

Aus der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. J. Rupp

---

Wachstumsabhängige Expressionsmusteranalysen von Regulatoren  
der Biofilmsynthese in *Staphylococcus epidermidis*

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von  
Agata Zienkiewicz  
aus Poznań

Lübeck 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Knobloch
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Torsten Goldmann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2017  
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.11.2017  
-Promotionskommission der Sektion Medizin-

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Staphylokokken.....	1
1.2 Pathogenität von <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	2
1.3 Mechanismen der Biofilmbildung bei <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	3
1.3.1 Kontakt und primäre Adhäsion .....	3
1.3.2 Akkumulation.....	5
1.3.3 Strukturierung und Ablösung.....	7
1.4 Regulation der Biofilmbildung .....	8
1.4.1 Regulation der PIA-Synthese .....	8
1.4.2 Quorum sensing .....	12
1.4.3 Regulation durch externe Faktoren .....	13
1.5 Resistenz gegen das Immunsystem und die Antibiotikatherapie.....	13
1.6 Fragestellung.....	15
2 Material .....	16
2.1 Bakterienstämme.....	16
2.2 Plasmide .....	17
2.3 Nährmedien.....	17
2.4 Antibiotika.....	18
2.5 Oligonuklotide.....	18
2.6 Enzyme.....	19
2.7 Antikörper .....	19
2.8 Kits .....	20
2.9 Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	20

---

2.10	Puffer und Lösungen .....	21
2.11	Geräte und Hilfsmittel .....	24
2.12	Software und Datenbanken .....	25
3	Methoden.....	26
3.1	Kultur und Lagerung bakterieller Zellen.....	26
3.1.1	Kultivierung bakterieller Zellen .....	26
3.1.2	Ermittlung der Zellmasse in Flüssigmedien.....	27
3.1.3	Wachstumskurven von <i>Staphylococcus epidermidis</i> Stämmen .....	27
3.2	Genetische Manipulation von Zellen .....	28
3.3	Arbeiten mit DNA.....	28
3.3.1	Isolation chromosomaler DNA aus <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457 .....	28
3.3.2	Polymerasekettenreaktion .....	29
3.3.3	Analyse von DNA mittels TBE-Agarosegelen .....	30
3.3.4	Nukleinsäureaufreinigung .....	30
3.3.5	Isolierung von Plasmid-DNA.....	30
3.3.6	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	31
3.3.7	Gateway-Klonierungen .....	31
3.4	Arbeiten mit Proteinen .....	34
3.4.1	Gewinnung von Proteinproben von <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	34
3.4.2	Proteinüberexpression in <i>Escherichia coli</i> .....	34
3.4.3	Proteinaufreinigung rekombinanter Proteine .....	35
3.4.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford .....	36
3.4.5	Trennung von Proteinen mittels SDS-Gelelektrophorese .....	37
3.5	Immunologische Arbeitstechniken.....	37
3.5.1	Erstellen eines polyklonalen Antiserums .....	37
3.5.2	Aufreinigung eines polyklonalen Antiserums.....	38
3.5.3	Western Blot Analysen .....	38
4	Ergebnisse .....	40

4.1	Herstellung polyklonaler Antiseren .....	40
4.1.1	Klonierung von Expressionsplasmiden.....	40
4.1.2	Proteinüberexpression in <i>E. coli</i> und -aufreinigung.....	41
4.1.3	Immunisierung von Kaninchen .....	44
4.1.4	Aufreinigung polyklonaler Antiseren .....	45
4.2	Analyse intrazellulärer <i>Staphylococcus epidermidis</i> Proteine .....	45
4.2.1	Wachstumsverhalten von <i>S. epidermidis</i> Stämmen und Gewinnung von Proteinproben .....	46
4.2.2	Proteinanalysen mittels Western Blot .....	47
5	Diskussion .....	57
5.1	Generierung polyklonaler Antiseren .....	57
5.2	Expression von $\sigma^B$ und RsbU .....	61
5.3	Expression von BarA und BarB .....	66
5.4	Expression von GcaD.....	68
5.5	Expression von IcaR .....	72
6	Zusammenfassung.....	77
7	Literaturverzeichnis.....	78
8	Anhang .....	97
I.	Proteinstandardkurve Bradfordassay .....	97
II.	Sequenzierungen.....	98
A.	Sequenzierung pENTRY <i>icaR</i> .....	98
B.	Sequenzierung pENTRY <i>gcaD</i> .....	99
C.	Erste Sequenzierung pENTRY <i>purR</i> .....	101
D.	Zweite Sequenzierung pENTRY <i>purR</i> .....	102
E.	Dritte Sequenzierung pENTRY <i>purR</i> .....	104
III.	Plasmidkarten der Expressionsvektoren.....	105
IV.	Tierversuchsgenehmigung .....	106
9	Danksagung.....	107

*Inhaltsverzeichnis*

---

Lebenslauf .....	108
------------------	-----

## Abkürzungsverzeichnis

A <sub>x nm</sub>	Absorption bei x nm
Aap	<i>accumulation associated protein</i>
AB	Antibiotika
Agr	<i>accessory gene regulator</i>
AIDS	<i>aquired immunodeficiency syndrome</i>
AIP	<i>autoinducing peptide</i>
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
asp23	<i>alkaline shock protein 23</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Bap	<i>Biofilm associated protein</i>
Bar	<i>biofilm accumulation regulator</i>
Bhp	Bap-homologes Protein
<i>bidest.</i>	Zweifach destilliert
bp	Basenpaare
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCIP	3-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang
ecDNA	extrazelluläre DNA
EC-Nummer	Nummer der Kommission für Enzyme ( <i>enzyme commission number</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
h	Stunde/n
HCl	Salzsäure
<i>ica</i>	<i>intercellular adhesin</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

Abkürzungsverzeichnis


---

kB	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
KOAc	Kaliumacetat
LB	Luria Bertani
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
MMSO	<i>macromolecular synthesis operon</i>
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
MSCRAMM	<i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD <sub>x nm</sub>	Optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PIA	<i>polysaccharide intercellular adhesin</i>
PNAG	Poly-N-Acetylglukosamin
PurR	<i>purine repressor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PSM	Phenollösliche Moduline ( <i>phenol-soluble modulins</i> )
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAP	RNA-Polymerase
Rsb	<i>Regulator of <math>\sigma^B</math></i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sar	<i>staphylococcus accessory regulator</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Trypton Soja Brühe
U	<i>unit</i>

*Abkürzungsverzeichnis*

---

UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Phasen der Biofilmbildung nach Otto, 2009.....	4
Abbildung 1-2 Regulatormodell der Biofilmbildung bei <i>S. epidermidis</i> nach Mack, 2006 .	9
Abbildung 3-1 BP-Klonierung am Beispiel von <i>gcaD</i> .....	32
Abbildung 3-2 LR-Klonierung am Beispiel von <i>gcaD</i> .....	33
Abbildung 4-1 Transformationskontrolle .....	40
Abbildung 4-2 SDS-Gelelektrophorese der Proteinüberexpression von IcaR.....	42
Abbildung 4-3 SDS-Gelelektrophorese der GcaD-Aufreinigung.....	42
Abbildung 4-4 Wachstumskurve der PurR-Testexpression .....	43
Abbildung 4-5 SDS-Gelelektrophorese der PurR-Test- und Überexpression .....	44
Abbildung 4-6 Reaktivitätskontrolle des GcaD-Probeserums mittels Western Blot .....	44
Abbildung 4-7 Western Blot der GcaD-Antikörperaufreinigung .....	45
Abbildung 4-8 Wachstumskurven <i>S. epidermidis</i> Stämmen.....	46
Abbildung 4-9 Western Blot Analysen mit $\sigma^B$ -spezifischen Antikörpern .....	47
Abbildung 4-10 Western Blot Analysen mit RsbU-spezifischen Antikörpern.....	49
Abbildung 4-11 Western Blot Analysen mit RsbU-spezifischen Antikörpern in der <i>sigB</i> - Mutante .....	50
Abbildung 4-12 Western Blot Analysen mit BarA-spezifischen Antikörpern .....	51
Abbildung 4-13 Western Blot Analysen mit BarB-spezifischen Antikörpern.....	52
Abbildung 4-14 Western Blot Analysen mit GcaD-spezifischen Antikörpern.....	52
Abbildung 4-15 Western Blot Analysen mit GcaD-spezifischen Antikörpern in <i>S. epidermidis</i> 1457 Mutanten.....	53
Abbildung 4-16 Western Blot Analysen mit IcaR-spezifischen Antikörpern.....	54
Abbildung 4-17 Western Blot Analysen mit IcaR-spezifischen Antikörpern im Vergleich mit der <i>sigB</i> -Mutante.....	55
Abbildung 4-18 Western Blot Analyse mit IcaR-spezifischen Antikörpern unter Biofilmbedingungen.....	55
Abbildung 4-19 Western Blot-Analyse mit IcaR-spezifischen Antikörpern: Einfluss von Ethanol .....	56
Abbildung 5-1 Ausschnitt aus dem Metabolismus von <i>S. epidermidis</i> .....	70
Abbildung 8-1 Plasmidkarten der Expressionsvektoren .....	105

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1-1 Virulenzfaktoren der initialen Anhaftung.....	5
Tabelle 2-1 In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme .....	16
Tabelle 2-2 In dieser Arbeit verwendete Plasmide .....	17
Tabelle 2-3 In dieser Arbeit verwendete Nährmedien .....	17
Tabelle 2-4 In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.....	18
Tabelle 2-5 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide .....	18
Tabelle 2-6 In dieser Arbeit verwendete Enzyme .....	19
Tabelle 2-7 In dieser Arbeit verwendete Antikörper .....	19
Tabelle 2-8 In dieser Arbeit verwendete Kits .....	20
Tabelle 2-9 In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	20
Tabelle 2-10 In dieser Arbeit verwendete Geräte und Hilfsmittel .....	24
Tabelle 2-11 In dieser Arbeit verwendete Software, Datenbanken oder Tools .....	25
Tabelle 3-1 In dieser Arbeit bestehende Kultivierungsbedingungen .....	26
Tabelle 3-2 PCR-Reaktionsbedingungen in dieser Arbeit .....	29
Tabelle 3-3 Einstellungen am <i>power supply</i> beim Western Blotting.....	39
Tabelle 5-1 Über Ni <sup>2+</sup> -Affinitätschromatographie potentiell mitaufgereinigte <i>E. coli</i> Proteine (HOWELL <i>et al.</i> , 2006) .....	60

# 1 Einleitung

## 1.1 Staphylokokken

Staphylokokken sind Gram-positive, unbewegliche, Haufen bildende Kokken, die nicht sporenbildend sind und fast ausschließlich fakultativ anaerob wachsen. In der aktuellen Taxonomie bilden die Staphylokokken eine von fünf Gattungen der Familie der *Staphylococcaceae*. Es sind aktuell 81 Spezies inklusive Subspezies der Gattung *Staphylococcus* bekannt (DSMZ, 2016).

Habitate für Staphylokokken können Luft, Staub, Essen und Wasser sein (WIDERSTRÖM *et al.*, 2011), sind jedoch in erster Linie die Schleimhäute und die Haut des Menschen, bei dem sie den größten Teil der kommensalen Flora bilden (KLOOS & MUSSELWHITE, 1975). Staphylokokken sind jedoch für den Menschen auch in anderer Hinsicht von besonderer Bedeutung, sie gehören zu den fünf häufigsten Ursachen nosokomialer Infektionen (NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE, 1996).

Die Spezies, die für die Humanmedizin relevant sind, werden diagnostisch anhand des Vorhandenseins an freier Koagulase (SPERBER & TATINI, 1975) eingeteilt. So unterscheiden wir koagulase-positive Staphylokokken von koagulase-negativen Staphylokokken (KNS).

Klinisch bedeutsamster Vertreter der koagulase-positiven Staphylokokken ist *Staphylococcus aureus*, der sich bei etwa 30% der Bevölkerung persistierend oder transient v.a. im *Vestibulum nasi* findet (VAN BELKUM, 2006; LINA *et al.*, 2003; WERTHEIM *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den KNS zeichnet er sich durch eine höhere Virulenz (GILL *et al.*, 2005; ROGERS *et al.*, 2009; VUONG & OTTO, 2002) aus. *S. aureus* ist u.a. als Verursacher pyogener Erkrankungen der Haut (Abszess, Furunkel, Karbunkel), Osteomyelitis, Pneumonie, Endokarditis sowie Bakteriämie und Sepsis bekannt (MUSHER *et al.*, 1994). Zusätzlich besitzt er mehrere Toxine, durch die beispielsweise das *staphylococcal-scalded-skin*-Syndrom, das *staphylococcal-toxic-shock*-Syndrom sowie Lebensmittelvergiftungen verursacht werden (LOWY, 1998).

Bei den KNS ist *S. epidermidis* die am häufigsten isolierte Spezies (MCCANN *et al.*, 2008; RUPP & ARCHER, 1994; VADYVALOO & OTTO, 2005; WIDERSTRÖM *et al.*, 2011) und findet sich ubiquitär auf Haut und Schleimhäuten (KLOOS & MUSSELWHITE, 1975). Galt *S. epidermidis* lange Zeit als apathogen, so wird das Bakterium in den letzten Jahren als klarer Opportunist eingestuft (DOMINGO & FONTANET, 2001; VUONG & OTTO, 2002). *S. epidermidis* ist der häufigste Verursacher nosokomialer Bakteriämien (WISPLINGHOFF

*et al.*, 2004). Eine besondere Bedeutung wird den fremdkörperassoziierten Infektionen beigemessen. Ursächlich hierfür ist vor allem ein in letzten Jahrzehnten stetig zunehmender Einsatz von Fremdkörpern in der Medizin, wie beispielsweise Gefäßprothesen, Herzklappen, Gelenkprothesen, Liquorshunts, (zentral-)venösen und arteriellen Kathetern, Schrittmachern, intraokulären Linsen und Peritonealkathetern (VON EIFF *et al.*, 2002; MACK *et al.*, 2006; MACK, 1999; RAAD *et al.*, 1998). Die Folgen dieser Infektionen sind eine erhöhte Morbidität und Mortalität und gehen mit operativen Eingriffen, einer prolongierten Antibiotikatherapie (SAGINUR *et al.*, 2006) und erhöhten Kosten für das Gesundheitssystem (UÇKAY *et al.*, 2009) einher.

## **1.2 Pathogenität von *Staphylococcus epidermidis***

*S. epidermidis* besiedelt erfolgreich Haut und Schleimhäute des Menschen. Diese Kolonisation ist für den gesunden Menschen mit intakter Haut unproblematisch. Im Gegensatz zu *S. aureus* besitzt *S. epidermidis* wesentlich weniger extrazelluläre Enzyme und Toxine (VON EIFF *et al.*, 2002; VUONG & OTTO, 2002), welche eine Infektion erleichtern würden. Während *S. aureus* mit seinem reichhaltigen Arsenal an Virulenzfaktoren fulminant verlaufende Infektionen verursacht (GILL *et al.*, 2005), verlaufen die durch *S. epidermidis* verursachten Infektionen meist subakut oder chronisch (VON EIFF *et al.*, 2002; OTTO, 2009). Eine Ausnahme stellt hier die durch *S. epidermidis* verursachte Endokarditis nativer Herzklappen (MONK *et al.*, 2008) dar, die mit einer zu *S. aureus* ähnlichen Fulminanz verläuft. Die Penetration von Haut oder Schleimhaut (GILL *et al.*, 2005; OTTO, 2008) ist ein wichtiger Risikofaktor für eine Infektion mit *S. epidermidis*, die Haut penetrierende Fremdkörper sind somit besonders riskant. Angestochene Portkatheter oder Dialyseshunts zum Beispiel bieten durch ihren Kontakt zur Haut eine leichte Eintrittspforte für eine Infektion. Eine immunsupprimierte Prädisposition des Wirtes, beispielsweise durch AIDS, eine immunsupprimierende Therapie oder Frühgeburtlichkeit begünstigt eine Infektion mit *S. epidermidis* (VUONG & OTTO, 2002). Weitere Risikofaktoren für eine Infektion sind ein prolongierter Krankenhausaufenthalt, rezidivierende operative Eingriffe, lange Dauer der Operation oder ein Aufenthalt auf der Intensivstation (CHOONG & WHITFIELD, 2000; WISPLINGHOFF *et al.*, 2004).

Trotz seiner im Vergleich zu *S. aureus* geringeren Virulenz ist *S. epidermidis*, zusammen mit den selteneren Spezies der KNS, mit 31% der häufigste Verursacher nosokomialer Bakteriämien (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004). Der wichtigste Virulenzfaktor von *S. epidermidis* ist die Fähigkeit sich auf Polymeroberflächen von Fremdkörpern in einem

mehrschichtigen Biofilm anzusiedeln (KNOBLOCH *et al.*, 2002a; MACK *et al.*, 2006; OTTO, 2008; RUPP *et al.*, 1999b; VUONG & OTTO, 2002). Ein zunehmender Einsatz von Fremdkörpern in der Medizin korreliert somit mit einer Zunahme an Infektionen mit *S. epidermidis*. Aggraviert wird die Situation durch eine zunehmende Resistenz gegenüber Antibiotika. So sind mittlerweile 75-89 % der *S. epidermidis* Stämme resistent gegenüber Methicillin (VADYVALOO & OTTO, 2005; VUONG & OTTO, 2002; WISPLINGHOFF *et al.*, 2004), hinzu kommen häufig Resistenzen gegenüber Penicillinen, Makroliden, Chloramphenicol, Tetracyclinen und Chinolonen (GILL *et al.*, 2005; SAGINUR *et al.*, 2006).

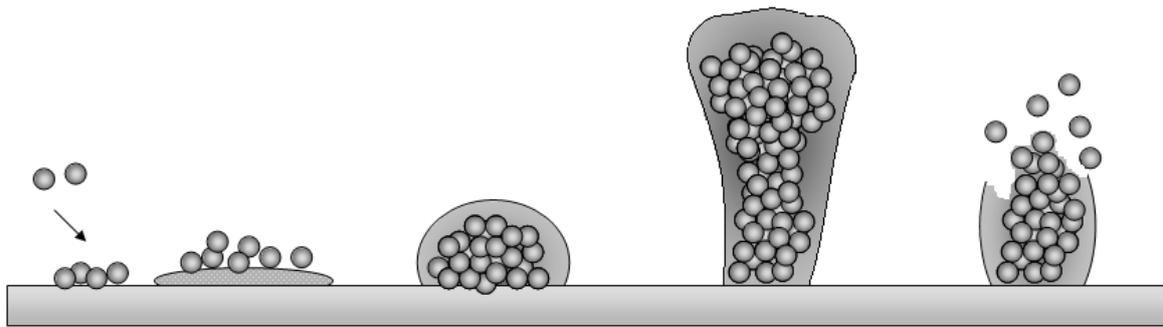
### **1.3 Mechanismen der Biofilmbildung bei *Staphylococcus epidermidis***

Biofilme sind ein in der Natur weit verbreitetes Konzept: planktonische Bakterien konglomerieren an einer Oberfläche und produzieren eine schützende, extrazelluläre Matrix u.a. aus Exopolysacchariden (COSTERTON, 1999). Viele der nosokomialen *S. epidermidis* Stämme bilden einen Biofilm (GALDBART *et al.*, 2000; KNOBLOCH *et al.*, 2002a) auf der Oberfläche von Fremdkörpern und können auf diese Weise dem Immunsystem und der Antibiotikatherapie entkommen (COSTERTON, 1999), sodass häufig eine Entfernung des Fremdkörpers nötig ist (MACK *et al.*, 2007; ROGERS *et al.*, 2009).

Die Biofilmbildung verläuft nach einem Vier-Stufen Modell (Abbildung 1-1 (OTTO, 2009)): Einer initialen Adhäsion an den Fremdkörper, der Akkumulation weiterer Zellen, der Strukturierung des Biofilms und letztendlich der Auflösung mit Abgabe von planktonischen Zellen, die zu einer Reinfektion führen können. Da die Strukturierung und die Ablösung des Biofilms von ihren molekularen Mechanismen her kaum zu trennen sind, werden diese hier gemeinsam betrachtet.

#### **1.3.1 Kontakt und primäre Adhäsion**

Bei der Herstellung des Kontaktes zu einer Oberfläche und der initialen Adhäsion spielen viele unterschiedliche Faktoren eine Bedeutung, wie Van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Kräfte, Säure-Base-Interaktionen, hydrophobe Interaktionen, und Faktoren wie die Thermodynamik, Art und Beschaffenheit der Bakterien- und Fremdkörperoberfläche (OTTO, 2009). Die initiale Anheftung der Bakterien kann durch die direkte Adhäsion an die Oberfläche eines Fremdkörpers oder unter Vermittlung wirtseigener Matrixproteine erfolgen. Ersteres wird hauptsächlich durch die Oberflächenhydrophobizität der Bakterien initiiert und dann von spezifischen Bindungsproteinen unterstützt (OTTO, 2009). Dazu gehören das Adhäsion und Autolysin AtlE (HEILMANN *et al.*, 1997) und das Bhp Protein



**Anheftung an Polymer-  
oberfläche oder an  
daran haftende Matrix-  
proteine**

Hydrophobe Wechsel-  
wirkungen, MSCRAMM,  
AtlE



**Akkumulation**

PIA,  
Teichonsäure,  
adhäsive Proteine  
(z.B.: Aap, Bhp),  
ecDNA



**Strukturierung**

PSM vom  $\beta$ -Typ



**Ablösung**

PSM vom  $\beta$ -Typ

Abbildung 1-1 Phasen der Biofilmbildung nach Otto, 2009

Die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* an eine Oberfläche erfolgt direkt oder via Matrixmoleküle. Für die interzelluläre Aggregation sind hauptsächlich das Exopolysaccharid PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*), adhäsive Proteine, Teichonsäuren und extrazelluläre DNA (ecDNA) verantwortlich. Es folgen Reifung und Strukturierung des Biofilms. Hier sind vermutlich phenollöslichen Moduline (PSM) für die Spaltung nicht-kovalenter Bindungen im Biofilm zuständig. Beim Überwiegen disruptiver Kräfte kommt es zur Ablösung planktonischer Zellen. (Otto, 2009)

(TORMO *et al.*, 2005a). Fraglich ist jedoch, ob dieser Weg *in vivo* von Bedeutung ist, da Fremdkörperoberflächen *in vivo* rasch von Matrixproteinen überlagert sind (MACK *et al.*, 2007; OTTO, 2008). Für AtlE konnte die Bedeutung *in vivo* mittels Katherterinfektionsmodellen nachgewiesen werden (RUPP *et al.*, 1999a, 1999b, 2001). Matrixproteine, wie Fibrinogen, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Elastin und Kollagen, sind auch die Vermittler des zweiten möglichen Adhäsionsmechanismus. *S. epidermidis* kann mithilfe von seinen auf der Oberfläche exprimierten MSCRAMM Proteinen (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) an Matrixproteine binden (PATTI *et al.*, 1994). Diese Bindung kann sowohl kovalent sein (SdrG/Fbe und Aap), als auch nicht-kovalent sein (AtlE). AtlE ist auch für die Freisetzung extrazellulärer DNA (ecDNA) verantwortlich, der eine biofilmfördernde Rolle zugeschrieben wird (IZANO *et al.*, 2008; QIN *et al.*, 2007). Das *et al.* zeigten, dass in Gegenwart von ecDNA die initiale Anheftung effektiver abläuft (DAS *et al.*, 2010). Weitere Virulenzfaktoren, die an der initialen Anheftung beteiligt sind, sind in Tabelle 1-1 dargestellt.

Tabelle 1-1 Virulenzfaktoren der initialen Anhaftung

Virulenzfaktor	Funktion	Referenz
AtlE	Autolysin/Adhäsine bindet an abiotische Oberflächen	(HEILMANN <i>et al.</i> , 1997)
Aae	Autolysin/Adhäsine bindet an abiotische Oberflächen und Matrixproteine	(HEILMANN <i>et al.</i> , 2003)
Embp	Bindung an Fibronectin	(WILLIAMS <i>et al.</i> , 2002)
GehD	Lipase, Kollagen bindendes Adhäsine	(BOWDEN <i>et al.</i> , 2002)
SdrG/Fbe	Bindung an Fibrinogen	(NILSSON <i>et al.</i> , 1998)
SdrF	Bindung an Kollagen	(MCCREA <i>et al.</i> , 2000)
SdrH		(MCCREA <i>et al.</i> , 2000)
Teichonsäuren	Fibronectin	(HUSSAIN <i>et al.</i> , 2001)

### 1.3.2 Akkumulation

Die interzelluläre Adhäsion folgt der initialen Anheftung und wird durch mehrere Faktoren vermittelt. Dazu gehören adhäsive Proteine, Teichonsäuren, extrazelluläre DNA und in erster Linie ein Exopolysaccharid, das PIA (*polysaccharid intercellular adhesin*) oder Poly-N-Acetylglukosamin (PNAG) genannt wird. PIA ist ein Homoglycan aus durchschnittlich 130  $\beta$ -1,6-verbundenen N-Acetylglukosaminresten (GlcNAc), die teilweise Succinat und Phosphat enthalten (MACK *et al.*, 1996). Zusätzlich sind 15 bis 20 % der Reste deacetyliert (MACK *et al.*, 1996), was dem sonst neutralen Molekül bei neutralem oder saurem Umgebungs-pH-Wert, wie er auf der menschlichen Haut herrscht, durch Protonierung der Aminogruppe eine positive Ladung gibt (VUONG *et al.*, 2004b). Folglich werden die Bakterien durch elektrostatische wirkende Kräfte zwischen der positiv geladenen Aminogruppe des PIA, der negativen Ladung des Succinats des PIA und der negativ geladenen Bakterienoberfläche zusammengehalten (OTTO, 2008).

PIA wird durch die Enzyme des *ica*-Operons (*intercellular adhesin*) synthetisiert, welches die vier Gene *icaADBC* umfasst (HEILMANN *et al.*, 1996). Durch das membranständige Enzym IcaA wird ein Glukosaminoglykanpolymer synthetisiert, indem UDP-GlcNAc auf die vorhandene Kette transferiert wird. Für volle Produktivität benötigt diese Reaktion das ebenfalls membranständige IcaD (GERKE *et al.*, 1998). IcaC transportiert die Glukosamino-

glykankette nach extrazellulär (GERKE *et al.*, 1998). Durch IcaB an der Bakterienoberfläche werden Aminogruppen an den N-Acetylglukosaminresten durch Deacetylierung frei (VUONG *et al.*, 2004b).

PIA ist für die Bildung des Biofilms und die Virulenz von *S. epidermidis* von essenzieller Bedeutung, wie mit einer PIA-negativen *S. epidermidis* 1457 Transposonmutante namens 1457-M10 im Vergleich mit dem Wildtyp in mehreren Tiermodellen gezeigt werden konnte (FLUCKIGER *et al.*, 2005; RUPP *et al.*, 1999a, 1999b, 2001). Neuere Ergebnisse zeigen, dass PIA für die Biofilmbildung jedoch nicht obligatorisch ist, da auch PIA-negative Stämme Biofilme bilden können (CHOKR *et al.*, 2006; KOGAN *et al.*, 2006; ROHDE *et al.*, 2005). Nach Kogan *et al.* wird die Akkumulation dieser Biofilme dann hauptsächlich durch Teichonsäuren und Proteine vermittelt (KOGAN *et al.*, 2006).

Eines dieser Proteine, das eine PIA-unabhängige Biofilmbildung vermitteln kann, ist das Protein Aap (*accumulation associated protein*) (KOGAN *et al.*, 2006; ROHDE *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2005). Aap besteht aus mehreren Anteilen. Von N- bis C-terminal finden sich folgende Regionen: eine *A-repeat*-, eine  $\alpha/\beta$ -, eine *B-repeat*-, eine prolin- und glycinreiche, kollagenähnliche Region, die letztendlich in ein N-terminales LPXTG-Motiv mündet, welches als Zellwand-Anker dient (CONRADY *et al.*, 2008; ROHDE *et al.*, 2005; SCHNEEWIND *et al.*, 1993).

Dieses 220 kDa Protein kann erst in seiner proteolytisch prozessierten 140 kDa Isoform eine Biofilmbildung vermitteln, wobei die Schnittstelle zwischen der  $\alpha/\beta$ - und der *B-repeat*-Region liegt (ROHDE *et al.*, 2005). Die Proteolyse kann einerseits durch staphylokokkeneigene Proteasen, andererseits durch Granulozytenproteasen erfolgen (ROHDE *et al.*, 2005).

Die in der B-Region repetierte Aminosäuresequenz wird G5-Domäne genannt und findet sich auch bei anderen gram-positiven Bakterien (BATEMAN *et al.*, 2005). In der Gegenwart von Zink ist es diese repetitive Domäne, die Dimere bildet, damit anderen Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise Cadherinen ähnelt, und auf diese Weise die interzelluläre Adhäsion vermittelt (*zinc-zipper*) (CONRADY *et al.*, 2008; ROHDE *et al.*, 2005). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die G5-Domäne eine potentielle Bindungsstelle für N-Acetylglukosamin, also für PIA, ist und somit die Biofilmbildung fördert (BATEMAN *et al.*, 2005; OTTO, 2009).

Ein weiteres Protein ist das Bap-homologe Protein (Bhp), das nach dem in *S. aureus* vorkommenden *Biofilm associated protein* (Bap) benannt wurde (TORMO *et al.*, 2005a). Bei *S. aureus* spielt Bap eine wichtige Rolle bei der Bindung an Styropor, interzellulärer

Adhäsion und Biofilmbildung. Eine ähnlich Wirkung wird auch bei *S. epidermidis* vermutet (CUCARELLA *et al.*, 2001; VON EIFF *et al.*, 2002; GILL *et al.*, 2005).

Außer PIA und adhäsiven Proteinen wird auch extrazellulären Teichonsäuren und extrazellulärer DNA aus lysierten Zellen eine Bedeutung in der akkumulativen Phase der Biofilmbildung zugeschrieben, die vermutlich auf ihre anionische Ladung zurückzuführen ist (OTTO, 2009; SADOVSKAYA *et al.*, 2004).

### 1.3.3 Strukturierung und Ablösung

Ein reifer Biofilm zeigt oft pilzartige, dreidimensionale Strukturen auf, die von Flüssigkeitskanälen durchzogen sind, in denen Nährstoffe transportiert werden (COSTERTON, 1999; HERMANOWICZ, 2001). Diese Strukturierung des Biofilms erfolgt durch Zunahme von disruptiven Kräften, die letztendlich zur Auflösung des Biofilms, der Abgabe von planktonischen Zellen und somit zur potentiellen Neuinfektion führen kann (YAO *et al.*, 2005). Über die disruptiven Kräfte ist im Vergleich zu den adhäsiven Kräften weniger bekannt. Andere biofilmproduzierende Bakterien produzieren Enzyme, die PIA hydrolysieren können (KAPLAN *et al.*, 2003), bei *S. epidermidis* gibt es bislang keinen direkten Nachweis über die Funktion von Enzymen in der Strukturierung und Ablösung eines Biofilms (WANG *et al.*, 2011).

Weiterhin sind amphipathische Peptide, die sogenannten phenollösliche Moduline (*phenol-soluble modulins*, PSM), beschrieben worden. Diese bewirken durch ihre grenzflächenaktive, surfactant-ähnliche Wirkung ein Lösen nichtkovalenter Bindungen im Biofilm, zu denen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der anionischen Fremdkörperoberfläche und dem kationischen PIA, sowie hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Bakterien zählen (OTTO, 2009; YAO *et al.*, 2005). PSM werden in zwei Klassen unterteilt, den Alpha-Typ mit einer Größe von 20 bis 25 Aminosäuren mit stark zytolytischer Wirkung und den Beta-Typ mit einer Größe von 40 bis 45 Aminosäuren mit keiner signifikanten zytolytischen Wirkung.

Wang *et al.* stellten vor Kurzem fest, dass PSM im Biofilm im Verhältnis zu planktonischen Zellen nur im geringeren Umfang produziert werden, jedoch aber mit einer relativen Dominanz der PSM vom Beta-Typ. Dies deutete schon darauf hin, dass diese für die Biofilmstrukturierung und -ablösung von besonderer Bedeutung sein könnten, was letztendlich auch *in vivo* gezeigt werden konnte (WANG *et al.*, 2011).

*S. epidermidis* besitzt im Gegensatz zu *S. aureus* nur ein einziges PSM vom Alpha-Typ, nämlich das  $\delta$ -Toxin (OTTO, 2009). Das  $\delta$ -Toxin inhibiert *in vitro* eine Bindung an

Polymeroberflächen (VUONG *et al.*, 2003), scheint aber, da es *in vivo* im Biofilm kaum exprimiert wird (WANG *et al.*, 2011), somit nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Für die Ablösung der Zellen zuständig und somit elementar für eine Neuinfektion, sind somit auch vorrangig die PSM vom Beta-Typ. Zusätzlich können das Beenden der PIA-Produktion oder Scherkräfte, wie sie beispielsweise in Blutgefäßen durch den Blutstrom erzeugt werden, eine Rolle spielen.

## **1.4 Regulation der Biofilmbildung**

Die Biofilmbildung ist ein vielseitig regulierter Prozess bei dem planktonische Bakterien an einer Oberfläche konglomerieren und eine schützende, extrazelluläre Matrix u.a. aus Exopolysacchariden produzieren.

### **1.4.1 Regulation der PIA-Synthese**

Das Exopolysaccharid PIA des Biofilms wird durch die Produkte des *ica*-Operons synthetisiert. Eine Transposoninsertion in diesem Operon führt zu einem biofilmmnegativen Phänotyp, eine Komplementierung mit *icaADBC* mit einem induzierbaren Promotor wiederum kann die PIA-Produktion wiederherstellen (MACK *et al.*, 1994, 2000; RUPP *et al.*, 1999a). Divergent des *icaADBC*-Genlocus liegt *icaR*, dessen Protein als spezifischer Repressor der *icaADBC*-Transkription identifiziert wurde (CONLON *et al.*, 2002b; GÖTZ, 2002). *icaR* selbst unterliegt wiederum weiteren Regulationsmechanismen. Conlon *et al.* zeigten, dass Ethanol im Medium die Transkription von *icaR* hemmt (CONLON *et al.*, 2002b).

