension gevortext. Daraufhin wurden 120 µl der Bakteriensuspension mit 120 µl der 1,6%-Low-melting-point-Agarose in ein neues Eppendorf-Tube überführt, gevortext und 100 µl der Suspension vorsichtig in eine Gießvorrichtung pipettiert. Nach 15-30 Minuten im Kühlschrank wurden die ausgehärteten Blöckchen in eine Lysis-Lösung I (Basislösung mit 5 mg/ml Lysozym und 10 µl/ml Lysostaphin) überführt und anschließend bei 37 °C unter leichtem Schütteln über Nacht inkubiert. Nach vollzogener Lyse I wurden die Lösung verworfen und durch 1 ml ESP-Lösung (ES-Lösung mit 2 µl Proteinase-

K-Lösung) ersetzt. Darauf erfolgte wieder eine Inkubation bei 56 °C über Nacht. Nach erfolgter Lyse II wurden die Blöckchen 4-mal mit 10 ml TE-Puffer für je 1 Stunde gespült. Nach diesem Schritt können die Blöckchen in 1 ml TE-Puffer bei 4 °C bis zu einem Jahr aufbewahrt werden. Als Nächstes folgte der Restriktionsverdau mit SmaI. Hierzu wurde der zugehörige 10x Restriktionspuffer A 1:10 mit Aqua ad iniectabilia verdünnt. Anschließend wurde der TE-Puffer entfernt und die Blöckchen in je 700 µl Restriktionspuffer A für 1 Stunde äquilibriert. Der Puffer wurde daraufhin verworfen und die Blöckchen in 100 µl Restriktionspuffer A mit 4 µl SmaI überführt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht.

Zur Herstellung und Zusammenbau des Gels wurden 2 l 0,5x-TBE-Puffer angesetzt. Für das Gel wurden 1,5 g Sigma-Agarose mit 150 ml 0,5x-TBE-Puffer aufgekocht und auf etwa 60 °C abgekühlt. Der Aufbau der Geldkammer erfolgte entsprechend Herstellerangaben. Die erhitzte Agarose wurde behutsam in die Kammer gegossen und der entsprechende Kamm gesteckt. 2-4 ml wurden bei 56 °C aufbewahrt, um später die Taschen zu verschließen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurden die Blöckchen vorsichtig in die Taschen des Gels überführt. Anschließend wurden die Taschen mit der zurückgehaltenen Agarose verschlossen. Als Puffer wurde der Restliche 0,5x-TBE-Puffer verwendet. Technische Werte der Pulsfeld-Gelelektrophorese: Spannung 6,0 V/cm, Winkel 120°, Umwälzrate der Pumpe 100 %, Kühltemperatur im Mini-Chiller 14 °C, 5-50 Sekunden für insgesamt 28 Stunden.

Nach abgelaufener Zeit wurde das Gel in 400 ml 0,5x-TBE-Puffer überführt und 20 µl der 1%-Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben. Die Färbung erfolgte für 25 Minuten unter leichten Rotationsbewegungen. Anschließend erfolgte die fotografische Geldokumentation unter UV-Belichtung.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse von *SE1923* (*PadR-like regulator*) und *downstream* gelegenen ORF *SE1923-SE1920*

4.1.1 Untersuchung zur Organisation der Transkription von *SE1923-SE1920*

Im Vorfeld wurde die Frage gestellt, ob die Gene *SE1923-SE1920* eine transkriptionelle Einheit bilden, was zur Folge hätte, dass ein Knockout des Genes *SE1923* zu einem funktionellen Knockout der *downstream* gelegenen Gene *SE1921* und *SE1920* führen würde. Hierzu wurde die RNA des Stammes *S. epidermidis* 1585 nach 16-stündigem Wachstum in TSB präpariert, anschließend in cDNA umgeschrieben und von dieser 1 µl in eine PCR mit den Primern

1920_rev und *1923_for* eingesetzt (**Abbildung 8**). Anhand der erhaltenen Bande konnte gezeigt werden, dass die Gene *SE1923-SE1920* in Form einer Einheit transkribiert werden.

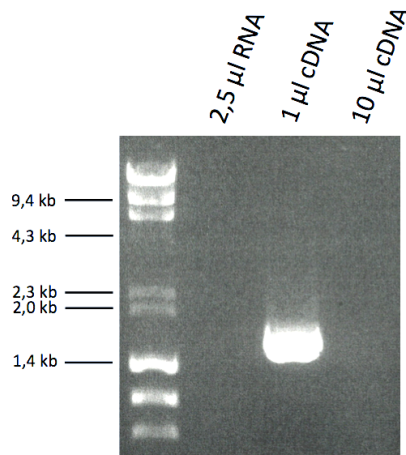


Abbildung 8: PCR der Gensequenz *SE1923-SE1920*. Als Negativkontrolle wurde die präparierte RNA eingesetzt (Spur 2). Um zu zeigen, dass es sich bei dem Amplifikat nicht um ein unspezifisches Bindungsprodukt handelt, wurden 10 µl der umgeschriebenen cDNA eingesetzt (Spur 4). Der Größenstandard wurde auf Spur 1 aufgetragen.

4.1.2 Verifikation der Knockout-Mutante $\Delta 1923/ \Delta 1923-1920$

Zur Verifikation der erfolgreichen Integration der *tet(M)*-Kassette in das bakterielle Chromosom und Elimination des Plasmides-*backbones* inklusive des *Gene of interest* wurden die Übergänge aus dem Chromosom in die *tet(M)*-Kassette zu beiden Seiten mittels PCR amplifiziert (**Abbildungen 9 und 10**). Darüber hinaus wurden die Amplifikate durch Sequenzierung überprüft. Abschließend erfolgte eine weitere Transduktion in die Stämme *S. epidermidis* 1457 und 1585. Auch hier wurde das Ergebnis auf dieselbe Weise überprüft.

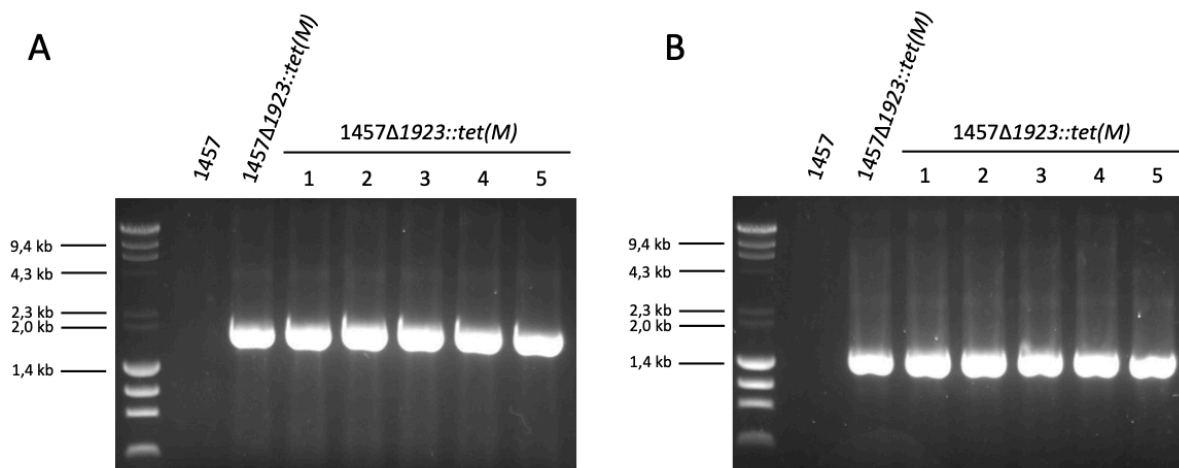


Abbildung 9: PCR der Übergänge des Chromosoms in die *tet(M)*-Kassette des Knockouts $\Delta 1923::tet(M)$. (A) Übergang am 3'-Ende mit den Primern *tetM_for* und *3_delt_1923_for2*. (B) Übergang am 5'-Ende mit den Primern *tetM_rev* und *5_delt_1923_for2*. Es wurden jeweils 5 Klone getestet und aufgetragen (Spuren 4-8). Als Positivkontrolle wurde die Mutante $1457\Delta 1923::tet(M)$ eingesetzt, in welcher der allele Genaustausch vollendet wurde (Spur 3). Als Negativkontrolle wurde der Wildtyp 1457 aufgetragen (Spur 2). Der Größenstandard wurde auf Spur 1 aufgetragen.

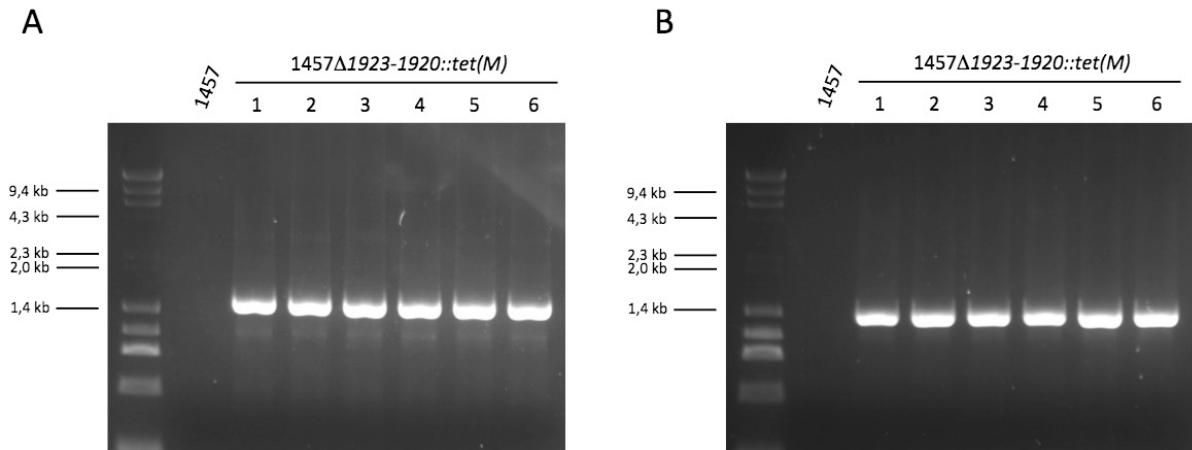


Abbildung 10: PCR der Übergänge des Chromosoms in die *tet(M)*-Kassette des Knockouts $\Delta 1923-1920::tet(M)$. **(A)** Übergang am 3'-Ende mit den Primern *tetM_3_for* und *3_delt_1920_rev*. **(B)** Übergang am 5'-Ende mit den Primern *tetM_5_for* und *5_delt_1923_for2*. Es wurden jeweils 6 Klone getestet und aufgetragen (Spuren 3-8). Als Negativkontrolle wurde der Wildtyp 1457 ebenfalls aufgetragen (Spur 2). Der Größenstandard wurde auf Spur 1 aufgetragen.

4.1.2.1 Untersuchung der Klonalität von *S. epidermidis* 1457, 1585 und den abgeleiteten SE1923- und SE1923-SE1920-Knockout-Mutanten mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

Nach erfolgreicher Etablierung der Knockouts $\Delta 1923$ und $\Delta 1923-1920$ in *S. epidermidis* 1457 und 1585 wurde vor Beginn phänotypischer Tests mittels einer Pulsfeld-Gelelektrophorese (**Abbildung 11**) dargelegt, dass es sich bei den generierten Mutanten um isogene Mutanten handelt. Anhand des Bandenmusters ist eine Zuordnung zu den Stämmen *S. epidermidis* 1457 und 1585 möglich.

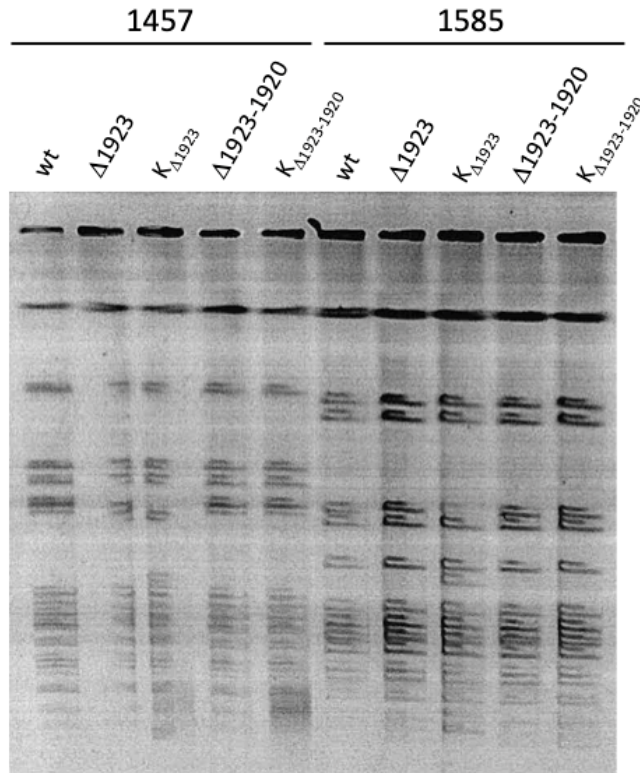


Abbildung 11: Pulsfeld-Gelelektrophorese von *S. epidermidis* 1457 (Spur 1-5) und 1585 (Spur 6-10). Aufgeführt sind die Wildtypen mit jeweiligen *SE1923*- und *SE1923-SE1920*-Mutanten sowie deren Komplementation (K). Als Restriktionsenzym wurde *SmaI* verwendet. Aufgrund mangelnder Gelkapazität wurde kein molekularer Größenstandard aufgetragen.

4.1.3 Phänotypische Analyse von *S. epidermidis* 1457, 1585 sowie abgeleiteten *SE1923*- und *SE1923-SE1920*-Mutanten

4.1.3.1 Untersuchung des Resistenzprofils mittels Gradiententest

Zur phänotypischen Charakterisierung der generierten *SE1923*- und *SE1923-SE1920*-Mutanten wurden standardisierte E-Tests durchgeführt. Dabei wurde die MHK der Antibiotika Erythromycin, Oxacillin, Daptomycin, Vancomycin und Ciprofloxacin für *S. epidermidis* 1457 (**Tabelle 16**) und 1585 (**Tabelle 17**) mit den jeweiligen Knockout-Mutanten ($\Delta 1923$ und $\Delta 1923-1920$) und den jeweiligen Komplementanten ($K_{\Delta 1923}$ und $K_{\Delta 1923-1920}$) verglichen. In den zu 1457 gehörigen *SE1923*- und *SE1923-SE1920*-Mutanten zeigte sich für den Wirkstoff Daptomycin eine deutlich veränderte MHK. Diese Beobachtung ließ sich ebenfalls für *S. epidermidis* 1585 machen. Weitere, getestete Antibiotika ergaben keine nennenswerten Unterschiede.

Tabelle 16: Auswertung der minimalen Hemmkonzentrationen [$\mu\text{g/ml}$] für *S. epidermidis* 1457 sowie abgeleiteten *SE1923*- und *SE1923-SE1920*-Mutanten

	<i>wt</i>	$\Delta 1923$	$K_{\Delta 1923}$	$\Delta 1923-1920$	$K_{\Delta 1923-1920}$
Erythromycin	0,125	0,125	0,19	0,125	0,25
Oxacillin	0,125	0,125	0,19	0,19	0,19
Daptomycin	0,064	4	1	6	1
Vancomycin	2	1,5	1,5	2	2
Ciprofloxacin	0,125	0,064	0,094	0,125	0,094

Tabelle 17: Auswertung der minimalen Hemmkonzentrationen [$\mu\text{g/ml}$] für *S. epidermidis* 1585 sowie abgeleiteten *SE1923*- und *SE1923-SE1920*-Mutanten

	<i>wt</i>	$\Delta 1923$	$K_{\Delta 1923}$	$\Delta 1923-1920$	$K_{\Delta 1923-1920}$
Erythromycin	0,19	0,125	0,125	0,125	0,125
Oxacillin	1	1	0,75	2	1
Daptomycin	1,5	6	8	8	6
Vancomycin	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Ciprofloxacin	0,19	0,094	0,125	0,094	0,094

4.1.3.2 Untersuchung der Fähigkeit zur Biofilmbildung

Um den Effekt des Knockouts von *SE1923* und *SE1923-SE1920* auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung zu untersuchen, wurde die Biofilmbildung der *S. epidermidis* Wildtypen 1457 und 1585 mit den *SE1923*- und *SE1923-SE1920*-Mutanten in Biofilm-Tests verglichen. Untersucht wurde die Biofilmbildung in TSB sowie in 70%-Ziegen Serum (**Abbildung 12**). Die in TSB Biofilm-negative, isogene *S. epidermidis* Mutante 1457-M10 wurde als Negativkontrolle aufgeführt. Es zeigte sich, dass $1457\Delta 1923$ und $1457\Delta 1923-1920$ in TSB einen starken Biofilm bildeten, vergleichbar mit dem des Wildtyps. Die Zugabe von 70%-Ziegen Serum führte in 1457-M10 zu einer geringfügigen Biofilmbildung. Zwischen dem Wildtyp und den Knockout-Mutanten $1457\Delta 1923$ und $1457\Delta 1923-1920$ zeigte sich durch die Zugabe von Serum kein Unterschied in der Biofilmbildung.

Bei *S. epidermidis* 1585 bildete keine der getesteten Mutanten in TSB einen Biofilm, entsprechend dem Wildtyp. Die Zugabe von 70%-Ziegen Serum führte in 1585 zur Biofilmbildung. Auch hier war unter den getesteten Bedingungen zwischen Wildtyp und beiden Mutanten kein Unterschied erkennbar.

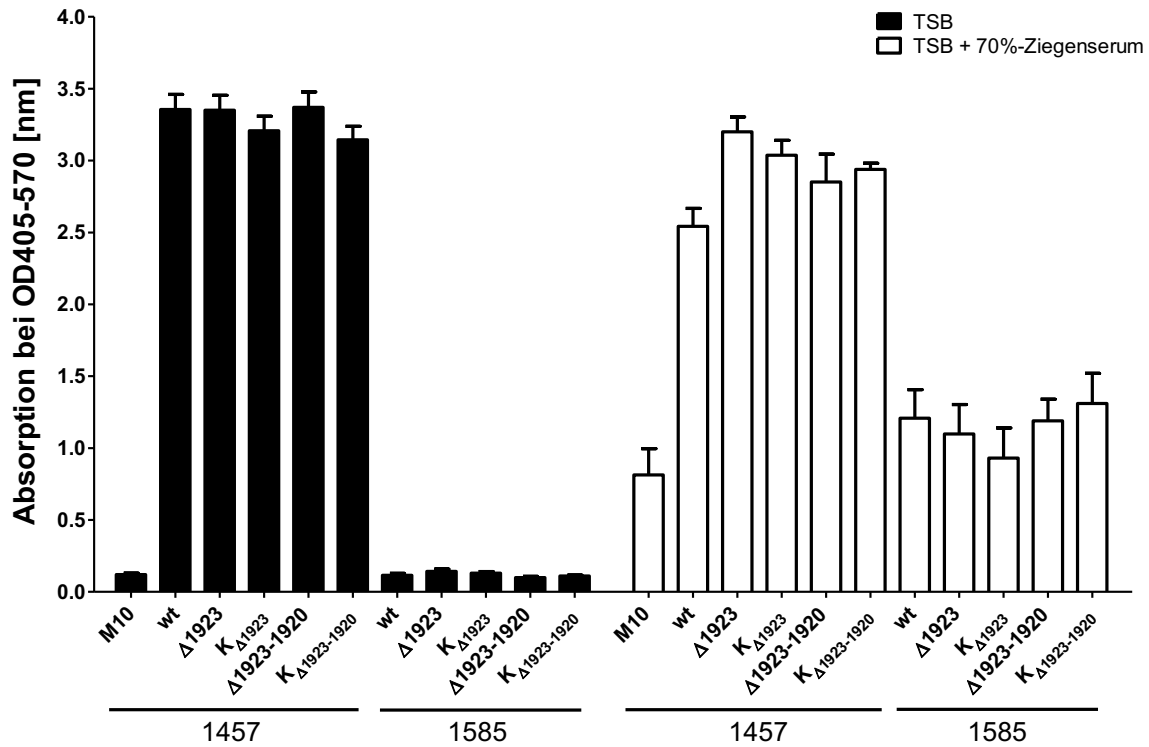


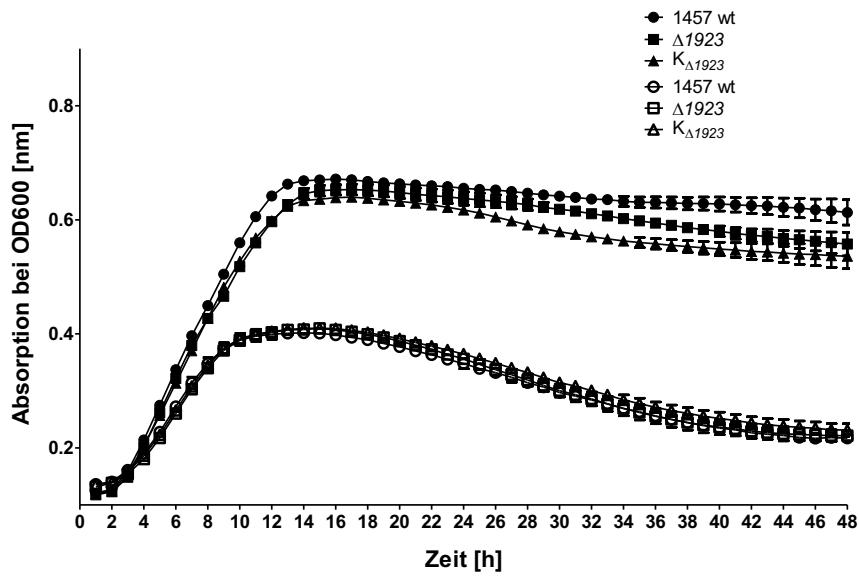
Abbildung 12: Biofilm-Test mit Wachstum in TSB und in 70%-Ziegenerum über 20 Stunden bei 37 °C. Aufgeführt sind 1457-M10 (Negativkontrolle), die Wildtypen 1457 und 1585 (Positivkontrollen), die Knockout-Mutanten $\Delta 1923$ und $\Delta 1923-1920$ sowie die korrespondierenden Komplementanten (K). Für den Versuch liegen jeweils acht technische Replikate vor. Abgebildet ist der Mittelwert mit entsprechendem Standardfehler.

Es lässt sich also schlussfolgern, dass der Knockout von *SE1923* beziehungsweise *SE1923-SE1920* in den getesteten Zuständen TSB und 70%-Ziegenerum keinen Einfluss auf die Biofilmbildung zu haben scheint. Dies konnte für *S. epidermidis* 1457 und 1585 gezeigt werden.

4.1.3.3 Untersuchung des Wachstumsverhalten

Um einen möglichen Einfluss des Knockouts von *SE1923* beziehungsweise *SE1923-SE1920* auf das bakterielle Wachstum bei statischer Inkubation von *S. epidermidis* darzustellen, wurde in dieser Arbeit Wachstumskurven entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise angefertigt. Sowohl in TSB als auch unter Zugabe von 70%-Ziegenerum zeigte sich kein erkennbarer Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *SE1923*-Mutante (**Abbildung 13**) beziehungsweise der *SE1923-SE1920*-Mutante (**Abbildung 14**) in Bezug auf die Wachstumskinetik. Dies lässt sich in den beiden genetischen Hintergründen 1457 und 1585 beobachten.

A



B

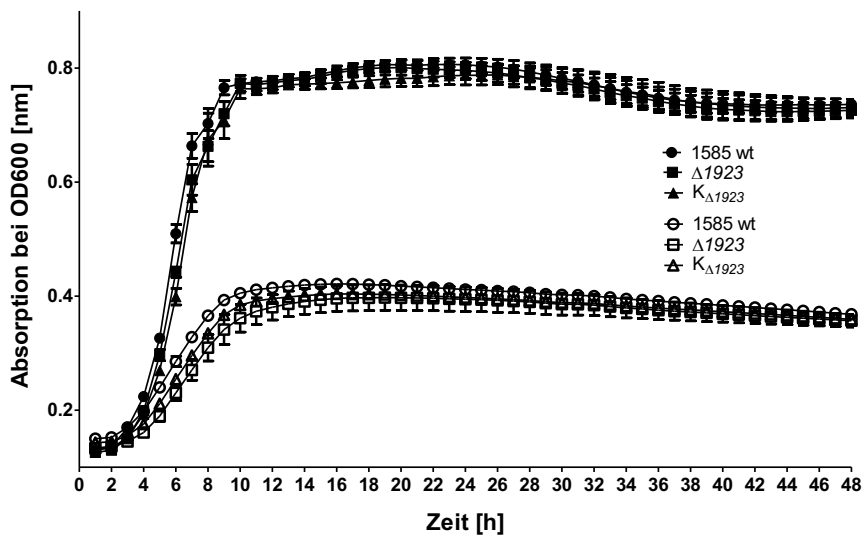
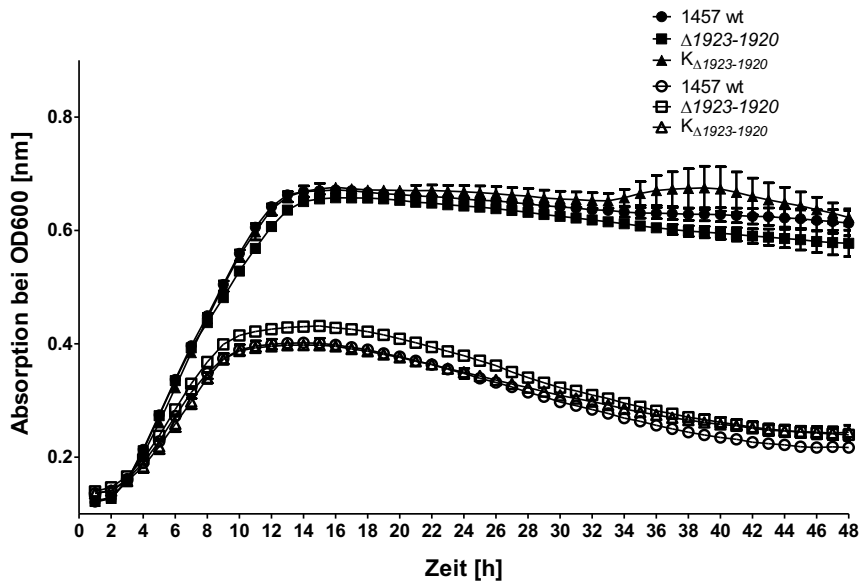


Abbildung 13: Wachstumsverhalten des Wildtyps 1457 (A) und 1585 (B) im Vergleich zur *SE1923*-Mutante und Komplementante ($K_{\Delta 1923}$) in TSB (ausgefüllte Symbole) und 70%-Zieglerserum (leere Symbole) bei statischer Inkubation, bei 37 °C, über 48 Stunden. Stündliche photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm. Für jeden abgebildeten Mittelwert mit entsprechendem Standardfehler liegen jeweils vier Messwerte vor.

A



B

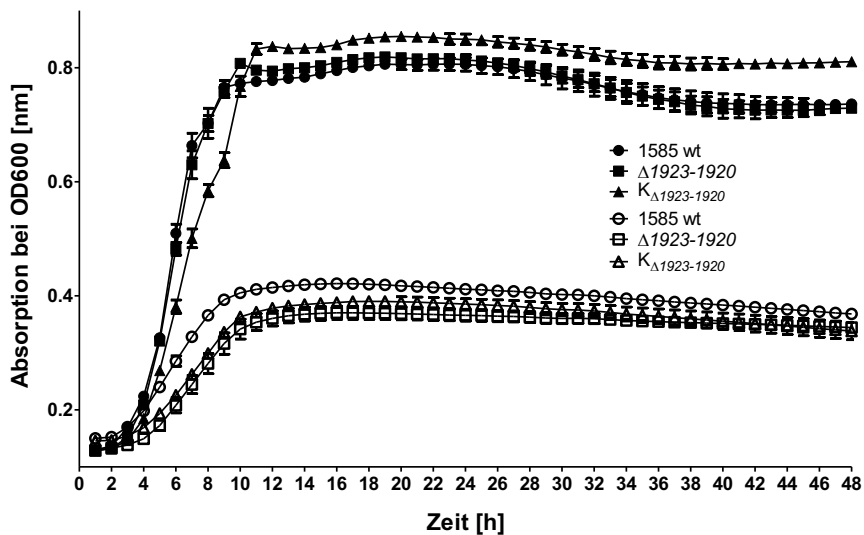


Abbildung 14: Wachstumsverhalten des Wildtyps 1457 (A) und 1585 (B) im Vergleich zur *SE1923-SE1920*-Mutante und Komplementante ($K_{\Delta 1923-1920}$) in TSB (ausgefüllte Symbole) und 70%-Ziegenserum (leere Symbole) bei statischer Inkubation, bei 37 °C, über 48 Stunden. Stündliche photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm. Für jeden abgebildeten Mittelwert mit entsprechendem Standardfehler liegen jeweils vier Messwerte vor.

4.2 Analyse des *S. epidermidis* ABC-Transporters *SE1621-SE1624* (*pmt*-Homolog *pmtH*)

4.2.1 Verifikation der Knockout-Mutante $\Delta pmtH$

Zur Verifikation der erfolgreichen Integration der *tet(M)*-Kassette in das bakterielle Chromosom und Elimination des Plasmides-*backbones* inklusive des *Gene of interest* wurden

die Übergänge aus dem Chromosom in die *tet(M)*-Kassette zu beiden Seiten mittels PCR amplifiziert (**Abbildung 15**). Darüber hinaus wurden die Amplifikate durch Sequenzierung überprüft. Nach Verifikation des Knockouts erfolgte die erneute Transduktion in die Stämme 1457, 1585 und 1457 Δ *agr* durch Verwendung des Phagen ϕ A6C. Auch hier wurde das Ergebnis auf dieselbe Weise überprüft.

Den allelen Genaustausch in der isogenen Mutante *S. epidermidis* 1457 Δ *agr* durchzuführen, wurde bewusst gewählt, da im Vorwege vermutet wurde, dass ein Knockout des ABC-Transporters zu einer Akkumulation der PSM und ferner zu einem Zelluntergang führen könnte, wie es bereits in *S. aureus* beschrieben wurde (Chatterjee et al. 2013). Die Mutante 1457 Δ *agr* bildet keine PSM (Vuong et al. 2004a). Mit erfolgreicher Etablierung des Knockouts und unauffälliger Wachstumskinetik (**Abbildung 20**) konnte diese Beobachtung für die Stämme *S. epidermidis* 1457 und 1585 hier nicht beobachtet werden.