Neben dem *icaADBC*-Locus wurden durch Transposonmutagenese weitere Gene mit Einfluss auf die PIA-Synthese gefunden. Diese Mutanten waren trotz intaktem *icaADBC*-Locus biofilmmnegativ (MACK *et al.*, 2000). Eins dieser durch Transposonmutagenese ausgetauschten Gene war *rsbU* (*regulator of  $\sigma^B$* ) in der *S. epidermidis* M15 Mutante (MACK *et al.*, 2000). RsbU ist einer der Regulatoren für den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  (KNOBLOCH *et al.*, 2001). Sigmafaktoren sind eine Untereinheit der RNA-Polymerase und für die Erkennung von Promotoren und somit der Bildung des RNA-Polymerasen-DNA-Komplexes zuständig. Sie werden nach initiiertem Transkription wieder freigesetzt, für die Elongation reicht das übrig gebliebene Kern-Enzym (MADIGAN *et al.*, 2000). Der alternative Sigmafaktor  $\sigma^B$  wurde erstmalig in *Bacillus subtilis* beschrieben und ist dort Stresssignal, unter anderem für Hitze, Ethanol, oxidativen Stress, Säuren und Substratmangel.  $\sigma^B$  findet sich als globaler Stressregulator aber auch in anderen Gram-positiven

Organismen, wie *S. aureus* und *S. epidermidis* (HALDENWANG & LOSICK, 1980; HECKER & VÖLKER, 2001; KNOBLOCH *et al.*, 2004; KULLIK & GIACHINO, 1997; GERTZ *et al.*, 2000). Wie auch bei *S. aureus*, ist das *S. epidermidis* *sigB*-Operon kleiner als das von *B. subtilis* und enthält nur vier Gene, die *sigB*-Regulatoren *rsbUVW* (*regulator of  $\sigma^B$* ) und *sigB* (HECKER & VÖLKER, 2001; KNOBLOCH *et al.*, 2001). Die Funktion dieser Gene wurde für *S. epidermidis* von Knobloch *et al.* durch ihre Deletion ermittelt (KNOBLOCH *et al.*, 2004). In *S. epidermidis* führt die Deletion von  $\sigma^B$  zu einer Reduktion der Biofilmbildung (KNOBLOCH *et al.*, 2001). Durch den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  wird die *icaR*-Transkription über einen bislang unbekanntem Mediator gehemmt werden und führt einer gesteigerten *icaADBC*-Expression (KNOBLOCH *et al.*, 2004). Darüberhinaus wurde die Funktion der Regulatoren des alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  ermittelt. Es wurde gezeigt, dass RsbU

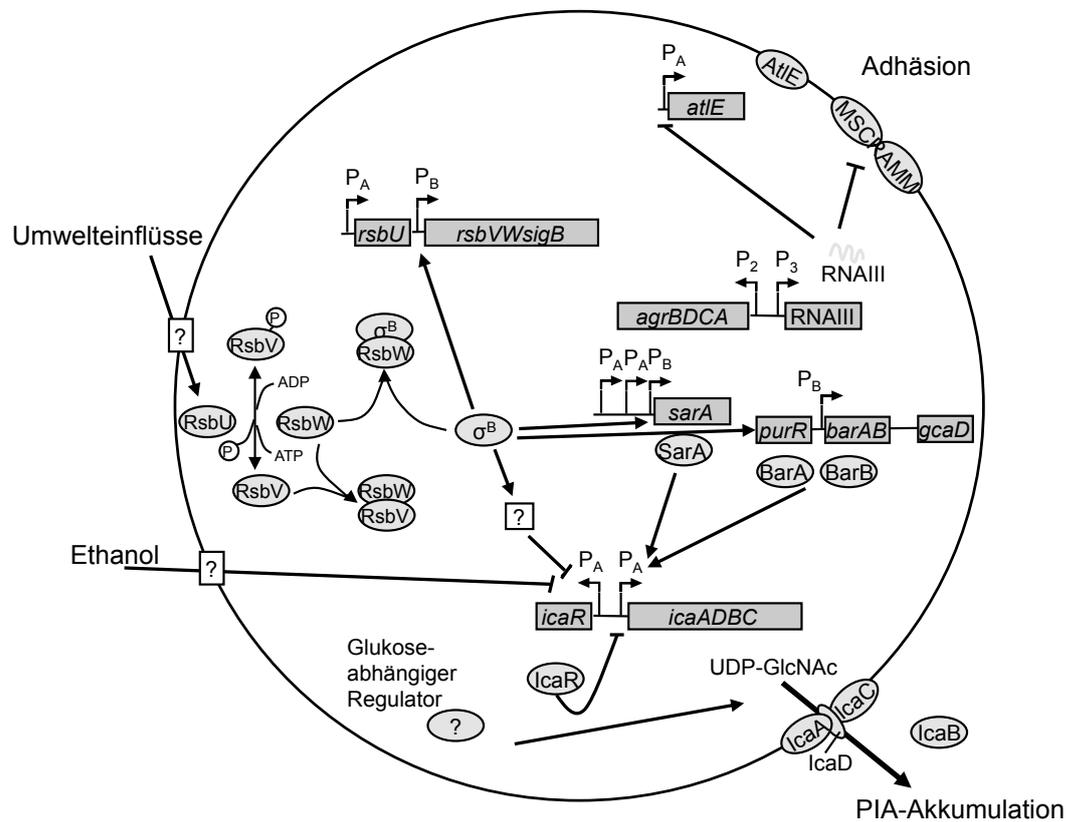


Abbildung 1-2 Regulatormodell der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* nach Mack, 2006  
 Die PIA-Synthese erfolgt durch die Proteine IcaA, IcaD, IcaB und IcaC aus UDP-aktiviertem N-Acetylglucosaminglykanresten, welche unter anderem durch GcaD synthetisiert werden. Die Ica-Proteine sind zusammen im *ica*-Operon codiert, dessen Transkription durch den spezifischen Repressor IcaR gehemmt wird. Die Transkription von *icaR* dahingegen wird via eines unbekanntem Intermediats durch den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  und Ethanol gehemmt. Die Aktivität des alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  unterliegt einer Regulationskaskade: RsbW ist Anti-Sigmafaktor und RsbV-spezifische Kinase, RsbV ist im dephosphorylierten Zustand Anti-anti-Sigmafaktor, RsbU ist eine RsbV-spezifische Phosphatase. Weitere Positivregulatoren der *icaADBC*-Transkription sind die Proteine BarA, BarB und SarA. Das *agr*-System reprimiert die für die primäre Adhäsion benötigten MSCRAMM und AtIE. In Rechtecken wurden Gene, in Ovalen Proteine dargestellt.  $P_A$  gibt einen  $\sigma^A$ -abhängigen,  $P_B$  einen  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor an.

und RsbV positive Regulatoren und RsbW ein negativer Regulator des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^B$  ist. So fungiert RsbW durch Komplexbildung mit dem Sigmafaktor  $\sigma^B$  mittels Protein-Protein-Interaktionen als Anti-Sigmafaktor, indem es dessen Bindung an die RNA-Polymerase verhindert. RsbV konkurriert im dephosphorylierten Zustand mit  $\sigma^B$  um Komplexbildung mit RsbW und ist somit ein Anti-anti-Sigmafaktor. RsbV wird durch RsbU, einer RsbV-spezifische Phosphatase, dephosphoryliert und durch RsbW, welches darüber hinaus eine Kinaseaktivität besitzt, phosphoryliert (KNOBLOCH *et al.*, 2004; MACK *et al.*, 2007). In einer Zelle, die keinem Stress unterliegt, liegt RsbV größtenteils im phosphorylierten Zustand vor, sodass  $\sigma^B$  durch RsbW inaktiviert wird. Dieses „*partner switching*“ Modell findet sich ebenfalls in *B. subtilis* und *S. aureus* (AKBAR *et al.*, 1997; ALPER *et al.*, 1994). Eine basale Transkription dieser Gene erfolgt durch einen Promotor, der durch den *Housekeeping* Sigmafaktor  $\sigma^A$  initiiert wird (KNOBLOCH *et al.*, 2001). Zu der genannten basalen  $\sigma^A$ -abhängigen Transkription des *sigB*-Operons findet zusätzlich eine Autoregulation durch einen  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor statt, der strangaufwärts des *rsbVWsigB*-Locus liegt (KNOBLOCH *et al.*, 2001).

Eine weitere biofilmnegative Transposonmutante ist *S. epidermidis* M12 (MACK *et al.*, 2000). M12 trägt eine Insertion in dem zu *B. subtilis*, *Lactococcus lactis* und *S. aureus* homologen *purR*-Gen (*purine repressor*) (KNOBLOCH *et al.*, 2003; MACK *et al.*, 2000). In *B. subtilis* ist PurR der Repressor des *pur*-Operons, das für Enzyme der Purinbiosynthese kodiert (WENG *et al.*, 1995). PurR bindet an einer Konsensussequenz des *pur*-Operons, die in *Lactococcus lactis* Pur-Box genannt wurde, dort jedoch ein Transkriptionsaktivator der *pur*-Gene ist (KILSTRUP *et al.*, 1998). Eine Konsensussequenz im Sinne einer Pur-Box findet sich bei *S. epidermidis* weder im *icaADBC*-Genlocus, noch bei seinem Negativregulator *icaR*, sodass eine direkte Regulation dieser Gene durch PurR nicht wahrscheinlich ist (KNOBLOCH *et al.*, 2003). Eine Transposoninsertion in *purR* führt jedoch nicht nur zum Verlust der Transkription von *purR*, sondern auch dreier anderer Gene, nämlich dem strangaufwärts liegenden *ispE* und den strangabwärts liegenden *barA* und *barB* (*biofilm associated regulator*) (JONAS, 2009). Dies wird auf die gleichzeitige Deletion des für die Transkription des *barAB*-Genlocus benötigten und in der kodierenden Sequenz vor *purR* enthaltenen Sequenz des  $\sigma^B$ -abhängigen-Promotors zurückgeführt (JONAS, 2009; KNOBLOCH *et al.*, 2003). Für *barAB* besteht eine Sequenzhomologie zum *yabJ-spoVG*-Operon in *B. subtilis* und *S. aureus* (BARTSCHT, 2001). In *B. subtilis* reguliert YabJ die Purinbiosynthese negativ, SpoVG ist dahingegen an der Sporenbildung und asymmetrischen Septierung beteiligt (MATSUNO & SONENSHEIN, 1999; SINHA *et al.*, 1999).

In *S. epidermidis* wurde die Funktion der Produkte des *barAB*-Genlocus in dieser Arbeitsgruppe erforscht. Nach der Konstruktion von Deletionsmutanten der vier Gene konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von *barA* zu einer mäßig verminderten Biofilmbildung und die Deletion von *barB* zu einem biofilmnegativen Phänotyp führte (JONAS, 2009). Dies ließ sich auf eine *icaR*-unabhängige, verminderte *icaA*-Transkription zurückführen, welche auch nicht durch Zugabe von Ethanol oder Natriumchlorid zu dem Medium rückgängig war. Folglich ergibt sich daraus eine positive Regulation durch *barAB* auf den *icaABDC*-Locus, wobei BarB eine essenzielle Bedeutung hat (JONAS, 2009).

600 kB strangabwärts einer nicht kodierenden Region des *barAB*-Locus liegt *gcaD*, die Transkription erfolgt jedoch unabhängig von *barAB* (BARTSCHT, 2001). Die Funktion von *gcaD* (Alternativname *glmU*) in *S. epidermidis* ist aufgrund der Sequenzhomologie zu *B. subtilis* und *Escherichia coli* wahrscheinlich eine bifunktionale N-Acetylglukosamin-1-phosphat Uridyltransferase/ Glukosamin-1-phosphat Acetyltransferase, die der Biosynthese von UDP-aktivierten N-Acetylglukosamin, einem essenziellen PIA-Bestandteil, dient (Gill *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2009; Olsen & Roderick, 2001; Wang *et al.*, 2004). Weitere Untersuchungen zu GcaD in *S. epidermidis* sind unter anderem Bestandteil dieser Arbeit.

Ein weiterer globaler Regulator mit positivem Einfluss auf die *icaADBC*-Transkription ist *sarA* (*staphylococcus accessory regulator*) (FLUCKIGER *et al.*, 1998). *sarA*-Mutanten und -Phasenvarianten, mit folglich inaktivierten *sarA*, zeigen IcaR-unabhängig eine verminderte Transkription von *icaADBC* und einen biofilmnegativen Phänotyp (CONLON *et al.*, 2004; TORMO *et al.*, 2005b). Dies lässt sich durch Bindung des Protein SarA an den *icaA*-Promotor erklären (TORMO *et al.*, 2005b). Weiterhin wurde gezeigt, dass durch die Zugabe von Ethanol *icaADBC* wieder vermehrt transkribiert wurde, wobei es jedoch nicht zu einer Biofilmbildung kam, was auf eine weitere SarA-vermittelte posttranskriptionelle Regulation hinweist (CONLON *et al.*, 2004). Von drei vorhandenen *sarA*-Promotoren ist einer  $\sigma^B$ -abhängig (FLUCKIGER *et al.*, 1998), trotz allem scheint SarA die PIA-Synthese unabhängig von  $\sigma^B$  zu regulieren (HANDKE *et al.*, 2007; JÄGER *et al.*, 2009).

Ein weiterer Positivregulator der PIA-Synthese wurde 2008 von Wang *et al.* beschrieben. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu einem Protein aus *S. aureus* wurde es ebenfalls *sarZ* genannt (KAITO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2008) Es konnte gezeigt werden, dass *sarZ* in *S. epidermidis* sowohl die primäre Adhäsion, als auch die Akkumulation fördert.

### 1.4.2 Quorum sensing

*Quorum sensing* befähigt Bakterien zur interzellulären Kommunikation und Koordination des Wachstums bei ansteigender Populationsdichte. Im Biofilm verhalten sich die Bakterien somit wie ein multizellulärer Organismus. Dies wird durch hormonähnliche Moleküle vermittelt, den Autoinducern, die freigesetzt und detektiert werden können (Bassler, 1999). Gram-positive Bakterien benutzen unter anderem nicht-membrangängige, prozessierte Oligopeptide als Autoinducer (Miller & Bassler, 2001). In der sich vermehrenden Population kommt es zu einem interzellulären Konzentrationsanstieg des Autoinducers, der daraufhin ein membranassoziertes Zweikomponenten-System aktiviert (Waters & Bassler, 2005). Dies führt zur Aktivierung einer Sensorkinase mit konsekutiver Phosphorylierung eines Antwortregulators, der die Genexpression an die neue Populationsdichte anpasst (Miller & Bassler, 2001; Novick & Geisinger, 2008; Waters & Bassler, 2005). *S. epidermidis* besitzt zwei bekannte *Quorum sensing* Systeme. Bei den in *S. epidermidis* beschriebenen *Quorum sensing* Systemen handelt es sich um das besser untersuchte *accessory gene regulator* System (*agr*) und das *luxS*-System (OTTO *et al.*, 1998; XU *et al.*, 2006). Beide Systeme reprimieren die Biofilmbildung (VUONG *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2006).

#### 1.4.2.1 Das *agr*-System

Der *agr*-Locus besteht aus dem für RNAPII kodierenden *agr*-Operon mit Promotor P<sub>2</sub> und dem divergenten RNAPIII-Locus mit dem Promotor P<sub>3</sub> (Novick *et al.*, 1995). Das *agr*-Operon besteht aus den vier Genen *agrBDCA*. *agrD* kodiert hierbei für das Signaloligopeptid AIP (*autoinducing peptide*), welches von dem membranständigen AgrB Protein von intra- nach extrazellulär transportiert und modifiziert wird (Ji *et al.*, 1995). AgrC ist ein membranständiger AIP-Rezeptor, der zusammen mit AgrA eine Zweikomponenten-Rezeptorkinase bildet (Novick *et al.*, 1995). Bindet AIP an die Sensorkinase AgrC, wird AgrA phosphoryliert, welches wiederum eine erneute Transkription von den Promotoren P<sub>2</sub> und P<sub>3</sub> initiiert und somit eine Autoinduktion bewirkt.

RNAPIII besitzt einen offenen Leserahmen für  $\delta$ -Hämolyisin, die Hauptfunktion liegt aber in den regulatorischen Fähigkeiten (NOVICK *et al.*, 1993; NOVICK & GEISINGER, 2008). Das *agr Quorum sensing* System wird in der postexponentiellen Phase aktiviert (NOVICK & MUIR, 1999; RECSEI *et al.*, 1986; VUONG *et al.*, 2000a). Durch RNAPIII werden Exoproteine wie Proteasen und Lipasen induziert und die Expression von Oberflächenproteinen reprimiert (VUONG *et al.*, 2000a). Gleichzeitig werden aber auch Transkriptionsregulatoren und Regulatoren von Stressantworten beeinflusst. Die Deletion von *agr* führt auch zur

Hochregulierung von  $\sigma^B$ , RsbV und RsbW (YAO *et al.*, 2006). Die Bedeutung von *agr* für die Biofilmbildung konnte ebenfalls mittels *agr* Deletion gezeigt werden. Diese führte zu einer verstärkten Biofilmbildung, besseren Anhaftung an Styropor oder menschliche Epithelzellen und verstärkten AtlE Expression (VUONG *et al.*, 2000b, 2003). Für die akkumulative Phase scheint *agr* jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen, da sie keinen Einfluss auf die *icaADBC*-Transkription oder PIA-Menge hat (VUONG *et al.*, 2003). Interessanterweise sezernieren die *agr*-Mutanten keine PSM. PSM spielen neben ihrer Rolle für die Strukturierung und Ablösung des Biofilms, ebenfalls eine Bedeutung als PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002; VUONG *et al.*, 2004a). Durch Aktivierung des *agr* *Quorum sensing* Systems in der postexponentiellen Phase werden PSM erst sezerniert, wenn ausreichend Biofilm vorhanden ist und somit eine vorzeitige Aktivierung des Immunsystems verhindert. Somit spielt das *agr* *Quorum sensing* System eine wichtige Rolle für die Interaktion mit dem angeborenen Immunsystems über Regulierung der PSM (VUONG *et al.*, 2004a).

### **1.4.3 Regulation durch externe Faktoren**

Eine Biofilmbildung kann durch externe Stressfaktoren induziert werden. Eine dieser Stresskonditionen ist eine subinhibitorische Antibiotikumkonzentration, wie sie beispielsweise für Tetracycline, die Streptograminkombination aus Quinupristin-Dalfopristin und im geringeren Umfang auch für Erythromycin nachgewiesen wurde (FITZPATRICK *et al.*, 2002; RACHID *et al.*, 2000). Ein für die Humanmedizin kritischer Faktor sind Desinfektionsmittel wie Ethanol, n-Propanol und Isopropanol, weil sie die Frage aufwerfen, ob durch Benutzung dieser Mittel fremdkörperassoziierte Infektionen gefördert werden (KNOBLOCH *et al.*, 2002b). Darüber hinaus zeigten auch externer Stress durch hohe Temperaturen und anaerobe Bedingungen, eine Limitation an Eisen sowie eine niedrige Glukosekonzentration und hohe Osmolarität des Mediums eine biofilminduzierende Wirkung (CRAMTON *et al.*, 2001; DEIGHTON & BORLAND, 1993; DOBINSKY *et al.*, 2003; MACK *et al.*, 1992; RACHID *et al.*, 2000).

## **1.5 Resistenz gegen das Immunsystem und die Antibiotikatherapie**

Viele der nosokomialen *S. epidermidis*-Stämme bilden einen Biofilm (KNOBLOCH *et al.*, 2002b) auf der Oberfläche von Fremdkörpern und sind auf diese Weise gegenüber dem Immunsystem und einer Antibiotikatherapie unempfindlich (COSTERTON, 1999). Für die

Biofilmbildung ist die PIA-Synthese durch das *ica*-Operon wesentlich. In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass das *ica*-Operon vor allem in nosokomialen *S. epidermidis* Isolaten vorhanden ist (ZIEBUHR *et al.*, 1997).

Es wurden viele Gründe diskutiert, weshalb das Immunsystem und Antibiotika bei Biofilmen nur eine stark limitierte Wirkung haben. Eine mögliche Ursache ist, dass sesshafte Zellen in einem Biofilm in ihrer Genexpression massiv von planktonischen Zellen unterscheiden (COSTERTON, 2003), indem basale zelluläre Prozesse wie Nucleinsäure-, Protein- und Zellwandbiosynthese heruntergefahren werden (OTTO, 2009). Sich rasch vermehrende planktonische Zellen in der exponentiellen Phase sind im Vergleich zu Zellen im Biofilm empfindlicher gegenüber Antibiotika (SPOERING & LEWIS, 2001). Es wurde vermutet, dass Zellen in einem Biofilm im Vergleich zu planktonischen, stationären Zellen resistenter gegenüber Antibiotika sind, dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein. Zellen in einem Biofilm scheinen unter bestimmten Bedingungen genauso empfindlich gegenüber Antibiotika zu sein wie planktonische, stationäre Zellen und werden durch Antibiotika abgetötet (BROOUN *et al.*, 2000; LEWIS, 2001). Ursächlich hierfür ist eine Subpopulation sogenannter Persister-Zellen, die im Biofilm tolerant gegenüber multiplen Antibiotika und dem Immunsystem sind (KNOBLOCH *et al.*, 2002a; LEWIS, 2010; WIUFF *et al.*, 2005). Nach einer Antibiotikatherapie verbleiben im Biofilm bei intaktem Immunsystem nur eine bestimmte Anzahl von Persistern. Es handelt sich hierbei nicht um eine zellzyklusbedingte Eigenschaft oder Mutation der Zellen, sondern um temporäre phänotypische Varianten (LEWIS, 2001, 2010). Im Gegensatz zur klassischen Resistenz, die mit Erhöhung der minimalen Hemmkonzentration einhergeht und es Zellen erlaubt, in einem sonst letalen Umfeld zu wachsen, können Persister weder sterben noch wachsen (CORREIA *et al.*, 2006). Die Entstehung und Wiederbelebung dieser Zellen ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Bekannt ist jedoch, dass eine Stressantwort der Zelle auf DNA-Schäden, wie sie beispielsweise durch Ciprofloxacin verursacht werden, zu einer Induktion von Toxin/Antitoxin-Modulen in der Zelle führt, die basale zelluläre Prozesse steuern (CORREIA *et al.*, 2006; DÖRR *et al.*, 2010; KORCH & HILL, 2006).

Erschwerend für die Therapie der fremdkörperassoziierten Infektionen kommt hinzu, dass *S. epidermidis* im Biofilm fähig ist, der Immunreaktion zu entgehen. Obwohl Phagozyten den Biofilm durchwandern können und eine vermehrte Komplementaktivierung erfolgt, werden im Biofilm lebende Bakterien nicht abgetötet (CERCA *et al.*, 2006; JOHNSON *et al.*, 1986, 1986; KRISTIAN *et al.*, 2008; VUONG *et al.*, 2004b). Es wurde nachgewiesen, dass die extrazelluläre Matrix des Biofilms die gegen sie gerichteten Antikörper auffängt und somit

eine effektive Phagozytose der Bakterien verhindert (CERCA *et al.*, 2006). Die Therapie fremdkörperassoziierter Infektionen wird zusätzlich durch eine Freigabe von Bakterien aus dem Biofilm und die konsekutive Kolonisation anderer Fremdkörper aggraviert (MACK *et al.*, 2007), folglich ist durch eine Persistenz der Erreger im Biofilm auf dem Fremdkörper häufig eine Entfernung des Fremdkörpers nötig (MACK *et al.*, 2007; ROGERS *et al.*, 2009).

## 1.6 Fragestellung

Aufgrund der zunehmenden Inzidenz fremdkörperassoziierter Infektionen durch *S. epidermidis* und einer häufigen Resistenz gegen Antibiotika ist die Forschung auf dem Gebiet der Biofilmbildung in den letzten Jahrzehnten immer weiter in den Vordergrund gerückt. Das Verständnis um die vielschichtige Regulation der Biofilmsynthese in *S. epidermidis* bietet ein Fundament für die weitere Erforschung der Infektionsprävention und der Generierung neuer spezifischer Therapieoptionen. Aus dieser Arbeitsgruppe war bereits ein vielschichtiges Regulationsmodell der PIA-Synthese bekannt.

In dieser Arbeit sollten systematisch wachstumsabhängige Expressionsmuster diverser Regulatorproteine der PIA-Synthese analysiert werden, um somit weitere Hinweise auf einen globalen Zusammenhang der Regulatoren zu sammeln. Die Expressionsmusteranalysen sollten mittels Western Blot mit Proteinproben von *S. epidermidis* 1457 erfolgen. Hierfür sollten im Flüssigmedium Reinkulturen kultiviert und Proteinproben während unterschiedlicher Wachstumsphasen zu noch zu definierenden Zeitpunkten gewonnen werden. Zum Ausschluss stammspezifischer Expressionsmuster wurden zwei weitere *S. epidermidis* Wildtypstämme, 1057 und 8400, gewählt. Bei besonderen Fragestellungen wurden die Analysen um vorliegende *S. epidermidis* Mutanten ergänzt.

Ausgewählt wurden der alternative Sigmafaktor  $\sigma^B$ , der ein globaler Stressregulator ist, und durch RsbU aktiviert wird, sowie die Positivregulatoren der PIA-Synthese BarA und BarB. Gegen  $\sigma^B$ , RsbU, BarA und BarB gerichtete polyklonale Antiseren lagen in dieser Arbeitsgruppe bereits für Western Blot Analysen vor.

Strangaufwärts von *barAB* liegt das zu *Bacillus subtilis* und *S. aureus* homologe *purR*, dessen Bedeutung für die Biofilmsynthese zu Beginn dieser Arbeit noch nicht geklärt war. Zusätzlich wurde der spezifische Repressor des *icaADBC*-Locus, IcaR, gewählt, sowie das Enzym GcaD, welches das für die PIA-Synthese benötigte N-Acetylglukosamin synthetisiert. Gegen PurR, IcaR und GcaD gerichtete polyklonale Antiseren sollten im Rahmen dieser Arbeit in Kaninchen generiert und für anschließende Western Blot Analysen verwendet werden.

## 2 Material

### 2.1 Bakterienstämme

Tabelle 2-1 In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Stämme	relevante Charakteristika	Referenz
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
1457	Katheterisolat, stark biofilmpositiv	MACK <i>et al.</i> , 1992
1057	ZVK-Isolat, schwach biofilmpositiv	MACK <i>et al.</i> , 1996
8400	Blutkulturisolat, schwach biofilmpositiv	MACK <i>et al.</i> , 1992
1457sigB	sigB:: <i>erm</i> , biofilmreduziert	KNOBLOCH <i>et al.</i> , 2004
1457barA	barA:: <i>erm</i> , biofilmreduziert	JONAS, 2009
1457barB	barB:: <i>erm</i> , biofilmnegativ	JONAS, 2009
1457barAB	barAbarB:: <i>erm</i> , biofilmnegativ	JONAS, 2009
1457agr	agr:: <i>spec</i> , verstärkt biofilmpositiv	VUONG <i>et al.</i> , 2003
1457sigBagr	agr:: <i>spec</i> sigB:: <i>erm</i> , biofilmreduziert	SCHEWE, 2009
<i>Escherichia coli</i>		
Top10	<i>F</i> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697	Invitrogen
DH5 $\alpha$	<i>F</i> <i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacUI169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i> $\lambda^-$ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	HANAHAH, 1985
BL21-AI	<i>F</i> <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>araB</i> ::T7RNAP- <i>tetA</i>	Invitrogen
BL21 Star (DE3)pLysS	<i>F</i> <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>rne131</i> (DE3) <i>pLysS</i> (CamR)	Invitrogen

## 2.2 Plasmide

Tabelle 2-2 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	relevante Charakteristika	Referenz
pDONR <sup>TM</sup> 221	4762 bp, <i>attP1</i> und <i>attP2</i> , Cm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , <i>ccdB</i> , Primer-Bindungsstellen für M13_for und M13_rev	Invitrogen
pDEST <sup>TM</sup> 17	6354 bp, <i>attR1</i> und <i>attR2</i> , 6His-tag, Cm <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup> , <i>ccdB</i>	Invitrogen
pENTRY- <i>icaR</i>	Klonierungsvektor mit <i>icaR</i> -Gen, <i>attP1</i> und <i>attP2</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pENTRY- <i>gcaD</i>	Klonierungsvektor mit <i>gcaD</i> -Gen, <i>attP1</i> und <i>attP2</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pENTRY- <i>purR</i>	Klonierungsvektor mit <i>purR</i> -Gen, <i>attP1</i> und <i>attP2</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEXPR- <i>icaR</i>	Expressionsvektor mit <i>icaR</i> -Gen, <i>attB1</i> und <i>attB2</i> , 6xHis-tag, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEXPR- <i>gcaD</i>	Expressionsvektor mit <i>gcaD</i> -Gen, <i>attB1</i> und <i>attB2</i> , 6xHis-tag, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEXPR- <i>purR</i>	Expressionsvektor mit <i>purR</i> -Gen, <i>attB1</i> und <i>attB2</i> , 6xHis-tag, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit

## 2.3 Nährmedien

Die Nährmedien wurden in *aqua bidest.* angesetzt und autoklaviert (121 °C, 1,2 bar, 15 min). Für Agarplatten wurde dem entsprechendem Medium 1,2 % (w/v) Bacto-Agar hinzugefügt.

Tabelle 2-3 In dieser Arbeit verwendete Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
1x SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,05 % (w/v) NaCl 2,5 mM KCl 20 mM MgCl <sub>2</sub> 20 mM Glukose pH 7,0
Luria-Bertani-Medium (LB)	2 % (w/v) LB Broth
Trypton Soja Brühe (TSB)	3 % (w/v) TSB

*Material*


---

Tym Brühe	2 %	Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	0,1 M	NaCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>

---

**2.4 Antibiotika**

Tabelle 2-4 In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

---

Bezeichnung	Lösungsmittel	Selektionskonzentration
Ampicillin	aqua bidest.	70 µg/ml in <i>E. coli</i>
Kanamycin	aqua bidest.	100 µg/ml in <i>E. coli</i>

---

**2.5 Oligonuklotide**

Tabelle 2-5 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

---

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
Klonierung der Expressionsvektoren	
<i>purR_attB1_for</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTGAAAAG ATGAGATATAAAAGAAG
<i>purR_attB2_rev</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAAGAA AATTAGACAAACTGTT
<i>icaR_attB1_for</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGGAGATT TTAGAATTGAAAGATAAG
<i>icaR_attB2_rev</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTTTGAA ATCTCGAATTTGTTACATAC
<i>gcaD_attB1_for</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCAA AGACATGCGATTATTC
<i>gcaD_attB2_rev</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCAAGAAC TATTTTTTTAGGTAGC
Transformationskontrolle	
<i>icaR_for</i>	GGGAGATTTTAGAATTGAAAGATAAG
<i>icaR_rev</i>	CTTTTGAAATCTCGAATTTGTTACATAC
<i>gcaD_for</i>	TCATGCAAAGACATGCGATTATTC
<i>gcaD_rev</i>	GCAAGAACTATTTTTTTAGGTAGC
<i>purR_for</i>	TTGAAAAGAT GAGATATAAAAGAAG

Die hier abgebildeten Oligonukleotide wurden von der Fima Eurofins MWG Operon synthetisiert

## 2.6 Enzyme

Tabelle 2-6 In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller
Klonasen		
Gateway BP Clonase™ II enzyme mix	0,5 Reakt./ $\mu$ l	Invitrogen
Gateway LR Clonase™ II enzyme mix	0,5 Reakt./ $\mu$ l	Invitrogen
Polymerasen		
DyNAzyme™ II	2 U/ $\mu$ l	Finnzymes
PCR Extender Polymerase Mix	5 U/ $\mu$ l	5Prime
weitere Enzyme		
DNase I Amplification Grade	1 U/ $\mu$ l	Invitrogen
Lysostaphin	1,5 U/ $\mu$ l	Genmedics
Proteinase K	2 $\mu$ g/ $\mu$ l	Invitrogen
Lysozym	0,2 mg/ml	Sigma

## 2.7 Antikörper

Tabelle 2-7 In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Bezeichnung	eingesetzte Verdünnung	Referenz
Ziegen Anti-Kaninchen IgG, monoklonal Alkalische Phosphatase konjugiert	1:30000	Invitrogen
Anti-RsbU_Sepi, polyklonal	1:1000	JONAS, 2009
Anti-SigB_Sepi, polyklonal	1:1000	JONAS, 2009
Anti-BarA_Sepi, polyklonal	1:1000	JONAS, 2009
Anti-BarB_Sepi, polyklonal	1:5000	JONAS, 2009
Anti-IcaR_Sepi, polyklonal	1:1000	diese Arbeit
Anti-GcaD_Sepi, polyklonal	1:1000	diese Arbeit
Anti-PurR_Sepi, polyklonal		diese Arbeit

Alle polyklonalen Seren wurden in Kaninchen generiert.

## 2.8 Kits

Tabelle 2-8 In dieser Arbeit verwendete Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Bio-Scale™ Mini Profinity™ IMAC cartridges	Proteinaufreinigung	Bio-Rad
DyNAzyme™ II DNA Polymerase Kit	Amplifikation von DNA- Fragmenten	Finnzymes
<i>E. coli</i> Expression System with Gateway® Technology	Proteinüberexpression	Invitrogen
HiTrap NHS-activated HP	Antikörper Aufreinigung	GE-Healthcare Biosciences
NucleoSpin® Extract II	PCR-Produkt Aufreinigung	Marcherey & Nagel
NucleoSpin® Tissue	Isolation chromosomaler DNA	Marcherey & Nagel
PCR Extender System	Amplifikation von DNA- Fragmenten, High Fidelity PCR	5Prime
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Plasmidisolation	PEQLAB

## 2.9 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien handelt es sich, soweit nicht anders angegeben, um analysereine Substanzen der Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland).

Tabelle 2-9 In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Amicon Ultra Centrifugal Filter Device 4 5k	Millipore
BCIP	Applichem
Blutagarplatten	Biomerieux
Quick Start™ Bradford dye agent	Bio-Rad
BSA	New England Biolabs
Complete, EDTA-free	Roche
Coomassie brilliant blue R250	Roth

*Material*


---

Cryobank, Stammhaltungssystem für Mikroorganismen	Mast Diagnostics
Ethidiumbromidlösung 1 %	Fluka
Freundsches Adjuvans, inkomplett	Sigma
Freundsches Adjuvans, komplett	Sigma
Halbmikroküvetten	Sarstedt
L(+)-Arabinose	Sigma
LB	Sigma
MES-Puffer 20x	Invitrogen
Milchpulver	Roth
NBT	Applichem
NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gels	Invitrogen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Roti®-PVDF-Membran	Roche
SeeBlue2®Plus	Invitrogen
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas
Sterilfilter MILLEX.GV 0,22 µm Poren	Millipore
TSB	Becton Dickinson
UVette	Eppendorf

---

**2.10 Puffer und Lösungen**

Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit *aqua bidest.* angesetzt. Sofern nicht anders angegeben, stammten die eingesetzten Chemikalien von den Firmen Carl Roth, Merck und Sigma-Aldrich.

1x NuPage Transferpuffer	1x NuPage Transferpuffer	
	10 % (v/v)	Methanol
5x TBE-Puffer	45 mM	Tris
	45 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA

*Material*


---

6x DNA-Probenpuffer	0,25 % (w/v) 30 % (v/v) 0,25 % (w/v) 50 mM	Bromphenolblau Glycerol Xylencyanol EDTA
10xTBS	0,49 M 9 % (w/v) pH 7,6	Tris NaCl
AP-Puffer	0,1 M 0,1 M	TrisHCl pH 9,5 NaCl
Blotto	50 ml 2,5 % (w/v) 0,05 % (v/v) ad 500 ml	10x TBS Magermilchpulver Tween <i>aqua bidest.</i>
Coomassie-Brilliantblau	800 ml 140 ml 2 g ad 2 l	Methanol Essigsäure Coomassie brilliant blue G250 <i>aqua dest.</i>
Coomassie-Entfärber	800 ml 140 ml ad 2 l	Methanol Essigsäure <i>aqua dest.</i>
Probenpuffer (3x Laemmli)	15 % (v/v) 1,5 % (v/v) 0,15 M 7,5 % (w/v) 0,03 % (w/v)	Glycerol beta-Mercaptoethanol Tris pH 6,8 SDS Bromphenolblau
Semidry Transferpuffer	48 mM 39mM 20 % (v/v) 1,3 % (w/v) pH 9,2	Tris Glycin Methanol SDS
Tbfl-Puffer	30 mM 50 mM 100 mM 10 mM 15 % (v/v)	KoAc RbCl <sub>2</sub> KCl CaCl <sub>2</sub> Glycerin
TbflI-Puffer	10 mM 75 mM 10 mM 15 % (v/v)	Na-MOPS pH 7,0 CaCl <sub>2</sub> KCl Glycerin

*Material*

---

TE-Puffer	10 mM 1 mM pH 7,4	Tris EDTA
-----------	-------------------------	--------------

**Antikörper Aufreinigung**

Blockierender Puffer	0,5 M 0,5 M pH 8,3	Ethanolamin NaCl
----------------------	--------------------------	---------------------

Waschpuffer	0,1 M 0,5 M pH 4	Azetat NaCl
-------------	------------------------	----------------

Kopplungspuffer	0,2 M 0,5 M pH 8,3	NaHCO <sub>3</sub> NaCl
-----------------	--------------------------	----------------------------

Bindepuffer	20 mM 0,5 M pH 7,4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaCl
-------------	--------------------------	--

Elutionspuffer	100 mM pH 3	Glycin
----------------	----------------	--------

**Proteinaufreinigung**

Waschpuffer I, denaturierend	300 mM 50 mM 5 mM 6 M	KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Imidazol Harnstoff
------------------------------	--------------------------------	---

Waschpuffer II, denaturierend	300 mM 50 mM 10 mM 6 M	KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Imidazol Harnstoff
-------------------------------	---------------------------------	---

Elutionspuffer	300 mM 50 mM 250 mM 6 M	KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Imidazol Harnstoff
----------------	----------------------------------	---

Für die native Proteinaufreinigung wurden alle drei Puffer ohne Harnstoff hergestellt.

## 2.11 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 2-10 In dieser Arbeit verwendete Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Biofuge 22R	Roche
Brutschrank Hera Cell 240	Heraeus
Brutschüttelinkubator	Edmund Bühler
FlexCycler	Analytik Jena
GelAir Dryer	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammer	PEQLAB
Infinite M200	Tecan
J2-2 Centrifuge	Beckmann
Kamera RLR	Kaiser
pH-Meter MP200	Mettler Toledo
Power supply Ev321	PEQLAB
Precellys 24	PEQLAB
SmartSpec™ Plus Spectrophotometer	Bio-Rad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultraschallsonde	Bandelin Sonopuls
UV-Transilluminator	Vilber Lourmat
Vario perpex	LKB
Wasserbad GFL 1083	GFL
XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen
Zentrifuge 5418	Eppendorf
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

## 2.12 Software und Datenbanken

Tabelle 2-11 In dieser Arbeit verwendete Software, Datenbanken oder Tools

Datenbank/ Software/ Tool	Funktion	Quelle/Hersteller
ClustalW2	Erstellen von Alignments	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
ExPASy Translate Tool	Konvertieren einer DNA-Sequenz in eine Proteinsequenz	ExPASy Proteomics Server: <a href="http://web.expasy.org/translate/">http://web.expasy.org/translate/</a>
KEGG-Pathway	Metabolismus in <i>S. epidermidis</i> :	<a href="http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html">http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html</a>
	Aminozuckermetabolismus	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ser00520">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ser00520</a>
	Glykolyse/Glukoneogenese	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ser00010">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ser00010</a>
	Citratzyklus	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ser00020">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ser00020</a>
NCBI-Server	Bezug aller Gen- und Proteinsequenzen	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Vector NTI	Theoretische Plasmidkonstruktion, Arbeiten mit DNA-Sequenzen	Invitrogen

### 3 Methoden

#### 3.1 Kultur und Lagerung bakterieller Zellen

##### 3.1.1 Kultivierung bakterieller Zellen

Die Kultivierung bakterieller Zellen auf Festnährböden erfolgte im Brutschrank über Nacht (üN) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Bei Verwendung von Flüssigmedien erfolgte die Anzucht, wenn nicht anders angegeben, in einem Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 150 Upm im Schüttelinkubator. Für die Hauptkultur erfolgte aus einer 5 ml üN-Vorkultur (16 h) die Inokulation auf eine optische Dichte von 0,05 bei 600 nm (OD<sub>600nm</sub>). Für die verwendeten Medien sowie Antibiotika gibt Tabelle 3-1 einen Überblick. Wenn nötig, erfolgte die Supplementierung des TSB mit 3 % Ethanol.