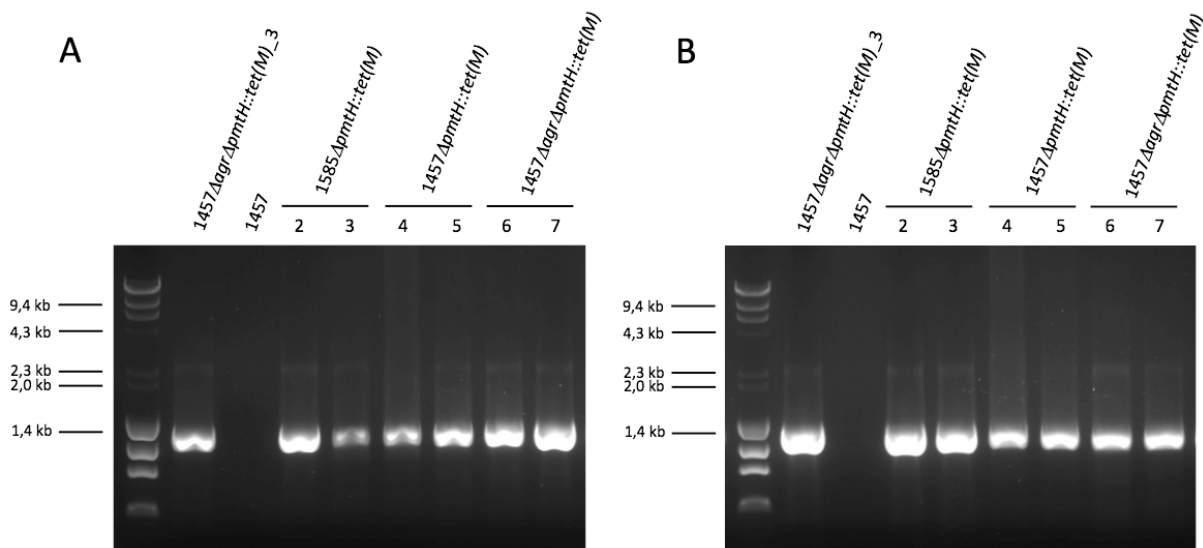


Abbildung 15: PCR der Übergänge des Chromosoms in die *tet(M)*-Kassette. (A) Übergang am 3'-Ende mit den Primern *tetM_3_for* und *5_delta_ABC_rev*. (B) Übergang am 5'-Ende mit den Primern *tetM_5_for* und *3_delta_ABC_for*. Nach Transduktion des Knockouts in die Wildtypen wurden zur Überprüfung pro Stamm jeweils 2 Klone getestet und aufgetragen. 1585 (Spuren 4 und 5), 1457 (Spuren 6 und 7), 1457 Δ *agr* (Spuren 8 und 9). Als Positivkontrolle wurde die Knockout-Mutante 1457 Δ *agr* Δ *pmtH*::*tet(M)* eingesetzt, in welcher der allele Genaustausch vollendet wurde. Als Negativkontrolle wurde der Wildtyp 1457 aufgetragen (Spur 3). Der Größenstandard wurde auf Spur 1 aufgetragen.

4.2.2 Phänotypische Analyse von *S. epidermidis* 1457, 1585 sowie abgeleiteten SE1621-SE1624 (*pmtH*)-Mutanten

4.2.2.1 Untersuchung des Resistenzprofils mittels Gradiententest

Zu Beginn der phänotypischen Charakterisierung stellte sich die Frage, ob der in dieser Arbeit generierte Knockout des ABC-Transporters Pmt_H einen Einfluss auf die MHK der Antibiotika Erythromycin, Oxacillin, Daptomycin, Vancomycin und Ciprofloxacin hat. Bei Betrachtung der ermittelten Werte (**Tabelle 18**) zeigte sich ein deutlicher Anstieg der MHK für Erythromycin nach Einbringung des Plasmides pHB3::P_{xyI}*pmtH*, welches eine Erythromycin-Resistenz enthält und im Rahmen der Komplementation in den *pmtH*-Knockout transduziert wurde. Die hohe MHK (>256 µg/ml) weist auf die Anwesenheit des Plasmides hin. Für den Wirkstoff Daptomycin zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp ein Anstieg der MHK für die jeweilige Pmt_H-Mutante und die Komplementante (K_{Δ*pmtH*}). Dies ist für beide Stämme 1457 und 1585 zu beobachten. Für die weiteren, getesteten Antibiotika ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede.

Tabelle 18: Auswertung der minimalen Hemmkonzentrationen [µg/ml] für *S. epidermidis* 1457, 1585, 1457Δ*agr* sowie abgeleiteter Pmt_H-Mutante

	1457 <i>wt</i>	Δ <i>pmtH</i>	K _{Δ<i>pmtH</i>}	1585 <i>wt</i>	Δ <i>pmtH</i>	K _{Δ<i>pmtH</i>}	1457 Δ <i>agr</i> Δ <i>pmtH</i>	K _{Δ<i>pmtH</i>}
Erythromycin	0,125	0,19	>256	0,25	0,25	>256	0,25	>256
Oxacillin	0,125	0,064	0,125	1	1	0,75	0,125	0,125
Daptomycin	0,064	12	8	1,5	12	12	12	12
Vancomycin	2	2	2	1,5	1,5	1,5	3	2
Ciprofloxacin	0,125	0,094	0,125	0,19	0,125	0,125	0,125	0,125

4.2.2.2 Untersuchung der Fähigkeit zur Biofilmbildung

Da das Komplementations-Plasmid pHB3::P_{xyI}*pmtH* einen Xylose-induzierbaren Promotor enthält, wurde zu Beginn die Biofilmbildung in TSB mit der in 4%-Xylose verglichen (**Abbildung 16**). Auffällig war, dass der Knockout *S. epidermidis* 1457Δ*pmtH* im Vergleich zum Wildtyp in TSB hier nahezu keinen Biofilm mehr bildete. Aus der kräftigen Biofilmbildung der Komplementante in TSB lässt sich schlussfolgern, dass die Hintergrundaktivität des Xylose-induzierbaren Promotors bereits ausreicht, den ursprünglichen, Biofilm-positiven Phänotyp vollständig wiederherzustellen.

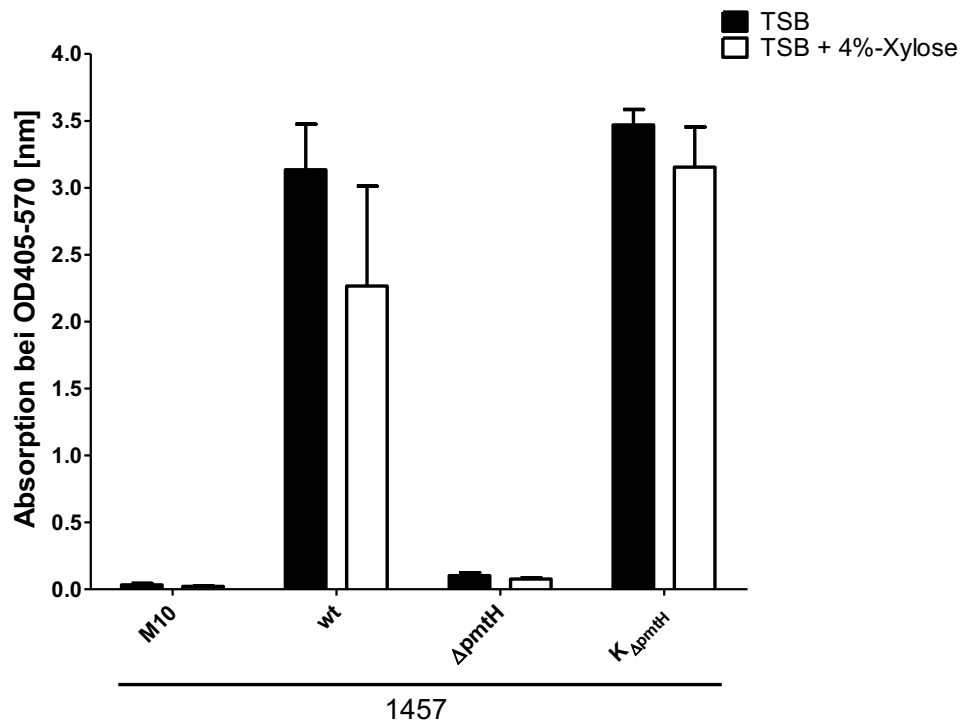


Abbildung 16: Biofilm-Test mit Wachstum in TSB sowie 4%-Xylose über 20 Stunden bei 37 °C. Aufgeführt sind der Stamm 1457-M10 (Negativkontrolle), der Wildtyp von 1457 (Positivkontrolle), die *pmtH*-Mutante sowie die korrespondierende Komplementante ($K_{\Delta pmtH}$). Für den Versuch liegen jeweils 12 technische Replikate vor. Abgebildet ist der Mittelwert mit entsprechendem Standardfehler.

So konnte im ersten Schritt gezeigt werden, dass der Knockout des ABC-Transporter Pmt_H in TSB zu einer massiven Reduktion der Biofilmbildung mit konsekutiv Biofilm-negativem Phänotyp führt. Zudem konnte die Wiederherstellung der Biofilmbildung durch Einbringen des Komplementations-Plasmides $pHB3::P_{xy}pmtH$ gezeigt werden. Anschließend sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich dieser Effekt unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen, also durch Zugabe von Ziegenserum, ebenfalls beobachten lässt (**Abbildung 17**).

In TSB zeigte der Wildtyp von 1457 eine ausgeprägte Biofilmbildung. Der zuvor beobachtete Biofilm-negative Phänotyp der *pmtH*-Mutante von 1457 in TSB (**Abbildung 16**) war in diesem Versuch reproduzierbar. Durch die Komplementation ließ sich der Biofilm-positive Phänotyp des Wildtyps in TSB wiederherstellen. In 70%-Ziegenserum zeigte die *pmtH*-Mutante von 1457 einen Biofilm-positiven Phänotyp ähnlich dem des Wildtyps. Die Komplementation zeigte eine stärkere Biofilmbildung als der Wildtyp 1457.

Es ließ sich also die Erkenntnis gewinnen, dass der ABC-Transporter Pmt_H einen wichtigen Teil zu der Biofilmbildung des Stammes *S. epidermidis* 1457 in TSB beiträgt und ein Knockout zu einem Biofilm-negativen Phänotyp in TSB führt. In Anwesenheit von Ziegenserum ließ sich diese Beobachtung für diesen Stamm nicht machen.

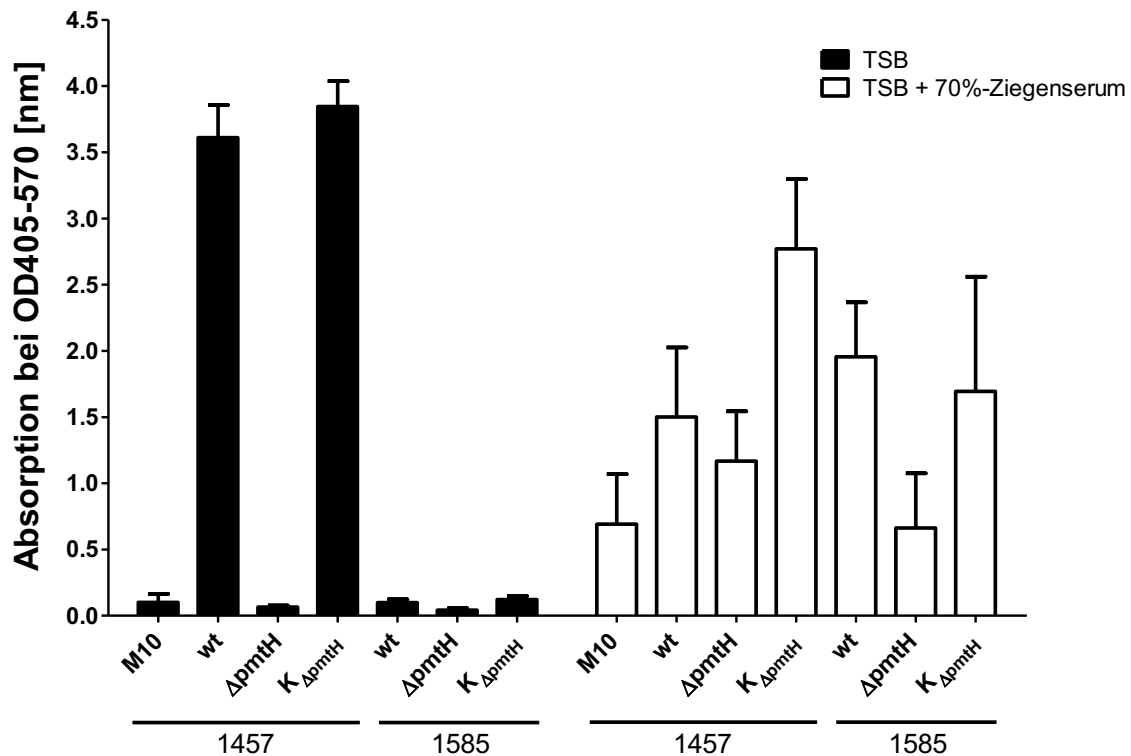


Abbildung 17: Biofilm-Test mit Wachstum in TSB sowie in 70%-Ziegenserum über 20 Stunden bei 37 °C. Aufgeführt sind der Stamm 1457-M10 (Negativkontrolle), sowie die Wildtypen 1457 und 1585 (Positivkontrollen), die jeweilige *pmtH*-Mutante sowie die korrespondierende Komplementante ($K_{\Delta pmtH}$). Für den Versuch liegen jeweils zwölf technische Replikate vor. Abgebildet ist der Mittelwert mit entsprechendem Standardfehler.

Bei *S. epidermidis* 1585 wiesen sowohl Wildtyp als auch die *pmtH*-Mutante in TSB einen Biofilm-negativen Phänotyp auf. Gegenüber dem Wildtyp, in welchem sich durch die Zugabe von Ziegenserum eine Biofilmbildung induzieren ließ (Christner et al. 2010), zeigte die *pmtH*-Mutante in Anwesenheit von Ziegenserum eine abgeschwächte Biofilmbildung. So konnte an dieser Stelle gezeigt werden, dass der *pmtH*-Knockout in 1585, anders als in 1457, die Biofilmbildung in Anwesenheit von Ziegenserum zu beeinflussen scheint.

Zudem wurde der Effekt des *pmtH*-Knockouts auf die Biofilmbildung in TSB und in 70%-Ziegenserum in einem *agr*-negativen Hintergrund untersucht. Interessanterweise zeigte sich hier zwischen dem Wildtyp von *S. epidermidis* 1457, $1457\Delta agr$ und der *pmtH*-Mutante von $1457\Delta agr$ kein Unterschied bezüglich der Biofilmbildung sowohl in TSB als auch in Ziegenserum (**Abbildung 18**).

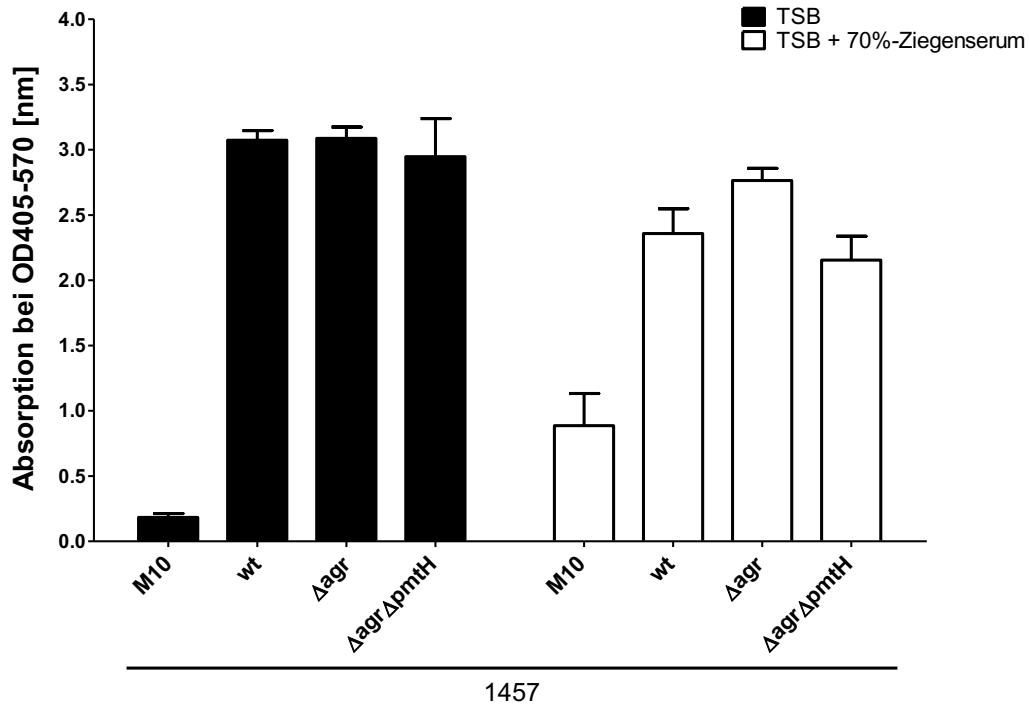
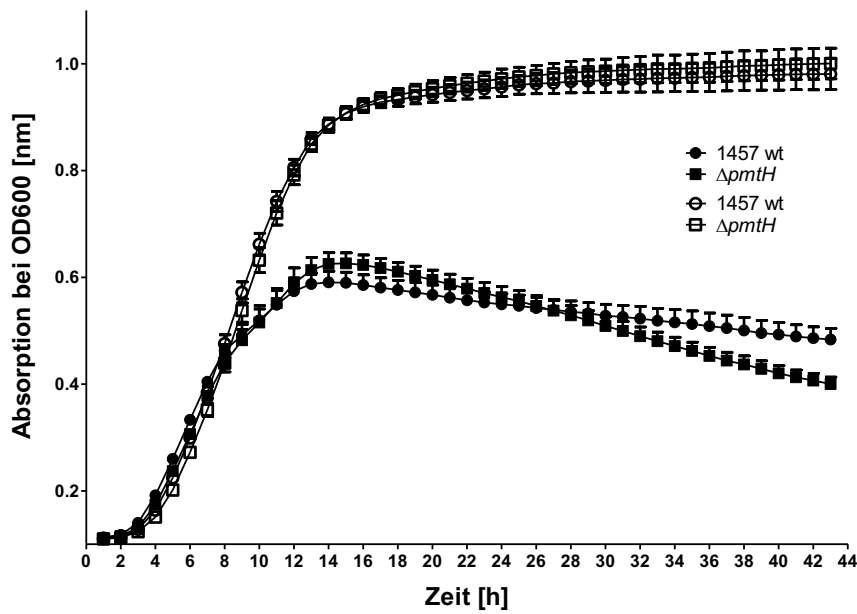


Abbildung 18: Biofilm-Test mit Wachstum in TSB sowie in 70%-Ziegenserum über 20 Stunden bei 37 °C. Als Kontrollen sind der Stamm 1457-M10 (Negativkontrolle) sowie der 1457 Wildtyp (Positivkontrolle) aufgeführt. Verglichen wird die Biofilmbildung der Mutante 1457 Δ agr mit der generierten Knockout-Mutante 1457 Δ agr Δ pmtH. Für den Versuch liegen jeweils acht technische Replikate vor. Abgebildet ist der Mittelwert mit entsprechendem Standardfehler.

4.2.2.3 Untersuchung des Wachstumsverhalten

Zur weiteren Charakterisierung der *pmtH*-Mutanten wurde der Einfluss des Knockouts auf das Wachstumsverhalten von *S. epidermidis* 1457 und 1585 bei statischer Inkubation entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise untersucht. Der **Abbildung 19, Teil A** gemäß gleichen sich der Wildtyp 1457 und die Knockout-Mutante 1457 Δ pmtH in ihrem Wachstumsverhalten sowohl in TSB als auch unter 4%-Natriumchlorid (osmotischer Stress). Ab etwa 8 Stunden zeigten sich zwischen den beiden Medien Unterschiede hinsichtlich der bakteriellen Wachstumskinetik. In TSB nahm die Steigung fortan ab, bis zu einem Wendepunkt bei 14 Stunden. Von dort nahm die Wachstumskurve einen negativen Verlauf. Fraglich ist, ob die abnehmende Dichte auf einen Untergang von Zellen oder möglicherweise auf die Bildung von Zellaggregationen zurückzuführen ist. Dieses Phänomen lässt sich für das Wachstum in 4%-Natriumchlorid nicht beobachten. Entsprechend **Abbildung 19, Teil B** zeigten sich für *S. epidermidis* 1585 ebenfalls sehr geringere Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *pmtH*-Mutante bezüglich des Wachstumsverhaltens in TSB und in 4%-Natriumchlorid. Ab etwa 10 Stunden wurde hier die Plateauphase erreicht.

A



B

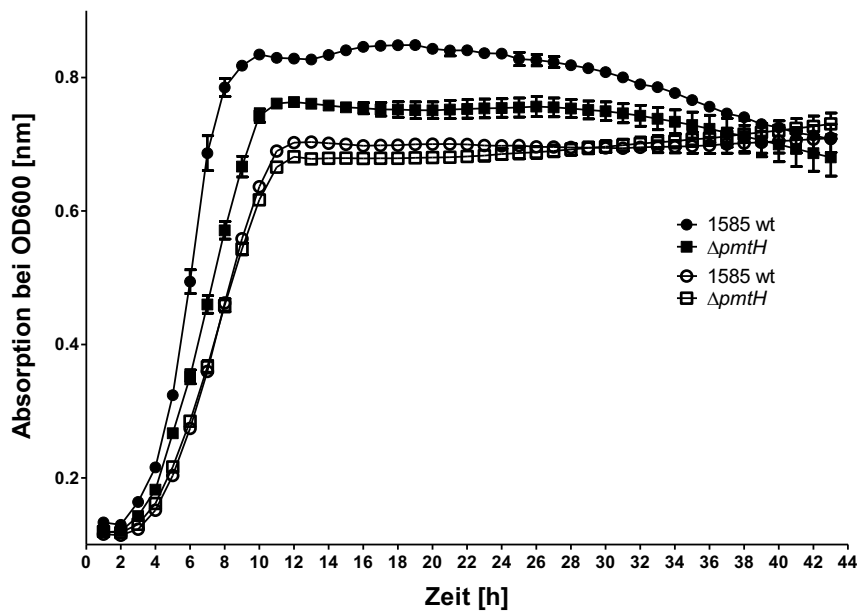


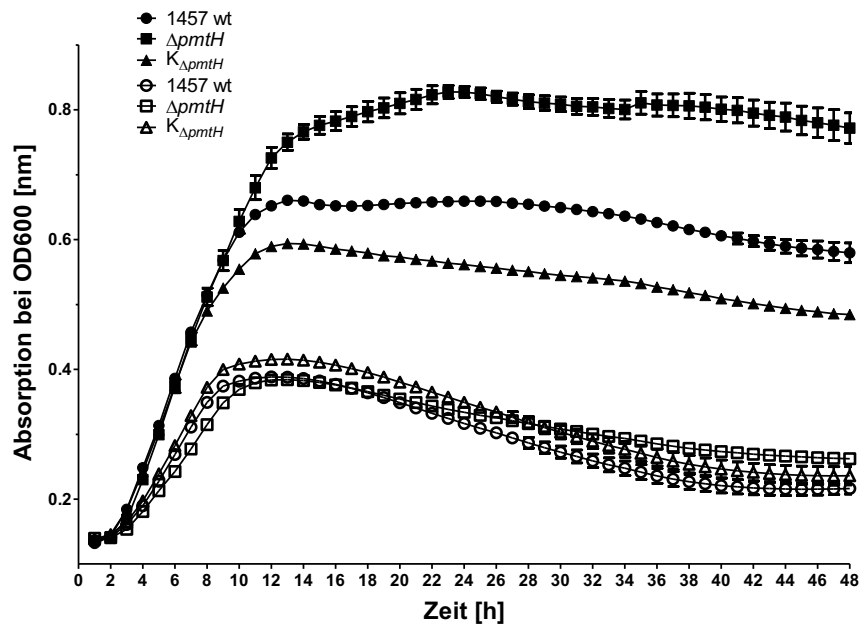
Abbildung 19: Wachstumsverhalten des Wildtyps 1457 (A) und 1585 (B) im Vergleich zur Knockout-Mutante $\Delta pmtH$ in TSB (ausgefüllte Symbole) und 4%-Natriumchlorid (leere Symbole) bei statischer Inkubation, bei 37 °C, über 44 Stunden. Stündliche photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm. Für jeden abgebildeten Mittelwert mit entsprechendem Standardfehler liegen jeweils vier Messwerte vor.

Insgesamt gleicht das Wachstumsverhalten der *pmtH*-Mutante sowohl in TSB als auch in 4%-Natriumchlorid dem des Wildtyps. Es ist kein Wachstumsdefekt zu beobachten. Dies gilt für beide getesteten Stämme.

Auch in **Abbildung 20**, welche das Wachstum in TSB und in 70%-Ziegenserum darstellt, ähneln sich der Wildtyp von *S. epidermidis* 1457, die Knockout-Mutante 1457 $\Delta pmtH$ und die Komplementante ($K_{\Delta pmtH}$) stark in ihrem Wachstumsverhalten (**Abbildung 20, Teil A**).

Gleiches lässt sich für den Stamm *S. epidermidis* 1585 beobachten (Abbildung 20, Teil B). Insgesamt ergaben sich innerhalb der getesteten Zustände keine nennenswerten Unterschiede.

A



B

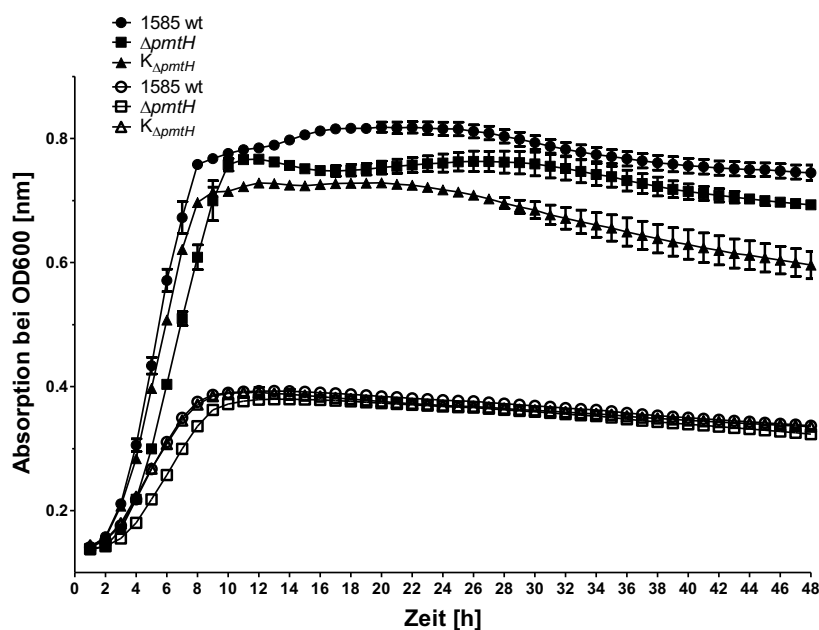


Abbildung 20: Wachstumsverhalten des Wildtyps 1457 (A) und 1585 (B) im Vergleich zur Knockout-Mutante $\Delta pmtH$ und Komplementante in TSB (ausgefüllte Symbole) und 70%-Ziegenserum (leere Symbole) bei statischer Inkubation, bei 37 °C, über 48 Stunden. Stündliche photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm. Für jeden abgebildeten Mittelwert mit entsprechendem Standardfehler liegen jeweils vier Messwerte vor.

4.2.2.4 Untersuchung der Fähigkeit zur Hämolyse

Zur weiteren Charakterisierung der *pmtH*-Mutanten wurde der Einfluss des Knockouts auf die Fähigkeit zur Hämolyse in den Stämmen *S. epidermidis* 1457 und 1585 mit Hilfe von

Hämolyse-Tests (**Abbildung 21**) entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise untersucht. Die isogene Mutante 1457 Δ *agr* wurde aufgrund ihrer fehlenden Produktion von PSM (Vuong et al. 2004a), welche für die Hämolyse verantwortlich gemacht werden (Cheung et al. 2012), als Negativkontrolle verwendet. Die jeweiligen Wildtypen 1457 und 1585 zeigten eine Hämolyse-Aktivität ähnlich der Positivkontrolle. Bei den *pmtH*-Mutanten der Stämme 1457 und 1585 ließ sich keine gesteigerte Absorption gegenüber der Negativkontrolle 1457 Δ *agr* und somit eine aufgehobene Hämolyse erkennen. Durch die Komplementation von 1457 Δ *pmtH* ließ sich die Hämolyse-Aktivität trotz Hinzugabe von 4%-Xylose nicht wiederherstellen. Bei der Komplementation von 1585 Δ *pmtH* war dies der Fall. Hier zeigte sich in 4%-Xylose eine gesteigerte Absorption bei einer Wellenlänge von 541 nm, ähnlich der des Wildtyps.

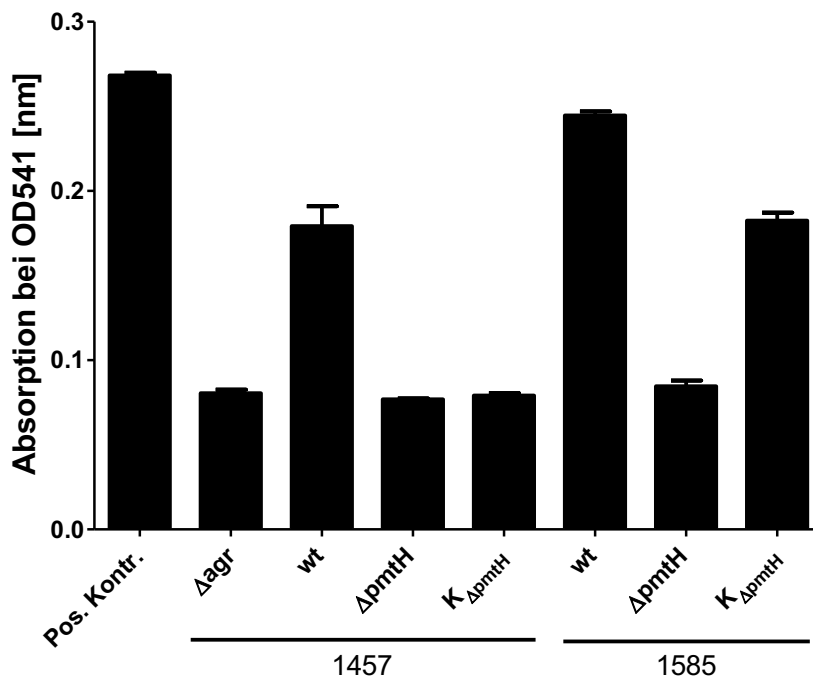


Abbildung 21: Hämolyse-Test nach Über-Nacht-Schüttelkultur in TSB + 4%-Xylose bei 37 °C. Aufgeführt sind die Wildtypen 1457 und 1585, die *pmtH*-negative Mutante und die entsprechende Komplementante (K Δ *pmtH*). Als Positivkontrolle wurde TSB + 1%-Tween verwendet. Als Negativkontrolle diente die isogene Mutante 1457 Δ *agr*, die keine PSM exprimiert (Vuong et al. 2004a). Für jeden abgebildeten Mittelwert mit entsprechendem Standardfehler liegen jeweils drei technische Replikate vor.