Zur Stammhaltung wurden Kryokulturen laut Angaben des Herstellers angelegt und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 3-1 In dieser Arbeit bestehende Kultivierungsbedingungen

Organismus	Nährmedium	Antibiotikum	Selektionskonzentration
<i>S. epidermidis</i>			
1457	Blutagar / TSB		
1057	Blutagar / TSB		
8400	Blutagar / TSB		
1457 <i>sigB</i>	TSB	Erythromycin	50 µg/ml
1457 <i>barA</i>	TSB	Erythromycin	50 µg/ml
1457 <i>barB</i>	TSB	Erythromycin	50 µg/ml
1457 <i>barAB</i>	TSB	Erythromycin	50 µg/ml
1457 <i>agr</i>	Blutagar / TSB		
1457 <i>sigBagr</i>	TSB	Erythromycin	50 µg/ml
<i>E. coli</i>			
Top10	LB / Tym-Brühe	Kanamycin	50 µg/ml
DH5α	LB / Tym-Brühe	Ampicillin	50 µg/ml

---

BL21-AI	LB / Tym-Brühe	Ampicillin	50 µg/ml
BL21 Star	LB / Tym-Brühe	Ampicillin Chloramphenicol	50 µg/ml 34 µg/ml

---

### 3.1.2 Ermittlung der Zellmasse in Flüssigmedien

Die Zellmasse einer Flüssigkultur wurde indirekt durch Messung der Trübung der Bakteriensuspension, der optischen Dichte (OD), ermittelt. Die Bestimmung erfolgt mittels Photometer bei 600 nm in einer Küvette gegen das entsprechende Medium als Leerwert. Dabei wurde auf entsprechende Verdünnungen geachtet, da stark trübe Suspensionen die Messungen und somit die lineare Abhängigkeit von Zellmasse und Zelldichte beeinträchtigen könnten.

### 3.1.3 Wachstumskurven von *Staphylococcus epidermidis* Stämmen

Es wurden Wachstumskurven einer *S. epidermidis* Reinkultur im Flüssigmedium erstellt um geeignete Zeitpunkte für eine Proteingewinnung zu ermitteln. Dafür wurde die optische Dichte logarithmisch über einen Zeitraum von 24 Stunden aufgetragen. Die Messungen erfolgten manuell alle 30 Minuten. Die Kultivierung erfolgte wie unter 3.1.1 angegeben. Anschließend erfolgte die Unterteilung der Wachstumskurve in die exponentielle, transitorische und stationäre Phase.

Um von der optischen Dichte einer *S. epidermidis* Kultur Rückschluss auf die Anzahl der lebenden Zellen zu ziehen zu können, wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) entlang der Wachstumskurve ermittelt. Hierfür wurden ab Animpfung der Hauptkultur halbstündlich die optische Dichte der Kultur bestimmt und gleichzeitig Proben entnommen, mit denen eine Verdünnungsreihe von unverdünnter Zellkultur bis  $10^{-7}$  erstellt wurde. Als nächstes wurden pro Verdünnungsstufe 3 Tropfen à 10µl auf eine Agarplatte getropft. Nach erfolgter Kultivierung wurden die Kolonien pro Tropfen gezählt um die koloniebildenden Einheiten mittels folgender Formel zu berechnen:

$$\text{KBE} \frac{1}{\text{ml}} = \frac{\text{Kolonien}}{10\mu\text{l}} \times \frac{1000}{\text{Verdünnung}}$$

Es wurde der Mittelwert der KBE der jeweiligen drei Tropfen ermittelt und in einem Diagramm gegen die optische Dichte linear aufgetragen. Aus diesen Werten wurde unter Annahme einer annähernden linearen Beziehung eine Regressionsgrade erstellt.

## 3.2 Genetische Manipulation von Zellen

Da *E. coli* Zellen keine natürliche Transformationskompetenz besitzen, wurden sie chemisch kompetent gemacht. Dafür wurden zuerst Vorkulturen mit Top10, DH5 $\alpha$  und BL21 in 5 ml Tym-Brühe über Nacht im Schüttelinkubator wie unter 3.1.1 angegeben kultiviert. Die Vorkulturen wurden darauf auf eine OD<sub>600nm</sub> = 0,05 in 150 ml Tym Brühe angeimpft und erneut im Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0,5 angezüchtet. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Als nächstes wurden die Zellen bei 3000 Upm 15 Minuten lang pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 15 ml TfbI-Puffer pro 50 ml ursprünglicher Zellkultur resuspendiert und für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert, mit 2 ml TfbII-Puffer pro 50 ml ursprünglicher Zellkultur resuspendiert. Die Suspension wurde zuletzt auf 200  $\mu$ l aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Anschließend wurden die chemisch kompetenten *E. coli* Zellen für die Transformation rekombinanter Vektoren verwendet. Dafür wurden zuerst 200  $\mu$ l chemisch kompetenter Zellen auf Eis gelegt und 5-10 ng Vektor-DNA in einem Volumen von 1  $\mu$ l hinzugefügt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte bei 42 °C für 30 s ein Hitzeschock, während dessen das Plasmid in die Zelle aufgenommen wurde. Nach einem sofortigen Transfer auf Eis wurden 250  $\mu$ l auf Raumtemperatur erwärmtes SOC-Medium hinzugefügt und die Zellen für eine Stunde bei 37 °C und 150 Upm kultiviert. Letztendlich wurden zwei unterschiedliche Volumina, 30  $\mu$ l und 70  $\mu$ l, auf LB-Agar mit dem für das Plasmid selektiven Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Erfolg der Transformation wurde mittels Kolonie-PCR überprüft (3.3.2).

## 3.3 Arbeiten mit DNA

### 3.3.1 Isolation chromosomaler DNA aus *Staphylococcus epidermidis* 1457

Für die Isolation chromosomaler DNA wurde das Kit NucleoSpin Tissue verwendet. Dafür wurden 5 ml Vorkultur abzentrifugiert (90 s), in 180  $\mu$ l T1-Puffer resuspendiert und 25  $\mu$ l Proteinase K hinzugefügt. Daraufhin wurde für 3 h bei 56 °C und 500 Upm prälysiert und 10  $\mu$ l Lysostaphin hinzugefügt, gevortext und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 200  $\mu$ l B3-Puffer, Vortexen und eine zehnmünütige Inkubation bei 70 °C wurde die Lyse induziert. Für verbesserte Bindebedingungen wurde 210  $\mu$ l 100 % Ethanol hinzugefügt, die Lösung auf die Säule geladen und die Säule für eine Minute zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrirte, zuerst mit 500  $\mu$ l BW-Puffer, dann mit 600  $\mu$ l B5-Puffer

mit jeweils folgendem einminütigen Zentrifugationsschritt. Anschließend wurde die Säulenmembran für eine Minute getrocknet. Zuletzt wurde nach einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur mit 100 µl auf 70 °C vorgeheiztem BE-Puffer die DNA für eine Minute eluiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 16873 xg.

### 3.3.2 Polymerasekettenreaktion

Um DNA-Sequenzen zu amplifizieren wurde die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) benutzt. Diese Methode wurde einerseits für die Herstellung von *attB*-PCR Produkten für Klonierungen benötigt, andererseits um DNA-Sequenzen mittels Kolonie-PCR nachzuweisen.

Für Klonierungen wurde das PCR Extender System von 5Prime verwendet, dessen Polymerase auch eine *proof reading*-Aktivität besitzt. Als *template* diente die isolierte genomische DNA von *S. epidermidis* 1457. Zum Nachweis einer stattgefundenen Transformation wurde eine Kolonie-PCR mit dem PCR Kit DyNAzyme™ II von Finnzyme durchgeführt. Als *template* wurde eine einzelne in 10 µl *aqua dest.* suspendierte Bakterienkolonie verwendet. Zur Bestimmung der optimale *Annealing*-Temperatur wurde im Voraus eine Temperaturgradienten-PCR durchgeführt.

Für einen 20 µl-Ansatz wurde verwendet:

1,0 µl	DNA
je 0,6 µl	forward/reverse Primer (10 pmol/µl)
0,4 µl	dNTPs
2,0 µl	Puffer (5x)
0,2 µl	Polymerase
ad 20 µl	<i>aqua dest.</i>

Für alle in dieser Arbeit benutzten Primerpaare wurden folgende in Tabelle 3-2 dargestellten Reaktionsbedingungen verwendet (35 Zyklen).

Tabelle 3-2 PCR-Reaktionsbedingungen in dieser Arbeit

	initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation
Temperatur	95 °C	95 °C	54,3 °C	72 °C
Zeit	5 min	90 s	45 s	100 s

### 3.3.3 Analyse von DNA mittels TBE-Agarosegelen

Die Größen-Analyse von DNA erfolgte mittels Elektrophorese (120 V, 400 mA, 1 h) in 1,5 % (w/v) Agarose-TBE-Gelen mit 0,003 % Ethidiumbromid in 0,5 x TBE-Puffer. Dafür wurden 10 µl der Probe mit 3 µl DNA-Probenpuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente  $\lambda$ -DNA *HindIII HaeIII*. Die Visualisierung als auch Dokumentation der Banden erfolgte mittels eines UV-Transilluminators.

### 3.3.4 Nukleinsäureaufreinigung

Die Aufreinigung eines PCR-Produktes erfolgte mit dem Kit Nucleo Spin Extract II. Dafür wurden 40 µl des erhaltenen PCR-Produkts mit 100 µl NT-Puffer vermischt um die Bindekonzentration anzupassen. Während eines einminütigen Zentrifugationsschrittes wurde die DNA an die Membran gebunden. Als nächstes wurde die Membran mit 600 µl NT3-Puffer gewaschen und die Membran anschließend für zwei Minuten durch Zentrifugieren getrocknet. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 16873 xg und Raumtemperatur.

Eluiert wurde mit 30 µl *aqua dest.* und anschließend die Nucleinsäurekonzentration gemessen.

### 3.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Plasmid Miniprep Kit I von PEQLAB benutzt. Dieser Vorgang unterteilt sich im Prinzip in drei Schritte, die Anzucht der Bakterien, die alkalischen Lyse und die Reinigung der DNA über eine Anionenaustauschersäule. Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten bei 16873 xg und Raumtemperatur. Zuerst wurden die Bakterien in 5 ml Flüssigkultur über Nacht angezüchtet und am nächsten Tag für 90 s komplett pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 250 µl Lösung I und RNase durch Vortexen resuspendiert. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde durch Zugabe von 250 µl Lösung II und Invertieren lysiert und durch Hinzufügen von 350 µl saurer Lösung III neutralisiert. Das dabei entstandene Präzipitat wurde durch den nachfolgenden Zentrifugationsschritt (10 min) entfernt. Mit der so entstandenen Lösung wurde die HiBind®DNA-Säule durch Zentrifugation (1 min) beladen und die Plasmid-DNA an die Silikamembran gebunden. Es schlossen sich zwei einminütige Zentrifugations-Waschschritte mit 500 µl HB-Puffer zur Entfernung von Protein- und RNA-Spuren beziehungsweise mit 750 µl DNA-Waschpuffer an. Die Säule wurde für 1 min in der Zentrifuge getrocknet und die Plasmid-DNA

letztendlich mit 30  $\mu\text{l}$  *aqua dest.* eluiert.

### 3.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäuren erfolgte photometrisch bei 260 nm Wellenlänge ( $A_{260\text{nm}}$ ) mit einer 1 : 10 Verdünnung mit *aqua ad iniectabilia* in UV-durchlässigen Küvetten.

Da  $A_{260\text{nm}} = 1$  einer Menge von  $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  doppelsträngiger DNA (dsDNA) entspricht, ergibt sich für die Konzentration:

$$\text{dsDNA} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Durch die Messung der Absorption bei 280 nm ( $A_{280\text{nm}}$ ) Wellenlänge, bei der Proteine ihr Absorptionsmaximum haben, lässt sich durch Berechnung des Quotienten auf Verunreinigung durch diese schließen, wenn  $\frac{A_{260\text{nm}}}{A_{280\text{nm}}} < 1,8$ .

### 3.3.7 Gateway-Klonierungen

Um einen Expressionsvektor für Proteinüberexpressionen in *E. coli* herzustellen, wurde die Gateway<sup>®</sup> Technologie von Invitrogen verwendet. Diese Methode basiert auf der für die Infektion von *E. coli* durch den Bakteriophagen  $\lambda$  benutzten Rekombination mittels sogenannter *att-sites*.

Zur Kontrolle der rekombinanten Vektoren wurden diese nach erfolgter Plasmidisolation (3.3.5) durch die Firma Eurofins MWG Operon mit den Primern M13 bzw. T7 sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden daraufhin mittels Alignment mit dem Genom von *S. epidermidis* RP62a verglichen.

#### 3.3.7.1 BP-Klonierung

Bei der BP-Klonierung werden durch die BP-Klonase II ein von zwei *attB-sites* flankiertes PCR-Produkt mit den zwei *attP-sites* des Donor-Vektors rekombiniert (Abbildung 3-1). Das PCR-Produkt enthielt die kodierende Sequenz des gewünschte Gens. Die beiden erhaltenen Produkte der Klonierung sind einerseits das *ccdB* Selbstmordgen, andererseits der *Entry*-Vektor, der nun die von *attL-sites* flankierte kodierende Sequenz enthält. Der *Entry*-Vektor kann im nächsten Schritt transformiert werden. *ccdB* dient bei nicht erfolgter Klonierung zur negativen Selektion. Als Donor-Vektor wurde der pDONR221<sup>™</sup> von Invitrogen, der eine Kanamycinresistenz besitzt, benutzt.

<b>Ansatz BP-Klonierung:</b>	20 fmol	<i>attB</i> -PCR-Produkt
	50 fmol	Donor-Vektor
	ad 8 $\mu$ l	TE-Puffer, pH8
	2 $\mu$ l	BP Clonase™ II enzyme mix

Die Berechnung der für die BP-Klonierung benötigten Stoffmenge erfolgte mittels folgender Formel:

$$\text{Stoffmenge [ng]} = (X \text{ fmol}) \times N \times \left( \frac{660 \text{ fg}}{\text{fmol}} \right) \times \left( 10^{-6} \frac{\text{ng}}{\text{fg}} \right)$$

X	–	einzusetzende Stoffmenge in Femtomol (fmol)
N	–	Größe der DNA in Basenpaaren (bp)

Der Ansatz der BP-Klonierung wurde bei Raumtemperatur pipettiert und für eine Stunde bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1  $\mu$ l Proteinase K und einer

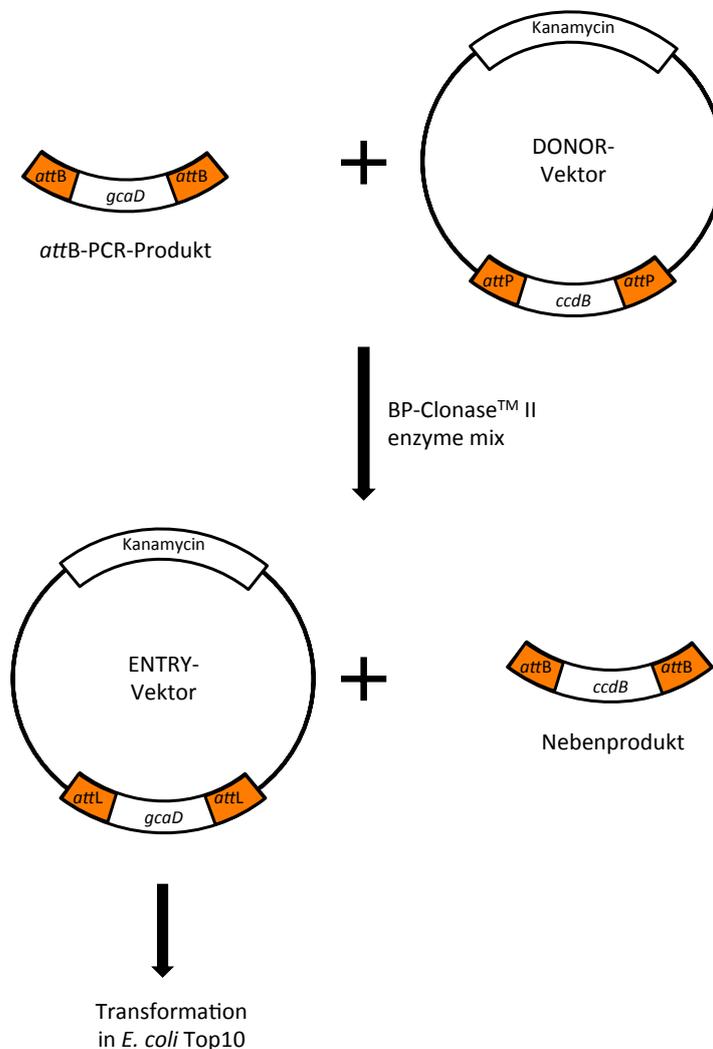


Abbildung 3-1 BP-Klonierung am Beispiel von *gcaD*

Das von *attB*-sites flankierte *gcaD* wird in den *attP*-sites besitzenden Donor-Vektor mittels der BP-Klonase kloniert. Es entsteht der Entry-Vektor pENTRY-*gcaD*, der für die weitere LR-Klonierung (3.3.7.2) verwendet wurde, sowie ein Nebenprodukt, welches die *ccdB*-Kassette enthält.

zehnminütigen Inkubation bei 37 °C unterbrochen. Der erhaltene *Entry*-Vektor wurde im nächsten Schritt in *E. coli* Top10 transformiert (3.2).

### 3.3.7.2 LR-Klonierung

Bei der LR-Klonierung wird die von *attL*-sites flankierte Sequenz eines *Entry*-Vektors (pENTRY), die für das gewünschte Gen kodiert, durch die LR-Clonase herausgeschnitten und in einen Destinationsvektor statt des *ccdB* Selbstmordgens integriert (Abbildung 3-2). Es entsteht ein neuer Expressionsvektor. Dieser enthält die gewünschte von *attB*-sites flankierte, kodierende Sequenz und sowohl die Ampicillinresistenz, als auch den induzierbaren T7-Promotor des Destinationsvektors. Der verwendete Destinationsvektor war pDEST17™ von Invitrogen. Proteine, die mit diesem Vektor erstellt werden, enthalten N-terminal sechsfach Histidin, den sogenannten His-tag, der eine Aufreinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie ermöglicht.

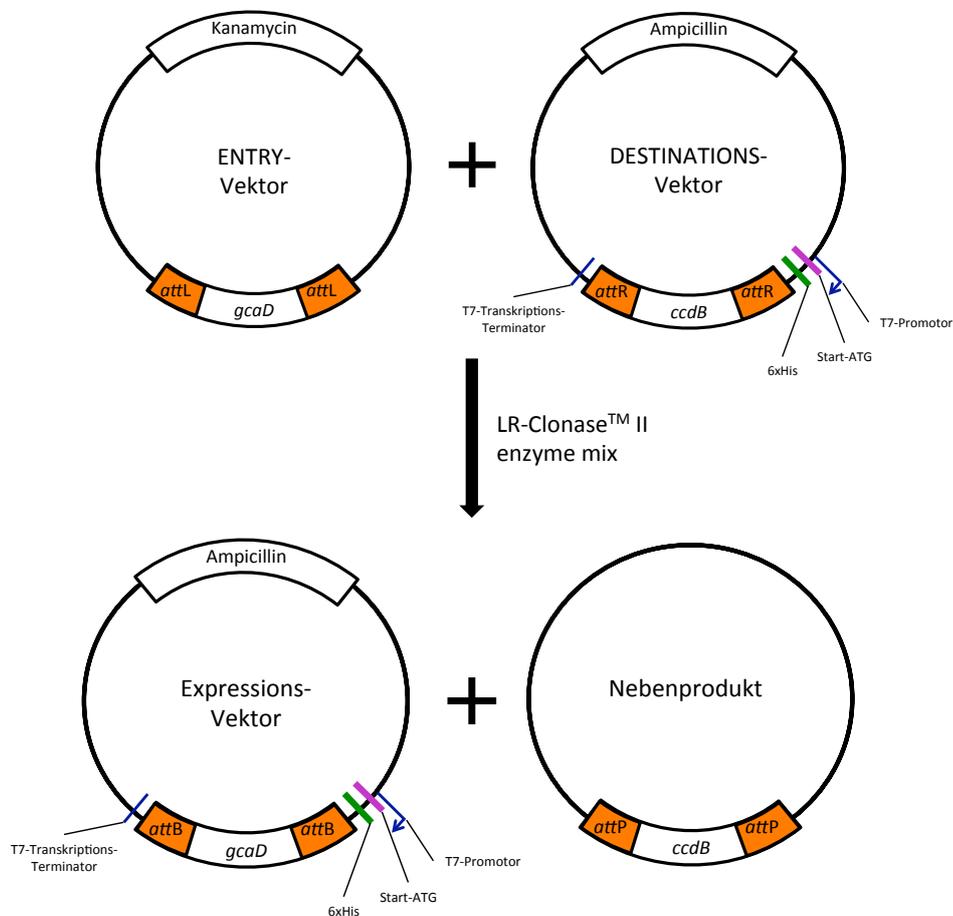


Abbildung 3-2 LR-Klonierung am Beispiel von *gcaD*

Die *attL*-sites des mittels BP-Klonierung erhaltenen *Entry*-Vektors werden mit den *attR*-sites des Destinations-Vektor rekombiniert. Hierbei entsteht ein Expressionsvektor, der eine Promotorsequenz, das zu exprimierende Gen inklusive Startcodon und eine für sechs Histidin kodierende Sequenz zur weiteren chromatographischen Aufreinigung (3.4.3) enthält.

---

<b>Ansatz LR-Klonierung</b>	20 fmol	pENTRY
	50 fmol	Destinationsvektor
	ad 8 µl	TE-Puffer, pH8
	2 µl	LR Clonase™ II enzyme mix

Mit dem Ansatz der LR-Klonierung wurde wie in 3.3.7.1 verfahren. Der erhaltene Expressionsvektor wurde im nächsten Schritt transformiert (3.2). Hierbei diente *E. coli* DH5α zur Stammhaltung und sowohl BL21-AI, als auch BL21 Star zur Proteinüberexpression.

### 3.4 Arbeiten mit Proteinen

#### 3.4.1 Gewinnung von Proteinproben von *Staphylococcus epidermidis*

Die Proteinproben der *S. epidermidis* Stämme wurden während der früh-, mittel- und spätexponentiellen, sowie der stationären Phase zu den Zeitpunkten 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 8 und 24 Stunden, vom Zeitpunkt der Animpfung ausgehend, gewonnen.

Um anschließend die intrazellulären Proteine aufzureinigen, wurden 50 ml einer *S. epidermidis* Kultur bei 4 °C, 3220 xg für 15 min pelletiert und mit 10 ml TE-Puffer resuspendiert. Um stark biofilmbildende Zellen zu resuspendieren wurden diese für 20 s bei 70 % Amplitude sonifiziert. Die Suspension wurde erneut bei 3220 xg für 15 min pelletiert.

Diese Aufreinigung wurde einmal wiederholt. Hiernach wurde das Pellet mit 1 ml TE-Puffer resuspendiert, 5 µl Proteaseinhibitor hinzugefügt, in ein Gefäß mit Glasperlen überführt und für 30 s bei 6800 Upm in einer Zelmühle (Precellys® 24) mechanisch aufgeschlossen.

Es folgte ein Zentrifugationsschritt (4 °C, 25200 xg, 25 min). Die in Lösung befindlichen Proteine wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und erneut für 45 min zentrifugiert um sämtliche Glasperlen und unerwünschte Zellreste zu pelletieren.

Die Proteinlösung wurde abermals überführt und bei -20 °C gelagert.

#### 3.4.2 Proteinüberexpression in *Escherichia coli*

Die Überexpression eines Proteins fand in *E. coli* BL21-AI oder alternativ für die PurR-Überexpression in BL21 Star statt, nachdem ein Expressionsvektor in die Zellen transformiert worden war (3.2 und 3.3.7). *E. coli* B21-AI besitzt eine T7-Expressions-

kassette, die sich im *araB-locus* des *araBAD-operons* befindet. So wird die Expression der T7-RNA-Polymerase, deren Promotorsequenz sich auf dem Expressionsvektor findet, durch Arabinose induziert. Folglich wird durch Zugabe von Arabinose zum Nährmedium die Überexpression des Proteins gesteuert. Darüber hinaus fehlen dem Stamm zwei Proteasen, die Lon- und OmpT-Protease, letztere ist für die Spaltung der T7-Polymerase zuständig (GRÄSLUND *et al.*, 2008; GRODBERG & DUNN, 1988). Alternativ wurde der Expressionsvektor *pEXPRpurR* in *E. coli* BL21 Star transformiert. Die T7-RNA-Polymerase wurde in das Genom dieses Stammes mittels des DE3-Prophagen eingebracht und ist unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors (DUBENDORFF & STUDIER, 1991; TABOR & RICHARDSON, 1985), welcher sich durch IPTG induzieren lässt. Zusätzlich zu der oben genannten Proteasendefizienz besitzt dieser Stamm eine Mutation im RNase E-Gen (*rne131*) und erhöht damit die Stabilität der mRNA.

Vor der eigentlichen Expression wurde eine Testexpression in einem geringeren Volumen (35 ml) LB-Medium durchgeführt. Die restlichen Bedingungen waren zur eigentlichen Überexpression identisch. Nach Induktion erfolgte eine Probenentnahme zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 120 und 240 Minuten. Eine Kontrolle der Proteinüberexpression erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese.

Für die eigentliche Überexpression wurde ausgehend von 3 l LB-Medium bei 37 °C, 150 Upm bis OD<sub>600nm</sub> 0,6 kultiviert. In *E. coli* BL21-AI wurde mit Arabinose (Endkonzentration 0,2 %) induziert und nach 3 bis 4 h bei 37 °C und 150 Upm geerntet. In BL21 Star wurde mit IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) induziert und die Kultur über Nacht bei Raumtemperatur, 150 Upm kultiviert. Die Zellen wurden bei 4 °C, 15 min bei 3220 xg pelletiert.

### **3.4.3 Proteinaufreinigung rekombinanter Proteine**

Die Proteinaufreinigung des in *E. coli* überexprimierten, rekombinanten Proteins erfolgte mittels Nickelaffinitätschromatographie (1 ml Bio-Scale™ Mini Profinity™ IMAC Cartridges) (HOCHULI *et al.*, 1987). Das rekombinante Protein enthält hierfür einen N-terminalen Polyhistidinrest als spezifische Markerstruktur (His-tag). Für die Aufreinigung wurde das Pellet aus der Überexpression mit 20 ml Waschpuffer I resuspendiert, DNase, Lysozym, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und Proteaseinhibitor zugefügt, um anschließend für 30 min auf Eis geschüttelt zu werden. Im Anschluss wurden die Zellen unter Eiskühlung mechanisch mithilfe von Ultraschallwellen (3 x 30 s bei 70 % Amplitude) aufgeschlossen und für 30 min bei 4 °C und 25200 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß

überführt, mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert und nach Protokoll über die Säule aufgereinigt. Zuerst wurde die Säule mit Waschpuffer äquilibriert, daraufhin mithilfe einer peristaltischen Pumpe (2 ml/min) mit der Probe beladen, dabei wurde der Durchlauf behalten. Es folgten 2 Waschschriffe. Mittels Elutionspuffer wurden fraktioniert Eluate zu je 1 ml aufgefangen. Das Pellet, der Durchlauf während des Beladens und Waschens, als auch die Eluate wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf das gewünschte Protein hin untersucht. Die optisch auf dem Gel rein erscheinenden Eluate wurden zusammengeführt und mit einem Ultrafilter (15 min, 4 °C, 3220 xg) umgepuffert und aufkonzentriert. Im Fall von PurR schloss sich eine Trichloressigsäurefällung an. Dafür wurde 100 %ige Trichloressigsäure auf eine Endkonzentration von 10 % zu der Proteinlösung hinzugefügt. Anschließend wurde das Protein über Nacht bei 4 °C präzipitiert. Das ausgefällte Protein wurde für 30 min bei 4 °C und 3220 xg pelletiert. Es schlossen sich zwei Waschschriffe an, erst mit einem Äquivalenten von 100 %igen Ethylalkohol, dann 70 %igen Ethylalkohol. Auf jeden Waschschriff folgte das Abzentrifugieren des Proteins (s.o.). Anschließend wurde das Präzipitat in TE-Puffer resuspendiert. Für eine native Aufreinigung wurde mit harnstofffreien Puffern bei 4 °C gearbeitet.

Zuletzt wurden die Säulen nach Angaben des Herstellers chaotrop gereinigt und bis zu ihrer erneuten Benutzung für das gleiche Protein in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

#### 3.4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung erfolgte nach Bradford (BRADFORD, 1976). Bei dieser Methode wird die Eigenschaft des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau ausgenutzt, Komplexe mit kationischen und nichtpolaren, hydrophoben Proteinseitenketten zu bilden, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 zu 595 nm führt. Bei allen Lösungen erfolgte eine Dreifachbestimmung mit anschließender Bildung des Mittelwerts. Zuerst wurde mittels einer BSA-Konzentrationsstandardkurve in sieben verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,125 mg/ml und 2 mg/ml kalibriert (Anhang I). Es wurden 5 µl Proteinlösung mit 250 µl Bradfordreagenz vermischt und nach fünfminütiger Inkubation die Absorption bei 595 nm ( $A_{595\text{nm}}$ ) mithilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts gemessen. Von den erhaltenen Werten wurde der *blank*-Ansatz (250 µl Bradfordreagenz mit 5 µl *aqua dest.*) subtrahiert. Die korrigierte Absorption wurde gegen die BSA-Konzentration aufgetragen und eine Eichgerade errechnet. Als Gleichung ergab sich:

$$\text{Proteinkonzentration} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = 0,427 \times A_{595\text{nm}} + 0,050$$

Diese Gleichung wurde daraufhin verwendet, um aus der gemessenen Absorption die Proteinkonzentration zu errechnen. Dabei wurde darauf geachtet, eine Absorption von  $A_{595\text{nm}} = 1,0$  nicht zu überschreiten, um Abweichungen von der linearen Beziehung von Intensität und Konzentration zu vermeiden. Wenn nötig, wurde eine Verdünnung der Proteinlösung mit *aqua dest.* verwendet.

### **3.4.5 Trennung von Proteinen mittels SDS-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach Molekulargewicht mittels SDS-Gelelektrophorese in einem vertikalen System mit 1x MES als Laufpuffer. Dafür wurden jeweils 10 µg Proteinprobe mit *aqua dest.* auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und mit 4 µl 3x Laemmli versetzt. Die Proteinlösung wurde anschließend für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf ein 12 % Bis-Tris Polyacrylamidgel aufgetragen.

Sollte ein Kulturüberstand untersucht werden, wurde jeweils das Pellet von 1 ml Kultur mit 1x Laemmli versetzt. Die Menge 1x Laemmli wurde je nach optischer Dichte der Kultur zum Entnahmezeitpunkte berechnet. Bei einer  $OD_{600\text{nm}} = 1$  wurde das Pellet entsprechend mit 100 µl 1x Laemmli resuspendiert und wie oben angegeben denaturiert. Aufgetragen wurden Äquivolumen (13 bis 15 µl).

Alternativ wurden *S. epidermidis* Proteinproben zellzahladaptiert ( $2 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 10 µl) aufgetragen und mit 5 µl 3x Laemmli versetzt.

Als Größenstandard dienten zuerst der Marker *SeeBlue2<sup>®</sup>Plus*, später *Spectra<sup>™</sup> Multicolor Broad Range Protein Ladder*. Das Gel wurde für ca. 30 min unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt und anschließend über Nacht ebenso mit Coomassie-Entfärber behandelt. Zuletzt wurde das Gel mit *aqua bidest.* äquilibriert und im Gelrockner zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet. Durch Anfärben mit Coomassie-Brilliantblau kann von der Intensität der Banden proportional auf die Proteinmenge geschlossen werden (BRADFORD, 1976; GRÄSLUND *et al.*, 2008).

## **3.5 Immunologische Arbeitstechniken**

### **3.5.1 Erstellen eines polyklonalen Antiserums**

Für die Erstellung eines polyklonalen Antiserums wurde ein New Zealand White Kaninchen mit 100 µg des gewünschten Proteins mittels subkutaner Injektion mindestens zwei Mal immunisiert. Da die gewünschten 100 µg Protein in maximal 250µl gelöst sein durften, mussten die Proteinproben teilweise in einer Vakuumevaporatorzentrifuge

aufkonzentriert werden. Für die Immunisierung wurde maximal 250 µl Proteinlösung mit einem Äquivolumen Freudschen Adjuvans vermischt. Bei der ersten Immunisierung wurde komplettes, ab der zweiten Immunisierung inkomplettes Freudsches Adjuvans verwendet. Die erste Titerkontrolle einer Serumprobe erfolgte vier Wochen nach der zweiten Immunisierung mittels eines Western Blots. Bis zum Erreichen des gewünschten Titers, einer sichtbaren Bande bei einer Verdünnung des Serums 1 : 50000, erfolgten weitere Immunisierungen. Zuletzt wurde das Kaninchen entblutet und das Blut bei Raumtemperatur, 3220 xg für mindestens 15 min zentrifugiert. Das Serum wurde anschließend dekantiert und bei -20 °C gelagert.

### **3.5.2 Aufreinigung eines polyklonalen Antiserums**

Um ein polyklonales Kaninchenantiserum aufzureinigen wurde das Kit HiTrap NHS-activated HP von Amersham benutzt. Die für die Aufreinigung benutzten Säulen enthalten NHS-aktivierte Sepharose, die an primäre Aminogruppen (-NH<sub>2</sub>) des rekombinant hergestellten Proteins kovalent bindet. Wenn das Protein an die Säule gebunden hat, wird das Serum über die Säule laufen gelassen. Die darin enthaltenen spezifischen Antikörper können so an das als Antigen fungierende Protein binden. Anschließend wird die Säule gewaschen und die spezifischen Antikörper eluiert.

Dafür muss zuerst das in der Säule enthaltene Isopropanol mit 1 mM HCl ausgespült werden. Als nächstes wird die Säule mit 1 ml der Ligandenlösung, welche 0,5 mg/ml des rekombinanten Proteins in Kopplungspuffer enthält, beladen und verschlossen für 30 min bei 25°C inkubiert. Nach erfolgter Kopplung des Proteins müssen alle restlichen aktiven Gruppen deaktiviert und unspezifisch gebundene Liganden ausgewaschen werden. Dies erfolgt in drei sich abwechselnden Wasch- und Deaktivierungsschritten. Nachdem die Säule mit neutralem Puffer gewaschen wurde, erfolgte bei der ersten Benutzung ein Leerlauf mit Binde- und Elutionspuffer und ein Äquilibrationsschritt mit Bindepuffer. Daraufhin liefen 30 ml des polyklonalen Antiserums mit einer Flussrate von 0,5 ml/min über die Säule. Mittels Antigen-Antikörper-Bindung erfolgte die Separation der gesuchten Antikörper. Als nächstes wurden Serumreste mit Waschpuffer entfernt und die gesuchten Antikörper mit Elutionspuffer eluiert und drei Fraktionen je 1 ml aufgefangen. Sowohl die optimale Fraktion, als auch die optimal einzusetzende Verdünnung der Antikörper wurde mittels Western Blot ermittelt.

### **3.5.3 Western Blot Analysen**

Um Proteine spezifisch nachzuweisen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dies

bezeichnet die elektrophoretische Aufspaltung eines Proteingemischs nach Größe in einem SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Immunodetektion. Nach der erfolgten Auftrennung mittels Gelelektrophorese (3.4.5) erfolgte der elektrophoretische Transfer der Proteine von dem Gel auf eine PVDF-Membran entweder mittels Tankblotting oder *semidry*-Blotting. Für die verwendeten Einstellungen am *power supply* siehe Tabelle 3-3.

Tabelle 3-3 Einstellungen am *power supply* beim Western Blotting

Blotsystem	Spannung	Strom	Zeit
Tankblotting	30 V	400 mA	120 min
<i>Semidry</i> -Blotting	max.25 V	3 mA/cm <sup>2</sup> Membran	30 min

Daraufhin wurde die Membran in Blotto äquilibriert und mit dem Primärantikörper gegen das gesuchte Protein in entsprechender Verdünnung in Blotto über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurden restliche Primärantikörper unter leichtem Schwenken mit dreimaligen je zehnminütigen Waschschritten mit Blotto entfernt. Anschließend inkubierte die Membran mit dem Sekundärantikörper, einem Alkalische Phosphatase konjugierten, monoklonalen Ziegen Anti-Kaninchen IgG Antikörper, in einer 1 : 30000-Verdünnung in Blotto unter leichtem Schwenken für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einmaligem Spülen mit Blotto und dreimaligem Spülen mit *aqua bidest.* wurde die Membran in AP-Puffer äquilibriert. Die Detektion erfolgte in 30 ml frischem AP-Puffer mit 100 µl 5 % BCIP in 100 %igen Dimethylformamid und 200 µl 5 % NBT in 70 %igen Dimethylformamid.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Herstellung polyklonaler Antiseren

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von IcaR, GcaD und PurR auf die Biofilmregulation von *S. epidermidis* 1457 weitergehend untersucht werden. Eine mögliche Methode um intrazelluläre Proteine in *S. epidermidis* nachweisen zu können sind Western Blots. Diese Methode erfordert zum Nachweis der Proteine spezifische Antikörper, welche als polyklonale Antiseren in Kaninchen generiert wurden. Hierfür wurden die Kaninchen mit dem jeweiligen Protein, das rekombinant in *E. coli* hergestellt wurde, immunisiert.

#### 4.1.1 Klonierung von Expressionsplasmiden

Um ein Expressionsplasmid zu generieren, wurde die kodierende Sequenz von IcaR, GcaD und PurR aus isolierter chromosomaler DNA von *S. epidermidis* mittels PCR amplifiziert. Es wurden Primer verwendet, die bereits die für eine *in frame* Klonierung benötigten *att-sites* enthielten. Das erhaltene *att*-PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Es folgte die BP-Klonierung und die Transformation des erhaltenen *Entry*-Vektors in *E. coli*. Ob eine Transformation erfolgreich war, wurde mittels einer Kolonie-PCR überprüft (Abbildung 4-1).

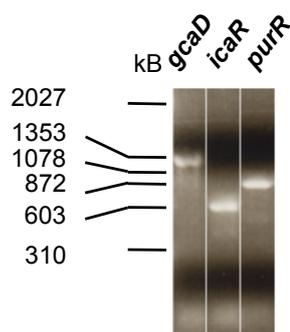


Abbildung 4-1 Transformationskontrolle

Die Überprüfung einer erfolgreichen Transformation erfolgte mittels Kolonie-PCR. Dargestellt sind die Fragmente der PCR-Produkte nach elektrophoretischer Aufspaltung in einem TBE-Agarosegel (Ausschnitte). *icaR* entspricht einer Größe von 558 kB, *purR* 825 kB und *gcaD* 1356 kB. Als Größenstandard diente ein Markermix aus  $\lambda$ -DNA *Hind* III verdaut und  $\phi$ -DNA *Hae* III verdaut.