5 Diskussion

Fremdmaterial-assoziierte Infektionen stellen eine große Herausforderung für das Gesundheitssystem dar. In diesem Rahmen zählen KoNS zu der am häufigsten isolierten Erregergruppe. Aus dieser Gruppe von Bakterien ist *S. epidermidis* die im klinischen Alltag am häufigsten nachgewiesene Spezies (Spanu et al. 2003, Darouiche 2004). Aufgrund seiner Fähigkeit, Oberflächen implantierter Fremdmaterialien in Form festhaftender Biofilme zu kolonisieren, wird *S. epidermidis* häufig im Zusammenhang mit Fremdmaterial-assoziierten Infektionen nachgewiesen. Bei einem Nachweis des Erregers muss jedoch stets zwischen einer zutreffenden Infektion und einer akzidentellen Kontamination der Probe unterschieden werden (Becker et al. 2014). Über viele Jahre führten der kommensale Charakter des Erregers und die breite Präsenz auf Haut und Schleimhäuten (Kloos und Musselwhite 1975, Kloos und Bannerman 1994, Rogers et al. 2009, Kong et al. 2012) zu der Annahme, dass Nachweise von *S. epidermidis* in klinischen Materialien vor allem als Ausdruck einer Probenkontamination aufzufassen wären. Diese Ansicht hat sich in den vergangenen Jahren zunehmend geändert, wonach *S. epidermidis* heutzutage eine bedeutende Rolle als opportunistischer Erreger und führender Erreger nosokomialer Infektionen zugesprochen wird (Vuong und Otto 2002, Otto 2009). Bemerkenswert ist, dass *S. epidermidis* für die erfolgreiche Etablierung außerhalb seines natürlichen Habitats auf Haut und Schleimhaut und darüber hinaus zur erfolgreichen Etablierung einer Infektion über flexible Mechanismen zur Anpassung an neue ökologische Nischen verfügen muss (Didelot et al. 2016, Heilmann et al. 2019, Schröter und Dersch 2019). Die Existenz adaptiver Prozesse ist seit längerer Zeit bekannt und beschrieben. Jedoch wurden regulative Ereignisse fast ausschließlich unter Anwendung artifizieller Nährmedien untersucht. Es ist daher unklar, inwieweit *in vitro* generierte Erkenntnisse auf eine Situation *in vivo* übertragbar sind (Büttner et al. 2015). Es ist evident, dass gerade Komponenten des Wirtsorganismus nachweislich Einfluss auf die Genexpression von *S. epidermidis* nehmen können (Lai et al. 2007). So konnte beispielhaft gezeigt werden, dass sich in dem sonst unter *in vitro*-Bedingungen Biofilm-negativen Stamm *S. epidermidis* 1585 durch Zugabe von Serum eine Embp-abhängige Biofilmbildung induzieren ließ. Unter artifiziellen Wachstumsbedingungen in TSB wird Embp praktisch nicht exprimiert (Christner et al. 2012, Weiser et al. 2016). Um weitere Gene zu identifizieren, welche in ihrer Expression dem Einfluss von Serum unterliegen, wurde in unveröffentlichten Vorarbeiten (Both und Rohde, unveröffentlichte Daten) die differentielle Genexpression des Stammes *S. epidermidis* 1585 mittels RNA-Seq in Serum im Vergleich zu TSB statistisch ausgewertet. Besonders stark reguliert war das Gen *SEI923*, welches in Anwesenheit von Serum 4,1-fach hochreguliert

wurde. *SE1923* kodiert am ehesten für einen DNA-bindenden transkriptionellen Regulator der PadR-Familie. Weitere Gene, die in der differentiellen Expressionsanalyse auffielen, waren *SE1622* (in Anwesenheit von Serum 1,7-fach stärker exprimiert als in TSB) und *SE1624* (in Anwesenheit von Serum 1,5-fach stärker exprimiert als in TSB). *SE1622* und *SE1624* kodieren am ehesten für einen in *S. epidermidis* bisher unbekanntem ABC-Transporter. Die Hypothese dieser Dissertation war es, dass die genannten Gene am Adaptationsprozess von *S. epidermidis* an Wachstumsbedingungen in Serum funktionell beteiligt sind.

5.1 Einfluss des *PadR-like*-Systems auf den Phänotyp von *S. epidermidis*

Ein Ziel dieser Dissertation war es, das *PadR-like*-System in *S. epidermidis* – bestehend aus den Genen *SE1923* (*PadR-like regulator*), *SE1921* und *SE1920* – funktionell zu charakterisieren und seinen Einfluss auf den Phänotypen von *S. epidermidis* unter sich ändernden Umweltbedingungen zu untersuchen.

Um sich seiner Umwelt erfolgreich anzupassen, verfügt *S. epidermidis* über Regulatoren, von denen einige in der Vergangenheit ausführlich beschrieben worden sind. Hierzu zählen neben weiteren der Regulator SarA (Tormo et al. 2005, Christner et al. 2012) und das Agr-System (Novick und Muir 1999, Vuong et al. 2003). Durch zentrale Regulatoren ist *S. epidermidis* in der Lage, seinen Phänotyp bestmöglich an seine Umgebung anzupassen, um in dieser bestehen zu können (Büttner et al. 2015). So konnte gezeigt werden, dass der entscheidende Virulenzfaktor von *S. epidermidis*, die Biofilmbildung, ebenfalls an Umweltbedingungen angepasst wird (Otto 2014). Wie vorbeschrieben, konnte in dem Stamm *S. epidermidis* 1585 durch Zugabe von Ziegen Serum eine Induktion der Biofilmbildung beobachtet werden (Christner et al. 2010). Die Tatsache, dass der PadR-ähnliche Regulator *SE1923* in Ziegen Serum ebenfalls hochreguliert wird, lässt es, unter Berücksichtigung bekannter Funktion homologer Regulatoren in anderen Mikroorganismen, plausibel erscheinen, dass dieser ebenfalls in Anpassungsvorgängen bei Wachstum und Biofilmbildung in Serum involviert sein könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit Knockout-Mutanten von *SE1923* und *SE1923-SE1920* etabliert.

Um zunächst die Konsequenzen der Inaktivierung auf die Biofilmbildung der Stämme 1457 und 1585 zu untersuchen, wurden Wildtyp-Stämme und korrespondierende Mutanten mittels Biofilm-Tests unter standardisierten Bedingungen untersucht. *S. epidermidis* 1457 bildet einen starken, PIA-abhängigen Biofilm (Mack et al. 2001, Rohde et al. 2010). Sowohl in TSB als auch in Anwesenheit von Ziegen Serum ließen sich zwischen Wildtyp und *SE1923-SE1923-SE1920*-Mutanten keine Unterschiede bezüglich der Biofilmbildung beobachten. Auch der

Vergleich beider Wachstumsbedingungen zeigte keine Unterschiede in der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457.

Der Stamm *S. epidermidis* 1585 ist *icaADBC*-negativ (Rohde et al. 2005) und produziert unter *in vitro*-Bedingungen keinen Biofilm (Christner et al. 2010). So zeigten sich Wildtyp als auch *SE1923-/SE1923-SE1920*-Mutanten in TSB erwartungsgemäß Biofilm-negativ. Die Zugabe von Ziegenserum führte bei *S. epidermidis* 1585 wie vorbeschrieben über eine Hochregulation von *Embp* (Christner et al. 2010) zu einer Induktion der Biofilmbildung und so zu einem Biofilm-positiven Phänotyp. Die Serum-induzierte, *Embp*-abhängige Biofilmbildung des Stammes *S. epidermidis* 1585 scheint durch die Inaktivierung des *PadR-like*-Systems nicht beeinflusst.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Inaktivierung des *PadR-like*-Systems unter den getesteten Bedingungen keinen direkten Einfluss auf die Biofilmbildung der Stämme *S. epidermidis* 1457 und 1585 zu haben scheint. Die bisher getesteten Bedingungen sind sicher nicht umfassend. So könnte sich unter anderen Testbedingungen (anderes Medium, andere Temperatur, osmotischem Stress, statische vs. dynamische Inkubation) ein Effekt auf die Biofilmbildung der Mutanten zeigen.

Darüber hinaus ist die Limitation der Methode selbst zu berücksichtigen. Mit einem Biofilmtest kann über die Beschaffenheit eines Biofilms wenig Aussage getroffen werden. Er gibt ausschließlich Auskunft darüber, dass die Bakterien erfolgreich an der Kunststoff-Platte adhären konnten, da sich nach Waschprozeduren für den Stamm *S. epidermidis* 1457 ein Biofilm nachweisen ließ und liefert anhand der gemessenen Absorption einen Eindruck über die Masse gebildeten Biofilms. Womöglich hat jedoch die Inaktivierung des *PadR-like*-Systems einen Einfluss auf die Architektur/ Qualität des Biofilms, die sich nicht mit Hilfe der gewählten Methode darstellen lässt. Um sich ein genaueres Bild von der Beschaffenheit des Biofilms machen zu können, müssen zukünftig Methoden zur Analyse der Biofilmultrastruktur, zum Beispiel die konfokale Mikroskopie, eingesetzt werden. Eventuell könnte hier eine durch den Knockout von *SE1923-/SE1923-SE1920* hervorgerufene, strukturelle Veränderung der Biofilmmorphologie dargestellt werden.

Ebenfalls muss die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass das *PadR-like*-System in *S. epidermidis* nicht die Biofilmbildung als zentralen Virulenzfaktor beeinflusst. In anderen Gram-positiven Bakterien scheint *PadR* eine Rolle in der Bewältigung bestimmter Stressoren einzunehmen. Zum einen reguliert er in einigen Spezies die Metabolisierung potenziell toxischer Phenolsäuren in weniger toxische Derivate (Barthelmebs et al. 2000, Tran et al. 2008).

Zum anderen wird *padR* in *Lactobacillus plantarum* zusammen mit einem *downstream* gelegenen *open reading frame* (ORF1) transkribiert, dessen Produkt zur Gruppe sogenannter *universal stress proteins* (Usp) gehören könnte (Gury et al. 2004). Somit könnte das System in *S. epidermidis* auch metabolische Anpassungen vermitteln, die es der Spezies unabhängig der Biofilmbildung ermöglicht, sich an ändernden Umweltbedingungen anzupassen.

Bezüglich des bakteriellen Wachstumsverhaltens der *SE1923-/SE1923-SE1920*-Mutanten von *S. epidermidis* 1457 und 1585 konnte beobachtet werden, dass das Wachstum bei statischer Inkubation sowohl in TSB als auch in Anwesenheit von Ziegenserum jeweils dem des Wildtyps gleich. Der lange Zeitraum von 48 Stunden wurde gewählt, um mögliche Effekte, wie etwa einen verstärkten Zelluntergang im Verlauf der Plateauphase darzustellen. Hier waren jedoch keine nennenswerten Unterschiede infolge des Knockouts zu beobachten. Unter den getesteten Bedingungen scheint somit die Inaktivierung des *PadR-like*-Systems das Wachstumsverhalten von *S. epidermidis* 1457 und 1585 nicht zu beeinflussen.

Gleichwohl ist an dieser Stelle anzumerken, dass allein das Wachstum bei statischer Inkubation in TSB und Ziegenserum über einen Zeitraum von 48 Stunden untersucht wurde. Auch hier kann vermutet werden, dass andere Bedingungen durchaus Unterschiede im Wachstumsverhalten der Knockout-Mutanten aufzeigen könnten. Somit könnten in kommenden Arbeiten weitere Wachstumsbedingungen getestet werden. Da der Regulator PadR in Gram-positiven Bakterien die Elimination von (Phenol-)Säuren reguliert (Barthelmebs et al. 2000), wäre es interessant, zu prüfen, welchen Einfluss eine erhöhte Konzentration an (Phenol-) Säuren beziehungsweise ein saurerer pH-Wert auf das Wachstumsverhalten von Mutanten hätte. In anderen Gram-positiven Bakterien konnte gezeigt werden, dass Phenolsäuren *in vitro* über eine Inaktivierung von PadR zu einer Transkription einer Phenolsäure-Decarboxylase führen (Tran et al. 2008).

Dass das *PadR-like*-System in *S. epidermidis* tatsächlich an der Vermittlung von Stresstoleranz beteiligt sein könnte, lässt sich aus der beobachteten Änderung der Daptomycin-MHK in den *SE1923-/SE1923-SE1920*-Mutanten ableiten. Die unmittelbaren Zusammenhänge sind allerdings nicht geklärt. Insbesondere muss auch diskutiert werden, ob eventuell die genetische Manipulation und die Einbringung der *tet(M)*-Resistenzkassette hierfür kausal verantwortlich sind. Die während des allelen Genaustausches in das Chromosom integrierte und durch Agardiffusionstests funktionell nachgewiesene *tet(M)*-Resistenzkassette (Ergebnis nicht abgebildet) dürfte jedoch nach aktuellem Kenntnisstand keinen Einfluss auf die gestiegene

Daptomycin-MHK der Knockout-Mutanten haben. Daptomycin gehört zu den zyklischen Lipopeptiden und scheint seinen Effekt an der bakteriellen, zytoplasmatischen Membran zu vermitteln, indem es sich in die Zellmembran Gram-positiver Bakterien integriert und eine Porenbildung induziert. In dessen Folge kommt es zu einer Depolarisation der Zelle und so zum Zelltod (Humphries et al. 2013, Zhang et al. 2014, Gómez Casanova et al. 2017). Tetrazykline hingegen binden an bakterielle Ribosomen, verändern deren Konformation und führen hierdurch letztendlich zu einer Unterbrechung der Proteinbiosynthese. Die in dieser Arbeit verwendete *tet(M)*-Resistenzkassette kodiert für ein ribosomales Protektions-Protein, welches nach aktueller Auffassung die primäre, allosterische Bindung des Tetrazyklin an das Ribosom stört und so das Tetrazyklin-Molekül aus dem Ribosom löst. Hierdurch kehrt das Ribosom zu seiner ursprünglichen Konformation zurück und die Proteinbiosynthese wird fortgesetzt (Connell et al. 2003, Roberts 2005). Tetrazyklin und Daptomycin gehören zu unterschiedlichen, antibiotischen Wirkstoffgruppen und entfalten ihre Funktion an unterschiedlichen Orten innerhalb beziehungsweise auf der bakteriellen Zelle. So ist die veränderte MHK für Daptomycin durch das Einbringen der *tet(M)*-Resistenzkassette nicht erklärbar.

Die Gründe für eine Daptomycin-Resistenz in Staphylokokken sind oft divers und nicht vollends verstanden. In Daptomycin-resistenten Isolaten lassen sich häufig Mutationen in solchen Genen nachweisen, welche im Prozess der bakteriellen Zellmembran, der Zellwandsynthese und -modifikation involviert sind (Bayer et al. 2013, Barros et al. 2019). Dies führt häufig zur Anpassung der Ladung der Zelloberfläche und so konsekutiv zu einem Abstoßen der anionisch geladenen Daptomycin-Moleküle (Tran et al. 2015). Als ein konkretes Beispiel lassen sich hier Single-Nukleotid Polymorphismen innerhalb des *Multiple peptide resistance factor (mprF)*-Genes aufführen, welches sich ebenfalls in *S. epidermidis* finden lässt. Dessen Produkt, die Phosphatidylglycerol Lysyltransferase, scheint für die Synthese und die Translokation positiv-geladener Phospholipide auf die Zellmembran verantwortlich zu sein (Bayer et al. 2013).

Die Gene *SE1920* und *SE1921* sind downstream von *SE1923* gelegen und bilden mit diesem eine transkriptionelle Einheit. Die Strukturvorhersage für *SE1920* lässt vermuten, dass es sich dabei um eine Art Tunnelprotein handeln könnte. In der KEGG Datenbank lassen sich in anderen *Staphylococcus spp.* Orthologe dieses hypothetischen Proteins finden, welche als putative Exporter klassifiziert werden (https://www.kegg.jp/ssdb-bin/ssdb_best?org_gene=sep:SE1920, Stand: 28.08.2021). Somit könnte *SE1920* beispielsweise am Stoffaustausch oder an Prozessen an der bakteriellen Zelloberfläche beteiligt sein. Der KEGG-Analyse gemäß werden Orthologe von *SE1921* unter anderem als putative Membranproteine beschrieben

(https://www.kegg.jp/ssdb-bin/ssdb_best?org_gene=sep:SE1921, Stand: 28.08.2021). Beruhend auf diesen Vorhersagen scheinen beide Proteine, sowohl SE1920 als auch SE1921 an der bakteriellen Zelloberfläche lokalisiert zu sein. Zusammen mit dem PadR-ähnlichen Regulator könnten sie ein Transportsystem in *S. epidermidis* bilden, welches am Stoffaustausch an der bakteriellen Zelloberfläche beteiligt ist und dessen Inaktivierung, wie oben dargestellt, über eine Veränderung der Ladung der Zelloberfläche zu einer veränderten Daptomycin-MHK beitragen könnte. Diese Annahme wird durch die Kenntnis weiterer Vertreter der PadR-Familie in *Listeria monocytogenes* gestützt. In dieser Spezies lassen sich vier PadR-ähnliche Repressoren finden: LftR, LadR, LstR und Lmo0599/LltR (Hauf et al. 2019). LftR (*listerial protein facilitating invasion/transcriptional regulator*) reguliert unter anderem die Expression des *lieAB*-Operons, welches für antibiotische Efflux-Pumpen kodiert (Kaval et al. 2015). LadR reguliert die Expression der *multidrug-resistance Pump* MdrL (Huillet et al. 2006). LstR (*lineage-specific thermal regulator*) trägt zur Hitzeresistenz der Spezies bei (Zhang et al. 2005). Bezüglich Lmo0599 konnte gezeigt werden, dass dieser am ehesten die Expression der hypothetischen Membranproteine lmo0600 und lmo0601 reguliert. Lmo0599-Mutanten zeigten ein auffälliges Wachstumsverhalten unter Kühlschrank-Temperaturen, weshalb durch die Autoren eine Umbenennung in LltR (*listerial low temperature regulator*) gefordert wurde (Hauf et al. 2019).

Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass Regulatoren der PadR-Familie maßgeblich an der Interaktion des Bakteriums mit seiner Umwelt beteiligt sind und ein möglichst optimales Bestehen unter bestimmten Umweltfaktoren sicherstellen. So ist dies auch für den untersuchten PadR-ähnlichen Regulator in der Spezies *S. epidermidis* anzunehmen. Die benachbarten Gene *SE1921* sowie *SE1920* kodieren allem Anschein nach für hypothetische Membranproteine. Eine mögliche Bezeichnung für *SE1921* wäre demnach MapA (Membran assoziiertes Protein A). Analog wäre dann *SE1920* als MapB (Membran assoziiertes Protein B) zu beschreiben.

5.2 Einfluss des Knockouts von *SE1621-SE1624 (pmtH)* auf den Phänotyp von *S. epidermidis*

Bezüglich des in der Spezies *S. aureus* beschriebenen ABC-Transporters Pmt lassen sich stark homologe Sequenzen in weiteren *Staphylococcus spp.* finden (Chatterjee et al. 2013). Die in der RNA-Seq differenziell exprimierten Gene *SE1622* und *SE1624* zeigten sich in Anwesenheit von Ziegenserum hochreguliert (**Tabelle 1**). Sie kodieren in *S. epidermidis* am ehesten für ATP-bindende Einheiten eines ABC-Transporters (*SE1622*: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?sep:SE1622 und *SE1624*: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?sep:SE1624, Stand: 28.08.2020) und sind Teil des Operons *SE1621-SE1624*, dessen Produkt

mutmaßlich ein Homolog des bereits in *S. aureus* beschriebenen ABC-Transporters Pmt darstellt.

Pmt ist verantwortlich für die Sekretion aller PSM-Klassen (Chatterjee et al. 2013), welche in Staphylokokken an einer Reihe von Virulenz-assoziierten Eigenschaften funktionell beteiligt sind (Rautenberg et al. 2011, Cheung et al. 2012). PSM nehmen strukturierenden Einfluss auf die Biofilmbildung (Vuong et al. 2004a, Wang et al. 2011), was auf ihren Surfactant-ähnlichen, amphipathischen Charakter zurückgeführt wird (Yao et al. 2005) und vermitteln darüber hinaus proinflammatorische Effekte, die zur klinischen Ausprägung einer Sepsis beitragen können (Becker et al. 2014). Zudem können PSM neutrophile Granulozyten und Erythrozyten lysieren (Wang et al. 2007, Cheung et al. 2012). Jedoch stellen sie auch eine potenzielle Gefahr für die eigene Zellintegrität dar, wenn es zu einem Ausfall des verantwortlichen Exportsystems kommt. In *S. aureus* führte ein Knockout von Pmt nachweislich zu einer intrazellulären Akkumulation der PSM im Zytosol, was konsekutiv Teilungsdefekte und Schäden an der zytoplasmatischen Membran hervorrief. Daher ließ sich ein Pmt-Knockout lediglich in einem Agr-negativen Hintergrund etablieren (Vuong et al. 2003, Chatterjee et al. 2013). Pmt scheint in *S. aureus* ein essenzielles Exportsystem gegenüber Membran-schädigenden Peptiden und der eigens produzierten PSM darzustellen (Cheung et al. 2018).

Die Tatsache, dass *SE1622* und *SE1624* in Serum verstärkt exprimiert werden, legt die Vermutung nahe, dass *S. epidermidis* unter wechselnden Umweltbedingungen die Expression eines Transporters intensiviert, der durch einen Export von PSM das Virulenzprofil der Spezies maßgeblich beeinflusst. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit Knockout-Mutanten von Pmt_H (*SE1621-SE1624*) generiert.

Um zunächst die Konsequenzen der Inaktivierung auf die Biofilmbildung der Stämme 1457 und 1585 zu untersuchen, wurden Wildtyp-Stämme und korrespondierende Mutanten mittels Biofilm-Tests unter standardisierten Bedingungen untersucht. Hier konnte beobachtet werden, dass sich die Biofilmbildung des Stammes 1457 in TSB durch Inaktivierung von Pmt_H nahezu vollkommen aufheben und durch Komplementation wiederherstellen ließ. In Anwesenheit von Ziegenserum war kein Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout-Mutante erkennbar. Interessanterweise führte der Pmt_H-Knockout in einem Agr-negativen Hintergrund zu keiner Veränderung der Biofilmbildung in TSB. Bezüglich des Stammes 1585, welcher in TSB bekanntermaßen Biofilm-negativ ist (Christner et al. 2010), war durch den Pmt_H-Knockout kein Unterschied in der Biofilmbildung unter dieser Gegebenheit zu erkennen. In Anwesenheit von Serum, war die Embp-abhängige-Biofilmbildung von 1585 (Christner et al. 2010) in der

Mutante leicht herabgesetzt, nicht aber aufgehoben. Durch Komplementation konnte der Effekt aufgehoben werden.

Unter Berücksichtigung der angenommenen Funktion von Pmt_H – dem Export von PSM – scheint eine Inaktivierung des Transportes die Biofilmbildung des Stammes 1457 in TSB derart zu beeinflussen, dass es zur Ausprägung eines Biofilm-negativen Phänotypen kommt. Bezüglich der Frage, ob eine intrazelluläre Akkumulation oder ein extrazelluläres Fehlen der PSM zu einem Biofilm-negativen Phänotyp führt, gilt es zu berücksichtigen, dass die *agr*-Mutante trotz fehlender PSM-Expression (Vuong et al. 2003) einen Biofilm bildet. Somit könnte eine intrazelluläre Akkumulation der PSM im Zytosol aufgrund eines fehlenden Exportes die Biofilmbildung maßgeblich sabotieren. Wie bereits erwähnt, führte die Akkumulation von PSM in *S. aureus* ebenfalls zu phänotypischen Störungen, insbesondere bezüglich des Wachstums (Chatterjee et al. 2013). Jedoch waren in den Pmt_H -Mutanten von *S. epidermidis* bei statischer Inkubation weder in TSB, noch in 4%-Natriumchlorid oder in Anwesenheit von Serum Auffälligkeiten beziehungsweise Unterschiede nachzuvollziehen. Da in dieser Arbeit keine bildliche Darstellung der Zellen beispielhaft mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt wurde, kann bezüglich Knockout-bedingter Zellteilungs- und Membrandefekte, wie in den Pmt -Mutanten in *S. aureus* beschrieben (Chatterjee et al. 2013), für die Pmt_H -Mutanten in *S. epidermidis* keine Aussage getroffen werden.

In *S. aureus* ist Pmt nachweislich für den Export von PSM verantwortlich (Chatterjee et al. 2013), die ihrerseits in der Lage sind, Erythrozyten zu lysieren (Cheung et al. 2012). Aus der Behauptung, Pmt_H in *S. epidermidis* stelle ein Homolog des Transporters Pmt dar, wurde abgeleitet, dass dieser analog für den Transport von PSM mit konsekutiver Hämolyse-Aktivität verantwortlich ist. So wurde in Hämolyse-Tests der Einfluss des *pmtH*-Knockout auf die Hämolyse-Aktivität von *S. epidermidis* 1457 und 1585 untersucht.

Tatsächlich hat die Inaktivierung von Pmt_H in beiden genetischen Hintergründen einen maßgeblichen Einfluss auf die Hämolyse. In beiden Fällen entsprach diese jener der *agr*-Mutante, die aufgrund fehlender Expression von PSM keine Hämolyse-Aktivität aufweist (Vuong et al. 2003). Durch Komplementation ließ sich der ursprüngliche Phänotyp zumindest in *S. epidermidis* 1585 wiederherstellen. Die Komplementante in 1457 blieb dieser Tatsache schuldig.

Die fehlende hämolytische Aktivität, welche in *S. epidermidis* maßgeblich PSM-vermittelt ist (Cheung et al. 2012), belegt indirekt den fehlenden PSM-Export durch eine Inaktivierung von Pmt_H . Dies bekräftigt wiederum die Ausgangshypothese, dass es sich bei Pmt_H um ein Homolog

von Pmt handelt. Andere Gründe für eine eingeschränkte hämolytische Aktivität der Mutanten scheinen unter Berücksichtigung bisheriger Erkenntnisse nicht plausibel.

Warum die hämolytische Aktivität der Mutante in 1457 durch Komplementation nicht wiederherzustellen war, ist aktuell schwierig zu deuten. Der Vermutung, dass die Komplementante möglicherweise ein fehlerhaftes Pmt_H-Molekül oder gar keins exprimiert, steht gegenüber, dass diese durchaus im Stande war, die durch Inaktivierung von Pmt_H vollständig aufgehobene Biofilmbildung in TSB zu sanieren. Auch zeigte sich die Biofilmbildung bereits in TSB ohne Vorhandensein von Xylose wiederhergestellt. Dies spricht für eine dezente Hintergrund-Aktivität des vor *pmtH* gelegenen Xylose-induzierbaren Promotors, die genügt, den ursprünglichen Phänotyp wiederherzustellen.

Da Pmt in *S. aureus* auch für den Export Membran-schädigender Peptide wie beispielhaft AMP (Antimikrobielle Peptide) verantwortlich zu sein scheint (Cheung et al. 2018) und ABC-Transporter in Staphylokokken über ihre Funktion als Effluxpumpen einen Einfluss auf das Resistenzprofil haben können (Otto und Götz 2001, Jang 2016), wurde ebenfalls der Einfluss der Inaktivierung von Pmt_H auf das Resistenzprofil von *S. epidermidis* untersucht.

Hier zeigte sich die erhöhte MHK für Daptomycin sowohl für den Knockout als auch für die Komplementation – wie oben bereits für das *PadR-like*-System diskutiert. Dies erhärtet die Vermutung, dass der Klonierungsprozess per se einen Einfluss auf die Ladung der Zelloberfläche haben könnte. Für die weiteren getesteten Antibiotika ergab sich durch Inaktivierung von Pmt_H keine Auffälligkeiten. Hieraus kann letztlich geschlussfolgert werden, dass sich ein Fehlen des Transporters nicht nachteilig auf das antibiotische Resistenzprofil der Spezies auszuwirken scheint.

Insgesamt lässt sich für den putativen ABC-Transporter Pmt_H festhalten, dass dieser allem Anschein nach für den Transport von PSM verantwortlich ist. Abzuleiten ist dies aus den Versuchen zur Untersuchung der Hämolyse. Aus den Ergebnissen der Biofilmtests konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass die Biofilmbildung von 1457 Δ *pmtH* in TSB durch eine vermutete Akkumulation von PSM in der Zelle gestört sein könnte. Dies macht Pmt_H zu einem beeinflussenden Faktor der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457 unter *in vitro*-Bedingungen. Warum der Effekt des Knockouts auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457 nicht in Anwesenheit von Ziegenserum zu beobachten war, obwohl gezeigt werden konnte, dass mit SE1622 und SE1624 Teile des Transporters in diesem Zustand verstärkt exprimiert werden, ist interessant. So wurde initial erwartet, dass ein Pmt_H-Knockout

insbesondere unter Zugabe von Serum einen veränderten Phänotyp hervorrufen würde. Für *S. epidermidis* 1585, in welchem die ursprünglichen Daten der RNA-Seq in Anwesenheit von Ziegenserum generiert wurden, deutete sich an, dass Pmt_H eine gewisse Rolle in der Biofilmbildung in Serum einnehmen könnte, da sich diese durch den Knockout reduzieren ließ. PSM sind in nahezu allen Staphylokokken zu finden und sind ein entscheidender Virulenzfaktor bei durch Staphylokokken verursachten Infektionen (Rautenberg et al. 2011). Pmt_H scheint hierzu das benötigte Exportsystem für PSM darzustellen, homolog zu Pmt in *S. aureus*, was ihn zu einem wegweisenden Stützpfeiler der Virulenz von *S. epidermidis* machen würde. Diese Annahme muss in kommenden Arbeiten jedoch bestätigt und direkte Folgen des Knockouts für die Zelle untersucht werden. Zu klären wäre beispielsweise, ob es tatsächlich zu einer Akkumulation von PSM innerhalb der Zelle kommt, wenn mit Pmt_H das nötige Exportsystem fehlt und ob dies zu morphologischen Störungen der Zelle führt. Mitunter könnten Teilungs- oder Membrandefekten, wie in der Spezies *S. aureus* beschrieben (Chatterjee et al. 2013), mittels konfokaler Mikroskopie nachvollzogen werden. Darüber hinaus wäre eine bildliche Darstellung der PSM in der Zelle mit Hilfe fluoreszierender Antikörper möglich. Zudem könnte durch Messung der Konzentration im Überstand (Wildtyp vs. Pmt_H-Mutante) nachvollzogen werden, ob es durch den Knockout mit konsekutiv fehlendem Export zu einer Reduktion der PSM im Überstand kommt.