Zur Bestätigung einer korrekten Insertion wurden der Insertionsbereich der Plasmide sequenziert (Anhang II Sequenzierungen) und die erhaltene Sequenz mit der publizierten Sequenz von *S. epidermidis* RP62a (GILL *et al.*, 2005) verglichen. Eine vollständige Sequenz von *S. epidermidis* 1457 ist bislang noch nicht publiziert worden. Die *icaR*-

Sequenz von *S. epidermidis* 1457 war komplett identisch mit dem *icaR*-Gen in *S. epidermidis* RP62a (IIA). Bei der Sequenz von *gcaD* fand sich im Protein selbst eine Punktmutation im Sinne einer Transition bei der es sich jedoch um eine stumme Mutation handelte (IIB).

Für *purR* in *S. epidermidis* 1457 fand sich im Vergleich zu der Sequenz von *S. epidermidis* RP62a in der ersten Sequenzierung (IIC) eine Transversion in der zweiten Base eines Triplets, die bei einer Expression des Proteins theoretisch zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Glutamin geführt hätte, sowie eine weitere Transversion im Sinne einer stummen Mutation. Aufgrund einer nichtinduzierbaren Proteinüberexpression wurden erneut Klonierungsversuche durchgeführt. Im zweiten Klonierungsexperiment fanden sich ebenfalls zwei Transitionen, die beide zu theoretischen Aminosäureveränderungen geführt hätten (IID), nämlich von Asparagin zu Asparaginsäure und von Serin zu Prolin. Auch hier gelang eine Überexpression nicht. Im dritten *purR*-Klonierungsexperiment zeigte sich die *purR*-Sequenz von *S. epidermidis* RP62a und *S. epidermidis* 1457 letztendlich identisch (IIE).

Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen aus den *Entry*-Vektoren in den Destinationsvektor pDEST17 kloniert. Der erhaltene Expressionsvektor (III) wurde anschließend in *E. coli* transformiert. Einzig der *purR*-Expressionsvektor wurde aufgrund zunächst erfolgloser Testexpressionen ebenfalls sequenziert. Die erhaltene Sequenz war jedoch identisch mit dem *purR*-Gen in *S. epidermidis* RP62a (Daten nicht gezeigt).

#### **4.1.2 Proteinüberexpression in *E. coli* und -aufreinigung**

Die Proteinüberexpression erfolgte in *E. coli* BL21-AI, der einen Expressionsvektor enthielt. Induziert wurde die Proteinüberexpression durch Arabinose. Nach erfolgter Überexpression des Proteins wurde der Kulturüberstand geerntet. Nach anschließender Aufreinigung (3.4.2 und 3.4.3) wurden zur Kontrolle neben den Proteineluaten auch der pelletierte Zellüberstand, Durchlauf und Waschschriffe mittels SDS-Gelelektrophorese überprüft. Sowohl IcaR, als auch GcaD konnten in den Eluaten als prominente Bande in der Elektrophorese nachgewiesen werden.

Bei IcaR (Abbildung 4-2) fanden sich große Mengen des Proteins in der ersten Elutionsfraktion, jedoch mit sichtbaren Verunreinigungen. Die zweite und dritte Elutionsfraktion zeigten sich visuell rein, sodass diese Fraktionen zusammengeführt wurden. IcaR war in einer ausreichenden Konzentration (0,787 µg/µl) vorhanden.

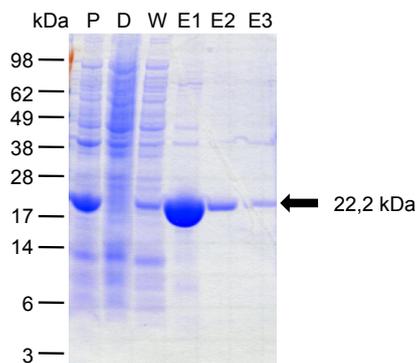


Abbildung 4-2 SDS-Gelelektrophorese der Proteinüberexpression von IcaR

Zusätzlich zu den erhaltenen Proteineluaten 1 bis 3 (E1 – E3) wurden zur Kontrolle der pelletierte Kulturüberstand (P), der Durchlauf (D) und der Waschschrift (W) ebenfalls aufgetragen.

GcaD (Abbildung 4-3A) war in großen Mengen überexprimiert worden. Allerdings hatte nicht das gesamte Protein an die Säule gebunden und war auch im Durchlauf (D) deutlich nachweisbar. Darüber hinaus ging ein nicht unerheblicher Teil während der beiden Waschschriffe (W1 und W2) verloren. In den Eluaten fand sich noch ausreichend GcaD. Die erste und zweite Elutionsfraktion waren noch deutlich verunreinigt, die darauffolgenden Fraktionen zeigten sich jedoch ausreichend rein und wurden zusammengefügt. Aufgrund der geringeren Proteinkonzentration ( $0,349 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurde eine Aufkonzentrierung durchgeführt. Für die Aufreinigung des Proteins wurden denaturierende, harnstoffhaltige Puffer verwendet. Bei der anschließenden Aufkonzentrierung fielen jedoch Harnstoffkristalle aus.

In einem zweiten Überexpressionsexperiment wurde das Protein in einem harnstofffreien Puffer nativ aufgereinigt. In der anschließenden SDS-Gelelektrophorese (Abbildung 4-3B) zeigte sich eine erfolgreiche Überexpression mit prominenten GcaD-Banden in den ersten Eluaten, die aber deutlich durch fremde Proteine verunreinigt waren. Infolgedessen wurden

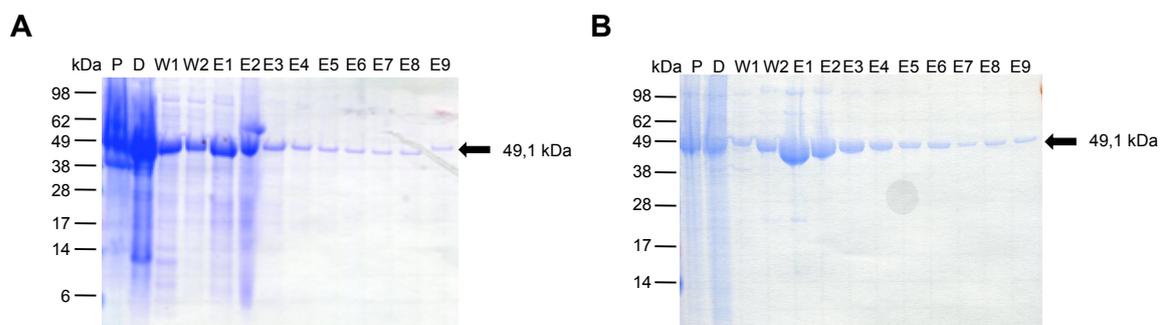


Abbildung 4-3 SDS-Gelelektrophorese der GcaD-Aufreinigung

(A) Denaturierende Aufreinigung und (B) native Aufreinigung in Harnstoff-freiem Puffer. Zusätzlich zu den erhaltenen Proteineluaten 1 bis 9 (E1 – E9) wurden zur Kontrolle der pelletierte Kulturüberstand (P), der Durchlauf (D) und beide Waschschriffe (W1 – W2) ebenfalls aufgetragen. Für weitere Untersuchungen wurden E3 – E9 (A) sowie E1 – E8 (B) verwendet.

die Fraktionen 1 bis 8 zusammengefügt und die native Aufreinigung wiederholt. Dadurch ging jedoch eine relativ große Menge an GcaD verloren, wie sich in einer erneuten SDS-Gelelektrophorese (Daten nicht gezeigt) darstellte. Die größte Menge an Protein war im Durchlauf nachweisbar. Dahingegen waren sämtliche Eluate visuell rein, sodass diese zusammengefügt wurden. Bedingt durch den relativ hohen Proteinverlust war die Konzentration eher gering ( $0,281 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), sodass eine Aufkonzentrierung durchgeführt wurde.

Vor der eigentlichen PurR-Überexpression wurden Testexpressionen in *E. coli* BL21-AI durchgeführt. Da diese nicht erfolgreich waren, erfolgte ein Wechsel des *E. coli* Stammes von BL21-AI auf BL21 Star. Auch hier schienen die Testexpressionen nicht zu funktionieren. In allen Testexpressionen stagnierte etwa 60 Minuten nach Induktion das Wachstum (Abbildung 4-4).

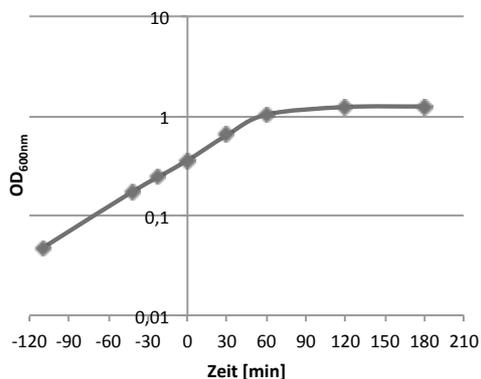


Abbildung 4-4 Wachstumskurve der PurR-Testexpression

Dargestellt ist eine repräsentative Wachstumskurve von *E. coli* BL21 Star pEXPR<sub>purR</sub>. Gemessen wurde die optische Dichte der Zellkulture bei 600nm ( $OD_{600\text{nm}}$ ), die in logarithmischer Skalierung gegen die Zeit in Minuten aufgetragen wurde. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Induktion der Proteinüberexpression mit IPTG. Es sind jeweils Mittelwerte aus drei Experimenten dargestellt.

In der Gelelektrophorese der Testexpression zeigte sich jedoch eine neue prominente Bande mit einem ungewöhnlichem Laufverhalten (Abbildung 4-5). Es folgten eine Überexpression und eine denaturierende Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie. In der SDS-Gelelektrophorese waren in den ersten beiden Eluaten ausreichend Protein nachweisbar, aber auch deutliche Verunreinigungen, sodass die restlichen acht Eluate zusammengefügt wurden. Die zusammengeführten Eluate enthielten eine nur geringe Proteinkonzentration ( $0,139 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Beim Aufkonzentrieren fiel erneut Harnstoff kristallin aus. Mittels Trichloressigfällung konnte das Protein vom Harnstoff getrennt werden und für eine Immunisierung verwendet werden.

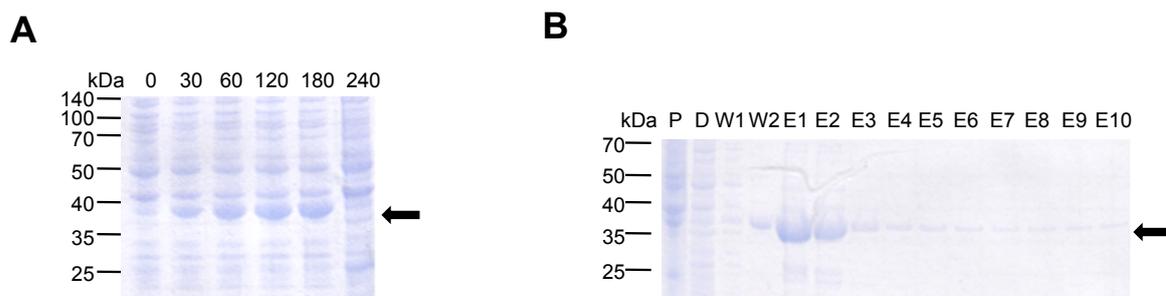


Abbildung 4-5 SDS-Gelelektrophorese der PurR-Test- und Überexpression

(A) stellt Proben der Testexpression zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 120, 180 und 240 Minuten nach Induktion dar. Aufgetragen wurde jeweils der pelletierte und mit 1x Laemmli resuspendierte vollständige Zellüberstand. Die erwartete Größe des Proteins beträgt 30,4 kDa + 4 kDa für den His-tag. (B) zeigt die Aufreinigung der PurR-Überexpression: pelletierter Kulturüberstand (P), Durchlauf (D), Waschschritte (W1 – 2) und Proteineluat 1 bis 10 (E1 – E10).

### 4.1.3 Immunisierung von Kaninchen

Die Generierung polyklonaler Antiseren erfolgte durch Immunisierung von New Zealand White Kaninchen. Vor Gewinnung des gesamten Antiserums wurde die Reaktivität des Serums in verschiedenen Verdünnungen mittels Western Blot getestet. Hierzu wurden Proteinproben von *S. epidermidis* 1457 und zur Positivkontrolle Eluate des aufgereinigten, nachzuweisenden Proteins verwendet (Abbildung 4-6). Zur Negativkontrolle diente ein vor den Immunisierungen entnommenes Nullserum. Ziel war es, eine Reaktivität bei Verdünnung des Serums von mindestens 1 : 5000, zu erreichen. Das IcaR- und das GcaD-

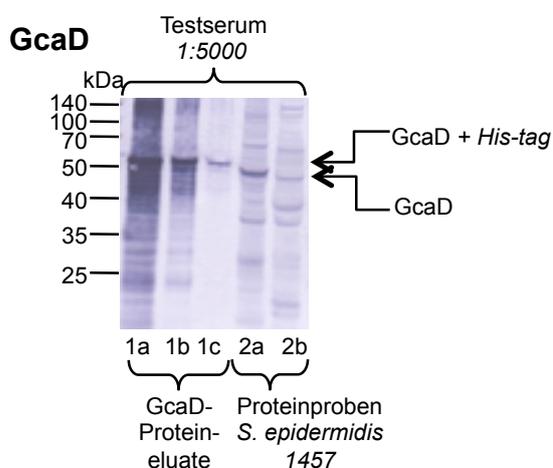


Abbildung 4-6 Reaktivitätskontrolle des GcaD-Proberserums mittels Western Blot

Getestet wurde das nach dreifacher Immunisierung entnommene Testserum in einer Verdünnung von 1:5000. Die getesteten Proteine waren GcaD-Proteineluat (1a-c) und Proteinproben von *S. epidermidis* 1457 (2a+b). 1a-c sind GcaD-Proteineluat aus der Überexpression in *E. coli* (1a → unverdünntes Eluat, 1b → 1:10 Verdünnung, 1c → 1:100 Verdünnung). Dieses GcaD enthält einen His-tag und ist etwa 4 kDa größer. Die *S. epidermidis* Proteinproben wurden bei 3,5 (2a) und 24 (2b) Stunden geerntet. Es besteht bereits eine geringe Reaktivität des Testserums bei 3,5 Stunden (2a).

Antiserum konnten nach vierfacher, das PurR-Antiserum nach fünffacher Immunisierung gewonnen werden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.4 Aufreinigung polyklonaler Antiseren

Da die Antiseren in Kaninchen generiert wurden, die nicht in steriler Umgebung gehalten wurden, zeigten die Western Blots viele unspezifische Banden. Um diese so gering wie möglich zu halten, wurden die Antiseren zusätzlich über eine Säule aufgereinigt, an die das jeweilige Protein kovalent gebunden hatte. Als nächstes wurde die Säule mit dem Antiserum beladen, die spezifischen Antikörper wurden gebunden, während die unspezifischen Antikörper ausgewaschen wurden. Zuletzt konnten die spezifischen Antikörper eluiert werden. Mit den Antikörpereluatn wurden Western Blots mit den Verdünnungen 1:500, 1:1000, 1:5000 und 1:10000 durchgeführt (Abbildung 4-7). Um

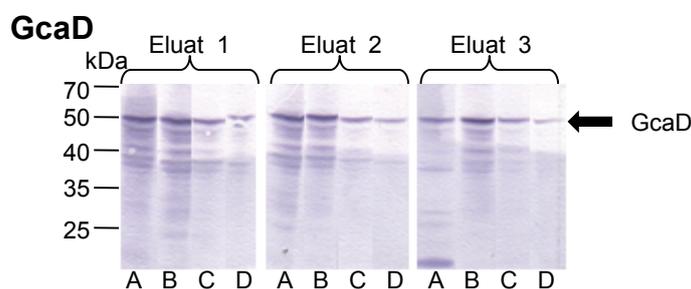


Abbildung 4-7 Western Blot der GcaD-Antikörperaufreinigung

Western Blots aller Eluate der GcaD-Antikörperaufreinigung. Als Protein wurden *S. epidermidis* 1457 Proteinproben, die nach 4,5 Stunden geerntet worden waren, verwendet. Getestet wurden alle drei Eluate in den Verdünnungen 1:500 (A), 1:1000 (B), 1:5000 (C) und 1:10000 (D). Verwendet wurde anschließend Eluat 3 in einer Verdünnung von 1:5000 (Eluat 3: C).

optimale Bedingungen für folgende Western Blot Analysen zu gewährleisten, wurde die Schnittstelle aus maximaler Reaktivität der Verdünnung und dem Minimum an Kreuzreaktionen gewählt. Für GcaD wurde Eluat 3 in einer Verdünnung von 1:5000 gewählt. Für IcaR wurde Eluat 3 in einer 1:1000 Verdünnung gewählt (Daten nicht gezeigt). Das PurR-Antiserum war bei Abschluss dieser Arbeit noch nicht aufgereinigt.

## 4.2 Analyse intrazellulärer *Staphylococcus epidermidis* Proteine

Im weiteren Verlauf sollten die Proteine IcaR, GcaD, RsbU,  $\sigma^B$ , BarA und BarB auf ihr Expressionsmuster während des Wachstums von *S. epidermidis* 1457 untersucht werden. Dafür eignen sich Western Blot Analysen, die mit Proteinproben von *S. epidermidis* Stämmen und den spezifischen Antikörpern erfolgten. Zum Ausschluss stammspezifischen

Verhaltens erfolgten zusätzlich Analysen mit zwei weiteren *S. epidermidis* Wildtypstämmen, *S. epidermidis* 1057 und *S. epidermidis* 8400.

#### 4.2.1 Wachstumsverhalten von *S. epidermidis* Stämmen und Gewinnung von Proteinproben

Um die Proteine IcaR, GcaD, RsbU,  $\sigma^B$ , BarA und BarB zu analysieren, wurden intrazelluläre Proteine der *S. epidermidis* Wildtypstämme 1457, 1057 und 8400 gewonnen. Anschließend mussten geeignete Zeitpunkte für die Proteingewinnung gewählt werden. Hierfür wurden Wachstumskurven aus Schüttelkulturen erstellt (Abbildung 4-8) und die Kurven anhand ihrer Steigung in Wachstumsphasen unterteilt. Daraus ergab sich bis fünf Stunden die exponentielle Phase, zwischen fünf und acht Stunden die transitorische Phase und ab acht Stunden bis Experimentende bei 24 Stunden die stationäre Phase. Als Zeitpunkte zur Proteingewinnung wurden 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 8 und 24 Stunden gewählt. Diese Zeitpunkte wurden für alle Stämme beibehalten, da alle Stämme ein ähnliches

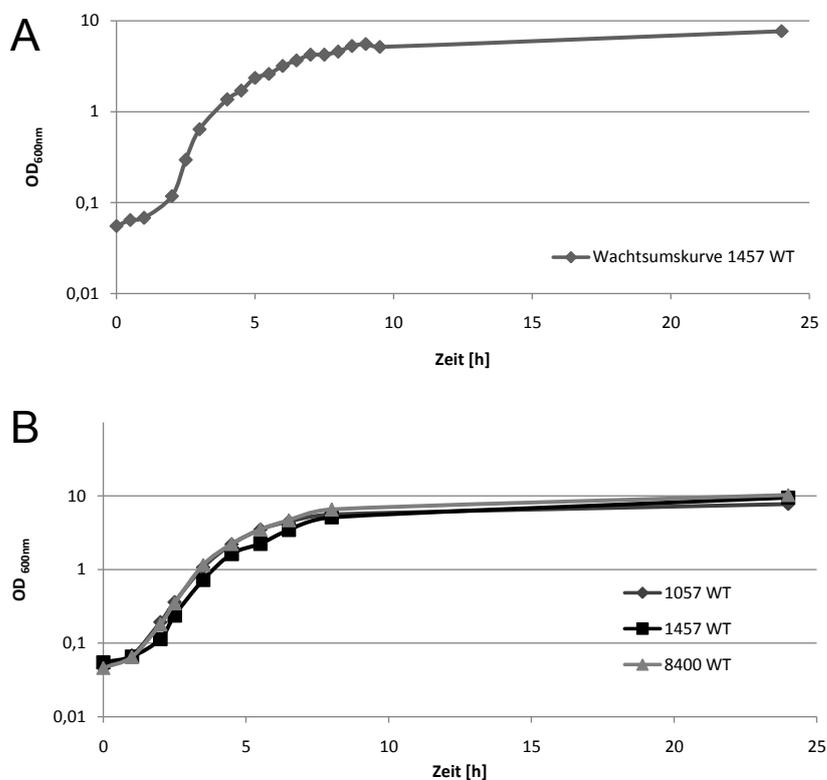


Abbildung 4-8 Wachstumskurven von *S. epidermidis* Stämmen

Gemessen wurde die optische Dichte bei 600nm, hier logarithmisch dargestellt, über die Zeit. Diagramm A zeigt eine Wachstumskurve von *S. epidermidis* 1457 Wildtyp. Markiert sind die Zeitpunkte zu denen Proteinproben gewonnen wurden. Diagramm B zeigt ebenfalls Wachstumskurven von *S. epidermidis* 1457 Wildtyp im Vergleich zu den Wildtypen 1057 und 8400. Die Wachstumskurven wurden aus gemittelten Werten aus mindestens drei Experimenten erstellt.

Wachstumsverhalten zeigten. Aus früheren Untersuchungen aus dieser Arbeitsgruppe war bekannt, dass auch die *S. epidermidis* 1457 Mutanten ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigen, ohne relevante Differenzen in Generationszeit und Wachstumsrate. Einzig die 1457*barAB*-Mutante zeigte eine leicht verlängerte Generationszeit (JONAS, 2009). Für weitere Fragestellungen wurden auch Proben während der stationären Phase zweistündlich entnommen. Zusätzlich wurden neben Schüttelkulturen auch statische Kulturen in Petrischalen angezchtet, um Proteinproben unter Biofilmbedingungen zu erhalten.

## 4.2.2 Proteinanalysen mittels Western Blot

### 4.2.2.1 Expressionsmuster von $\sigma^B$

In *S. epidermidis* 1457 war der globale Stressregulator  $\sigma^B$  in fünf Untersuchungen während sämtlicher Phasen präsent (Abbildung 4-9A). Allen gemein war eine Dynamik im Expressionsmuster. Bis auf eine Ausnahme mit gleichstarken Banden war von der früh- (2,5 h) bis mittexponentiellen (3,5 h) Phase immer eine Zunahme der Proteinmenge nachweisbar. Bei zwei Untersuchungen fand sich zur mitt- (3,5 h) und spätexponentiellen (4,5 h) Phase relativ die stärkste Bande. Zwei weitere zeigten zusätzlich eine ebenso starke Bande in der frühtransitorischen Phase (5,5 h). In der späten transitorischen Phase (8 h) war bis auf eine Ausnahme bereits eine deutlich geringere Proteinmenge präsent. In der stationären Phase konnte bei allen Analysen ein weitere Abnahme mit kaum noch detektierbaren Banden beobachtet werden.

Aufgrund der beobachteten Dynamik, mit Abnahme der Proteinmenge sowohl zwischen der früh- (5,5 h) und spättransitorischen (8 h) Phase, als auch zwischen der spättransitorischen (8 h) und stationären (24 h) Phase, wurden Einzeluntersuchungen mit

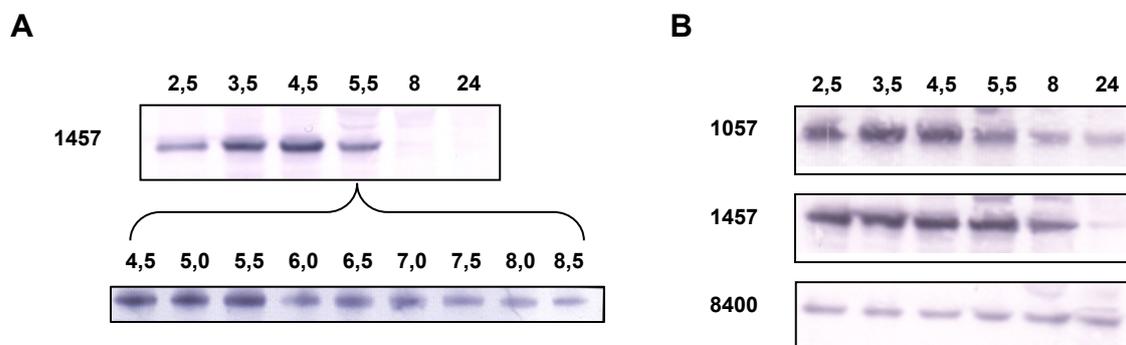


Abbildung 4-9 Western Blot Analysen mit  $\sigma^B$ -spezifischen Antikörpern

Die Expression von  $\sigma^B$  wurde in *S. epidermidis* 1457 analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit Proteinpräparationen der frühexponentiellen (2,5 h) mittexponentiellen (3,5 h), spätexponentiellen (4,5 h), transitorischen (5,5 und 8 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Zusätzlich ist in (A) die  $\sigma^B$ -Expression zwischen 4,5 und 8,5 h dargestellt. In (B) wurde das Expressionsmuster mit den *S. epidermidis* Stämmen 1057 und 8400 von 2,5 bis 24 Stunden verglichen.

*S. epidermidis* 1457 Proteinproben durchgeführt, die halbstündlich zwischen 4,5 und 8,5 Stunden (Abbildung 4-9A) und zweistündlich zwischen 8 und 20 Stunden gewonnen worden waren (Daten nicht gezeigt). Zwischen der spätexponentiellen (4,5 h) und der spättransitorischen (8,5 h) Phase nahm die Stärke der Banden kontinuierlich ab. In der stationären Phase fanden sich in beiden durchgeführten Analysen differierende Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Ab 10 Stunden zeigten beide kaum noch erkennbare Banden, eine der Beiden zeigte jedoch eine Zunahme zwischen 16 und 18 Stunden mit nachfolgender Abnahme der Bandenstärke.

Zum Ausschluss stammspezifischen Verhaltens wurden vergleichende Untersuchungen mit *S. epidermidis* 1057 und 8400 durchgeführt (Abbildung 4-9B). In *S. epidermidis* 1057 stellte sich ein ähnliches Expressionsmuster zu *S. epidermidis* 1457 dar. Eine maximale Expression war in der mitt- bis spätexponentiellen Phase, mit einer darauffolgenden Abnahme der Bandenstärke. In *S. epidermidis* 8400 zeigte sich in zwei von drei Untersuchungen keine Dynamik in der Expression von  $\sigma^B$ . Die Ausnahme stellte eine Untersuchung bei der  $\sigma^B$  in der exponentiellen und transitorischen Phase deutlich, in der stationären Phase nur fraglich nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich fand sich bei dieser Ausnahme auch eine Zunahme des Proteins von früh- bis zur mittexponentieller Phase. Ab diesem Zeitpunkt zeigte sich bis zur spättransitorischen Phase keine Dynamik mehr.

#### 4.2.2.2 Expressionsmuster von RsbU

RsbU ist ein Positivregulator von  $\sigma^B$  und wird von einem  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor transkribiert. In fünf Western Blot Analysen mit RsbU-spezifischen Antikörpern in *S. epidermidis* 1457 war RsbU immer ohne relevante Dynamik in der mittexponentiellen bis spättransitorischen Phase nachweisbar (Abbildung 4-10A). Bis auf eine Ausnahme war RsbU bereits in einer geringeren Menge in der frühexponentiellen Phase detektierbar. In der stationären Phase war RsbU bis auf zwei Ausnahmen kaum noch detektierbar. Interessanterweise war RsbU in diesen zwei Ausnahmen in der stationären Phase als Doppelbande erkennbar. Es stellte sich ein etwa ein Kilodalton kleineres Protein zusätzlich dar, die ursprüngliche RsbU-Bande war etwas schwächer ausgeprägt.

Zum Ausschluss stammspezifischen Verhaltens wurden die *S. epidermidis* Stämme 1057 und 8400 ebenfalls analysiert (Abbildung 4-10B). Beide Stämme zeigten ein fast identisches Expressionsmuster, von der frühexponentiellen bis frühtransitorischen Phase war RsbU gut darstellbar. Während in *S. epidermidis* 8400 RsbU nach 8 Stunden noch keine Dynamik zeigte, war die Bande in *S. epidermidis* 1057 schwächer. Interessanter-

## Ergebnisse

weise zeigte sich bei beiden Stämmen in der stationären Phase eine Dreifachbande, wobei die größte fraglich der ursprünglichen RsbU-Bande zugeordnet werden konnte. Bei *S. epidermidis* 1057 zeigten sich alle drei Banden nur schwach, aber gleichmäßig, während bei *S. epidermidis* 8400 das kleinste, etwa zwei Kilodalton kleinere, Protein, die relativ stärkste Bande darstellte.

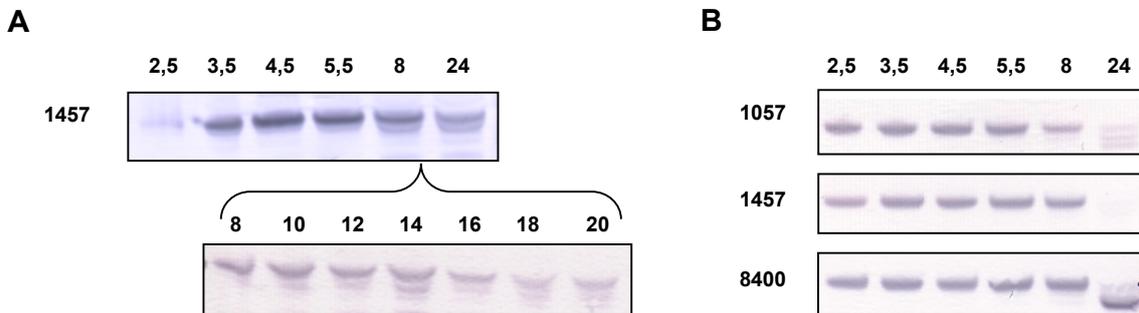


Abbildung 4-10 Western Blot Analysen mit RsbU-spezifischen Antikörpern

Die Expression von RsbU wurde in *S. epidermidis* 1457 analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit Proteinpräparationen der frühexponentiellen (2,5 h) mittlexponentiellen (3,5 h), spätexponentiellen (4,5 h), transitorischen (5,5 und 8 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Zusätzlich ist in (A) die RsbU-Expression zwischen 8 und 20 h dargestellt. In (B) wurde das Expressionsmuster mit den *S. epidermidis* Stämmen 1057 und 8400 von 2,5 bis 24 Stunden analysiert.

Aufgrund der Doppelbanden in *S. epidermidis* 1457 stellte sich der Verdacht auf eine spezifische proteolytische Prozessierung. Konsekutiv wurden *S. epidermidis* 1457 Proteinproben, die zweistündlich zwischen acht und 20 Stunden gewonnen worden waren, analysiert (Abbildung 4-10A). In dieser zweifach durchgeführten Untersuchung zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der Stärke der RsbU-Banden. In beiden Untersuchungen zeigten sich Doppelbanden, in der Ersten von acht bis 18 Stunden, mit einem Maximum bis 14 Stunden und in der Zweiten konnte bei allen Zeitpunkten fraglich eine Doppelbande detektiert werden, eine eindeutige Doppelbande stellte sich allerdings nur bei 14 Stunden dar. Folglich war eine spezifische proteolytische Prozessierung naheliegend.

Aufgrund der Hinweise auf eine spezifische proteolytische Prozessierung sollte eine Mutante untersucht werden, für die eine andere Proteasenaktivität gezeigt worden war. Für *S. epidermidis* 1457sigB war in dieser Arbeitsgruppe eine gesteigerte Aktivität von Proteasen gezeigt worden (SCHEWE, 2009), sodass diese Mutante in einer Einzeluntersuchung mit RsbU-spezifischen Antikörpern untersucht wurde (Abbildung 4-11A).

RsbU war in 1457sigB von der frühexponentiellen bis zur spättransitorischen Phase nachweisbar. Eine Zunahme der RsbU-Expression konnte hier erst später in der exponentiellen Phase von 3,5 Stunden auf 4,5 Stunden beobachtet werden. Die stärkste

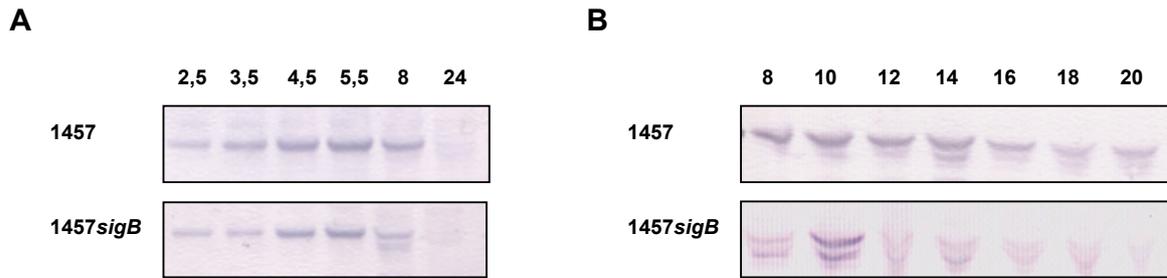


Abbildung 4-11 Western Blot Analysen mit RsbU-spezifischen Antikörpern in der *sigB*-Mutante

Die Expression von RsbU wurde in *S. epidermidis* 1457 und 1457*sigB* analysiert. Dargestellt (A) ist ein Experiment mit Proteinpräparationen der frühexponentiellen (2,5 h) mittexponentiellen (3,5 h), spätexponentiellen (4,5 h), transitorischen (5,5 und 8 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Zusätzlich ist in (B) für beide Stämme die RsbU-Expression zwischen 8 und 20 h dargestellt.

Proteinexpression war am Übergang von der spätexponentiellen bis frühtransitorischen Phase zu beobachten. Spättransitorisch fand sich eine Doppelbande, stationär war kein RsbU mehr darstellbar. Wie zuvor der Wildtyp wurde auch 1457*sigB* zwischen 8 und 20 Stunden auf RsbU hin analysiert (Abbildung 4-11B). Bis zehn Stunden ließ sich noch eindeutig eine Doppelbande darstellen, ab 12 Stunden nur noch das kleinere Protein, dessen Bande kontinuierlich abnahm und sich bei 20 Stunden nicht weiter darstellte.

#### 4.2.2.3 Expressionsmuster der globalen Regulatoren BarA und BarB

BarAB werden von einem  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor auf einem gemeinsamen Transkript transkribiert. BarA war in vier Untersuchungen immer von der mittexponentiellen bis frühtransitorischen Phase präsent (Abbildung 4-12A). In der frühexponentiellen Phase war BarA bei drei von vier Untersuchungen noch ausreichend darstellbar, einmal nur fraglich. Zwischen 2,5 und 3,5 Stunden zeigte sich durchgehend eine Zunahme der Proteinexpression. In der einen Hälfte der Analysen stellten sich die stärksten Banden bei 3,5 und 4,5 Stunden dar, mit Abnahme bei 5,5 Stunden. In der anderen Hälfte zeigten sich die stärksten Banden bis 5,5 Stunden. Spättransitorisch war bei einer Untersuchung kein BarA mehr präsent, während bei den restlichen Analysen eine weitere Abnahme der Proteinmenge beobachtet wurde. Aufgrund der beobachteten relativen Abnahme der Proteinmenge zwischen 5,5 bis 8 Stunden und 8 bis 24 Stunden, wurden Einzeluntersuchungen durchgeführt, die diese Zeitpunkte halbstündlich, beziehungsweise zweistündlich umfassten. Zwischen 4,5 und 8,5 Stunden fand sich eine kontinuierlich abnehmende Proteinmenge. Bei der Analyse der stationär gewonnenen Proteinproben war BarA von 8 bis 14 Stunden noch präsent, eine Abnahme konnte zwischen 10 und 12 Stunden beobachtet werden.

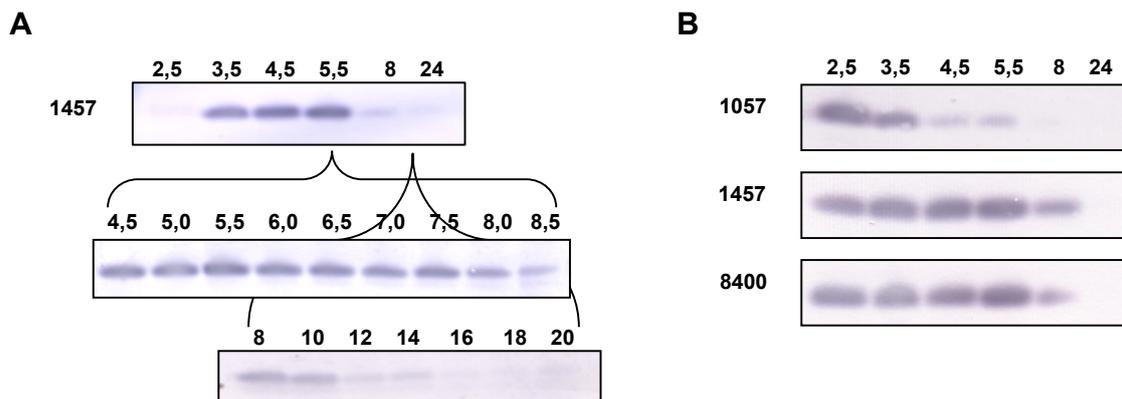


Abbildung 4-12 Western Blot Analysen mit BarA-spezifischen Antikörpern

Die Expression von BarA wurde in *S. epidermidis* 1457 analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit Proteinpräparationen der frühexponentiellen (2,5 h) mittlexponentiellen (3,5 h), spätexponentiellen (4,5 h), transitorischen (5, 5 und 8 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Zusätzlich ist in (A) die BarA-Expression sowohl zwischen 4,5 und 8,5 h als auch zwischen 8 und 20 h dargestellt. In (B) wurde das Expressionsmuster mit den *S. epidermidis* Stämmen 1057 und 8400 von 2,5 bis 24 Stunden analysiert.

Es erfolgten drei vergleichende Untersuchungen über 24 Stunden mit den *S. epidermidis* Stämmen 1057 und 8400 (Abbildung 4-12B). In *S. epidermidis* 1057 war BarA immer während der exponentiellen und der frühtransitorischen Phase präsent. Während dieser Phasen zeigte sich keine relevante Dynamik. Ausnahme war eine einzelne Untersuchung, bei der die relativ stärkste Expression bei 2,5 und 3,5 Stunden beobachtet wurde. In zwei Untersuchungen war BarA zu den Zeitpunkten 8 und 24 Stunden nicht und in der dritten Untersuchung nur fraglich nachweisbar. In *S. epidermidis* 8400 zeigte BarA ein einheitliches Expressionsmuster und war in sämtlichen während der exponentiellen und transitorischen Phase gewonnenen Proben präsent. Es zeigte sich eine zu *S. epidermidis* 1457 vergleichbare Dynamik. Die stärkste Bande fand sich in der frühtransitorischen Phase mit nachfolgender Abnahme bis zur spättransitorischen Phase. In der stationären Phase fand sich kein BarA.

BarB war in sechs Analysen in *S. epidermidis* 1457 zu sämtlichen untersuchten Zeitpunkten ohne relevante Dynamik nachweisbar (Abbildung 4-13A). Ein identisches Expressionsmuster fand sich auch in allen mit *S. epidermidis* 1057 und 8400 durchgeführten Analysen.

Da bekannt war, dass BarB, welches von einem  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor transkribiert wird, für die PIA-Synthese essenziell ist, *S. epidermidis* 1457sigB aber trotzdem zu einer, wenn auch im Vergleich zum Wildtyp reduzierten, Biofilmbildung fähig ist, sollte *S. epidermidis* 1457sigB auf BarB hin analysiert werden (Abbildung 4-13B). BarB wurde auch in *S. epidermidis* 1457sigB kontinuierlich ohne Dynamik exprimiert. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich jedoch eine geringere Proteinexpression (Abbildung 4-13B).

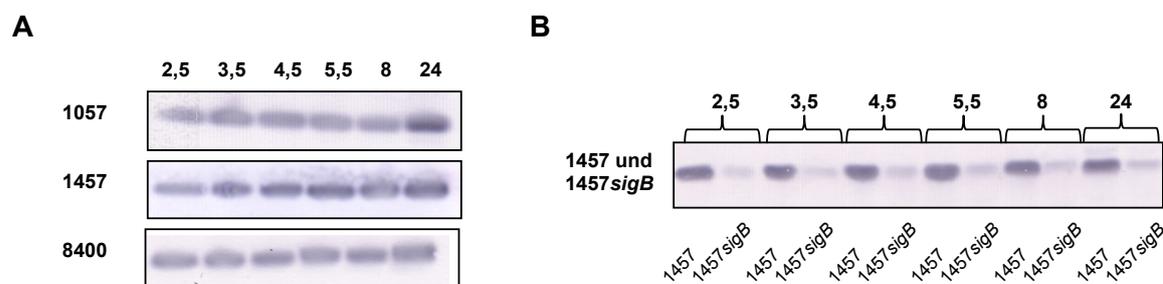


Abbildung 4-13 Western Blot Analysen mit BarB-spezifischen Antikörpern

Die Expression von BarB wurde in den *S. epidermidis* Stämmen 1057, 1457 und 8400 (A), als auch in 1457sigB im direkten Vergleich mit dem Wildtyp analysiert (B). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit Proteinpräparationen der frühexponentiellen (2,5 h) mittexponentiellen (3,5 h), spätexponentiellen (4,5 h), transitorischen (5,5 und 8 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase.

#### 4.2.2.4 Expressionsmuster von GcaD

GcaD ist ein bifunktionales Enzym. GcaD transferiert zuerst einen Acetylrest auf Glucosamin-1-Phosphat, sodass Acetylglucosamin-1-Phosphat entsteht, anschließend katalysiert GcaD unter Zusatz von UTP die Reaktion zu UDP-N-Acetylglucosamin. UDP-N-Acetylglucosamin wird sowohl bei der Zellwandsynthese, als auch für die PIA-Synthese benötigt (GERKE *et al.*, 1998). *gcaD* liegt strangabwärts von *barAB* und besitzt einen putativen  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor (BARTSCHT, 2001).

In *S. epidermidis* 1457 war GcaD in sechs Untersuchungen immer in der exponentiellen Phase darstellbar (Abbildung 4-14). In fünf von sechs Experimenten zeigte sich in der exponentiellen Phase eine Dynamik mit Zunahme der Proteinexpression von der früh- bis mittexponentiellen Phase. In der mitt- und spätexponentiellen Phase zeigte sich die stärkste Bande. Nur in einer Untersuchung zeigte sich in der frühtransitorischen Phase noch eine identisch starke Expression wie in der spätexponentiellen Phase. Bei vier Untersuchungen stellte sich in der frühtransitorischen Phase eine deutlich schwächere Bande, in einer kein GcaD mehr dar. Bei vier von sechs Untersuchungen war bei 8 und 24 Stunden kein GcaD nachweisbar, bei den restlichen beiden Untersuchungen nur sehr fraglich.



Abbildung 4-14 Western Blot Analysen mit GcaD-spezifischen Antikörpern

Die Expression von GcaD wurde in den *S. epidermidis* Stämmen 1057, 1457 und 8400 analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit Proteinpräparationen der frühexponentiellen (2,5 h) mittexponentiellen (3,5 h), spätexponentiellen (4,5 h), transitorischen (5,5 und 8 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase.

## Ergebnisse

Zum Ausschluss eines stammspezifischen Expressionsmusters erfolgten ähnliche Untersuchungen mit den *S. epidermidis* Stämmen 1057 und 8400 (Abbildung 4-14). In *S. epidermidis* 1057 zeigte sich eine kontinuierliche Proteinexpression in der exponentiellen Phase, bei 5,5 Stunden war GcaD nur noch unsicher nachweisbar. In *S. epidermidis* 8400 war GcaD außer in der exponentiellen Phase auch in der transitorischen Phase präsent und ließ sich als schwache Bande auch bei 24 Stunden darstellen. Von 2,5 bis 5,5 Stunden war eine Zunahme der Proteinexpression zu beobachten, bei 8 Stunden war eine geringere Menge präsent.

Es folgten weitere Einzeluntersuchungen in *S. epidermidis* 1457 Mutanten (Abbildung 4-15). In *1457sigB* wurde GcaD im Vergleich zum Wildtyp geringer exprimiert und ließ sich nur in der exponentiellen Phase und ohne relevante Dynamik darstellen.

In *1457barA* war eine kontinuierliche Zunahme der Proteinexpression von der frühexponentiellen bis frühtransitorischen Phase zu beobachten, während es spättransitorisch und stationär nicht präsent war. GcaD war in *1457barB* von 2,5 bis 5,5 Stunden darstellbar, die stärkste Expression fand sich mittexponentiell.

In *1457barAB* war GcaD zu allen Zeitpunkten präsent, es ließ sich jedoch eine Dynamik beobachten, mit Zunahme der Expression in der exponentiellen und Abnahme ab der spättransitorischen Phase

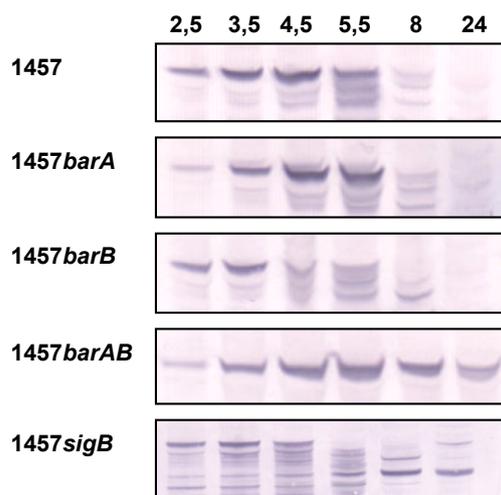


Abbildung 4-15 Western Blot Analysen mit GcaD-spezifischen Antikörpern in *S. epidermidis* 1457 Mutanten

Die Expression von GcaD wurde in *S. epidermidis* Stämmen 1457, *1457barA*, *1457barB*, *1457barAB* und *1457sigB* analysiert. Dargestellt ist ein Experiment mit Proteinpräparationen der frühexponentiellen (2,5 h) mittexponentiellen (3,5 h), spätexponentiellen (4,5 h), transitorischen (5,5 und 8 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase.

#### 4.2.2.5 Expressionsmuster von IcaR

Aus Transkriptionsanalysen ist bekannt, dass die *icaADBC*-Transkription während der postexponentiellen und stationären Phase herunterreguliert ist (KNOBLOCH *et al.*, 2004). Also könnte IcaR, als negativer Transkriptionsregulator des *ica*-Operons, zu diesen Zeitpunkten hochreguliert sein.

In *S. epidermidis* 1457 war IcaR in sechs Untersuchungen zu allen Zeitpunkten der exponentiellen und transitorischen Phase präsent (Abbildung 4-16, Abbildung 4-17). Von 2,5 bis 4,5 Stunden zeigte sich bei vier von sechs Analysen eine kontinuierliche Zunahme der Proteinexpression, während sich bei den übrigen beiden keine relevante Dynamik zeigte. Interessanterweise wurde die Bande durchgehend während der transitorischen Phase breiter, dreimalig bei 5,5, zweimalig bei 8 Stunden, einmal nicht beurteilbar. In zwei der sechs Western Blots ließ sich erkennen, dass es sich bei dieser verbreiterten Bande um eine Doppelbande handelte. Diese stellte neben der spezifischen IcaR-Bande eine zweite, etwa 0,5 Kilodalton kleinere spezifische Bande dar. Bei 24 Stunden war jeweils nur noch das kleinere Protein präsent. Es wurde eine mögliche spezifische Prozessierung in Erwägung gezogen.

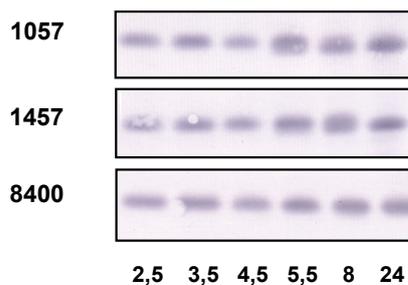


Abbildung 4-16 Western Blot Analysen mit IcaR-spezifischen Antikörpern

Die Expression von IcaR wurde in *S. epidermidis* Stämmen 1057, 1457 und 8400 analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit Proteinpräparationen der frühexponentiellen (2,5 h) mittexponentiellen (3,5 h), spätexponentiellen (4,5 h), transitorischen (5,5 und 8 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase.

In einer Einzeluntersuchung mit *S. epidermidis* 1457 Proteinproben, die zwischen 8 und 20 Stunden gewonnen worden waren, sollten genauere Hinweise zu der möglichen proteolytischen Prozessierung gewonnen werden (Abbildung 4-17A). Die Doppelbande war nur bei 8 Stunden präsent, zwischen 10 und 20 Stunden fand sich nur die kleinere Bande ohne weitere Dynamik. In einer vergleichenden Untersuchungen mit *S. epidermidis* 1057 (Abbildung 4-16) zeigte sich ein zu *S. epidermidis* 1457 ähnliches Expressionsmuster mit in der exponentiellen Phase nur darstellbarem größeren Protein und einer Doppelbande bei 5,5 und 8 Stunden. Die Doppelbande bei 8 Stunden zeigte kaum noch die ursprüngliche IcaR-Bande. Bei 24 Stunden war ebenfalls nur das kleinere Protein präsent. Bei Analysen

mit *S. epidermidis* 8400 (Abbildung 4-16) war IcaR zu allen Zeitpunkten präsent, eine Doppelbande war nicht sicher abgrenzbar.

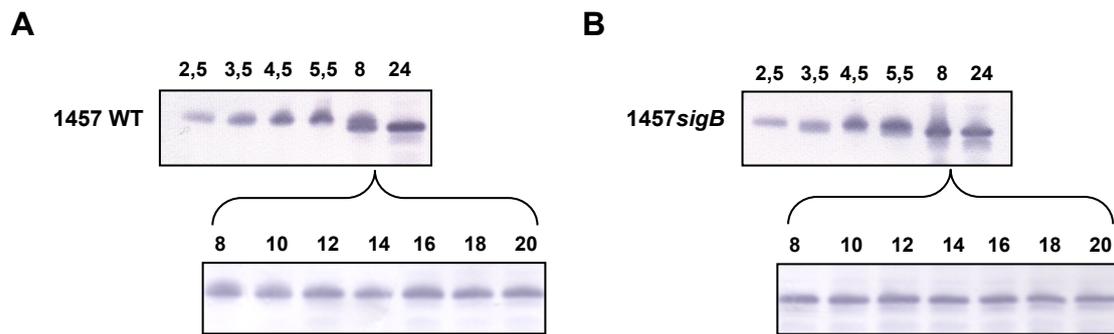


Abbildung 4-17 Western Blot Analysen mit IcaR-spezifischen Antikörpern im Vergleich mit der *sigB*-Mutante

Die Expression von IcaR wurde in *S. epidermidis* 1457 (A) und *1457sigB* (B) in einem Experiment analysiert. Dargestellt ist ein Experiment mit Proteinpräparationen der frühexponentiellen (2,5 h) mittlexponentiellen (3,5 h), spätexponentiellen (4,5 h), transitorischen (5, 5 und 8 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Zusätzlich wurden die Zeitpunkte zwischen 8 und 24 h dargestellt.

Da bekannt war, dass  $\sigma^B$  ein indirekter negativer Transkriptionsregulator von *icaR* ist und die *S. epidermidis* *1457sigB*-Deletionsmutante einen biofilmreduzierten Phänotyp besitzt, sollte das IcaR-Expressionsmuster in dieser Mutante analysiert werden. Es zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster zum Wildtyp (Abbildung 4-17B), als einziger Unterschied erschien die Doppelbande schon bei 5,5 Stunden. In den zwischen 8 und 20 Stunden gewonnenen Proteinproben stellte sich zu diesen Zeitpunkten bereits nur die kleinere Bande dar und zeigte ein kontinuierliches Expressionsmuster.

Da alle vorausgehenden Experimente nur in Schüttelkulturen durchgeführt worden waren, sollten unter Biofilmbedingungen gewonnene Proteinproben ergänzend auf IcaR hin analysiert werden. Exemplarisch wurden die Zeitpunkte 7 und 14 Stunden gewählt. In *S. epidermidis* 1457 (Abbildung 4-18) stellte sich bei 7 Stunden, ähnlich der Schüttelkulturen, eine Doppelbande dar. Bei 14 Stunden war zwar auch eine Doppelbande zu

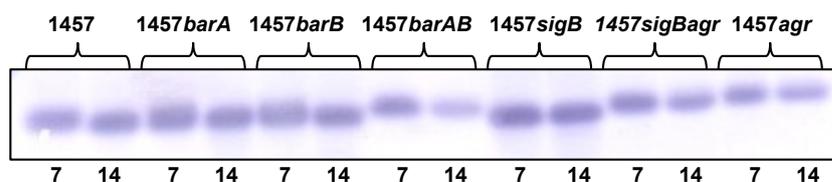


Abbildung 4-18 Western Blot Analyse mit IcaR-spezifischen Antikörpern unter Biofilmbedingungen

Die Expression von IcaR wurde unter Biofilmbedingungen in *S. epidermidis* 1457, *1457barA*, *1457barB*, *1457barAB*, *1457sigB*, *1457sigBagr* und *1457agr* analysiert. Dargestellt ist ein Experiment mit Proteinpräparationen aus der transitorischen (7 h) und stationären (14 h) Wachstumsphase.

sehen, die Bande des größeren Proteins war jedoch kaum noch erkennbar. In 1457*sigB* war analog des Expressionsmusters der aus Schüttelkulturen gewonnenen Proben nur das kleinere Protein vorhanden.

Die Analysen mit *S. epidermidis* 1457*sigB* wiesen auf eine möglicherweise früher einsetzende proteolytische Prozessierung oder erhöhte intrazelluläre Proteaseaktivität hin. Konsekutiv wurde IcaR in *S. epidermidis* 1457*agr* (Abbildung 4-18) analysiert, da diese Mutante über eine deutlich erniedrigte Proteaseaktivität verfügt (SCHEWE, 2009). Interessanterweise zeigte diese stark biofilmpositive Mutante ausschließlich das größere Protein ohne Dynamik in der Expression. Ebenso verhielt sich *S. epidermidis* 1457*sigB**agr*. Für *S. epidermidis* 1457*barA*, 1457*barB* und 1457*barAB* war vor kurzem in dieser Arbeitsgruppe im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte extrazelluläre Proteaseaktivität gezeigt worden (JONAS, 2009). In 1457*barAB* und in 1457*agr* war bei beiden Zeitpunkten das größere Protein präsent (Abbildung 4-18). 1457*barA* zeigte bei 7 Stunden noch eine Doppelbande, 1457*barB* zeigte bereits bei 7 Stunden eine Doppelbande die hauptsächlich das kleinere Protein darstellte. Bei beiden Mutanten war bei 14 Stunden nur das kleinere Protein nachweisbar (Abbildung 4-18).

Zuletzt sollte in einer Einzeluntersuchung der Einfluss von Ethanol auf IcaR untersucht werden (Abbildung 4-19). Es ist bekannt, dass Ethanol die *icaR*-Transkription hemmt (KNOBLOCH *et al.*, 2004). In dem mit Ethanol supplementierten Medium war das IcaR sowohl in *S. epidermidis* 1457, als auch 1457*sigB* in geringerer Menge nachweisbar. Zusätzlich zeigte sich, dass in diesen Proteinproben vor allem das größere Protein darstellbar war.

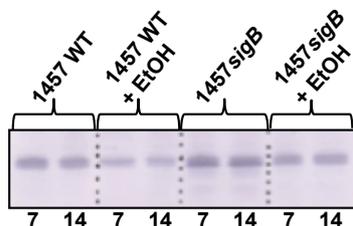


Abbildung 4-19 Western Blot-Analyse mit IcaR-spezifischen Antikörpern: Einfluss von Ethanol

Die Expression von IcaR wurde unter Biofilmbedingungen und Supplementierung des Mediums mit 3 % Ethanol (EtOH) in *S. epidermidis* 1457 und 1457*sigB* analysiert. Dargestellt ist ein Experiment mit Proteinpräparationen der transitorischen (7 h) und stationären (14 h) Wachstumsphase.

## 5 Diskussion

*Staphylococcus epidermidis* ist ein Kommensal der menschlichen Haut und Schleimhäute, dessen Rolle als Pathogen jahrelang unterschätzt worden ist (HUEBNER & GOLDMANN, 1999; KLOOS & MUSSELWHITE, 1975). Infektionen in immunkompetenten Personen sind selten, jedoch zählt *S. epidermidis* zu einem der fünf häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen (VON EIFF *et al.*, 2002; LIM & WEBB, 2005; RUPP & ARCHER, 1994; ZIEBUHR *et al.*, 2006). Dass *S. epidermidis* Infektionen in den letzten Jahrzehnten zugenommen haben, korreliert unter anderem mit dem zunehmenden Gebrauch implantierter Fremdkörper in der modernen Medizin (VUONG & OTTO, 2002). Ursächlich hierfür ist die Fähigkeit von *S. epidermidis*, an Fremdkörperoberflächen zu adhären und einen mehrschichtigen Biofilm zu bilden (GÖTZ, 2002; KNOBLOCH *et al.*, 2004). Biofilmbildung auf Fremdkörpern führt zu einer erschwerten Erreichbarkeit des Erregers für das wirtseigene Immunsystem und zu einer Toleranz gegenüber Antibiotika, häufig ist die Explantation des Fremdmaterials die letzte Therapieoption (MACK *et al.*, 2007).

Die Biofilmbildung unterteilt sich in vier Phasen: der primären Adhäsion des Erregers an die Polymeroberfläche, der darauffolgenden Akkumulation, Reifung und letztendlich Ablösung. In der Akkumulationsphase wird der interzelluläre Kontakt unter anderem durch das Exopolysaccharid PIA (*polysaccharid intercellular adhesin*) vermittelt, deren Synthese durch ein komplexes Netzwerk reguliert wird. Das Wissen um diese Regulationsmechanismen bildet eine Grundlage für die Entwicklung gezielter Therapien. Das Verständnis, zu welchem Zeitpunkt des bakteriellen Wachstums Regulatoren exprimiert werden, ist essenziell, um spezielle Targets wählen zu können. Untersuchungen zur wachstumsabhängigen Expression der Regulatoren der PIA-Synthese in *S. epidermidis* fehlten jedoch bislang.

### 5.1 Generierung polyklonaler Antiseren

Das wachstumsabhängige Expressionsmuster folgender Proteine sollte mittels Western Blots in *S. epidermidis* 1457 analysiert werden: der alternative Sigmafaktor  $\sigma^B$ , der ein globaler Stressregulator ist und durch RsbU aktiviert wird, die Positivregulatoren der PIA-Synthese BarA und BarB, IcaR, einem Negativregulator des *ica*-Operons, das bifunktionale Enzym GcaD und der putative Regulator PurR.

Gegen den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$ , RsbU, BarA und BarB gerichtete Antiseren lagen in dieser Arbeitsgruppe bereits vor. Gegen IcaR, GcaD und PurR gerichtete Antiseren

wurden erfolgreich im Rahmen dieser Arbeit generiert.

Die spezifischen Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit den rekombinant überexprimierten Proteinen IcaR, GcaD und PurR generiert. Für die Überexpression von IcaR, GcaD und PurR wurde das *E. coli* Expressions System mit Gateway<sup>®</sup> Technologie von Invitrogen verwendet. Nach der Klonierung wurde die Sequenz des jeweiligen offenen Leserahmens durch Sequenzierung überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die Sequenzen der Gene *icaR*, *gcaD* und *purR* in *S. epidermidis* 1457 und die bereits publizierten Sequenzen dieser Gene in *S. epidermidis* RP62a (GILL *et al.*, 2005) identisch sind.

IcaR konnte erfolgreich und komplikationslos überexprimiert und aufgereinigt werden. Die Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten GcaD erfolgte zweimal. In der ersten Überexpression erforderte eine zu geringe Proteinkonzentration der Eluate eine Aufkonzentrierung. Aufgrund denaturierender Aufreinigungsmethoden führte die Aufkonzentrierung zu einer Kristallisation des enthaltenen Harnstoffs.

Eine denaturierende Aufreinigung bietet, wenn die biochemischen Fähigkeiten des Proteins nicht benötigt werden, beispielsweise bei einer Immunisierung, zahlreiche Vorteile. Werden größere Mengen eines Proteins rekombinant hergestellt, bilden sich häufig unlösliche intrazelluläre Proteinaggregate, sogenannte *inclusion bodies*, welche im Pellet nachgewiesen werden können. *Inclusion bodies* können unter denaturierenden Bedingungen aufgelöst werden (GABERC-POREKAR & MENART, 2001; SCHLAGER *et al.*, 2012). Zusätzlich wird durch Denaturierung des rekombinanten Proteins, welches N-terminal den aus sechs Histidinresten bestehenden His-tag enthält, aufgrund der Konformationsänderung eine bessere Freilegung des His-tags erreicht. Der freigelegte His-tag bewirkt eine effizientere Bindung des rekombinanten Proteins an eine affinitätschromatographische Säule bei einer Proteinaufreinigung.

In der zweiten GcaD Überexpression und der anschließenden nativen Aufreinigung fanden sich ausreichende Proteinmengen. Trotz Imidazol in den Waschpuffern enthielten die ersten Eluate jedoch reichlich Kontaminationen (GRÄSLUND *et al.*, 2008). Folglich wurden die erhaltenen Eluate nochmals nativ über die Säule aufgereinigt. Trotz identischer Versuchsbedingungen war eine relativ große Menge des rekombinanten Proteins im Durchlauf verloren gegangen. Einerseits lag möglicherweise der His-tag unter nativen Bedingungen nicht ausreichend frei, sodass das rekombinante Protein nicht effizient binden konnte, andererseits waren die Eluate eventuell nicht ausreichend umgepuffert worden, sodass eine zu hohe Imidazolkonzentration (> 30 mM Imidazol) eine vollständige

Bindung verhinderte (GRÄSLUND *et al.*, 2008). Denkbar wäre ebenfalls eine Proteolyse mit Entfernung des His-tags, allerdings war präventiv ein Proteaseinhibitor bei der Aufreinigung hinzugefügt worden. Zusätzlich zeigte die beobachtete Bande in der SDS-Gelelektrophorese die erwartete Größe, was eine Proteolyse unwahrscheinlich macht. Trotz Proteinverlust im Durchlauf war nach Zusammenführen der Eluate und anschließendem Aufkonzentrieren eine für weitere Experimente ausreichende Proteinkonzentration in dem zusammengeführten Eluat vorhanden.

Für die initial erfolglose PurR-Überexpression können mehrere Gründe diskutiert werden. Trotz korrekter Sequenz des dritten Vektors (Anhang IIE) konnte in *E. coli* BL21-AI keine Proteinüberexpression erzielt werden, sodass die Mutationen der *purR*-Sequenz der ersten beiden Vektoren nicht ursächlich sein können. Erst nach Wechsel des Stammes auf *E. coli* BL21 Star zeigte sich in der Testexpression eine prominente Bande. Berrow *et al.* analysierten in einer großen multizentrischen Studie mögliche Parameter, die zur Veränderungen der Expression eines rekombinanten Proteins in *E. coli* BL21 führten (BERROW *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurde nicht nur der *E. coli* Stamm variiert, sondern mit dem Wechsel wurde ebenfalls eine geringere Umgebungstemperatur gewählt. Eine Reduktion der Umgebungstemperatur verbessert die Löslichkeit des rekombinanten Proteins (VERA *et al.*, 2007). Trotz möglicher Präzipitation des Proteins, hätte dieses Protein jedoch in einer SDS-Gelelektrophorese als prominente Bande im gesamten Zellüberstand sichtbar sein müssen. Somit liegt für die initial erfolglose Expression eine stammspezifische Ursache nahe.

PurR könnte in höheren Konzentrationen für *E. coli* toxisch sein, denn in allen Testexpressionen zeigte sich ab etwa 60 Minuten nach Induktion sowohl bei *E. coli* BL21-AI, als auch bei *E. coli* BL21 Star ein stagnierendes Wachstum (Abbildung 4-4). Dagegen spricht jedoch, dass *E. coli* BL21-AI für die Expression toxischer Proteine geeigneter ist als *E. coli* BL21 Star (Herstellerangaben). *E. coli* BL21 Star besitzt eine Mutation im *rne131*-Gen, welches für die Endonuclease RNase E codiert und somit den RNA-Abbau verhindert (GRUNBERG-MANAGO, 1999; KIDO *et al.*, 1996). Folglich ist denkbar, dass die PurR Expression in *E. coli* BL21-AI zu gering war, um sie mittels SDS-Gelelektrophorese zu detektieren und erst dank erhöhter mRNA-Stabilität in *E. coli* BL21 Star ausreichend hohe Proteinkonzentrationen erzielt werden konnten, um PurR als prominente Bande darzustellen.

Unerwarteterweise stellte sich die als PurR identifizierte Bande inklusive des His-tags in der SDS-Gelelektrophorese etwa fünf Kilodalton größer dar. Allerdings ließ sich das

überexprimierte Protein erfolgreich mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen. Eine erfolgreiche Aufreinigung über eine metallaffinitätschromatographische Säule garantiert jedoch nicht, dass es sich um das gewünschte überexprimierte Protein handelt, da auch gewöhnliche *E. coli* Proteine aufgrund einer hohen Affinität zu zweiwertigen Kationen, wie beispielsweise Nickel, mitaufgereinigt werden können (GRÄSLUND *et al.*, 2008; HOWELL *et al.*, 2006; MEINNEL *et al.*, 1992). Mögliche kontaminierende *E. coli* Proteine, die etwa ein ähnliches Molekulargewicht wie PurR besitzen, werden in Tabelle 5-1 aufgezählt.

Tabelle 5-1 Über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie potentiell mitaufgereinigte *E. coli* Proteine (HOWELL *et al.*, 2006)

<i>Protein</i>	<i>Funktion</i>	<i>Molekulargewicht [kDa]</i>
YeiH	hypothetisch	36,9
YbiB	hypothetisch	34,9
YrbG	Metallkationenaustauscher	34,7
HchA	Chaperon	31,1
RplB	Großes ribosomales Protein L2	29,7

Um auszuschließen, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein um ein gewöhnliches *E. coli* Protein mit ähnlichem Molekulargewicht handelt, könnte beispielsweise eine Massenspektrometrie durchgeführt werden. Dieses wurde jedoch im Rahmen der Doktorarbeit nicht durchgeführt. Die Experimente mit den gewonnenen polyklonalen Testseren wiesen später jedoch auf eine korrekte Überexpression von PurR hin (siehe unten), sodass von einem atypischen Laufverhalten des Proteins in der SDS-Gelelektrophorese ausgegangen werden kann.

IcaR, GcaD und PurR waren somit erfolgreich überexprimiert worden und wurden für die Immunisierung von Kaninchen zur Generierung polyklonaler Antiseren verwendet. Nachdem die Antiseren mittels Western Blots auf eine ausreichende Reaktivität überprüft worden waren, konnten sie über Säulen aufgereinigt werden. Diese Säulen waren durch Bindung des jeweiligen Proteins an NHS-aktivierte Sepharose für die Antikörperaufreinigung vorbereitet worden. Um sicherzustellen, dass die aufgereinigten Antiseren das für die Immunisierung verwendete Protein detektierten, wurden Western Blots mit einem aufgereinigten Eluat der His-tag Proteine durchgeführt (Abbildung 4-7). Diese Banden

stellten sich dann aufgrund des His-tags erwartungsgemäß etwa vier Kilodalton größer als die entsprechenden Proteine in *S. epidermidis* 1457 dar. Einen zusätzlichen Kontrollmechanismus stellte eine fehlende prominente Bande gleicher Größe dar, wenn der Western Blot mit dem Nullserum durchgeführt wurde. Somit standen für den Nachweis von IcaR und GcaD aus *S. epidermidis* 1457 geeignete polyklonale Antiseren zur Verfügung. Das PurR-Antiserum war im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht aufgereinigt worden. Reaktivitätskontrollen zeigten jedoch eine erfolgreiche Immunisierung. Für das erzeugte PurR-Antiserum steht eine abschließende Kontrolle mittels Western Blot Analyse zur Verfügung. So könnten die Antikörper anhand gewonnener Proteinproben aus der *S. epidermidis* 1457*purR*-Deletionsmutante überprüft werden (JONAS, 2009). Das Fehlen der PurR-Bande im Vergleich zu der im Proteingemisch des Wildtyp-Stammes wäre hier beweisend für die erfolgreiche Herstellung eines PurR Antiserums.

Für weitere Untersuchungen standen somit die bereits in dieser Arbeitsgruppe erzeugten polyklonalen Antiseren gegen RsbU,  $\sigma^B$ , BarA und BarB (JONAS, 2009) sowie die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Antiseren gegen IcaR und GcaD zur Verfügung.

## 5.2 Expression von $\sigma^B$ und RsbU

In dieser Arbeitsgruppe war bereits gezeigt worden, dass die in dieser Arbeit verwendeten *S. epidermidis* 1457 Mutanten sich bis auf eine Ausnahme in ihrer Wachstumsrate und Generationszeit nicht relevant vom Wildtyp unterscheiden (JONAS, 2009). Einzig *S. epidermidis* 1457*barAB* zeigt im Vergleich eine nicht signifikante Verzögerung des Wachstums. Für die anderen beiden untersuchten Wildtypen *S. epidermidis* 1057 und 8400 war ebenfalls keine relevante Abweichung in der Wachstumskurve festgestellt worden (JONAS, 2009). Folglich wurden für alle Stämme in den weitergehenden Untersuchungen identische Zeitpunkte für die Gewinnung von Proteinproben gewählt.

Erkenntnisse zum globalen Stressregulator  $\sigma^B$  (1.4.1) stammen vor allem aus Untersuchungen mit *Bacillus subtilis* und konnten teilweise auch für *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* adaptiert werden. In dieser Arbeit sollte das wachstumsabhängige Expressionsmuster des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^B$  in *S. epidermidis* analysiert werden. Für *S. epidermidis* 1457 wurde in allen Western Blot Analysen eine Dynamik im Expressionsmuster beobachtet (Abbildung 4-9). Die Analysen zeigten eine zunehmende Expression während der exponentiellen Phase, mit einem Maximum während der spätexponentiellen Phase. Spätestens ab der spättransitorischen Phase nahm die Menge von  $\sigma^B$  relevant ab. Trotzdem scheint eine minimale basale

Expression auch während der stationären Phase vorhanden zu sein. In einer von zwei Einzeluntersuchungen wurde eine erneute Zunahme der Expression ab etwa 16 Stunden beobachtet (Daten nicht gezeigt). Weitere Untersuchungen müssten hier folgen, um diese Einzelbeobachtung zu evaluieren.

Dass der intrazelluläre  $\sigma^B$ -Spiegel allerdings nicht mit der  $\sigma^B$ -Aktivität korrelieren muss, ist aus Untersuchungen mit *B. subtilis* bekannt (BENSON & HALDENWANG, 1993a, 1993b). In *S. epidermidis* 1457 wurde bereits zuvor in dieser Arbeitsgruppe die wachstumsabhängige  $\sigma^B$ -Aktivität anhand von Transkriptionsanalysen des ausschließlich  $\sigma^B$ -abhängig transkribierten Gens *asp23* (*alkaline shock protein 23*) untersucht. Interessanterweise fand sich für *S. epidermidis* 1457 die maximale  $\sigma^B$ -Aktivität bei sieben Stunden, somit später als die in dieser Arbeit beobachtete maximale  $\sigma^B$ -Menge (JÄGER, 2007). Für die Aktivität von  $\sigma^B$  ist die Regulation durch RsbU, RsbV und RsbW entscheidend. Somit konnte auch für *S. epidermidis* 1457 gezeigt werden, dass keine direkte Korrelation zwischen der Menge und Aktivität des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^B$  besteht.

Um ein stammspezifisches Verhalten auszuschließen, wurden ebenfalls Untersuchungen in den *S. epidermidis* Wildtypstämmen 1057 und 8400 durchgeführt (Abbildung 4-9B). Während *S. epidermidis* 1057 eine ähnliche Dynamik zeigt, kann für *S. epidermidis* 8400 eine kontinuierliche Expression in einem Zeitraum von 24 Stunden beobachtet werden. Weitere Untersuchungen mit anderen Stämmen sind somit nötig, um stammspezifische Ursachen auszuschließen. Für *S. aureus* Newman (DUTHIE & LORENZ, 1952) wurde von Senn *et al.* ein zu *S. epidermidis* 8400 ähnliches kontinuierliches Expressionsmuster (1 bis 8 Stunden) beobachtet (SENN *et al.*, 2005), auch hier fand sich eine abweichende Dynamik der  $\sigma^B$ -Aktivität, mit maximaler Aktivität während der spätexponentiellen Phase (BISCHOFF *et al.*, 2001).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass  $\sigma^B$  als globaler Regulator in *S. epidermidis* in allen Wachstumsphasen präsent ist. Die Dynamik der Proteinmenge variiert je nach *S. epidermidis* Stamm. Wachstumsabhängige Northern Blot Analysen des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^B$  könnten helfen zu verstehen, inwieweit posttranskriptionelle Mechanismen eine Rolle für die Expression von  $\sigma^B$  in *S. epidermidis* spielen. Ähnliche Analysen in *S. aureus* Newman ergaben eine Diskrepanz zwischen Transkription und Proteinexpressionsmuster (BISCHOFF *et al.*, 2001; SENN *et al.*, 2005). Entscheidend für die regulative Funktion von  $\sigma^B$  ist jedoch vor allem die Aktivität und nicht die Proteinmenge. Der  $\sigma^B$  Positivregulator RsbU wird benötigt, um den globalen Stressregulator  $\sigma^B$  über eine Regulationskaskade zu aktivieren (Abbildung 1-2) (GIACHINO *et al.*, 2001; KNOBLOCH

*et al.*, 2001). In *S. epidermidis* 1457 wurde RsbU sowohl in der exponentiellen, als auch transitorischen Phase nachgewiesen (Abbildung 4-10). Während die Expression von der früh- bis mittexponentiellen Phase zunahm, war RsbU ab der mittexponentiellen bis zur spättransitorischen Phase ohne relevante Dynamik präsent. Stationär war RsbU bis auf zwei aus fünf Untersuchungen kaum noch nachweisbar. Darüber hinaus wurde ab der spättransitorischen Phase eine weitere, etwa ein Kilodalton kleinere spezifische Bande beobachtet. Dies weist auf eine spezifische Prozessierung von RsbU hin. Ein fast identisches Expressionsmuster ließ sich für die anderen untersuchten Wildtypstämme *S. epidermidis* 1057 und 8400 nachweisen, mit dem Unterschied, dass bei diesen Wildtypen bei 24 Stunden noch immer eine spezifische Bande vorhanden war. Somit zeigen die hier untersuchten *S. epidermidis* Wildtypstämme eine kontinuierliche Expression während der exponentiellen und transitorischen Phase, mit Hinweis auf eine spezifische Prozessierung in der stationären Phase.