6 Zusammenfassung

Nosokomiale Infektionen stellen eine große Herausforderung für das moderne Gesundheitssystem dar. Als ein entscheidender Risikofaktor erweist sich hierbei die Implantation medizinischen Fremdmaterials. Im Rahmen Fremdmaterial-assoziiertes Infektionen lässt sich meist die Spezies *Staphylococcus epidermidis* in gewonnenen Untersuchungsmaterialien nachweisen. Der Erreger ist in der Lage, sich in einem Biofilm zu organisieren, welcher eine Eradikation durch den Wirt verhindert und eine medizinische Therapie nachhaltig erschwert. Aufgrund seines geringen Virulenzpotentials wurde der Erreger lange Zeit als harmloses, kommensales Hautbakterium eingestuft und eine Infektion als zufälliges, eher nachteiliges Ereignis für die Spezies erachtet. Ein besonderes Augenmerk kommt aktuell dem beachtlichen Anpassungsvermögen von *S. epidermidis* an sich ändernde Umweltbedingungen zu, welches dem Erreger ermöglicht, unter vielfältigen Bedingungen zu bestehen. Die bisher gesammelten Erkenntnisse wurden nahezu vollständig unter künstlichen Bedingungen generiert und es ist ungewiss, inwieweit diese auf lebensnähere Bedingungen übertragbar sind. Vorarbeiten, die zu dieser Arbeit führten, konnten zeigen, dass die Transkription von *S. epidermidis* 1585 in Anwesenheit von Serum maßgeblich beeinflusst wird. Hier zeigten sich die Gene *SE1622* und *SE1624*, die für Teile eines unbeschriebenen, putativen ABC-Transporters kodieren und das unbeschriebene Gen *SE1923*, dessen Produkt am ehesten einen Regulator der PadR-Familie darstellt (*PadR-like regulator*), verstärkt transkribiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass es sich bei dem in dieser Arbeit untersuchten ABC-Transporter Pmt_H um ein Homolog des bereits in *S. aureus* beschriebenen ABC-Transporter Pmt handeln könnte, welcher für einen Export von PSM verantwortlich ist. Ein Knockout führte zu einer Reduktion der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457 in TSB sowie von 1585 in Serum und führte in beiden Stämmen zu einer Inhibition der PSM-vermittelten Hämolyse.

SE1923 (*PadR-like regulator*) bildet mit den beiden eng benachbarten Genen *SE1921* und *SE1920*, welche wiederum beide Zellwand-assoziiert zu sein scheinen, eine transkriptionelle Einheit. Für einen isolierten Knockout von *SE1923* sowie von *SE1923-SE1920* zeigten sich unter den getesteten Umständen (TSB und 70%-Ziegenserum) keine wegweisenden Unterschiede bezüglich des Wachstums und der Biofilmbildung. Eine, im Rahmen der Resistenztestung aller Mutanten aufgefallene, erhöhte MHK für Daptomycin ist am ehesten nicht kausal auf den Knockout zurückführbar. Sie könnte Ausprägung einer veränderten Ladung der Zelloberfläche aufgrund des Klonierungsprozesses sein.

7 Summary

Nosocomial infections represent a major challenge for the modern health system. The implantation of foreign medical material has proven to be a decisive risk factor. In the context of foreign material-associated infections, the species *Staphylococcus epidermidis* can usually be detected in the examination materials obtained. The pathogen is able to organize itself in a biofilm, which prevents eradication by the host and makes medical therapy more difficult. Due to its low virulence potential, the pathogen was classified as a harmless, commensal skin bacterium for a long time and an infection was regarded as a random, rather adverse event for the species. Particular attention is currently paid to the considerable adaptability of *S. epidermidis* to changing environmental conditions, which enables the pathogen to survive under diverse conditions. Almost all of the knowledge gathered so far has been generated under artificial conditions and it is uncertain to what extent these can be transferred to more realistic conditions. Preliminary attempts that led to this work could show that the transcription of *S. epidermidis* strain 1585 is significantly influenced in the presence of serum. The genes *SE1622* and *SE1624*, which code for parts of an undescribed, putative ABC transporter, and the undescribed gene *SE1923*, the product of which is most likely a regulator of the PadR family (PadR-like regulator), were transcribed to an increased extent.

The results of this work indicate that the ABC transporter PmtH could be a homologue of the ABC transporter Pmt already described in *S. aureus*, which is responsible for an export of PSM. A knockout led to a reduction in biofilm formation of *S. epidermidis* strain 1457 in TSB and 1585 in serum and led to an inhibition of PSM-mediated hemolysis in both strains.

SE1923 (PadR-like regulator) forms a transcriptional unit with the two closely adjacent genes *SE1921* and *SE1920*, which in turn both appear to be associated with the cell wall. For an isolated knockout of *SE1923* and *SE1923-SE1920*, there were no significant differences with regard to growth and biofilm formation under the circumstances tested (TSB and 70% goat serum). An increased MIC for daptomycin detected in the resistance testing of all mutants is most likely not causally traceable to the knockout. It could be expression of a changed charge on the cell surface due to the cloning process.

8 Literaturverzeichnis

- Agerberth B, Guðmundsson GH (2006) Host Antimicrobial Defence Peptides in Human Disease. In: Antimicrobial Peptides and Human Disease (Current Topics in Microbiology and Immunology). Shafer WM (Hrg.) Band 306, Springer, Berlin, Heidelberg, 67–90.
- Álvarez-Lerma F et al. (2007) Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en Unidades de Cuidados Intensivos. Informe evolutivo de los años 2003-2005. *Med Intensiva*, 31(1):6–17.
- Andrews J et al. (2000) A comparison of antimicrobial resistance rates in Gram-positive pathogens isolated in the UK from October 1996 to January 1997 and October 1997 to January 1998. *J Antimicrob Chemother*, 45(3):285–293.
- Aranaz-Andrés JM et al. (2008) Incidence of adverse events related to health care in Spain: results of the Spanish National Study of Adverse Events. *J Epidemiol Community Health*, 62(12):1022–1029.
- Arciola CR et al. (2012) Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, 33(26):5967–5982.
- Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L (2018) Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol*, 16(7):397–409.
- Arrecubieta C et al. (2006) The role of Staphylococcus aureus adhesins in the pathogenesis of ventricular assist device-related infections. *J Infect Dis*, 193(8):1109–1119.
- Bae T, Schneewind O (2006) Allelic replacement in Staphylococcus aureus with inducible counter-selection. *Plasmid*, 55(1):58–63.
- Barros EM et al. (2019) Daptomycin Resistance and Tolerance Due to Loss of Function in Staphylococcus aureus dsp1 and asp23. *Antimicrob Agents Chemother*, 63(1): e01542-18.
- Barthelmebs L et al. (2000) Inducible Metabolism of Phenolic Acids in *Pediococcus pentosaceus* Is Encoded by an Autoregulated Operon Which Involves a New Class of Negative Transcriptional Regulator. *J Bacteriol*, 182(23):6724–6731.

- Batzilla CF et al. (2006) Impact of the accessory gene regulatory system (Agr) on extracellular proteins, codY expression and amino acid metabolism in *Staphylococcus epidermidis*. *Proteomics*, 6(12):3602–3613.
- Bayer AS, Schneider T, Sahl H-G (2013) Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall. *Ann N Y Acad Sci*, 1277(1):139–158.
- Becker K, Heilmann C, Peters G (2014) Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, 27(4):870–926.
- Bell T, O’Grady N (2017) Prevention of Central Line-Associated Bloodstream Infections. *Infect Dis Clin North Am*, 31(3):551-559.
- Boles BR, Horswill AR (2008) agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathog*, 4(4):e1000052.
- Both A et al. (2021) Distinct clonal lineages and within-host diversification shape invasive *Staphylococcus epidermidis* populations. *PLoS Pathog*, 17(2):e1009304.
- Brown MM, Horswill AR (2020) *Staphylococcus epidermidis*—Skin friend or foe? *PLoS Pathog*, 16(11):e1009026.
- Brückner R. (1992). A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* 122, 187-192.
- Büttner H et al. (2020) A Giant Extracellular Matrix Binding Protein of *Staphylococcus epidermidis* Binds Surface-Immobilized Fibronectin via a Novel Mechanism. *mBio*, 11(5):e01612-20.
- Büttner H, Mack D, Rohde H (2015) Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol*, 5:14.
- Chatterjee SS et al. (2013) Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system. *Nat Med*, 19(3):364–367.
- Cheung AL, Projan SJ (1994) Cloning and sequencing of sarA of *Staphylococcus aureus*, a gene required for the expression of agr. *J Bacteriol*, 176(13):4168–4172.
- Cheung GYC et al. (2010). *Staphylococcus epidermidis* Strategies to Avoid Killing by Human Neutrophils. *PLoS Pathog* 6(10): e1001133.
- Cheung GYC et al. (2018) Antimicrobial Peptide Resistance Mechanism Contributes to *Staphylococcus aureus* Infection. *J Infect Dis*, 217(7):1153–1159.

- Cheung GYC, Duong AC, Otto M (2012) Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes Infect*, 14(4):380–386.
- Christensen GD et al. (1983) Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*, 18(2):258–269.
- Christner M et al. (2010) The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol Microbiol*, 75(1):187–207.
- Christner M et al. (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(2):394–410.
- Christov LP, Prior BA (1993) Esterases of xylan-degrading microorganisms: Production, properties, and significance. *Enzyme Microb Technol*, 15(6):460–475.
- Cogen AL et al. (2010) Selective Antimicrobial Action Is Provided by Phenol-Soluble Modulins Derived from *Staphylococcus epidermidis*, a Normal Resident of the Skin. *J Invest Dermatol*, 130(1):192–200.
- Conlon BP et al. (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(24):4268–4275.
- Connell SR et al. (2003) Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(12):3675–3681.
- Costerton JW et al. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49:711–745.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418):1318–1322.
- Da F et al. (2017) Phenol-Soluble Modulin Toxins of *Staphylococcus haemolyticus*. *Front Cell Infect Microbiol*, 7:206.
- Darouiche RO (2004) Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. *N Engl J Med*, 350(14):1422–1429.
- Dengler Haunreiter V et al. (2019) In-host evolution of *Staphylococcus epidermidis* in a pacemaker-associated endocarditis resulting in increased antibiotic tolerance. *Nat Commun*, 10(1):1149.

- Didelot X et al. (2016) Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 14(3):150-62.
- Domingo P, Fontanet A (2001) Management of complications associated with totally implantable ports in patients with AIDS. *AIDS Patient Care STDS*, 15(1):7–13.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2018) Rapid risk assessment: Multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. Stockholm, ECDC [Online im Internet.] URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-multidrug-resistant-staphylococcus-epidermidis>. [Stand 28.08.2021, 12:15 Uhr].
- Fitzgerald JR (2007) Targeted Gene Disruption for the Analysis of Virulence of *Staphylococcus aureus*. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol*, 391:103-12.
- Flemming H-C, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8(9):623–633.
- Foster TJ (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol*, 3(12):948–958.
- Frank KL, Hanssen AD, Patel R (2004) *icaA* Is Not a Useful Diagnostic Marker for Prosthetic Joint Infection. *J Clin Microbiol*, 42(10):4846–4849.
- Frebourg NB et al. (2000) PCR-Based Assay for Discrimination between Invasive and Contaminating *Staphylococcus epidermidis* Strains. *J Clin Microbiol*, 38(2):877–880.
- Galac MR, Stam J, Maybank R, Hinkle M, Mack D, Rohde H, Roth AL, Fey, PD (2017). Complete Genome Sequence of *Staphylococcus epidermidis* 1457. *Genome Announc* 5. 10.1128/genomeA.00450-17.
- Geffers C, Sohr D, Gastmeier P (2008) Mortality attributable to hospital-acquired infections among surgical patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 29(12):1167–1170.
- Gómez Casanova N, Siller Ruiz M, Muñoz Bellido J (2017) Mechanisms of Resistance to Daptomycin in *Staphylococcus Aureus*. *Rev Esp Quimioter*, 30(6):391–396.
- Götz F (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*, 43(6):1367–1378.
- Grice EA, Segre JA (2011) The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*, 9(4):244–253.
- Gross M et al. (2001) Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. *Infect Immun*, 69(5):3423–3426.
- Gruszka DT et al. (2012) Staphylococcal biofilm-forming protein has a contiguous rod-like structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(17):E1011-1018.

- Gury J et al. (2004) Cloning, Deletion, and Characterization of PadR, the Transcriptional Repressor of the Phenolic Acid Decarboxylase-Encoding padA Gene of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 70(4):2146–2153.
- Haenle M et al. (2012) Economic Impact of Infected Total Knee Arthroplasty. *ScientificWorldJournal*, 2012:196515.
- Handke LD et al. (2007) SigmaB and SarA independently regulate polysaccharide intercellular adhesin production in *Staphylococcus epidermidis*. *Can J Microbiol*, 53(1):82–91.
- Hauf S et al. (2019) PadR-type repressors controlling production of a non-canonical FtsW/RodA homologue and other trans-membrane proteins. *Sci Rep*, 9(1):10023.
- Heilmann C et al. (1997) Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol*, 24(5):1013–1024.
- Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K (2019) Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clin Microbiol Infect*, 25(9):1071–1080.
- Hennig S, Nyunt Wai S, Ziebuhr W (2007) Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an ica-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate. *Int J Med Microbiol*, 297(2):117–122.
- Hirschhausen N et al. (2010) A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell Microbiol*, 12(12):1746–1764.
- Huillet E et al. (2006) LadR, a new PadR-related transcriptional regulator from *Listeria monocytogenes*, negatively regulates the expression of the multidrug efflux pump MdrL. *FEMS Microbiol Lett*, 254(1):87–94.
- Humphries RM, Pollett S, Sakoulas G (2013) A Current Perspective on Daptomycin for the Clinical Microbiologist. *Clin Microbiol Rev*, 26(4):759–780.
- Iwase T et al. (2010) *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, 465(7296):346–349.
- Izano EA et al. (2008) Differential Roles of Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 74(2):470–476.
- Jang S (2016) Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. *J Microbiol*, 54(1):1–8.

- Joo H-S et al. (2016) Mechanism of Gene Regulation by a *Staphylococcus aureus* Toxin. *mBio*, 7(5): e01579-16.
- Joo H-S, Cheung GYC, Otto M (2011) Antimicrobial Activity of Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Is Caused by Phenol-soluble Modulins Derivatives. *J Biol Chem*, 286(11):8933–8940.
- Jørgensen N et al. (2016) Rifampicin-containing Combinations Are Superior to Combinations of Vancomycin, Linezolid and Daptomycin Against *Staphylococcus Aureus* Biofilm Infection in Vivo and in Vitro. *Pathog Dis*, 74(4):ftw019.
- Josefsson E et al. (1998) Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 144 (Pt 12):3387-3395.
- Kaplan JB et al. (2004) Genes Involved in the Synthesis and Degradation of Matrix Polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* Biofilms. *J Bacteriol*, 186(24):8213–8220.
- Kaval KG et al. (2015) The PadR-like transcriptional regulator LftR ensures efficient invasion of *Listeria monocytogenes* into human host cells. *Front Microbiol*, 6:772.
- Kiedrowski MR, Horswill AR (2011) New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann N Y Acad Sci*, 1241:104–121.
- Kloos WE, Bannerman TL (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, 7(1):117–140.
- Kloos WE, Musselwhite MS (1975) Distribution and Persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* Species and Other Aerobic Bacteria on Human Skin. *Appl Microbiol*, 30(3):381–395.
- Kong HH et al. (2012) Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res*, 22(5): 850–859.
- Koskela A et al. (2009) Prevalence of the *ica* operon and insertion sequence IS256 among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28(6):655–660.
- Kresken M, Hafner D, the Study Group Bacterial Resistance of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy (1999) Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in central Europe during 1975–1995. *Infection*, 27 Suppl 2:S2-8.