In *B. subtilis* wird RsbU selbst durch eine Kaskade reguliert, bestehend aus RsbR, RsbS, RsbT und RsbX, wobei RsbT durch Bindung an eine N-terminale Bindungsdomäne in RsbU dessen Phosphataseaktivität stimuliert (AKBAR *et al.*, 1997; DELUMEAU *et al.*, 2004). Diese vorgeschaltete Kaskade fehlt jedoch in *S. aureus* und *S. epidermidis*. In Staphylokokken wird *rsbU* von einem  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor abgelesen, strangabwärts werden zusätzlich *rsbVWsigB* von einem vorgeschalteten,  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor transkribiert (KNOBLOCH *et al.*, 2001). Interessanterweise konnte für *S. aureus* trotz fehlender vorgeschalteter Regulationskaskade gezeigt werden, dass die N-terminale Bindungsdomäne für RsbT in RsbU ebenfalls konserviert ist (PANE-FARRE *et al.*, 2009). Dies lässt somit einen von *B. subtilis* abweichenden Aktivierungsmechanismen für RsbU in Staphylokokken vermuten.

Für *S. aureus* ist bekannt, dass eine Überexpression von RsbU zu einer unverzüglichen Erhöhung der  $\sigma^B$ -Aktivität führt (SENN *et al.*, 2005). Dies lässt auch für *S. epidermidis* eine direkte Korrelation zwischen RsbU-Expression und  $\sigma^B$ -Aktivität vermuten. Allerdings zeigte in *S. epidermidis* die  $\sigma^B$ -Aktivität im Gegensatz zur RsbU-Expression eine deutliche Dynamik, mit einem Maximum der Aktivität während der spätexponentiellen Phase (JÄGER, 2007). Diese Beobachtung deckt sich mit denen in *S. aureus*. Northern und Western Blots zeigten während der exponentiellen Phase eine kontinuierliche *rsbU*-Transkription in *S. aureus* und einen konstanten RsbU Proteinspiegel, während  $\sigma^B$  eine Dynamik mit maximaler Aktivität während der spätexponentiellen Phase aufwies (BISCHOFF *et al.*, 2001; SENN *et al.*, 2005).

Auffällig ist, dass  $\sigma^B$  länger als RsbU in der stationären Phase nachweisbar ist. Ein Grund hierfür könnte unter anderem die Autoregulation von  $\sigma^B$  sein.

Um zu beurteilen, ob  $\sigma^B$  Einfluss auf die Regulation von RsbU hat, wurde das Expressionsmuster in einer *sigB*-Deletionsmutante untersucht (Abbildung 4-11), welches eine tendenziell später einsetzende und verkürzte Expression von RsbU zeigte. Zusätzlich setzte in dieser Mutant die spezifische Prozessierung früher ein als beim Wildtyp. Die Beurteilung dieses veränderten Expressionsmusters ist allerdings schwierig, da es sich bei  $\sigma^B$  um einen globalen Regulator handelt, dessen Deletion in *S. epidermidis* eine massive Veränderung der Expressionsmuster sowohl von Exoproteinen, als auch cytoplasmatischer Proteine bewirkt (JONAS, 2009; KIES *et al.*, 2001). Die Hypothese, dass  $\sigma^B$  selbst Einfluss auf die Regulation von RsbU hat, wird allerdings durch neuere Erkenntnisse über die Expression von  $\sigma^A$  gestützt. Die Gene, die für den Sigmafaktor  $\sigma^A$  kodieren, finden sich im *macromolecular synthesis operon* (MMSO), welches in *S. epidermidis* für drei weitere Gene kodiert. Bryant *et al.* zeigten anhand *S. epidermidis* 1457, dass *sigA* unter anderem auch von einem  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor transkribiert wird (BRYANT *et al.*, 2010). Dies würde bedeuten, dass *sigA* bei einer Deletion von *sigB* vermindert transkribiert wird und somit eine geringere und verzögerte RsbU-Expression erklären könnte.

Transkriptionsanalysen zeigten, dass *sigA* fast ausschließlich kontinuierlich transkribiert wird (BRYANT *et al.*, 2010). Eine Ausnahme bildet jedoch der Übergang von der transitorischen in die stationäre Phase, bei 10 und 12 Stunden fand sich eine deutlich reduzierte Transkription. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die *sigA*-Transkription im Wildtyp ab 12 bis 16 Stunden wieder zunahm, jedoch nicht in der *sigB*-Deletionsmutante (BRYANT *et al.*, 2010). Eine Reduktion der RsbU Expression zwischen 10 und 12 Stunden konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden, wohl aber die deutlich längere Expression von RsbU beim Wildtyp im Gegensatz zu der *sigB*-Deletionsmutante.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass  $\sigma^B$  die Expression von RsbU indirekt mittels Modulation der  $\sigma^A$ -Transkription reguliert, eine zusätzliche posttranskriptionelle Regulation scheint jedoch wahrscheinlich. Diese RsbU-Modulation durch  $\sigma^B$  bedeutet, dass unter Stressbedingungen, neben der Autoregulation von  $\sigma^B$ , eine Aktivierung der RsbU-Expression stattfindet. Dies erscheint sinnvoll, wenn bedacht wird, dass durch die Autoregulation von  $\sigma^B$  die Transkription von *rsbVWsigB* initiiert und somit dafür gesorgt wird, dass RsbV ausreichend durch RsbU dephosphoryliert werden kann. Diese Positivregulation von RsbU wirft allerdings die Frage auf, inwieweit Mechanismen vorhanden sind, die RsbU negativ regulieren könnten, wie dies für *S. aureus* vermutet

wurde (PANE-FARRE *et al.*, 2009). Hier könnten Untersuchungen zu der in *S. aureus* konservierten RsbT-Bindungsdomäne Aufschluss über einen potentiellen negativen Regulator geben.

Alternativ wäre auch eine *agr*-vermittelte Regulation von RsbU in Betracht zu ziehen. Proteomanalysen in dieser Arbeitsgruppe ergaben für *S. epidermidis* 1457*agr* eine stärkere RsbU Expression (JONAS, 2009). Dies könnte ebenfalls die geringere RsbU-Expression in *S. epidermidis* 1457*sigB* erklären, da das *agr*-System durch  $\sigma^B$  reprimiert wird und somit für eine geringere RsbU-Expression verantwortlich sein könnte (JÄGER, 2007; ZIEBANDT *et al.*, 2004). Dagegen sprechen jedoch die Beobachtung von Jäger, der für *S. epidermidis* 1457*sigB* keinen relevanten Transkriptionsunterschied von *rsbU* zum Wildtyp beobachtete (JÄGER, 2007). Zudem fiel eine früher einsetzende spezifische Prozessierung von RsbU in der *sigB*-Deletionsmutante im Vergleich mit dem Wildtyp auf (Abbildung 4-11). Für *S. epidermidis* 1457*sigB* war in dieser Arbeitsgruppe bereits eine Verdopplung der extrazellulären Gesamtproteaseaktivität beobachtet worden (KNESCHKE, 2011). Somit wird erstmalig eine verstärkte cytoplasmatische proteolytische Aktivität der *sigB*-Deletionsmutante postuliert. Da Sigmafaktoren für die Erkennung von Promotoren zuständig sind (1.4.1), können sie nur positiv regulieren und benötigen einen weiteren Regulator. Auch hier ist eine *agr*-vermittelte Regulation möglich. Aus Transkriptionsanalysen mit RNAIII, einem Transkript des *agr*-Locus, ist bekannt, dass RNAIII bei *S. epidermidis* 1457*sigB* im Vergleich zum Wildtyp verstärkt transkribiert wird (KNESCHKE, 2011). Durch die fehlende Repression von *agr* werden Proteasen hochreguliert und sorgen somit für einen beschleunigten Abbau von RsbU. Bislang wurde für *agr* nur eine Induktion von Exoproteasen beschrieben (YAO *et al.*, 2006). Dies wird zusätzlich durch Erkenntnisse dieser Arbeitsgruppe gestützt, dass eine Deletion von *agr* zu einem fast vollständigem Verlust der extrazellulären Proteasen führt (Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. J.K.-M. Knobloch, unpubliziert).

Der globale Stressregulator  $\sigma^B$  wird durch RsbU über eine Regulationskaskade aktiviert. In dieser Arbeit sollten die wachstumsabhängigen Expressionsmuster beider Proteine untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass das von einem  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor transkribierte RsbU in allen untersuchten *S. epidermidis* Stämmen kontinuierlich bis zur transitorischen Phase exprimiert wird und in der stationären Phase einer spezifischen Prozessierung unterliegt.  $\sigma^B$  ist in *S. epidermidis* in allen Wachstumsphasen präsent, mit einer variierenden Dynamik der Proteinmenge je nach *S. epidermidis* Stamm. Für *S. epidermidis* 1457 wurde gezeigt, dass keine Korrelation zwischen der Aktivität und

Expression von  $\sigma^B$  vorhanden ist. Des Weiteren ergaben die Analysen, dass  $\sigma^B$  offensichtlich länger als RsbU exprimiert wird. Erklärungen hierfür sind die Autoregulation von  $\sigma^B$ , eine indirekte Regulation von RsbU durch das *agr*-System oder durch  $\sigma^B$  mittels Modulation der  $\sigma^A$ -Transkription. Am wahrscheinlichsten ist jedoch eine Steuerung der beobachteten spezifischen proteolytischen Prozessierung von RsbU. An dieser Stelle wurde erstmalig eine früher einsetzende spezifische proteolytische Prozessierung in der *S. epidermidis* 1457 *sigB* Mutante beobachtet. Es wird eine verstärkte *agr*-regulierte Proteasenaktivität dieser Mutante postuliert.

### 5.3 Expression von BarA und BarB

In *S. epidermidis* sind BarA und BarB globale Regulatoren, die initial aufgrund ihrer postulierten Funktion in der Biofilmregulation benannt wurden (KNOBLOCH, 2005). In dieser Arbeitsgruppe wurde für BarB sowohl eine essenzielle Bedeutung für die Biofilmbildung ermittelt, als auch ein signifikanter Einfluss auf das intrazelluläre Proteom durch BarA und BarB (JONAS, 2009). In dieser Arbeit sollte das Expressionsmuster von BarA und BarB in *S. epidermidis* 1457 untersucht werden. BarA war in *S. epidermidis* 1457 von der frühen exponentiellen bis zur transitorischen Phase nachweisbar (Abbildung 4-12). Die prominenteste Bande fand sich in der mitt- und spätexponentielle Phase, mit folgender kontinuierlicher Abnahme der Proteinmenge bis etwa 14 Stunden. Ab 16 Stunden war kein BarA mehr nachweisbar. In *S. epidermidis* 8400 zeigte sich ein sehr ähnliches Expressionsmuster. In *S. epidermidis* 1057 nahm die Menge an BarA über die Zeit gesehen bereits schon ab der spätexponentiellen Phase ab, sodass für BarA keine verallgemeinernde Aussage zur Expression in *S. epidermidis* getroffen werden kann. Es wurde aber festgestellt, dass BarA immer von der exponentiellen bis frühstationären Phase exprimiert wird.

BarB hingegen zeigte immer ein konstitutives Expressionsmuster ohne relevante Dynamik (Abbildung 4-13). Dies konnte in allen untersuchten *S. epidermidis* Wildtypen beobachtet werden.

Aus Transkriptionsanalysen ist bekannt, dass *barA* und *barB* zusammen transkribiert werden (BARTSCHT, 2001), einerseits von einem  $\sigma^B$ -, andererseits von einem  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor (JONAS, 2009). Das  $\sigma^A$ -abhängige Transkript umfasst zusätzlich das strangaufwärts liegende Gen *purR*. Northern Blot Analysen zeigten, dass das  $\sigma^B$ -abhängige Transkript während der exponentiellen Phase stark und während der stationären Phase nur schwach vorhanden war (BARTSCHT, 2001). Das  $\sigma^A$ -abhängige Transkript hingegen war

nur während der exponentiellen Phase nachweisbar (BARTSCHT, 2001). Für BarA kann somit nur gezeigt werden, dass ein wachstumsabhängiges Expressionsmuster vorliegt, welches sich ähnlich dem Transkriptionsmuster verhält. Es stellt sich die Frage, warum BarB trotz einer zur BarA identischen Transkription länger nachweisbar ist. Da BarA während der stationären Phase (24 Stunden) nicht mehr exprimiert wird, wurde vermutet, dass die BarB Expression offensichtlich nicht auf (post-)transkriptioneller Ebene reguliert wird. Somit würde es sich bei BarB um ein besonders stabiles Protein handeln.

In *S. epidermidis* reguliert BarA die PIA-Synthese durch eine signifikante positive Regulation der *icaA*-Transkription (JONAS, 2009). Für andere Staphylokokkenspezies liegen für das BarA-homologe YabJ bislang keine vergleichbaren Daten oder Hinweise auf die Funktion vor. YabJ in *B. subtilis* wurde bislang eine fragliche Rolle in der Purinbiosynthese zugesprochen (SAXILD *et al.*, 2001; SINHA *et al.*, 1999). In *S. aureus* konnte durch Deletion des *yabJspoVG*-Operons und anschließender Komplementierung nur dem BarB-homologen SpoVG eine Funktionen beigemessen werden (MEIER *et al.*, 2007; SCHULTHESS *et al.*, 2009, 2011). In *S. aureus* ist SpoVG unter anderem essenziell für die Bildung einer Polysaccharidkapsel, welche bei *S. epidermidis* nicht vorhanden ist (MEIER *et al.*, 2007). Zusätzlich ist SpoVG in *S. aureus* Induktor der Nuklease-, der extrazellulären Protease- und Lipaseaktivität (SCHULTHESS *et al.*, 2011).

Im Gegensatz zu der konstitutiven Expression in *S. epidermidis* wurde für das BarB-homologe SpoVG in *S. aureus* eine Dynamik in der Expression beobachtet, sowohl auf Transkriptions-, als auch Translationsebene (SCHULTHESS *et al.*, 2011). Dass sich das Expressionsmuster von BarB in *S. epidermidis* von dem von SpoVG in *S. aureus* unterscheidet, lässt sich wahrscheinlich an den unterschiedlichen Funktionen der Proteine erklären, die diese in den jeweiligen Organismen inne haben. BarB induziert in *S. epidermidis* die *icaA*-Transkription, wobei bislang unklar ist, ob diese Induktion direkt oder über ein Intermediat erfolgt (JONAS, 2009). Die *icaA*-Genexpression unterliegt im Gegensatz zu BarB einer wachstumsabhängigen Dynamik, neben BarB reguliert jedoch auch IcaR als spezifischer Repressor die Transkription von *icaA* (GÖTZ, 2002; PINTENS *et al.*, 2008). Die konstitutive Expression von BarB als essenziellem Regulator der Biofilmsynthese erscheint durchaus sinnvoll. Möglicherweise spielen hier post-translationale Mechanismen zur Regulierung eine Rolle. In einer anderen Arbeit aus dieser Arbeitsgruppe wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Proteinmenge und das Verhältnis von BarA und BarB zueinander für die Biofilmsynthese entscheidend sein könnten, da die Komplementierung einer *S. epidermidis barAB*-Deletionsmutante mit einem *barAB*-

tragenden Plasmid ihren biofilmbegleitenden Phänotyp beibehält (JONAS, 2009).

Um zu bestätigen, dass BarB ein besonders stabiles Protein ist, sollte die BarB-Expression in *S. epidermidis* 1457*sigB* analysiert werden. Aus Transkriptionsanalysen war bereits bekannt, dass BarB nicht nur  $\sigma^B$ -abhängig transkribiert wird, sondern zusätzlich über ein größeres, *purR* umfassendes Transkript, welches jedoch nur während der exponentiellen und nicht in der stationären Phase vorhanden ist (BARTSCHT, 2001). Tatsächlich zeigte sich, dass BarB in der *sigB*-Deletionsmutante weiterhin kontinuierlich vorhanden war, wenn auch in einer im Vergleich zum Wildtyp geringeren Menge. Es konnte also gezeigt werden, dass es sich bei BarB um ein besonders stabiles Protein handelt. Zusätzlich zeigt sich, dass die  $\sigma^B$ -abhängige Transkription keine Bedeutung für die Dynamik der BarB Expression spielt, wohl aber für die absolute Menge an BarB.

Limitiert werden die Ergebnisse zu BarA und BarB in *S. epidermidis* allerdings dadurch, dass die Expressionsmusteranalysen nur an planktonischen Zellen durchgeführt wurden und somit nicht vollständig den Bedingungen der im Biofilm lebenden Zellen entspricht. Somit sollten weitergehende Untersuchungen zum Expressionsmuster von BarA und BarB an sessilen Zellen erfolgen.

BarA und BarB sind globale Regulatoren in *S. epidermidis*. Für BarA wurde in den vorliegenden Analysen in *S. epidermidis* eine wachstumsabhängige Expression von der exponentiellen bis frühstationären Phase beobachtet. Für BarB dahingegen wurde nicht nur in *S. epidermidis* Wildtypen, sondern sogar in der *sigB*-Deletionsmutante eine konstitutive Expression beobachtet. Somit wird dieses Protein trotz eines  $\sigma^B$ -abhängigen Promotors auch unabhängig von  $\sigma^B$  konstitutiv exprimiert und weist eine deutlich erhöhte Stabilität auf. BarA und BarB haben in *S. epidermidis* im Vergleich zu ihren Homologen YabJ und SpoVG in *S. aureus* aufgrund unterschiedlicher Funktionen in dem jeweiligen Organismus eine abweichende Regulation und dementsprechend ein anderes Expressionsmuster.

## 5.4 Expression von GcaD

PIA ist ein Homoglycan, welches aus durchschnittlich 130  $\beta$ -1,6-verbundenen N-Acetylglukosaminresten (GlcNAc) besteht und von den Proteinen des *ica*-Operons synthetisiert wird (HEILMANN *et al.*, 1996; MACK *et al.*, 1996). UDP-aktiviertes N-Acetylglukosamin wird in mehreren Schritten aus Fruktose-6-phosphat, einem Glykolyseintermediat, synthetisiert (Abbildung 5-1) (GERKE *et al.*, 1998). Die letzten beiden Syntheseschritte werden durch GcaD (Alternativname: GImU, EC-Nummern 2.7.7.23 und 2.3.1.157) katalysiert, welche eine bifunktionale UDP-N-Acetylglukosaminpyrophosphorylase und

Glukosamin-1-phosphat-N-acetyltransferase ist. In *S. epidermidis* 1457 wurde GcaD von der frühen exponentiellen bis frühen transitorischen Phase nachgewiesen (Abbildung 4-14). Hierbei zeigte sich eine Zunahme der Expression am Anfang der exponentiellen Phase, postexponentiell war weniger Protein nachweisbar. Ab der späten transitorischen Phase war GcaD nicht mehr sicher nachweisbar. Für *S. epidermidis* 1057 zeigte sich ein identisches Bild, während bei *S. epidermidis* 8400 eine Abnahme der Proteinmenge erst zum Ende der transitorischen Phase beobachtet werden konnte. Es kann somit gesagt werden, dass GcaD in *S. epidermidis* offensichtlich vor allem während der mitt- bis spätexponentiellen Phase exprimiert wird. Somit wäre vor allem zu diesen Zeitpunkten genug UDP-N-Acetylglukosamin für die Zellwandsynthese und PIA-Produktion vorhanden.

Sadykov *et al.* führten an *S. epidermidis* 1457 wachstumsabhängige Transkriptionsanalysen der für die Synthese von UDP-N-Acetylglukosamin aus Fruktose-6-phosphat benötigten Enzyme GlmS, GlmM und GcaD/GlmU durch (SADYKOV *et al.*, 2008). *gcaD* mRNA wurde während der exponentiellen Phase (2 und 4 h), nicht aber während der transitorischen Phase (6 und 8 h) nachgewiesen. Von 2 bis 4 Stunden konnte eine Zunahme der Bandenstärke der Transkriptionsanalysen beobachtet werden (SADYKOV *et al.*, 2008). Somit fand sich zu diesen Zeitpunkten eine Dynamik ähnlich zu den hier durchgeführten Proteinexpressionsmustern. Allerdings war das Protein etwa 1,5 Stunden länger als die entsprechende mRNA nachweisbar. Unerwarteterweise nahm die Transkription bei 8 und 10 Stunden wieder zu, die Bandenstärke entsprach sogar denen der exponentiellen Phase (SADYKOV *et al.*, 2008). Eine ähnliche Zunahme der Proteinexpression wurde nicht beobachtet, lediglich in zwei von sechs Untersuchungen war bei 8 und 24 Stunden eine Bande beobachtet worden. Eine mögliche Erklärung könnte ein beschleunigter Proteinabbau während der stationären Phase sein. Alternativ könnte GcaD einen zu geringen Anteil an der Gesamtmenge des Proteingemisches besessen haben, um mittels Western Blot nachgewiesen zu werden. Vermutlich ist eine Translation von GcaD während der stationären Phase möglich, da in zwei von sechs Western Blots ein Nachweis erfolgte. Eine zumindest geringere GcaD Expression am Übergang zwischen transitorischer und stationärer Phase erscheint sinnvoll, da auch zu diesen Zeitpunkt UDP-N-Acetylglukosamin als Bestandteile der Zellwandsynthese, wenn auch in einem geringeren Umfang, benötigt wird.

Vuong *et al.* konnten zeigen, dass eine Hemmung des Citratzyklus in *S. epidermidis* zu einer vermehrten PIA-Synthese führte (Abbildung 5-1), umgekehrt war bei erhöhter

Citratzyklusaktivität weniger PIA nachweisbar (VUONG *et al.*, 2005). Die Citratzyklusaktivität ist für den vollständigen Katabolismus nichtbevorzugter Kohlenstoffquellen essenziell (VUONG *et al.*, 2005). UDP-N-Acetylglukosamin wird aus Fruktose-6-phosphat synthetisiert, welches ein Intermediat der Glykolyse ist. Am Ende der Glykolyse entsteht Pyruvat, welches durch die Pyruvatdehydrogenase zu Acetyl-CoA umgewandelt wird. Die vollständige Verstoffwechslung von Acetyl-CoA erfolgt dann im Citratzyklus. Für welchen Stoffwechselweg Fruktose-6-Phosphat weiterverwendet wird, muss somit reguliert werden. Durch Generierung einer Deletionsmutante beschrieben Sadykov *et al.* einen positiven Effekt auf die Biofilmbildung und Repression des Citratzyklus durch das *catabolite control protein A* (CcpA). Dieser Effekt scheint sich jedoch nicht via *gcaD*-Transkription auszuwirken. (SADYKOV *et al.*, 2011).

Anhand einer *S. epidermidis* 1457 Aconitasemutante zeigten Sadykov *et al.*, dass durch Hemmung des Citratzyklus die Transkription von *gcaD* induziert wurde und im Vergleich zum Wildtyp vermehrt UDP-N-Acetylglukosamin vorhanden war (SADYKOV *et al.*, 2008). Aus Untersuchungen der biofilmbildung negativen Mutante *S. epidermidis* 1457*barAB* war

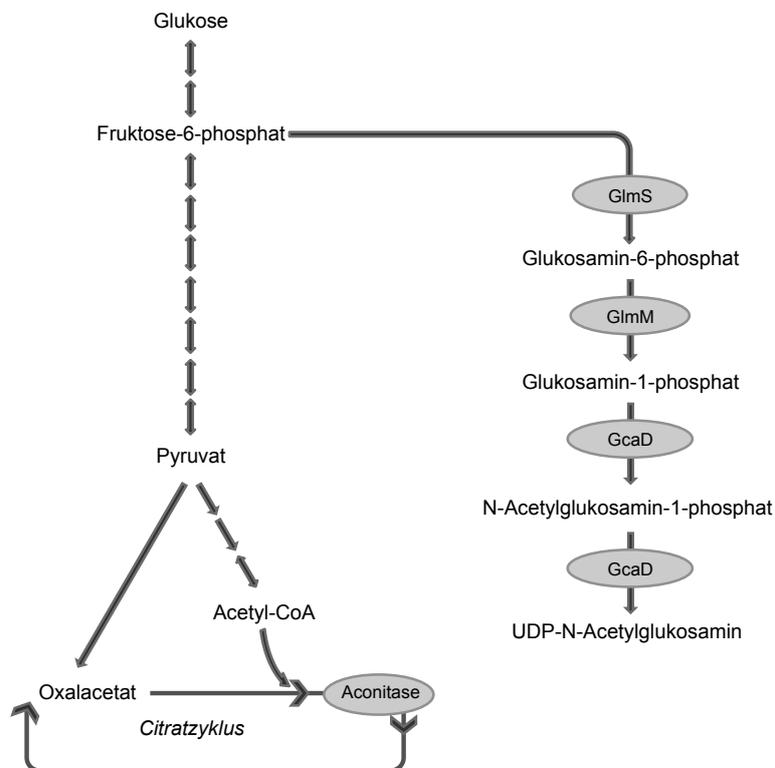


Abbildung 5-1 Ausschnitt aus dem Metabolismus von *S. epidermidis*

Dargestellt ist der Zusammenhang zwischen PIA-Synthese, Glykolyse/Glukoneogenese und Citratzyklus. Für die PIA-Synthese wird UDP-N-Acetylglukosamin benötigt. UDP-N-Acetylglukosamin wird in mehreren Schritten, von denen zwei durch GcaD katalysiert werden, aus dem Glykolyseintermediat Fruktose-6-phosphat hergestellt (KEGG-Pathway 2.12).

bekannt, dass in dieser Mutante Enzyme der Glykolyse und des Citratzyklus induziert wurden (JONAS, 2009). Werden Enzyme der Glykolyse und des Citratzyklus induziert, müsste eine geringere Synthese von UDP-N-Acetylglucosamin erfolgen, da weniger Fruktose-6-phosphat für die Synthese zur Verfügung steht. Da *S. epidermidis* 1457*barAB* keinen Wachstumsdefekt, sondern nur eine nicht relevante Wachstumsverzögerung besitzt (JONAS, 2009), scheint für das Wachstum eine ausreichende Menge UDP-N-Acetylglucosamin vorzuliegen. Es stellte sich somit die Frage nach der Expression von GcaD in dieser Mutante. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass GcaD trotz vermehrter Glykolyse und Citratzyklusaktivität in *S. epidermidis* 1457*barAB* während des gesamten Wachstums annähernd konstitutiv exprimiert wurde (Abbildung 4-15). Für die *barAB*-homologe *S. aureus* Newman *yabJspoVG*-Deletionsmutante wurde beobachtet, dass eine Induktion der *glmU*-/*gcaD*-Transkription in dieser Mutante vorlag (SCHULTHESS *et al.*, 2011). Allerdings wurden in dieser Arbeit nur Proben am Übergang zur transitorischen Phase bei fünf Stunden verwendet, sodass keine Aussage zum zeitlichen Verlauf möglich ist.

Eine konstitutive GcaD-Expression erscheint sinnvoll, da der Organismus jederzeit bei Zufuhr von Glucose überschüssiges Fruktose-6-Phosphat in die Synthese von UDP-N-Acetylglucosamin verwenden kann. Ein ähnliches Verhalten, welches die Bereitschaft zur Aufnahme der PIA-Synthese signalisiert, wurde von Dobinsky *et al.* für die *icaADBC* Transkription unter Glucosemangel bei *S. epidermidis* beobachtet (DOBINSKY *et al.*, 2003). Bei Mangel von Glucose im Medium wurde kein PIA synthetisiert, erstaunlicherweise fand eine ausgeprägte *icaADBC* Transkription statt. Diese Transkripte waren zudem funktionell aktiv, da bei Zufuhr von Glucose eine zügige Aufnahme der PIA-Synthese beobachtet wurde.

Interessanterweise scheint die Einzeldelation von *barA* oder *barB* in *S. epidermidis* 1457 nicht den gleichen Einfluss auf die GcaD-Menge zu haben wie die Doppeldelation (Abbildung 4-15). Bei beiden Mutanten war ähnlich dem Wildtyp GcaD bei acht und 24 Stunden nicht sicher nachweisbar. Die 1457*barA* Deletionsmutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp kaum eine relevante Änderung im Expressionsmuster. Die biofilmnegative *S. epidermidis* 1457*barB*-Mutante zeigte eine eindeutige Proteinexpression sogar nur während der früh- bis mittexponentiellen Phase. Somit korreliert ein biofilmnegativer Phänotyp nicht mit einer annähernd konstitutiven GcaD Expression, wie es bei *S. epidermidis* 1457*barAB* der Fall ist.

Da ein biofilmnegativer Phänotyp offensichtlich nicht mit einer annähernd konstitutiven GcaD Expression einhergeht, stellt sich die Frage wieso *S. epidermidis* 1457*barAB* dieses

Expressionsmuster aufweist. Alternativ ist somit an eine verminderte Proteaseaktivität der *barAB*-Deletionsmutante zu denken und einer daraus resultierenden längeren GcaD Halbwertszeit. Aus Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe ist bekannt, dass in der *barAB*-Deletionsmutante extrazelluläre Proteasen nicht mehr detektierbar sind (Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. J.K.-M. Knobloch, unpubliziert). Der Ausfall dieser globalen Regulatoren führt auch am intrazellulären Proteom zu massiven Veränderungen (JONAS, 2009), sodass hier eine verminderte intrazelluläre Proteasenaktivität postuliert wird.

Stresssignale, wie beispielsweise Hitze, induzieren eine Biofilmbildung. Dies geschieht durch Aktivierung von RsbU, der konsekutiv erhöhten  $\sigma^B$ -Aktivität und negativen Transkriptionsregulation des spezifischen Repressors des *ica*-Operons, IcaR. Die Deletion von  $\sigma^B$  führt zu einem biofilmreduzierten Phänotyp. Hier stellte sich ebenfalls die Frage nach der Expression von GcaD in einer  $\sigma^B$ -Deletionsmutante. In *S. epidermidis* 1457*sigB* war GcaD nur in der exponentiellen Phase nachweisbar und zeigte sogar im Vergleich zu *S. epidermidis* 1457*barB* mit biofilmnegativem Phänotyp schmalere Banden (Abbildung 4-15). Somit lässt sich auch hier kein Zusammenhang zwischen Biofilmphänotyp und GcaD Expression erkennen. Auffällig waren viele kleinere Proteine im Verlauf des Wachstums. Wie schon bei RsbU (5.2) wurde auch bei Untersuchungen mit GcaD eine erhöhte Proteaseaktivität in *S. epidermidis* 1457*sigB* festgestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine direkte Korrelation zwischen Biofilmphänotyp und der GcaD Expression besteht. Die Regulation zentraler Stoffwechselwege in *S. epidermidis* hat einen Einfluss auf die PIA-Synthese. Durch Hemmung des Citratzyklus wird die PIA-Synthese induziert, ein wichtiger Mechanismus ist die Expression des an der Synthese von UDP-N-Acetylglucosamin beteiligten GcaD.

Zusätzlich konnte die bei RsbU beobachtete erhöhte Proteasenaktivität in *S. epidermidis* 1457*sigB* bei Untersuchungen mit GcaD bestätigt werden. Für *S. epidermidis* 1457*barAB* wird dahingegen eine deutlich verminderte Proteasenaktivität postuliert.

## 5.5 Expression von IcaR

PIA wird aus UDP-N-Acetylglucosamin durch die Enzyme des *ica*-Operons, IcaA, IcaD, IcaB und IcaC, synthetisiert (HEILMANN *et al.*, 1996). IcaR ist ein spezifische Repressor der *icaADBC*-Transkription (CONLON *et al.*, 2002b; GÖTZ, 2002). Die Transkription von *icaR* wird indirekt negativ durch  $\sigma^B$  und Ethanol im Medium reguliert (CONLON *et al.*, 2002a; KNOBLOCH *et al.*, 2004). In *S. epidermidis* 1457 wird IcaR von der exponentiellen bis transitorischen Phase exprimiert (Abbildung 4-16). Ab der transitorischen Phase wurde

eine Doppelbande aus IcaR und einer etwa 0,5 Kilodalton kleineren Bande beobachtet. Die Doppelbande ging im weiteren Verlauf in das kleinere Protein über, sodass ab Beginn der stationären Phase nur noch das kleinere Protein vorhanden war. Dies ließ eine spezifische proteolytische Prozessierung des Proteins vermuten. Vergleichende Analysen mit weiteren *S. epidermidis* Wildtypstämmen ergaben für *S. epidermidis* 1057 ein identisches Expressionsmuster und für *S. epidermidis* 8400 ein konstitutives Expressionsmuster, jedoch ohne abgrenzbare Doppelbande. Somit fand sich für zwei von drei untersuchten *S. epidermidis* Stämmen eine Expression von der exponentiellen bis transitorischen Phase mit spezifischer Prozessierung während der transitorischen Phase.

Aus Northern Blot Analysen war bekannt, dass *icaADBC* in einem Medium mit ausreichend Glukose während der exponentiellen Phase von einem  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor transkribiert wird (DOBINSKY *et al.*, 2003; KNOBLOCH *et al.*, 2004). Somit müsste die Transkription von *icaADBC* während der transitorischen und stationären Phase reprimiert werden. Diese direkte Repression ist bislang nur für IcaR bekannt, während BarB und SarA *icaADBC* positiv regulieren (CONLON *et al.*, 2002b; FLUCKIGER *et al.*, 1998; JONAS, 2009; TORMO *et al.*, 2005b). Eine Repression von *icaADBC* während der transitorischen und stationären Phase würde auf eine IcaR-Aktivität während dieser Phase hindeuten. *icaR* wird bis zur frühen stationären Phase (10 h) annähernd konstitutiv transkribiert, mit einem leichten Maximum während der frühen exponentiellen Phase (2 und 4 h) und ist bei zwölf Stunden kaum noch vorhanden (SADYKOV *et al.*, 2008). Leider liegen keine Daten für die Transkriptionsanalysen für 24 Stunden vor. Somit konnte gezeigt werden, dass IcaR offensichtlich kontinuierlich bis zur späten transitorischen Phase translatiert wird, vermutlich aber schon ab der frühen transitorischen Phase einer proteolytischen Prozessierung unterliegt. Es stellt sich folglich die Frage, ob möglicherweise die proteolytisch prozessierte Form des IcaR die *icaADBC*-Transkription reprimiert.

Einen indirekten Hinweis auf die wachstumsabhängige IcaR Aktivität in *S. epidermidis* sammelten Sadykov *et al.* mittels Northern Blot Analysen, die mit einer *icaD*-spezifischen Sonde die Menge an *icaADBC* mRNA in *S. epidermidis* 1457 Wildtyp und der *icaR*-Deletionsmutante demonstrierten (SADYKOV *et al.*, 2008). Die stärkste Bande der *icaADBC* Transkripte im Wildtyp fand sich während der exponentiellen Phase bei vier Stunden. Ohne Repression durch IcaR zeigte sich eine deutlich stärkere Transkription von der frühen exponentiellen (2 h) bis späten transitorischen (8 h) Phase, mit einem Maximum von der früh- bis mittexponentiellen Phase (SADYKOV *et al.*, 2008). Dies würde somit auf

eine IcaR Aktivität vor allem während der exponentiellen Phase hindeuten und gegen die Vermutung sprechen, dass das proteolytisch prozessierte IcaR der Repressor der *icaADBC* Transkription ist.

Die Citratzyklusaktivität spielt offensichtlich ebenfalls eine Rolle für die Transkription von *icaR*. Anhand einer Aconitasedelektionsmutante konnte gezeigt werden, dass die *icaR* Transkription durch die Citratzyklusaktivität während der exponentiellen Phase gehemmt und während der transitorischen und stationären Phase induziert wird (SADYKOV *et al.*, 2008). In *S. epidermidis* 1457*barAB* werden Enzyme der Glykolyse und des Citratzyklus induziert (JONAS, 2009). Dies würde also bedeuten, dass in dieser Mutante trotz biofilmnegativem Phänotyp vermehrt IcaR exprimiert werden könnte. Interessanterweise fand sich bei *S. epidermidis* 1457*barAB* auch noch während der stationären Phase nur das nicht prozessierte IcaR (Abbildung 4-18). Somit findet in *S. epidermidis* 1457*barAB* im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich längere Expression von IcaR statt. Es könnte also vermutet werden, dass der biofilmnegative Phänotyp dieser Mutante aus der abweichenden IcaR Expression resultiert. In Western Blot Analysen der ebenfalls biofilmnegativen *S. epidermidis* 1457*barB* Mutante ergaben allerdings bereits in der transitorischen Phase die Doppelbande und stationär nur noch die proteolytisch prozessierte Form. Des Weiteren war aus Transkriptionsanalysen in dieser Arbeitsgruppe bereits bekannt, dass eine Einfach- oder Doppeldeletion im *barAB*-Locus keinen Einfluss auf die *icaR*-Transkription hat (JONAS, 2009). Folglich kann eine Regulation der Expression von IcaR in *S. epidermidis* 1457*barA*, 1457*barB* und 1457*barAB* nicht auf transkriptioneller Ebene ablaufen. So ist erneut eine erniedrigte Proteaseaktivität in *S. epidermidis* 1457*barAB* für einen deutlich verzögerten Abbau des Proteins zu vermuten. Dies ist bereits bei Untersuchungen mit GcaD für diese Mutante aufgrund des im Vergleich zum Wildtyp massiv veränderten Proteoms von *S. epidermidis* 1457*barAB* postuliert worden (5.4). Somit konnte erneut gezeigt werden, dass extra- und intrazelluläre Proteasen gleichsinnig reguliert werden.

Im Gegensatz zu *S. epidermidis* 1457*barAB* wurde für *S. epidermidis* 1457*sigB* eine erhöhte *agr*-vermittelte Proteasenaktivität postuliert (5.2, 5.4). Um weitere Hinweise auf die Bedeutung der Proteasenaktivität und der Expression von IcaR zu sammeln, wurden die Expressionsmuster in *S. epidermidis* 1457*sigB* mittels Western Blot analysiert (Abbildung 4-17). Tatsächlich erschien im Expressionsmuster von IcaR in *S. epidermidis* 1457*sigB* im Vergleich zum Wildtyp sowohl die Doppelbande früher, als auch die prozessierte Form von IcaR. Aufgrund dieser Betrachtung stellt sich erneut die Frage, ob es die prozessierte Form von IcaR ist, die als *icaADBC*-spezifischer Repressor fungiert.

Die Deletion von *sigB* führt in *S. epidermidis* 1457 zu einer Reduktion der Biofilmbildung, zusätzlich fehlt die indirekte negative Regulation von *icaR* durch  $\sigma^B$  (JONAS, 2009). Da IcaR in *S. epidermidis* 1457*sigB* schneller abgebaut wird, wird postuliert, dass das proteolytisch prozessierte IcaR der aktivere Repressor ist.

Eine Bestätigung, dass die veränderte Proteasenaktivität in der *sigB*-Deletionsmutante *agr*-vermittelt ist, konnte durch weitere Untersuchungen in den Deletionsmutanten *S. epidermidis* 1457*agr* und 1457*sigBagr* bestätigt werden. *agr* wird durch  $\sigma^B$  indirekt negativ reguliert (BISCHOFF *et al.*, 2001). In *S. epidermidis* 1457*agr* zeigte sich transitorisch und stationär nur die unprozessierte Form von IcaR, gleiches galt für die *sigBagr* Doppelmutante. Durch die Deletion von *agr* fehlte die Induktion der Proteasen. Bislang wurde für *agr* nur eine Induktion von extrazelluläre Proteasen beschrieben (SCHEWE, 2009; VUONG *et al.*, 2000a; YAO *et al.*, 2006). Somit kann auch für *S. epidermidis* 1457*agr* postuliert werden, dass sowohl extra-, als auch intrazelluläre Proteasen in dieser Mutante herunterreguliert sind.

Die Deletion von *agr* führt zwar zu einer verstärkten Biofilmbildung, aber nicht zu einer erhöhten PIA-Synthese (VUONG *et al.*, 2003), sodass hier keine Aussage getroffen werden kann, welche Form von IcaR aktiver ist. Hier könnten Untersuchungen mit Hemmung der Proteinbiosynthese, beispielsweise mit Chloramphenicol, und sequenzieller Entnahme von Proteinproben zur Beurteilung der Entwicklung des Expressionsmusters mittels Western Blot einen Hinweis auf eine veränderte Proteaseaktivität oder Regulation auf Translationsebene liefern.

Eine Supplementierung des Mediums mit Ethanol führt zu einer  $\sigma^B$ -unabhängigen Repression der *icaR*-Transkription in *S. epidermidis* und induziert so eine starke Biofilmsynthese (CONLON *et al.*, 2002a; KNOBLOCH *et al.*, 2004). Da bislang nur Daten aus Northern Blot Analysen für *icaR* vorlagen, sollten in dieser Arbeit zusätzlich Analysen der Proteinexpressionsmuster erfolgen (Abbildung 4-19). Sowohl in *S. epidermidis* 1457, als auch in *S. epidermidis* 1457*sigB* wurde in dem mit 3 % Ethanol supplementierten Medium eine schwächere IcaR Expression im Vergleich zu ethanolfreiem Medium beobachtet. Während der transitorischen und stationären Phase war vor allem die nichtprozessierte Form von IcaR dominant. Wenn also bei Supplementierung des Mediums mit Ethanol eine verstärkte Biofilmbildung aufgrund einer deutlich verminderten Repression der *icaADBC*-Transkription beobachtet wird, so kann von einer geringeren IcaR Aktivität ausgegangen werden. Theoretisch könnte man also einen schnelleren Abbau des Proteins erwarten, dies ist jedoch nicht der Fall. Somit ergibt sich auch hier ein weiterer Hinweis, dass die

proteolytisch prozessierte Form der aktivere Repressor der *icaADBC*-Transkription ist. Zusammenfassend betrachtet unterliegt IcaR einem wachstumsabhängigen Expressionsmuster mit einer proteolytischen Prozessierung ab der transitorischen Phase. Es wird postuliert, dass die prozessierte Form von IcaR der aktivere Repressor der *icaADBC*-Transkription ist. Globale Regulatoren, wie BarA, BarB,  $\sigma^B$ , als auch das *Quorum sensing agr*-System, haben einen Einfluss auf die wachstumsabhängige Expression von IcaR. Dies geschieht durch Änderung der intrazellulären Proteaseaktivität. Hierbei konnte gezeigt werden, dass *S. epidermidis* 1457*sigB* eine deutlich erhöhte und 1457*agr* und 1457*barAB* eine deutlich verminderte Proteasenaktivität besitzen. Abschließend konnte auch gezeigt werden, dass intra- und extrazelluläre Proteasen in den genannten Mutanten gleichsinnig reguliert werden.

## 6 Zusammenfassung

*Staphylococcus epidermidis* ist Teil der menschlichen Haut- und Schleimhautflora. Jahrelang wurde *S. epidermidis* in seinem pathogenen Potenzial unterschätzt und als Kontaminat mikrobiologischer Kulturen behandelt. Eine zunehmende Inzidenz langwieriger, fremdkörperassoziierter und häufig auch therapieresistenter Infektionen zwingen jedoch zur Reevaluation der Pathogenität und machen die Biofilmbildung in *S. epidermidis* zum Gegenstand intensiver Forschung. Im Biofilm wird die interzelluläre Adhäsion vor allem durch das extrazelluläre Polysaccharid PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) vermittelt. Die Regulation der PIA-Synthese erfolgt über IcaR, den spezifischen Repressor des *icaADBC*-Locus, sowie globale Regulatoren, wie BarA, BarB, den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  und das *agr-Quorum sensing* System. Systematische Analysen zur wachstumsabhängigen Expression dieser Regulatoren in *S. epidermidis* fehlten bislang. Die wachstumsabhängige Expression wurde mittels Western Blots analysiert, für die polyklonale Antiseren gegen IcaR, GcaD und PurR in Kaninchen generiert wurden. Der Regulator von  $\sigma^B$ , RsbU, wurde während der exponentiellen und transitorischen Phase exprimiert und aktiviert über eine Regulationskaskade  $\sigma^B$ . Der globale Stressregulator  $\sigma^B$  war in *S. epidermidis* in allen Wachstumsphasen präsent. Aus vorherigen Arbeiten dieser Arbeitsgruppe war bekannt, dass  $\sigma^B$  über ein noch unbekanntes Intermediat die Transkription von *icaR* reprimiert. IcaR zeigte ebenfalls ein wachstumsabhängiges Expressionsmuster und unterlag ab der transitorischen Phase einer spezifischen proteolytischen Prozessierung. Es wird postuliert, dass das prozessierte IcaR der aktivere Repressor des *icaADBC*-Locus ist. Die *icaADBC*-Transkription unterliegt einer positiven Regulation durch die Proteine BarA und BarB, die unter anderem  $\sigma^B$ -abhängig transkribiert werden. Trotz gemeinsamer Transkription wurde ein unterschiedliches Expressionsmuster für BarA und BarB beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei BarB um ein sehr stabiles Protein handeln muss. Zusätzlich wurde die Expression des für die Synthese von UDP-N-Acetylglukosamin benötigten Enzyms GcaD analysiert. Eine Korrelation zwischen dem GcaD Expressionsmuster und dem Biofilmphänotyp eines Stammes konnte nicht gefunden werden. Anhand der analysierten Expressionsmuster in unterschiedlichen *S. epidermidis* Mutanten wurde für einige Mutanten eine veränderte cytoplasmatische Proteaseaktivität postuliert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass *S. epidermidis* 1457*sigB* eine deutlich erhöhte und 1457*agr* und 1457*barAB* eine deutlich verminderte Proteasenaktivität besitzen. Intra- und extrazelluläre Proteasen wurden in den genannten Mutanten gleichsinnig reguliert.

## 7 Literaturverzeichnis

**AKBAR, S; KANG, CM; GAIDENKO, TA; PRICE, CW:** Modulator protein RsbR regulates environmental signalling in the general stress pathway of *Bacillus subtilis*. In: *Mol Microbiol* Bd. 24 (1997), Nr. 3, S. 567–578. — PMID: 9179850

**ALPER, S; DUNCAN, L; LOSICK, R:** An adenosine nucleotide switch controlling the activity of a cell type-specific transcription factor in *B. subtilis*. In: *Cell* Bd. 77 (1994), Nr. 2, S. 195–205. — PMID: 8168129

**BARTSCHT, K:** *Adhäsion von Staphylococcus epidermidis an Oberflächen: Charakterisierung einer Biofilm-negativen Transposonmutante*, *Rer. nat. Diss. Hamburg*, Fachbereich Biologie, 2001

**BASSLER, BL:** How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. In: *Curr Opin Microbiol* Bd. 2 (1999), Nr. 6, S. 582–587. — PMID: 10607620

**BATEMAN, A; HOLDEN, MTG; YEATS, C:** The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. In: *Bioinformatics* Bd. 21 (2005), Nr. 8, S. 1301–1303. — PMID: 15598841

**VAN BELKUM, A:** Staphylococcal colonization and infection: homeostasis versus disbalance of human (innate) immunity and bacterial virulence. In: *Curr Opin Infect Dis* Bd. 19 (2006), Nr. 4, S. 339–344. — PMID: 16804380

**BENSON, AK; HALDENWANG, WG:** *Bacillus subtilis* sigma B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* Bd. 90 (1993a), Nr. 6, S. 2330–2334. — PMID: 8460143

**BENSON, AK; HALDENWANG, WG:** Regulation of sigma B levels and activity in *Bacillus subtilis*. In: *J Bacteriol* Bd. 175 (1993b), Nr. 8, S. 2347–2356. — PMID: 8468294

**BERROW, NS; BÜSSOW, K; COUTARD, B; DIPROSE, J; EKBERG, M; FOLKERS, GE; LEVY, N; LIEU, V; OWENS, RJ; ET AL.:** Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* Bd. 62 (2006), Nr. Pt 10, S. 1218–1226. — PMID: 17001098

**BISCHOFF, M; ENTENZA, JM; GIACHINO, P:** Influence of a Functional *sigB* Operon on the Global Regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. In: *J Bacteriol* Bd. 183 (2001), Nr. 17, S. 5171–5179. — PMID: 11489871

**BOWDEN, MG; VISAI, L; LONGSHAW, CM; HOLLAND, KT; SPEZIALE, P; HÖÖK, M:** Is

the GehD Lipase from *Staphylococcus epidermidis* a Collagen Binding Adhesin? In: *J Biol Chem* Bd. 277 (2002), Nr. 45, S. 43017–43023

**BRADFORD, MM:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem* Bd. 72 (1976), S. 248–254. — PMID: 942051

**BROOUN, A; LIU, S; LEWIS, K:** A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. In: *Antimicrob Agents Chemother* Bd. 44 (2000), Nr. 3, S. 640–646. — PMID: 10681331

**BRYANT, KA; KINKEAD, LC; LARSON, MA; HINRICHS, SH; FEY, PD:** Genetic analysis of the *Staphylococcus epidermidis* Macromolecular Synthesis Operon: Serp1129 is an ATP binding protein and *sigA* transcription is regulated by both sigmaA- and sigmaB-dependent promoters. In: *BMC Microbiol* Bd. 10 (2010), S. 8. — PMID: 20067631

**CERCA, N; JEFFERSON, KK; OLIVEIRA, R; PIER, GB; AZEREDO, J:** Comparative Antibody-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* Cells Grown in a Biofilm or in the Planktonic State. In: *Infect Immun* Bd. 74 (2006), S. 4849–4855

**CHOKR, A; WATIER, D; ELEAUME, H; PANGON, B; GHNASSIA, J; MACK, D; JABBOURI, S:** Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. In: *Int J Med Microbiol* Bd. 296 (2006), Nr. 6, S. 381–388. — PMID: 16753338

**CHOONG, S; WHITFIELD, H:** Biofilms and their role in infections in urology. In: *BJU Int* Bd. 86 (2000), Nr. 8, S. 935–941. — PMID: 11069430

**CONLON, KM; HUMPHREYS, H; O’GARA, JP:** Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. In: *FEMS Microbiol Lett* Bd. 216 (2002a), Nr. 2, S. 171–177. — PMID: 12435499

**CONLON, KM; HUMPHREYS, H; O’GARA, JP:** Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Bacteriol* Bd. 186 (2004), Nr. 18, S. 6208–6219. — PMID: 15342591

**CONLON, KM.; HUMPHREYS, H; O’GARA, JP:** *icaR* Encodes a Transcriptional Repressor Involved in Environmental Regulation of *ica* Operon Expression and Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Bacteriol* Bd. 184 (2002b), Nr. 16, S. 4400–4408. — PMID: 12142410

**CONRADY, DG; BRESCIA, CC; HORII, K; WEISS, AA; HASSETT, D; HERR, A B:** A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* Bd. 105 (2008), Nr. 49, S. 19456–19461. — PMID: 19047636

**CORREIA, F F; D'ONOFRIO, A; REJTAR, T; LI, L; KARGER, B L; MAKAROVA, K; KOONIN, E V; LEWIS, K:** Kinase Activity of Overexpressed HipA Is Required for Growth Arrest and Multidrug Tolerance in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* Bd. 188 (2006), Nr. 24, S. 8360–8367

**COSTERTON, JW:** Introduction to biofilm. In: *Int J Antimicrob Agents* Bd. 11 (1999), Nr. 3-4, S. 217–221; Diskussion 237–239. — PMID: 10394973

**COSTERTON, JW:** The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. In: *J Clin Invest* Bd. 112 (2003), S. 1466–1477. — PMID: 14617746

**CRAMTON, SE; ULRICH, M; GÖTZ, F; DÖRING, G:** Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. In: *Infect Immun* Bd. 69 (2001), Nr. 6, S. 4079–4085. — PMID: 11349079

**CUCARELLA, C; SOLANO, C; VALLE, J; AMORENA, B; LASA, I; PENADÉS, JR:** Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. In: *J Bacteriol* Bd. 183 (2001), Nr. 9, S. 2888–2896. — PMID: 11292810

**DAS, T; SHARMA, PK; BUSSCHER, HJ; VAN DER MEI, HC; KROM, BP:** Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. In: *Appl Environ Microbiol* Bd. 76 (2010), Nr. 10, S. 3405–3408. — PMID: 20363802

**DEIGHTON, M; BORLAND, R:** Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. In: *Infect Immun* Bd. 61 (1993), Nr. 10, S. 4473–4479. — PMID: 8406839

**DELUMEAU, O; DUTTA, S; BRIGULLA, M; KUHNKE, G; HARDWICK, S W; VÖLKER, U; YUDKIN, MD; LEWIS, RJ:** Functional and Structural Characterization of RsbU, a Stress Signaling Protein Phosphatase 2C. In: *J Biol Chem* Bd. 279 (2004), Nr. 39, S. 40927–40937

**DOBINSKY, S; KIEL, K; ROHDE, H; BARTSCHT, K; KNOBLOCH, JK-M; HORSTKOTTE, MA; MACK, D:** Glucose-Related Dissociation between *icaADBC* Transcription and Biofilm Expression by *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for an Additional Factor

Required for Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis. In: *J Bacteriol* Bd. 185 (2003), Nr. 9, S. 2879–2886. — PMID: 12700267

**DOMINGO, P; FONTANET, A:** Management of complications associated with totally implantable ports in patients with AIDS. In: *AIDS Patient Care STDS* Bd. 15 (2001), Nr. 1, S. 7–13. — PMID: 11177583

**DÖRR, T; VULIĆ, M; LEWIS, K:** Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. In: *PLoS Biol* Bd. 8 (2010), Nr. 2, S. e1000317. — PMID: 20186264

**DSMZ, DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH:** *DSMZ - Bacterial Nomenclature Up-to-Date, Genus: Staphylococcus*. URL [http://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial\\_nomenclature\\_info\\_mm.php?genus=Staphylococcus&show\\_genus\\_info=1](http://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial_nomenclature_info_mm.php?genus=Staphylococcus&show_genus_info=1) - (Tag des Zugriffs: 02.01.2017)

**DUBENDORFF, JW; STUDIER, FW:** Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. In: *J Mol Biol* Bd. 219 (1991), Nr. 1, S. 45–59. — PMID: 1902522

**DUTHIE, ES; LORENZ, LL.:** Staphylococcal Coagulase: Mode of Action and Antigenicity. In: *J Gen Microbiol* Bd. 6 (1952), Nr. 1-2, S. 95–107 — PMID: 14927856

**VON EIFF, C; PETERS, G; HEILMANN, C:** Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. In: *Lancet Infect Dis* Bd. 2 (2002), Nr. 11, S. 677–685. — PMID: 12409048

**FITZPATRICK, F; HUMPHREYS, H; SMYTH, E; KENNEDY, CA; O’GARA, JP:** Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Hosp Infect* Bd. 52 (2002), Nr. 3, S. 212–218. — PMID: 12419274

**FLUCKIGER, U; WOLZ, C; CHEUNG, AL:** Characterization of a *sar* homolog of *Staphylococcus epidermidis*. In: *Infect Immun* Bd. 66 (1998), Nr. 6, S. 2871–2878. — PMID: 9596762

**FLUCKIGER, U; ULRICH, M; STEINHUBER, A; DORING, G; MACK, D; LANDMANN, R; GOERKE, C; WOLZ, C:** Biofilm Formation, *icaADBC* Transcription, and Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis by Staphylococci in a Device-Related Infection Model. In: *Infect Immun* Bd. 73 (2005), Nr. 3, S. 1811–1819

**GABERC-POREKAR, V; MENART, V:** Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. In: *J Biochem Biophys Methods* Bd. 49 (2001), Nr. 1-3, S. 335–360. — PMID: 11694288

**GALDBART, JO; ALLIGNET, J; TUNG, HS; RYDÈN, C; EL SOLH, N:** Screening for *Staphylococcus epidermidis* Markers Discriminating between Skin-Flora Strains and Those Responsible for Infections of Joint Prostheses. In: *J Infect Dis* Bd. 182 (2000), Nr. 1, S. 351–355. — PMID: 10882623

**GERKE, C; KRAFT, A; SÜSSMUTH, R; SCHWEITZER, O; GÖTZ, F:** Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. In: *J Biol Chem* Bd. 273 (1998), Nr. 29, S. 18586–18593. — PMID: 9660830

**GERTZ, S; ENGELMANN, S; SCHMID, R; ZIEBANDT, AK; TISCHER, K; SCHARF, C; HACKER, J; HECKER, M:** Characterization of the  $\sigma^B$  Regulon in *Staphylococcus aureus*. In: *J Bacteriol* Bd. 182 (2000), Nr. 24, S. 6983–6991. — PMID: 11092859

**GIACHINO, P; ENGELMANN, S; BISCHOFF, M:**  $\sigma^B$  Activity Depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. In: *J Bacteriol* Bd. 183 (2001), Nr. 6, S. 1843–1852. — PMID: 11222581

**GILL, SR; FOUTS, DE.; ARCHER, GL; MONGODIN, EF; DEBOY, RT; RAVEL, J; PAULSEN, IT; KOLONAY, JF; BRINKAC, L; ET AL.:** Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. In: *J. Bacteriol.* Bd. 187 (2005), Nr. 7, S. 2426–2438. — PMID: 15774886

**GÖTZ, F:** *Staphylococcus* and biofilms. In: *Mol Microbiol* Bd. 43 (2002), Nr. 6, S. 1367–1378. — PMID: 11952892

**GRÄSLUND, S; NORDLUND, P; WEIGELT, J; BRAY, J; GILEADI, O; KNAPP, S; OPPERMAN, U; ARROWSMITH, C; HUI, R; ET AL.:** Protein production and purification. In: *Nat Methods* Bd. 5 (2008), Nr. 2, S. 135–146

**GRODBERG, J; DUNN, JJ:** *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. In: *J Bacteriol* Bd. 170 (1988), Nr. 3, S. 1245–1253. — PMID: 3277950

**GRUNBERG-MANAGO, M:** Messenger RNA stability and its role in control of gene

expression in bacteria and phages. In: *Annu Rev Genet* Bd. 33 (1999), S. 193–227. — PMID: 10690408

**GUAN, W; CAI, L; FANG, J; WU, B; WANG, PG:** Enzymatic synthesis of UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc analogs using N-acetylglucosamine 1-phosphate uridyltransferase (GlmU). In: *Chem Commun (Camb)* (2009), Nr. 45, S. 6976–6978. — PMID: 19904366

**HALDENWANG, WG; LOSICK, R:** Novel RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* Bd. 77 (1980), Nr. 12, S. 7000–7004. — PMID: 6784117

**HANAHAH, D:** In: *DNA Cloning: A Practical Approach* (Hrsg.: Glover, DM) IRL Press, Oxford 1985, Vol. 1, S. 109–135

**HANDKE, LD; SLATER, SR; CONLON, KM; O'DONNELL, ST; OLSON, ME; BRYANT, KA; RUPP, ME; O'GARA, JP; FEY, PD:**  $\sigma^B$  and SarA independently regulate polysaccharide intercellular adhesin production in *Staphylococcus epidermidis*. In: *Can J Microbiol* Bd. 53 (2007), Nr. 1, S. 82–91. — PMID: 17496953

**HECKER, M; VÖLKER, U:** General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. In: *Adv Microb Physiol* Bd. 44 (2001), S. 35–91. — PMID: 11407115

**HEILMANN, C; HUSSAIN, M; PETERS, G; GÖTZ, F:** Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. In: *Mol Microbiol* Bd. 24 (1997), Nr. 5, S. 1013–1024. — PMID: 9220008

**HEILMANN, C; SCHWEITZER, O; GERKE, C; VANITTANAKOM, N; MACK, D; GÖTZ, F:** Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. In: *Mol Microbiol* Bd. 20 (1996), Nr. 5, S. 1083–1091. — PMID: 8809760

**HEILMANN, C; THUMM, G; CHHATWAL, GS; HARTLEIB, J; UEKÖTTER, A; PETERS, G:** Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. In: *Microbiology (Reading, England)* Bd. 149 (2003), Nr. Pt 10, S. 2769–2778. — PMID: 14523110

**HERMANOWICZ, SW:** A simple 2D biofilm model yields a variety of morphological features. In: *Math Biosci* Bd. 169 (2001), Nr. 1, S. 1–14. — PMID: 11137525

**HOCHULI, E; DÖBELI, H; SCHACHER, A:** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. In: *Journal of chromatography* Bd. 411 (1987), S. 177–184. — PMID: 3443622

**HOWELL, JM; WINSTONE, TL; COORSSEN, JR; TURNER, RJ:** An evaluation of in vitro protein-protein interaction techniques: assessing contaminating background proteins. In: *Proteomics* Bd. 6 (2006), Nr. 7, S. 2050–2069. — PMID: 16518870

**HUEBNER, J; GOLDMANN, DA:** Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. In: *Annu Rev Med* Bd. 50 (1999), S. 223–236. — PMID: 10073274

**HUSSAIN, M; HEILMANN, C; PETERS, G; HERRMANN, M:** Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. In: *Microb Pathog* Bd. 31 (2001), Nr. 6, S. 261–270. — PMID: 11747374

**IZANO, EA; AMARANTE, MA; KHER, WB; KAPLAN, JB:** Differential Roles of Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. In: *Appl Environ Microbiol* Bd. 74 (2008), Nr. 2, S. 470–476. — PMID: 18039822

**JÄGER, S:** *Regulationsmechanismen von Oxacillinresistenz und Biofilmbildung: Generierung und Charakterisierung von Deletionsmutanten des  $\sigma^B$  Operons in Staphylococcus epidermidis*, Med. Diss. Lübeck, 2007

**JÄGER, S; JONAS, B; PFANZELT, D; HORSTKOTTE, MA; ROHDE, H; MACK, D; KNOBLOCH, JK-M:** Regulation of biofilm formation by sigmaB is a common mechanism in *Staphylococcus epidermidis* and is not mediated by transcriptional regulation of *sarA*. In: *Int J Artif Organs* Bd. 32 (2009), Nr. 9, S. 584–591. — PMID: 19856270

**JANEWAY, CA, JR; MEDZHITOV, R:** Innate immune recognition. In: *Annu Rev Immunol* Bd. 20 (2002), S. 197–216. — PMID: 11861602

**JI, G; BEAVIS, RC; NOVICK, RP:** Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* Bd. 92 (1995), Nr. 26, S. 12055–12059. — PMID: 8618843

**JOHNSON, GM; LEE, DA; REGELMANN, WE; GRAY, ED; PETERS, G; QUIE, PG:** Interference with granulocyte function by *Staphylococcus epidermidis* slime. In: *Infect Immun* Bd. 54 (1986), Nr. 1, S. 13–20. — PMID: 3019888

**JONAS, B:** *Untersuchungen zur Regulation der Biofilmbildung in Staphylococcus epidermidis*. Rer. nat. Diss. Lübeck, 2009

**KAITO, C; MORISHITA, D; MATSUMOTO, Y; KUROKAWA, K; SEKIMIZU, K:** Novel DNA binding protein SarZ contributes to virulence in *Staphylococcus aureus*. In: *Mol Microbiol*

Bd. 62 (2006), Nr. 6, S. 1601–1617. — PMID: 17087772

**KAPLAN, JB; RAGUNATH, C; RAMASUBBU, N; FINE, DH:** Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. In: *J Bacteriol* Bd. 185 (2003), Nr. 16, S. 4693–4698. — PMID: 12896987

**KIDO, M; YAMANAKA, K; MITANI, T; NIKI, H; OGURA, T; HIRAGA, S:** RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* Bd. 178 (1996), Nr. 13, S. 3917–3925. — PMID: 8682798

**KIES, S; OTTO, M; VUONG, C; GÖTZ, F:** Identification of the *sigB* Operon in *Staphylococcus epidermidis*: Construction and Characterization of a *sigB* Deletion Mutant. In: *Infect Immun* Bd. 69 (2001), S. 7933–7936

**KILSTRUP, M; JESSING, SG; WICHMAND-JØRGENSEN, SB; MADSEN, M; NILSSON, D:** Activation control of *pur* gene expression in *Lactococcus lactis*: proposal for a consensus activator binding sequence based on deletion analysis and site-directed mutagenesis of *purC* and *purD* promoter regions. In: *J Bacteriol* Bd. 180 (1998), Nr. 15, S. 3900–3906. — PMID: 9683487

**KLOOS, WE; MUSSELWHITE, MS:** Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. In: *Appl Microbiol* Bd. 30 (1975), Nr. 3, S. 381–385. — PMID: 810086

**KNESCHKE, J-C:** *Vergleich von extrazellulären Proteinen Biofilm-positiver Staphylococcus epidermidis Stämme mit ihren isogenen  $\sigma^B$  Mutanten im Phänotyp, auf aktivitäts- und transkriptioneller Ebene*, Med. Diss. Lübeck, 2011

**KNOBLOCH, JK-M; BARTSCHT, K; SABOTTKE, A; ROHDE, H; FEUCHT, HH; MACK, D:** Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. In: *J Bacteriol* Bd. 183 (2001), Nr. 8, S. 2624–2633. — PMID: 11274123

**KNOBLOCH, JK-M:** *Expression von Virulenzfaktoren in Staphylococcus epidermidis: Regulationsmechanismen der Biofilmbildung und Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen.*, Med. Habil. Schr. Hamburg, 2005

**KNOBLOCH, JK-M; NEDELMANN, M; KIEL, K; BARTSCHT, K; HORSTKOTTE, MA; DOBINSKY, S; ROHDE, H; MACK, D:** Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. In: *Appl Environ Microbiol* Bd. 69 (2003),

Nr. 10, S. 5812–5818. — PMID: 14532029

**KNOBLOCH, JK-M; VON OSTEN, H; HORSTKOTTE, MA; ROHDE, H; MACK, D:** Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative *Staphylococcus epidermidis*. In: *Med Microbiol Immunol* Bd. 191 (2002a), Nr. 2, S. 107–114. — PMID: 12410350

**KNOBLOCH, JK-M; HORSTKOTTE, MA.; ROHDE, H; KAULFERS, P-M; MACK, D:** Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Antimicrob Chemother* Bd. 49 (2002b), Nr. 4, S. 683 –687. — PMID: 11909845

**KNOBLOCH, JK-M; JÄGER, S; ROHDE, H; MACK, D:** RsbU-Dependent Regulation of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation Is Mediated via the Alternative Sigma Factor  $\sigma^B$  by Repression of the Negative Regulator Gene *icaR*. In: *Infect Immun* Bd. 72 (2004), Nr. 7, S. 3838–3848. — PMID: 15213125

**KOGAN, G; SADOVSKAYA, I; CHAIGNON, P; CHOKR, A; JABBOURI, S:** Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. In: *FEMS Microbiol Lett* Bd. 255 (2006), S. 11–16

**KORCH, SB; HILL, TM:** Ectopic overexpression of wild-type and mutant *hipA* genes in *Escherichia coli*: effects on macromolecular synthesis and persister formation. In: *J Bacteriol* Bd. 188 (2006), Nr. 11, S. 3826–3836. — PMID: 16707675

**KRISTIAN, SA.; BIRKENSTOCK, TA.; SAUDER, U; MACK, D; GÖTZ, F; LANDMANN, R:** Biofilm Formation Induces C3a Release and Protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and Complement Deposition and from Neutrophil-Dependent Killing. In: *J Infect Dis* Bd. 197 (2008), S. 1028–1035. — PMID: 18419540

**KULLIK, I; GIACHINO, P:** The alternative sigma factor  $\sigma^B$  in *Staphylococcus aureus*: regulation of the *sigB* operon in response to growth phase and heat shock. In: *Arch Microbiol* Bd. 167 (1997), Nr. 2/3, S. 151–159. — PMID: 9042755

**LEWIS, K:** Riddle of biofilm resistance. In: *Antimicrob Agents Chemother* Bd. 45 (2001), Nr. 4, S. 999–1007. — PMID: 11257008

**LEWIS, K:** Persister cells. In: *Annu Rev Microbiol* Bd. 64 (2010), S. 357–372. — PMID: 20528688

**LIM, SM; WEBB, SAR:** Nosocomial bacterial infections in Intensive Care Units. I:

Organisms and mechanisms of antibiotic resistance. In: *Anaesthesia* Bd. 60 (2005), Nr. 9, S. 887–902. — PMID: 16115251

**LINA, G; BOUTITE, F; TRISTAN, A; BES, M; ETIENNE, J; VANDENESCH, F:** Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of *Staphylococcal agr* alleles. In: *Appl Environ Microbiol* Bd. 69 (2003), Nr. 1, S. 18–23. — PMID: 12513972

**LOWY, FD:** *Staphylococcus aureus* infections. In: *N Engl J Med* Bd. 339 (1998), Nr. 8, S. 520–532. — PMID: 9709046

**MACK, D; NEDELMANN, M; KROKOTSCH, A; SCHWARZKOPF, A; HEESEMANN, J; LAUFS, R:** Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. In: *Infect Immun* Bd. 62 (1994), Nr. 8, S. 3244–3253. — PMID: 8039894

**MACK, D; ROHDE, H; DOBINSKY, S; RIEDEWALD, J; NEDELMANN, M; KNOBLOCH, JK-M; ELSNER, HA; FEUCHT, HH:** Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. In: *Infect Immun* Bd. 68 (2000), Nr. 7, S. 3799–3807. — PMID: 10858187

**MACK, D; ROHDE, H; HARRIS, L G; DAVIES, AP; HORSTKOTTE, MA; KNOBLOCH, JK-M:** Biofilm formation in medical device-related infection. In: *Int J Artif Organs* Bd. 29 (2006), Nr. 4, S. 343–359. — PMID: 16705603

**MACK, D; SIEMSEN, N; LAUFS, R:** Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. In: *Infect Immun* Bd. 60 (1992), Nr. 5, S. 2048–2057. — PMID: 1314224

**MACK, D:** Molekulare Mechanismen der Biofilm-Entstehung von *Staphylococcus epidermidis*. In: *Chemother J* Bd. 8 (1999), Nr. 5, S. 166–175

**MACK, D; DAVIES, AP; HARRIS, LG; ROHDE, H; HORSTKOTTE, MA; KNOBLOCH, JK-M:** Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. In: *Anal Bioanal Chem* Bd. 387 (2007), Nr. 2, S. 399–408. — PMID: 16955256

**MACK, D; FISCHER, W; KROKOTSCH, A; LEOPOLD, K; HARTMANN, R; EGGE, H; LAUFS, R:** The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural

analysis. In: *J Bacteriol* Bd. 178 (1996), Nr. 1, S. 175–183. — PMID: 8550413

**MADIGAN, MT; MARTINKO, JM; PARKER, J; BROCK, TD.; GOEBEL, W** (Hrsg.): *Brock Mikrobiologie*. 1. Aufl., S. 237–262: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2000 — ISBN 3827405661

**MATSUNO, K; SONENSHEIN, AL.**: Role of SpoVG in Asymmetric Septation in *Bacillus subtilis*. In: *J Bacteriol* Bd. 181 (1999), Nr. 11, S. 3392–3401. — PMID: 10348850

**MCCANN, MT; GILMORE, BF; GORMAN, SP**: *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. In: *J Pharm Pharmacol* Bd. 60 (2008), Nr. 12, S. 1551–1571. — PMID: 19000360

**MCCREA, KW; HARTFORD, O; DAVIS, S; EIDHIN, DN; LINA, G; SPEZIALE, P; FOSTER, TJ; HÖÖK, M**: The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. In: *Microbiology* Bd. 146 (2000), Nr. 7, S. 1535–1546. — PMID: 10878118

**MEIER, S; GOERKE, C; WOLZ, C; SEIDL, K; HOMEROVA, D; SCHULTHESS, B; KORMANEC, J; BERGER-BACHI, B; BISCHOFF, M**: SigmaB and the SigmaB-Dependent *arlRS* and *yabJ-spoVG* Loci Affect Capsule Formation in *Staphylococcus aureus*. In: *Infect Immun* Bd. 75 (2007), Nr. 9, S. 4562–4571. — PMID: 17635871

**MEINNEL, T; SCHMITT, E; MECHULAM, Y; BLANQUET, S**: Structural and biochemical characterization of the *Escherichia coli argE* gene product. In: *J Bacteriol* Bd. 174 (1992), Nr. 7, S. 2323–2331. — PMID: 1551850

**MILLER, MB; BASSLER, BL**: Quorum sensing in bacteria. In: *Annu Rev Microbiol* Bd. 55 (2001), S. 165–199. — PMID: 11544353

**MONK, AB; BOUNDY, S; CHU, VH; BETTINGER, JC; ROBLES, JR; FOWLER, VG; ARCHER, GL**: Analysis of the Genotype and Virulence of *Staphylococcus epidermidis* Isolates from Patients with Infective Endocarditis. In: *Infect Immun* Bd. 76 (2008), Nr. 11, S. 5127–5132. — PMID: 18794284

**MUSHER, DM; LAMM, N; DAROUICHE, RO; YOUNG, EJ; HAMILL, RJ; LANDON, GC**: The current spectrum of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital. In: *Medicine (Baltimore)* Bd. 73 (1994), Nr. 4, S. 186–208. — PMID: 8041242

**NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE**: National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report, data summary from October 1986-April 1996, issued May 1996. A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. In:

*Am J Infect Control* Bd. 24 (1996), Nr. 5, S. 380–388. — PMID: 8902113

**NILSSON, M; FRYKBERG, L; FLOCK, J-I; PEI, L; LINDBERG, M; GUSS, B:** A Fibrinogen-Binding Protein of *Staphylococcus epidermidis*. In: *Infect Immun* Bd. 66 (1998), Nr. 6, S. 2666–2673. — PMID: 9596732

**NOVICK, RP; PROJAN, SJ; KORNBLUM, J; ROSS, HF; JI, G; KREISWIRTH, B; VANDENESCH, F; MOGHAZEH, S:** The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. In: *Mol Gen Genet: MGG* Bd. 248 (1995), Nr. 4, S. 446–458. — PMID: 7565609

**NOVICK, RP; ROSS, HF; PROJAN, SJ; KORNBLUM, J; KREISWIRTH, B; MOGHAZEH, S:** Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. In: *EMBO J* Bd. 12 (1993), Nr. 10, S. 3967–3975. — PMID: 7691599

**NOVICK, RP; MUIR, TW:** Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. In: *Curr Opin Microbiol* Bd. 2 (1999), Nr. 1, S. 40–45

**NOVICK, RP.; GEISINGER, E:** Quorum Sensing in Staphylococci. In: *Annu Rev Genet* Bd. 42 (2008), S. 541–564

**OLSEN, LR; RODERICK, SL:** Structure of the *Escherichia coli* GlmU pyrophosphorylase and acetyltransferase active sites. In: *Biochemistry* Bd. 40 (2001), Nr. 7, S. 1913–1921. — PMID: 11329257

**OTTO, M:** Staphylococcal biofilms. In: *Curr Top in Microbiol Immunol* Bd. 322 (2008), S. 207–228. — PMID: 18453278

**OTTO, M; SÜSSMUTH, R; JUNG, G; GÖTZ, F:** Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis agr* system. In: *FEBS letters* Bd. 424 (1998), Nr. 1-2, S. 89–94. — PMID: 9537521

**OTTO, M:** *Staphylococcus epidermidis* — the „accidental“ pathogen. In: *Nature Reviews Microbiology* Bd. 7 (2009), S. 555–567. — PMID: 19609257

**PANE-FARRE, J; JONAS, B; HARDWICK, SW; GRONAU, K; LEWIS, RJ; HECKER, M; ENGELMANN, S:** Role of RsbU in Controlling SigB Activity in *Staphylococcus aureus* following Alkaline Stress. In: *J Bacteriol* Bd. 191 (2009), Nr. 8, S. 2561–2573. — PMID: 19201800

**PATTI, JM; ALLEN, BL; MCGAVIN, MJ; HÖÖK, M:** MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. In: *Annu Rev Microbiol* Bd. 48 (1994), S. 585–617. —

PMID: 7826020

**PINTENS, V; MASSONET, C; MERCKX, R; VANDECASTEELE, S; PEETERMANS, WE; KNOBLOCH, JK-M; VAN ELDERE, J:** The role of  $\sigma^B$  in persistence of *Staphylococcus epidermidis* foreign body infection. In: *Microbiology* Bd. 154 (2008), Nr. 9, S. 2827–2836. — PMID: 18757816