- Kreiswirth BN, O'Reilly M, Novick RP (1984). Genetic characterization and cloning of the toxic shock syndrome exotoxin. *Surv Synth Pathol. Res* 3, 73-82.
- Kretschmer D et al. (2010) Human Formyl Peptide Receptor 2 (FPR2/ALX) Senses Highly Pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe*, 7(6):463–473.
- Lai Y et al. (2007) The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol Microbiol*, 63(2):497–506.
- Lai Y et al. (2009) Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3–dependent inflammation after skin injury. *Nat Med*, 15(12):1377–1382.
- Lambert LA et al. (1997) Proteins induced in *Escherichia coli* by benzoic acid. *J Bacteriol*, 179(23):7595–7599.
- Lee C, Kim M il, Hong M (2017) Structural and functional analysis of BF2549, a PadR-like transcription factor from *Bacteroides fragilis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 483(1):264–270.
- Lewis K (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol*, 5(1):48–56.
- Li H et al. (2005) Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infect Immun*, 73(5):3188–3191.
- Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339(8):520–532.
- Lyytikäinen O et al. (1996) Increased resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates in a large teaching hospital over a 12-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 15(2):133–138.
- Macintosh RL et al. (2009) The terminal A domain of the fibrillar accumulation-associated protein (Aap) of *Staphylococcus epidermidis* mediates adhesion to human corneocytes. *J Bacteriol*, 191(22):7007–7016.
- Mack D et al. (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol*, 178(1):175–183.
- Mack D, Rohde H, Dobinsky S, Riedewald J, Nedelmann M, Knobloch JK, Elsner HA, Feucht HH (2000). Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of

- Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun* 68, 3799-3807. 10.1128/IAI.68.7.3799-3807.2000.
- Mack D et al. (2001) Genetic and biochemical analysis of Staphylococcus epidermidis biofilm accumulation. *Methods Enzymol*, (336):215–239.
- Mack D et al. (2006) Biofilm Formation in Medical Device-Related Infection. *Artif Organs*, 29(4):343–359.
- Mack D et al. (2009) Staphylococcus epidermidis Biofilms: Functional Molecules, Relation to Virulence, and Vaccine Potential. *Top Curr Chem*, 288:157–182.
- Mandell GL, Moorman DR (1980) Treatment of experimental staphylococcal infections: effect of rifampin alone and in combination on development of rifampin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 17(4):658–662.
- McCaig LF et al. (2006) Staphylococcus aureus-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. *Emerg Infect Dis*, 12(11):1715–1723.
- McFarland J (1907) The Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J Natl Med Assoc*, (14):1176–1178.
- McKevitt AI et al. (1990) Amino acid sequence of a deltalike toxin from Staphylococcus epidermidis. *Infect Immun*, 58(5):1473–1475.
- Mehlin C, Headley CM, Klebanoff SJ (1999) An Inflammatory Polypeptide Complex from Staphylococcus epidermidis: Isolation and Characterization. *J Exp Med*, 189(6):907–918.
- Miragaia M, Couto I, Lencastre HD (2005) Genetic Diversity among Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis (MRSE). *Microb Drug Resist*, 11(2):83–93.
- Moormeier DE et al. (2014) Temporal and stochastic control of Staphylococcus aureus biofilm development. *mBio*, 5(5):e01341-01314.
- Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin Charité - Universitätsmedizin Berlin (2017a). Definitionen nosokomialer Infektionen für die Surveillance im Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS-Definitionen). [Online im Internet.] URL: https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/KISS_Definitionen_E-Book_Neuaufgabe_06_2017-.pdf [Stand: 28.08.2021, 12:23].

- Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin Charité - Universitätsmedizin Berlin (2017b). Surveillance nosokomialer Infektionen auf Intensivstationen. [Online im Internet.] URL: https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/its/ITS-KISS-Protokoll_v201-70322.pdf [Stand: 28.08.2021, 12:24]
- Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin Charité - Universitätsmedizin Berlin (2019). Infektionssurveillance im Modul ITS-KISS Referenzdaten, Berechnungszeitraum: Januar 2017 bis Dezember 2018. [Online im Internet.] https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/its/201701_201812_ALLE_ITSRef.pdf [Stand: 28.08.2021, 12:25]
- Novick RP et al. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J*, 12(10):3967–3975.
- Novick RP (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*, 48(6):1429–1449.
- Novick RP, Geisinger E (2008) Quorum Sensing in Staphylococci. *Annu Rev Genet*, 42(1):541–564.
- Novick RP, Muir TW (1999) Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2(1):40–45.
- Olaechea PM et al. (2013) Morbidity and mortality associated with primary and catheter-related bloodstream infections in critically ill patients. *Rev Esp Quimioter*, 26(1):21–29.
- Otto M (2008) Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322:207–228.
- Otto M (2009) *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 7(8):555–567.
- Otto M (2014) Physical stress and bacterial colonization. *FEMS Microbiol Rev*, 38(6):1250–1270.
- Otto M, Götz F (2001) ABC transporters of staphylococci. *Res Microbiol*, 152(3–4):351–356.
- Paharik AE et al. (2017) The metalloprotease SepA governs processing of accumulation-associated protein and shapes intercellular adhesive surface properties in *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol*, 103(5):860-874.

- Peters G, Locci R, Pulverer G (1982) Adherence and Growth of Coagulase-Negative Staphylococci on Surfaces of Intravenous Catheters. *J Infect Dis*, 146(4):479-482.
- Pittet D, Tarara D, Wenzel RP (1994) Nosocomial Bloodstream Infection in Critically Ill Patients: Excess Length of Stay, Extra Costs, and Attributable Mortality. *JAMA*, 271(20):1598–1601.
- Prax M, Lee CY, Bertram R (2013) An update on the molecular genetics toolbox for staphylococci. *Microbiology*, 159(Pt 3):421–435.
- Qin Z et al. (2007) Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 153(Pt 7):2083–2092.
- Rautenberg M et al. (2011) Neutrophil responses to staphylococcal pathogens and commensals via the formyl peptide receptor 2 relates to phenol-soluble modulins release and virulence. *FASEB J*, 25(4):1254–1263.
- Rice KC et al. (2007) The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(19):8113–8118.
- Roberts MC (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*, 245(2):195–203.
- Rogers KL, Fey PD, Rupp ME (2009) Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. *Infect Dis Clin North Am*, 23(1):73–98.
- Rohde H et al. (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(12):5614–5619.
- Rohde H et al. (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol*, 55(6):1883–1895.
- Rohde H et al. (2006) Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Rev Med Microbiol*, (17):45–54.
- Rohde H et al. (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(9):1711–1720.

- Rohde H et al. (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(1):103–111.
- Rupp ME, Karnatak R (2018) Intravascular Catheter–Related Bloodstream Infections. *Infect Dis Clin North Am*, 32(4):765–787.
- Schaeffer CR et al. (2015) Accumulation-associated protein enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation under dynamic conditions and is required for infection in a rat catheter model. *Infect Immun*, 83(1):214–226.
- Scherr TD et al. (2014) Hiding in Plain Sight: Interplay between *Staphylococcal* Biofilms and Host Immunity. *Front Immunol*, 5:37.
- Schommer NN et al. (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(6):2267–2276.
- Schröter L, Dersch P (2019) Phenotypic Diversification of Microbial Pathogens—Cooperating and Preparing for the Future. *Am J Mol Biol*, 431(23):4645–4655.
- Schwartz K et al. (2012) Functional Amyloids Composed of Phenol Soluble Modulins Stabilize *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathog*, 8(6):e1002744.
- Spanu T et al. (2003) Use of the VITEK 2 System for Rapid Identification of Clinical Isolates of *Staphylococci* from Bloodstream Infections. *J Clin Microbiol*, 41(9):4259–4263.
- Sperber WH, Tatini SR (1975) Interpretation of the Tube Coagulase Test for Identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol*, 29(4):502–505.
- Stevens NT et al. (2008) Biofilm and the role of the *ica* operon and *aap* in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing neurosurgical meningitis. *Clin Microbiol Infect*, 14(7):719–722.
- Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358(9276):135–138.
- Sugimoto S et al. (2013) *Staphylococcus epidermidis* Esp Degrades Specific Proteins Associated with *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Host-Pathogen Interaction. *J Bacteriol*, 195(8):1645–1655.
- Tacconelli E et al. (1997) Central venous catheter-related sepsis in a cohort of 366 hospitalised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 16(3):203–209.

- Tormo MÁ et al. (2005) SarA Is an Essential Positive Regulator of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Development. *J Bacteriol*, 187(7):2348–2356.
- Tran NP et al. (2008) Phenolic Acid-Mediated Regulation of the *padC* Gene, Encoding the Phenolic Acid Decarboxylase of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 190(9):3213–3224.
- Tran TT, Munita JM, Arias CA (2015) Mechanisms of Drug Resistance: Daptomycin Resistance. *Ann N Y Acad Sci*, 1354:32–53.
- Uçkay I et al. (2009) Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Ann Med*, 41(2):109–119.
- Vacheethasanee K et al. (1998) Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. *J Biomed Mater Res*, 42(3):425–432.
- Vandecasteele SJ et al. (2003) Expression of Biofilm-Associated Genes in *Staphylococcus epidermidis* during In Vitro and In Vivo Foreign Body Infections. *J Infect Dis*, 188(5):730–737.
- de Vries RP et al. (1997) The *faeA* genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* encode ferulic acid esterases involved in degradation of complex cell wall polysaccharides. *Appl Environ Microbiol*, 63(12):4638–4644.
- Vuong C et al. (2000) Impact of the *agr* Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 182(6):1688–1693.
- Vuong C et al. (2003) Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis*, 188(5):706–718.
- Vuong C et al. (2004a) Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. *Cell Microbiol*, 6(8):753–759.
- Vuong C et al. (2004b) Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol*, 6(3):269–275.
- Vuong C, Otto M (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect*, 4(4):481–489.
- Wang R et al. (2007) Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med*, 13(12):1510–1514.

- Wang R et al. (2011) Staphylococcus epidermidis surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J Clin Invest*, 121(1):238–248.
- Weiser J et al. (2016) Sub-inhibitory tigecycline concentrations induce extracellular matrix binding protein Embp dependent Staphylococcus epidermidis biofilm formation and immune evasion. *Int J Med Microbiol*, 306(6):471–478.
- Whitchurch CB et al. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559):1487.
- Williams RJ et al. (2002) Identification of a Fibronectin-Binding Protein from Staphylococcus epidermidis. *Infect Immun*, 70(12):6805–6810.
- Wright JS et al. (2005) The agr Radiation: an Early Event in the Evolution of Staphylococci. *J Bacteriol*, 187(16):5585–5594.
- Yao Y et al. (2005) Factors Characterizing Staphylococcus epidermidis Invasiveness Determined by Comparative Genomics. *Infect Immun*, 73(3):1856–1860.
- Yao Y et al. (2006) Characterization of the Staphylococcus epidermidis Accessory-Gene Regulator Response: Quorum-Sensing Regulation of Resistance to Human Innate Host Defense. *J Infect Dis*, 193(6):841–848.
- Yao Y, Sturdevant DE, Otto M (2005) Genomewide Analysis of Gene Expression in Staphylococcus epidermidis Biofilms: Insights into the Pathophysiology of S. epidermidis Biofilms and the Role of Phenol-Soluble Modulins in Formation of Biofilms. *J Infect Dis*, 191(2):289–298.
- Zaldivar J, Ingram LO (1999) Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic Escherichia coli LY01. *Biotechnol Bioeng*, 66(4):203–210.
- Zarb P et al. (2012) The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Euro Surveill*, 17(46):20316
- Zeytuni N et al. (2020) Structural insight into the Staphylococcus aureus ATP-driven exporter of virulent peptide toxins. *Sci Adv*, 6(40):eabb8219.
- Zhang C et al. (2005) Functional Consequences of Genome Evolution in Listeria monocytogenes: the lmo0423 and lmo0422 Genes Encode σ^C and LstR, a Lineage II-Specific Heat Shock System. *J Bacteriol*, 187(21):7243–7253.

Zhang T et al. (2014) Cardiolipin Prevents Membrane Translocation and Permeabilization by Daptomycin. *J Biol Chem*, 289(17):11584–11591.

Zimmerli W et al. (1998) Role of Rifampin for Treatment of Orthopedic Implant–Related Staphylococcal Infections : A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 279(19):1537–1541.

9 Danksagung

An dieser Stelle ein Dank, all jenen, die zum Gelingen dieses Werkes beigetragen. Herrn Professor Martin Aepfelbacher danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene durchführen zu können. Dies schließt auch die Nutzung der Räumlichkeiten, der Gerätschaften und insbesondere den Berg an Verbrauchsmaterialien, welche im Rahmen dieser Arbeit verpulvert wurden, mit ein.

Für die technische Unterstützung in Laborangelegenheiten danke ich insbesondere Gesche Kroll, welche sich niemals (vielleicht ein zwei Mal) ihren Unmut über dezent zu laute Musik anmerken lassen hat und immer ein offenes Ohr hatte, wenn man mal wieder keinen Schimmer hatte, was man da eigentlich macht. Danke zudem für das Bekanntmachen mit dem Radiosender PULS (Bayrischer Rundfunk), den ich bis heute gerne höre.

Ferner möchte ich Paul Haffke danken, für seine Fröhlichkeit, Offenheit und Begeisterungsfähigkeit. Sein bedingungsloses Mitwirken hat mich unglaublich unterstützt. Paul, du bist mir ein wirklich guter Freund geworden. *Skü.*

Auch Samira Weißelberg musste sich den einen oder anderen verzweifelten Satz anhören, wie schlimm doch alles wäre. Auch dir Samira herzlichsten Dank für deine fachliche Expertise, dein stets offenes Ohr und deine anpackende Art.

Ärztlicherseits möchte ich Anna Both und Henning Büttner erwähnen. Danke für die Lehre, die Unterstützung und für die lustigen und oft kuriosen Gespräche über Gott und die Welt.

Ferner möchte ich meine Mitstreiter Benjamin Hilpert und Christian Krambeck erwähnen. Vielleicht war unser Dreiergespann nicht die optimale Bedingung für einen zügigen Progress unserer Arbeiten - aber auch nur vielleicht. Danke!

Zu guter Letzt möchte ich meinem Doktorvater Professor Holger Rohde von ganzem Herzen danken. Ich werde diesen Samstag lange in Erinnerung behalten, an dem ich einer typischen Schicht meines Studentenjobs im Fischverkauf nachkam und plötzlich diesen Mann aus meinem Unterricht in medizinischer Mikrobiologie wiedererkannte. Zwar schien die Begeisterung über diese Fügung unidirektional, so hatte ich doch hier den Samen einer, wie sich im Verlauf rausstellte, wunderbaren Zusammenarbeit säen können. Holger, auch wenn der Weg ein langer war (was du mir prophezeitest), so möchte ich ihn niemals missen. Danke für das Thema, deine Menschlichkeit, dein Feuer. Uns verbindet durchaus mehr als unser geschätzter *Staphylococcus epidermidis*.

An meine geliebte Miri, danke für alles – danke für dich!

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.

Joon Art Pitann, September 2021 in Hamburg