**QIN, Z; OU, Y; YANG, L; ZHU, Y; TOLKER-NIELSEN, T; MOLIN, S; QU, D:** Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. In: *Microbiology* Bd. 153 (2007), Nr. Pt 7, S. 2083–2092. — PMID: 17600053

**RAAD, I; ALRAHWAN, A; ROLSTON, K:** *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. In: *Clin Infect Dis* Bd. 26 (1998), Nr. 5, S. 1182–1187. — PMID: 9597250

**RACHID, S; OHLSEN, K; WITTE, W; HACKER, J; ZIEBUHR, W:** Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression in Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*. In: *Antimicrob Agents Chemother* Bd. 44 (2000), Nr. 12, S. 3357–3363. — PMID: 11083640

**RECSEI, P; KREISWIRTH, B; O'REILLY, M; SCHLIEVERT, P; GRUSS, A; NOVICK, RP:** Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. In: *Mol Gen Genet* Bd. 202 (1986), Nr. 1, S. 58–61. — PMID: 3007938

**ROGERS, KL; FEY, PD; RUPP, ME:** Coagulase-negative staphylococcal infections. In: *Infect Dis Clin North Am* Bd. 23 (2009), Nr. 1, S. 73–98. — PMID: 19135917

**ROHDE, H; BURDELSKI, C; BARTSCHT, K; HUSSAIN, M; BUCK, F; HORSTKOTTE, MA; KNOBLOCH, JK-M; HEILMANN, C; HERRMANN, M; ET AL.:** Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. In: *Mol Microbiol* Bd. 55 (2005), S. 1883–1895. — PMID: 15752207

**RUPP, ME; ARCHER, GL:** Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. In: *Clin Infect Dis* Bd. 19 (1994), Nr. 2, S. 231–243. — PMID: 7986894

**RUPP, ME; FEY, PD; HEILMANN, C; GÖTZ, F:** Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. In: *J Infect Dis* Bd. 183 (2001), Nr. 7, S. 1038–1042. — PMID: 11237828

**RUPP, ME; ULPHANI, JS; FEY, PD; BARTSCHT, K; MACK, D:** Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. In: *Infect Immun* Bd. 67 (1999a), Nr. 5, S. 2627–2632. — PMID: 10225932

**RUPP, ME; ULPHANI, JS; FEY, PD; MACK, D:** Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. In: *Infect Immun* Bd. 67 (1999b), Nr. 5, S. 2656–2659. — PMID: 10225938

**SADOVSKAYA, I; VINOGRADOV, E; LI, J; JABBOURI, S:** Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus epidermidis* RP62A, a reference biofilm-positive strain. In: *Carbohydr Res* Bd. 339 (2004), Nr. 8, S. 1467–1473. — PMID: 15178389

**SADYKOV, MR; HARTMANN, T; MATTES, TA; HIATT, M; JANN, NJ; ZHU, Y; LEDALA, N; LANDMANN, R; HERRMANN, M; ET AL.:** CcpA coordinates central metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. In: *Microbiology* Bd. 157 (2011), Nr. 12, S. 3458–3468. — PMID: 21964732

**SADYKOV, MR; OLSON, ME; HALOUSKA, S; ZHU, Y; FEY, P D; POWERS, R; SOMERVILLE, GA:** Tricarboxylic Acid Cycle-Dependent Regulation of *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis. In: *J Bacteriol* Bd. 190 (2008), Nr. 23, S. 7621–7632. — PMID: 18820013

**SAGINUR, R; STDENIS, M; FERRIS, W; AARON, SD; CHAN, F; LEE, C; RAMOTAR, K:** Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. In: *Antimicrob Agents Chemother* Bd. 50 (2006), Nr. 1, S. 55–61. — PMID: 16377667

**SAXILD, HH; BRUNSTEDT, K; NIELSEN, KI; JARMER, H; NYGAARD, P:** Definition of the *Bacillus subtilis* PurR Operator Using Genetic and Bioinformatic Tools and Expansion of the PurR Regulon with *glyA*, *guaC*, *pbuG*, *xpt-pbuX*, *yqhZ-fold*, and *pbuO*. In: *J Bacteriol* Bd. 183 (2001), Nr. 21, S. 6175–6183. — PMID: 11591660

**SCHEWE, S:** *Wechselwirkung des agr-Quorum sensing-Systems mit dem Regulon des alternativen Sigmafaktors sigB im Rahmen der Regulation von Virulenzfaktoren in Staphylococcus epidermidis*, Med. Diss. Lübeck, 2009

**SCHLAGER, B; STRAESSLE, A; HAFEN, E:** Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression. In: *BMC Biotechnol* Bd. 12 (2012), S. 95. — PMID: 23231964

**SCHNEEWIND, O; MIHAYLOVA-PETKOV, D; MODEL, P:** Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. In: *EMBO J* Bd. 12 (1993), Nr. 12, S. 4803–4811. — PMID: 8223489

**SCHULTHESS, B; BLOES, D A; FRANCOIS, P; GIRARD, M; SCHRENZEL, J; BISCHOFF, M; BERGER-BACHI, B:** The sigmaB-Dependent *yabJ-spoVG* Operon Is Involved in the Regulation of Extracellular Nuclease, Lipase, and Protease Expression in *Staphylococcus aureus*. In: *J Bacteriol* Bd. 193 (2011), Nr. 18, S. 4954–4962. — PMID: 21725011

**SCHULTHESS, B; MEIER, S; HOMEROVA, D; GOERKE, C; WOLZ, C; KORMANEC, J; BERGER-BACHI, B; BISCHOFF, M:** Functional Characterization of the SigmaB-Dependent *yabJ-spoVG* Operon in *Staphylococcus aureus*: Role in Methicillin and Glycopeptide Resistance. In: *Antimicrob Agents Chemother* Bd. 53 (2009), Nr. 5, S. 1832–1839. — PMID: 19223635

**SENN, MM; GIACHINO, P; HOMEROVA, D; STEINHUBER, A; STRASSNER, J; KORMANEC, J; FLUCKIGER, U; BERGER-BACHI, B; BISCHOFF, M:** Molecular Analysis and Organization of the  $\sigma^B$  Operon in *Staphylococcus aureus*. In: *J Bacteriol* Bd. 187 (2005), Nr. 23, S. 8006–8019. — PMID: 16291674

**SINHA, S; RAPPU, P; LANGE, S C; MANTSALA, P; ZALKIN, H; SMITH, J L:** Crystal structure of *Bacillus subtilis* YabJ, a purine regulatory protein and member of the highly conserved YjgF family. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* Bd. 96 (1999), Nr. 23, S. 13074–13079. — PMID: 10557275

**SPERBER, WH; TATINI, SR:** Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. In: *Appl Microbiol* Bd. 29 (1975), Nr. 4, S. 502–505. — PMID: 164821

**SPOERING, AL; LEWIS, K:** Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. In: *J Bacteriol* Bd. 183 (2001), Nr. 23, S. 6746–6751. — PMID: 11698361

**SUN, D; ACCAVITTI, MA; BRYERS, JD:** Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. In: *Clin Diagn Lab Immunol* Bd. 12 (2005), Nr. 1, S. 93–100. — PMID: 15642991

**TABOR, S; RICHARDSON, CC:** A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* Bd. 82 (1985), Nr. 4, S. 1074–1078. — PMID: 3156376

**TORMO, MA; KNECHT, E; GÖTZ, F; LASA, I; PENADÉS, JR:** Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? In: *Microbiology* Bd. 151 (2005a), Nr. Pt 7, S. 2465–2475. — PMID: 16000737

**TORMO, MA; MARTÍ, M; VALLE, J; MANNA, AC; CHEUNG, AL; LASA, I; PENADÉS, JR:** SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. In: *J Bacteriol* Bd. 187 (2005b), Nr. 7, S. 2348–2356. — PMID: 15774878

**UÇKAY, I; PITTET, D; VAUDAUX, P; SAX, H; LEW, D; WALDVOGEL, F:** Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. In: *Ann Med* Bd. 41 (2009), Nr. 2, S. 109–119. — PMID: 18720093

**VADYVALOO, V; OTTO, M:** Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. In: *Int J Artif Organs* Bd. 28 (2005), Nr. 11, S. 1069–1078. — PMID: 16353113

**VERA, A; GONZÁLEZ-MONTALBÁN, N; ARÍS, A; VILLAVERDE, A:** The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. In: *Biotechnol Bioeng* Bd. 96 (2007), Nr. 6, S. 1101–1106. — PMID: 17013944

**VUONG, C; GÖTZ, F; OTTO, M:** Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. In: *Infect Immun* Bd. 68 (2000a), Nr. 3, S. 1048–1053. — PMID: 10678906

**VUONG, C; DÜRR, M; CARMODY, A B; PESCHEL, A; KLEBANOFF, S J; OTTO, M:** Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. In: *Cell Microbiol* Bd. 6 (2004a), Nr. 8, S. 753–759. — PMID: 15236642

**VUONG, C; GERKE, C; SOMERVILLE, G A; FISCHER, E R; OTTO, M:** Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Infect Dis* Bd. 188 (2003), Nr. 5, S. 706–718. — PMID: 12934187

**VUONG, C; KIDDER, JB; JACOBSON, ER; OTTO, M; PROCTOR, RA; SOMERVILLE, GA:** *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin production significantly increases during tricarboxylic acid cycle stress. In: *J Bacteriol* Bd. 187 (2005), Nr. 9,

S. 2967–2973. — PMID: 15838022

**VUONG, C; KOCIANOVA, S; YAO, Y; CARMODY, AB; OTTO, M:** Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. In: *J Infect Dis* Bd. 190 (2004b), Nr. 8, S. 1498–1505. — PMID: 15378444

**VUONG, C; OTTO, M:** *Staphylococcus epidermidis* infections. In: *Microbes Infect* Bd. 4 (2002), S. 481–489. — PMID: 11932199

**VUONG, C; SAENZ, H L.; GÖTZ, F; OTTO, M:** Impact of the *agr* Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in *Staphylococcus aureus*. In: *J Infect Dis* Bd. 182 (2000b), Nr. 6, S. 1688–1693

**WANG, L; LI, M; DONG, D; BACH, T-HL; STURDEVANT, DE; VUONG, C; OTTO, M; GAO, Q:** SarZ is a key regulator of biofilm formation and virulence in *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Infect Dis* Bd. 197 (2008), Nr. 9, S. 1254–1262. — PMID: 18422437

**WANG, R; KHAN, B A; CHEUNG, G Y C; BACH, T-H L; JAMESON-LEE, M; KONG, K-F; QUECK, S Y; OTTO, M:** *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. In: *J Clin Invest* Bd. 121 (2011), S. 238–248

**WANG, X; PRESTON, JF, 3RD; ROMEO, T:** The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. In: *J Bacteriol* Bd. 186 (2004), Nr. 9, S. 2724–2734. — PMID: 15090514

**WATERS, CM; BASSLER, BL:** QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* Bd. 21 (2005), S. 319–346. — PMID: 16212498

**WENG, M; NAGY, PL; ZALKIN, H:** Identification of the *Bacillus subtilis pur* operon repressor. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* Bd. 92 (1995), Nr. 16, S. 7455–7459. — PMID: 7638212

**WERTHEIM, HFL; MELLES, D C; VOS, MC; VAN LEEUWEN, W; VAN BELKUM, A; VERBRUGH, HA; NOUWEN, JL:** The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. In: *Lancet Infect Dis* Bd. 5 (2005), Nr. 12, S. 751–762. — PMID: 16310147

**WIDERSTRÖM, M; WISTRÖM, J; SJÖSTEDT, A; MONSEN, T:** Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. In: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2011). — PMID: 21533877

**WILLIAMS, RJ; HENDERSON, B; SHARP, LJ; NAIR, SP:** Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis*. In: *Infect Immun* Bd. 70 (2002), Nr. 12, S. 6805–6810. — PMID: 12438356

**WISPLINGHOFF, H; BISCHOFF, T; TALLENT, SM; SEIFERT, H; WENZEL, RP; EDMOND, MB:** Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. In: *Clin Infect Dis* Bd. 39 (2004), Nr. 3, S. 309–317. — PMID: 15306996

**WIUFF, C; ZAPPALA, RM; REGOES, RR; GARNER, KN; BAQUERO, F; LEVIN, BR:** Phenotypic tolerance: antibiotic enrichment of noninherited resistance in bacterial populations. In: *Antimicrob Agents Chemother* Bd. 49 (2005), Nr. 4, S. 1483–1494. — PMID: 15793130

**XU, L; LI, H; VUONG, C; VADYVALOO, V; WANG, J; YAO, Y; OTTO, M; GAO, Q:** Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. In: *Infect Immun* Bd. 74 (2006), Nr. 1, S. 488–496. — PMID: 16369005

**YAO, Y; STURDEVANT, D E; OTTO, M:** Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. In: *J Infect Dis* Bd. 191 (2005), Nr. 2, S. 289–298. — PMID: 15609240

**YAO, Y; VUONG, C; KOCIANOVA, S; VILLARUZ, A E; LAI, Y; STURDEVANT, DE; OTTO, M:** Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* accessory-gene regulator response: quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defense. In: *J Infect Dis* Bd. 193 (2006), Nr. 6, S. 841–848. — PMID: 16479519

**ZIEBANDT, A-K; BECHER, D; OHLSEN, K; HACKER, J; HECKER, M; ENGELMANN, S:** The influence of *agr* and  $\sigma^B$  in growth phase dependent regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. In: *Proteomics* Bd. 4 (2004), Nr. 10, S. 3034–3047. — PMID: 15378746

**ZIEBUHR, W; HEILMANN, C; GÖTZ, F; MEYER, P; WILMS, K; STRAUBE, E; HACKER, J:** Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. In: *Infect Immun* Bd. 65 (1997), Nr. 3, S. 890–896. — PMID: 9038293

**ZIEBUHR, W; HENNIG, S; ECKART, M; KRÄNZLER, H; BATZILLA, C; KOZITSKAYA, S:** Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns

into a pathogen. In: *Int J Antimicrob Agents* Bd. 28 Suppl 1 (2006), S. S14–20. — PMID: 16829054

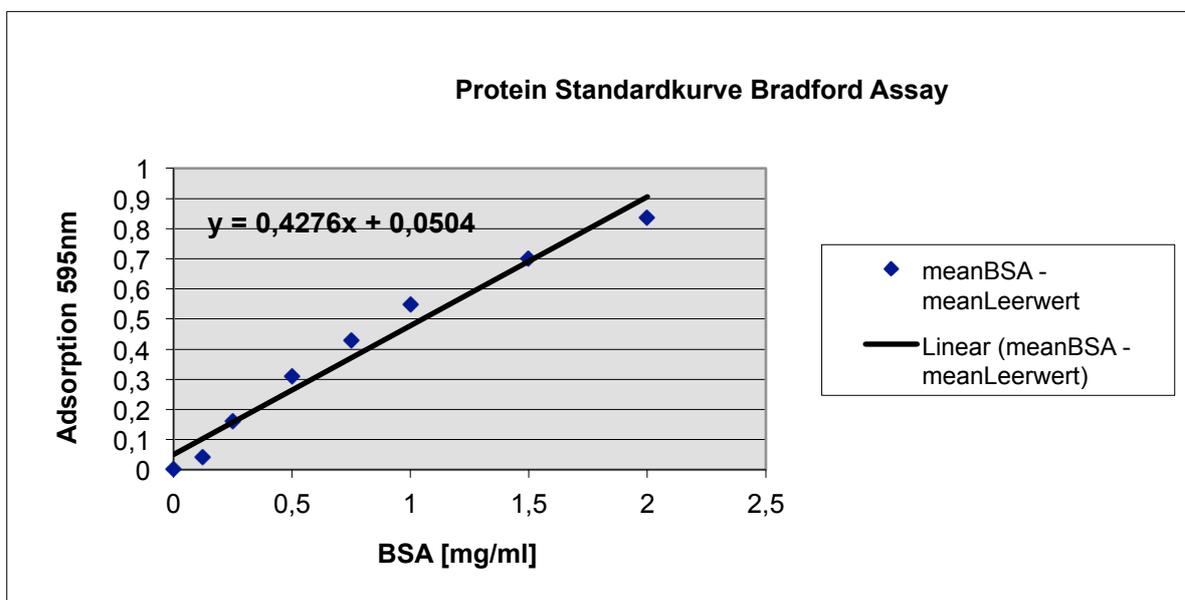
## 8 Anhang

### I. Proteinstandardkurve Bradfordassay

Mode	Absorbance
Wavelength	595 nm
Bandwidth	9 nm
Number of Reads	25

Konzentration BSA [mg/ml]	<>	1	2	3	mean 1-3	mean <sub>BSA</sub> - mean <sub>Leerwert</sub>
Leerwert 5µl aq. ad inject.	A					
0,125	B	0,3502	0,3053	0,3101	<b>0,3219</b>	<b>0,0411</b>
0,25	C	0,3621	0,3635	0,3633	<b>0,3630</b>	<b>0,1587</b>
0,5	D	0,4729	0,4891	0,4797	<b>0,4806</b>	<b>0,3104</b>
0,75	E	0,6047	0,6221	0,67	<b>0,6323</b>	<b>0,4280</b>
1	F	0,7319	0,8202	0,6974	<b>0,7498</b>	<b>0,5502</b>
1,5	G	0,8656	0,8664	0,8842	<b>0,8721</b>	<b>0,6992</b>
2	H	0,9789	0,9941	1,0903	<b>1,0211</b>	<b>0,6992</b>
		1,1356	1,1435	1,1912	<b>1,1568</b>	<b>0,8349</b>

Konzentration BSA [mg/ml]	mean <sub>BSA</sub> - mean <sub>Leerwert</sub>
0	0,0000 mg/ml
0,125	0,0411 mg/ml
0,25	0,1587 mg/ml
0,5	0,3104 mg/ml
0,75	0,4280 mg/ml
1	0,5502 mg/ml
1,5	0,6992 mg/ml
2	0,8349 mg/ml



## II. Sequenzierungen

In den folgenden Sequenzierungen wurden die codierenden Sequenzen des gewünschten Proteins grau hinterlegt. Zusätzlich wurde bei Sequenzierungen der *Entry*-Vektoren der Anteil der ehemaligen *attB*-site blau hinterlegt. Fehler in der Sequenz wurden gelb hinterlegt und das Basentriplett umrahmt.

### A. Sequenzierung pENTRY*icaR*

Sequenzierung **AAAAAAGCAGGCT**GGGAGATTTTAGAATTGAAAGATAAGATTATTGATAACGCAATAACC  
 pENTRY*icaR* AAAAAAGCAGGCTGGGAGATTTTAGAATTGAAAGATAAGATTATTGATAACGCAATAACC  
 \*\*\*\*\*  
**Anteil att-site** Start *icaR*

Sequenzierung TTATTTCCGAAAAGGGGTACGATGGTACTACACTTGATGATATTTCTAAAAGTGTAAT  
 pENTRY*icaR* TTATTTCCGAAAAGGGGTACGATGGTACTACACTTGATGATATTTCTAAAAGTGTAAT  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung ATAAAAAGGCTAGTCTATATTATCATTACGATAATAAGGAAGAAATATATCGAAAAAGT  
 pENTRY*icaR* ATAAAAAGGCTAGTCTATATTATCATTACGATAATAAGGAAGAAATATATCGAAAAAGT  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung GTTGAGAATTGTTTCAATTACTTTATAGATTTTTTGCTTAGGAACCATGATGATAATTAT  
 pENTRY*icaR* GTTGAGAATTGTTTCAATTACTTTATAGATTTTTTGCTTAGGAACCATGATGATAATTAT  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung TCCATTGACGGACTTTACCAGTTTTTATCAAATTTATATTCGACGTTGATGAGAGATAT  
 pENTRY*icaR* TCCATTGACGGACTTTACCAGTTTTTATCAAATTTATATTCGACGTTGATGAGAGATAT  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung ATTAAATTATATGTTCAATTATCTAGTGCTCCAGAAGCACTGAATTCAGAAATCAAACAC  
 pENTRY*icaR* ATTAAATTATATGTTCAATTATCTAGTGCTCCAGAAGCACTGAATTCAGAAATCAAACAC  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung CATCTTCAAGAAATTAATACTACCTTACATGATGAATTGATAAAGTATTATGATCCTACG  
 pENTRY*icaR* CATCTTCAAGAAATTAATACTACCTTACATGATGAATTGATAAAGTATTATGATCCTACG  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung CACATCGCTTTGGATAAAGAGGACTTTATAAACTTAATCTTCTTTTTCTTGAGACTTGG  
 pENTRY*icaR* CACATCGCTTTGGATAAAGAGGACTTTATAAACTTAATCTTCTTTTTCTTGAGACTTGG  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung TATTTTAGAGCCTCCTTTTCACAAAAATTCGGGATTATTGAGGACAGTAAAAACCGTTTT  
 pENTRY*icaR* TATTTTAGAGCCTCCTTTTCACAAAAATTCGGGATTATTGAGGACAGTAAAAACCGTTTT  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung AAAGACCAAGTATATTCACCTGTTAAATGTATTTTTAAAAAATAATTTTTGTAAGTAGTA  
 pENTRY*icaR* AAAGACCAAGTATATTCACCTGTTAAATGTATTTTTAAAAAATAATTTTTGTAAGTAGTA  
 \*\*\*\*\*

## B. Sequenzierung pENTRYgcaD

Sequenzierung **AAAAAAGCAGGCT**TCATGCAAAGACATGCGATTATTCTGGCAGCAGGTAAGGGCACAAGA  
 pENTRYgcaD AAAAAAGCAGGCTTCATGCAAAGACATGCGATTATTCTGGCAGCAGGTAAGGGCACAAGA  
 \*\*\*\*\*  
**Anteil attB** Start gcaD

Sequenzierung ATGAAATCAAAGAAATATAAAGTGCTCCATGAGGTTGCTGGCAAACCAATGGTTGAACAT  
 pENTRYgcaD ATGAAATCAAAGAAATATAAAGTGCTCCATGAGGTTGCTGGCAAACCAATGGTTGAACAT  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung GTGCTTAACAACGTAAAACAAGCTGGCGTTGATCAAATTGTAACTATTATTGGCCATGGC  
 pENTRYgcaD GTGCTTAACAACGTAAAACAAGCTGGCGTTGATCAAATTGTAACTATTATTGGTCATGGC  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung GCTGAGAGTGTGAAAGATACATTGGGTAATCAATCATTATATAGTTTTTCAGGATAAAACAA  
 pENTRYgcaD GCTGAGAGTGTGAAAGATACATTGGGTAATCAATCATTATATAGTTTTTCAGGATAAAACAA  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung CTTGGAACAGCTCATGCTGTGAAAATGGCACATGAACATTTAGCAGATAAAGAAGGAAC  
 pENTRYgcaD CTTGGAACAGCTCATGCTGTGAAAATGGCACATGAACATTTAGCAGATAAAGAAGGAAC  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung ACTCTAGTAGTATGTGGAGATACACCACTTATTACATACCAAACCTTACAATCACTTATT  
 pENTRYgcaD ACTCTAGTAGTATGTGGAGATACACCACTTATTACATACCAAACCTTACAATCACTTATT  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung GAACATCATGAAAGTACACAATCACATGTTACTGTATTATCTGCTTCTACTATCAATCCT  
 pENTRYgcaD GAACATCATGAAAGTACACAATCACATGTTACTGTATTATCTGCTTCTACTATCAATCCT  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung TATGGTTATGGACGAATTATTAGAAATCATAATGGAATATTAGAGCGTATTGTTGAAGAG  
 pENTRYgcaD TATGGTTATGGACGAATTATTAGAAATCATAATGGAATATTAGAGCGTATTGTTGAAGAG  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung AAAGACGCAAATGACTCAGAACGTGCGATTAAAGAAATTAGTTCAGGTATTTTTGCCTTT  
 pENTRYgcaD AAAGACGCAAATGACTCAGAACGTGCGATTAAAGAAATTAGTTCAGGTATTTTTGCCTTT  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung AATAATCGAGTACTATTTGAGAAGTTAGAACAAGTTAAAAATGATAATGCTCAAGGAGAA  
 pENTRYgcaD AATAATCGAGTACTATTTGAGAAGTTAGAACAAGTTAAAAATGATAATGCTCAAGGAGAA  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung TATTATTTACCTGATGTTTTGTCTTTAATTTTAAAAGACGGAGGTAAAGCTGAAGTTTAT  
 pENTRYgcaD TATTATTTACCTGATGTTTTGTCTTTAATTTTAAAAGACGGAGGTAAAGCTGAAGTTTAT  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung TGTACCGAAGATTTTGATGAAATCATGGTGTTAATGATCGTTTATGTTAAGTGAAGCT  
 pENTRYgcaD TGTACCGAAGATTTTGATGAAATCATGGTGTTAATGATCGTTTATGTTAAGTGAAGCT  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung GAAAAGGCTTTGCAACAACGTATCAATCGCTATCATATGGAAAATGGTGTGACAATCATT  
 pENTRYgcaD GAAAAGGCTTTGCAACAACGTATCAATCGCTATCATATGGAAAATGGTGTGACAATCATT  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung **GAC**CCTAGTTC AACATTTATTGGAACAGATGTGAAAATGGAAATAGATACAACCTATTGAA  
 pENTRYgcaD **GAT**CCTAGTTC AACATTTATTGGAACAGATGTGAAAATGGAAATAGATACAACCTATTGAA  
 \*\* \*\*\*\*\*  
**Transition**

Sequenzierung CCGGGCGTGCGCATCGGAGGTATACAACGATTGAAGAAGATGTGTGGATAGGCCAATAC  
 pENTRYgcaD CCGGGCGTGCGCATCGGAGGTATACAACGATTGAAGAAGATGTGTGGATAGGCCAATAC  
 \*\*\*\*\*

Sequenzierung TCTGAAATTAATAATAGCACAATTCATTGCAATGCTAACATAAAACAATCGGTTATCAAT  
 pENTRYgcaD TCTGAAATTAATAATAGCACAATTCATTGCAATGCTAACATAAAACAATCGGTTATCAAT

```

*****
Sequenzierung GACTCTATTGTTGGAGAGAACAACAGTTGGACCTTTCGCTCAACTACGCCAGGATCT
pENTRYgcaD GACTCTATTGTTGGAGAGAACAACAGTTGGACCTTTCGCTCAACTACGCCAGGATCT
*****

Sequenzierung AATTTAGGTTCTGAAGTTAAAGTAGGAACTTTGTTGAAGTGAAGAAAGCAGATATTA
pENTRYgcaD AATTTAGGTTCTGAAGTTAAAGTAGGAACTTTGTTGAAGTGAAGAAAGCAGATATTA
*****

Sequenzierung GATGGTGCTAAAGTATCACACTTGAGCTACATTGGAGATGCTGAAATAGGTGAGCGTACA
pENTRYgcaD GATGGTGCTAAAGTATCACACTTGAGCTACATTGGAGATGCTGAAATAGGTGAGCGTACA
*****

Sequenzierung AATATCGGATGTGGTTCTATCACTGTAAACTATGACGGCGCTAACAAATTTAAAACAATA
pENTRYgcaD AATATCGGATGTGGTTCTATCACTGTAAACTATGACGGCGCTAACAAATTTAAAACAATA
*****

Sequenzierung GTAGGTAAAGATGCTTTTATAGGATGTAATACGAACCTTATAGCACCTGTAACAGTAGGT
pENTRYgcaD GTAGGTAAAGATGCTTTTATAGGATGTAATACGAACCTTATAGCACCTGTAACAGTAGGT
*****

Sequenzierung AATCATACTCTTATTGCAGCTGGATCCACAATTACAGATAATATCCCTGAAGATAGTTTA
pENTRYgcaD AATCATACTCTTATTGCAGCTGGATCCACAATTACAGATAATATCCCTGAAGATAGTTTA
*****

Sequenzierung GCATTAGCGCGTGCAAGACAAGTAAATAAAGAGGGCTACCTAAAAAATAGTTCTTGCAC
pENTRYgcaD GCATTAGCGCGTGCAAGACAAGTAAATAAAGAGGGCTACCTAAAAAATAGTTCTTGCAC
*****
Stop gcaD

```

### C. Erste Sequenzierung pENTRY<sub>purR</sub>

```

Sequenzierung purR      GCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTGAAAAGATGAGATATAAAAAGCGAACGTAT
-----ATGAGATATAAAAAGCGAACGTAT
                          *****
                          Anteil att-site      Start purR

Sequenzierung purR      TGTATTTATGACACAATACCTCATGAACCACCAAATAAGTTGATACTCACTTATTT
                          TGTATTTATGACACAATACCTCATGAACCACCAAATAAGTTGATACTCACTTATTT
                          *****
                          Transversion      Transversion
                          Prolin → Glutamin

Sequenzierung purR      TGTAAAGAAATTTAAACAAGCAAAATCGTCAATTAGTGAAGACGTTCAAATCATTA AAAA
                          TGTAAAGAAATTTAAACAAGCAAAATCGTCAATTAGTGAAGACGTTCAAATCATTA AAAA
                          *****

Sequenzierung purR      TACGTTTC AAAATGAAAAATTAGGA ACTATTATTACTACAGCAGGTGCTAGCGGTGGAGT
                          TACGTTTC AAAATGAAAAATTAGGA ACTATTATTACTACAGCAGGTGCTAGCGGTGGAGT
                          *****

Sequenzierung purR      AACCTATAAGCCTATGATGAGTAAATCAGAGGCCACAGAGGTTGTTGATGAGGTGATAGA
                          AACCTATAAGCCTATGATGAGTAAATCAGAGGCCACAGAGGTTGTTGATGAGGTGATAGA
                          *****

Sequenzierung purR      GCAATTACAAGAGAAAGACCGTTTGCTACCTGGAGGATATTTATTTTATCCGATTTAGT
                          GCAATTACAAGAGAAAGACCGTTTGCTACCTGGAGGATATTTATTTTATCCGATTTAGT
                          *****

Sequenzierung purR      TGGTAATCCTTCTCTATTAATAAAAGTAGGTAAGTTAATTGCTAGTATATATATGAACGA
                          TGGTAATCCTTCTCTATTAATAAAAGTAGGTAAGTTAATTGCTAGTATATATATGAACGA
                          *****

Sequenzierung purR      AGAACTTGATGCTGTTGTTACCATAGCGACTAAAGGGATATCACTTGCGAATGCAGTCGC
                          AGAACTTGATGCTGTTGTTACCATAGCGACTAAAGGGATATCACTTGCGAATGCAGTCGC
                          *****

Sequenzierung purR      AAACGTATTA AATTTACCTGTAGTGGTTATAAGAAAGGACAATAAAGTTACAGAAGGTTTC
                          AAACGTATTA AATTTACCTGTAGTGGTTATAAGAAAGGACAATAAAGTTACAGAAGGTTTC
                          *****

Sequenzierung purR      TACGGTTTCAATCAATTATGTTTCAGGATCATCTAGAAAAATAGAAACAATGGTGTATC
                          TACGGTTTCAATCAATTATGTTTCAGGATCATCTAGAAAAATAGAAACAATGGTGTATC
                          *****

Sequenzierung purR      GAAACGAAC TTTAGCTGAGAA TTTCTAATGTCC TCGTAGTAGACGATTTTATGAGGGCTGG
                          GAAACGAAC TTTAGCTGAGAA TTTCTAATGTCC TCGTAGTAGACGATTTTATGAGGGCTGG
                          *****

Sequenzierung purR      TGGCTCAATTAATGGAGTAATGAATTTAATGAATGAGTTTAAAGCATGTAAAAGGGGT
                          TGGCTCAATTAATGGAGTAATGAATTTAATGAATGAGTTTAAAGCCATGTAAAAGGGGT
                          *****
                          Transversion

Sequenzierung purR      ATCAGTACTTGTAGAATCAAAGAAGTAAAACAAAGATTAATTGAAGATTATACTTCCTT
                          ATCAGTACTTGTAGAATCAAAGAAGTAAAACAAAGATTAATTGAAGATTATACTTCCTT
                          *****

Sequenzierung purR      AGTCAGATTGTCAGATGTCGACGAGTACAACCAAGAATTTAAAGTGAACCAGGCAACAG
                          AGTCAGATTGTCAGATGTCGACGAGTACAACCAAGAATTTAAAGTGAACCAGGCAACAG
                          *****

Sequenzierung purR      TTTGTCTAAATTTCTTAAACCAGCTTTCTT
                          TTTGTCTAAATTTCTTAA-----
                          *****
                          Stop purR

```

## D. Zweite Sequenzierung pENTRYpurR

Sequenzierung pENTRYpurR	-----TATTTTACTGATA TGTAACACGACGGCCAGTCTTAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTACTGATA *****
Sequenzierung pENTRYpurR	GTGACCTGTTTCGTTGCAACACATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTAC GTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTAC *****
Sequenzierung pENTRYpurR	AAAAAAGCAGGCTTTGATAAGATGAGATATAAAAGAAGCGAACGTATTGTATTTATGACA AAAAAAGCAGGCTTTGATAAGATGAGATATAAAAGAAGCGAACGTATTGTATTTATGACA ***** Anteil att-site                      Start purR
Sequenzierung pENTRYpurR	CAATACCTCATGAACCACCCAAATAAGTTGATACCCCTCACTTATTTTGTAAAGAAATTT CAATACCTCATGAACCACCCAAATAAGTTGATACCCCTCACTTATTTTGTAAAGAAATTT *****
Sequenzierung pENTRYpurR	AAACAAGCAAAATCGTCAATTAGTGAAGACGTTCAAATCATTAAAAATACGTTTCAAAT AAACAAGCAAAATCGTCAATTAGTGAAGACGTTCAAATCATTAAAAATACGTTTCAAAT *****
Sequenzierung pENTRYpurR	GAAAAATTAGGAACTATTATTACTACAGCAGGTGCTAGCGGTGGAGTAACCTATAAGCCT GAAAAATTAGGAACTATTATTACTACAGCAGGTGCTAGCGGTGGAGTAACCTATAAGCCT *****
Sequenzierung pENTRYpurR	ATGATGAGTAAATCAGAGGCCACAGAGTTGTTGATGAGGTGATAGAGCAATTACAAGAG ATGATGAGTAAATCAGAGGCCACAGAGTTGTTGATGAGGTGATAGAGCAATTACAAGAG *****
Sequenzierung pENTRYpurR	AAAGACCGTTTGCTACCTGGAGGATATTTATTTTTATCCGATTTAGTTGGTAATCCTTCT AAAGACCGTTTGCTACCTGGAGGATATTTATTTTTATCCGATTTAGTTGGTAATCCTTCT *****
Sequenzierung pENTRYpurR	CTATTAAATAAAGTAGGTAAGTTAATTGCTAGTATATATATGAACGAAGAACTTGATGCT CTATTAAATAAAGTAGGTAAGTTAATTGCTAGTATATATATGAACGAAGAACTTGATGCT *****
Sequenzierung pENTRYpurR	GTTGTTACCATAGCGACTAAAGGGATATCACTTGCGAATGCAGTCGCAAACGTATTAAT GTTGTTACCATAGCGACTAAAGGGATATCACTTGCGAATGCAGTCGCAAACGTATTAAT *****
Sequenzierung pENTRYpurR	TTACCTGTAGTGGTTATAAGAAAGGACGATAAAGTTACAGAAGTTCTACGGTTTCAATC TTACCTGTAGTGGTTATAAGAAAGGACGATAAAGTTACAGAAGTTCTACGGTTTCAATC ***** Transition Asparagin → Asparaginsäure
Sequenzierung pENTRYpurR	AATTATGTTTCAGGATCATCTAGAAAAATAGAAACAATGGTGTATCGAAACGAACTTTA AATTATGTTTCAGGATCATCTAGAAAAATAGAAACAATGGTGTATCGAAACGAACTTTA *****
Sequenzierung pENTRYpurR	GCTGAGAATTCTAATGTCCTCGTAGTAGACGATTTTATGAGGGCTGGTGGCCCAATTAAT GCTGAGAATTCTAATGTCCTCGTAGTAGACGATTTTATGAGGGCTGGTGGCTCAATTAAT ***** Transition Serin → Prolin
Sequenzierung pENTRYpurR	GGAGTAATGAATTTAATGAATGAGTTTAAAGCCCATGTAAGGGGTATCAGTACTTGTA GGAGTAATGAATTTAATGAATGAGTTTAAAGCCCATGTAAGGGGTATCAGTACTTGTA *****
Sequenzierung pENTRYpurR	GAATCAAAGAAGTAAAACAAAGATTAATTGAAGATTATACTTCCTTAGTCAGATTGTCA GAATCAAAGAAGTAAAACAAAGATTAATTGAAGATTATACTTCCTTAGTCAGATTGTCA *****

Sequenzierung GATGTCGACGAGTACAACCAAGAATTTAAAGTGGAAACCAGGCAACAGTTTGTCTAAATTT  
pENTRYpurR GATGTCGACGAGTACAACCAAGAATTTAAAGTGGAAACCAGGCAACAGTTTGTCTAAATTT  
\*\*\*\*\*

Sequenzierung TCTTAAAACCCAGCTTTC-----  
pENTRYpurR TCTTAAAACCCAGCTTCTTGACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATT  
\*\*\*\*\*

Stop purR

### E. Dritte Sequenzierung pENTRY<sub>purR</sub>

```

Sequenzierung   TGCCAAC TTTGTAC AAAAAAGCAGGCT TTGAAAAG ATGAGATATAAAAAGAAGCGAACGTA
pENTRYpurR      -----ATGAGATATAAAAAGAAGCGAACGTA
                                     *****
                                     Anteil att-site      Start purR

Sequenzierung   TTGTATTTATGACACAATACCTCATGAACCACCCAAATAAGTTGATACCCCTCATTATT
pENTRYpurR      TTGTATTTATGACACAATACCTCATGAACCACCCAAATAAGTTGATACCCCTCATTATT
                                     *****

Sequenzierung   TTGTAAAGAAATTTAAACAAGCAAAATCGTCAATTAGTGAAGACGTTCAAATCATTAATA
pENTRYpurR      TTGTAAAGAAATTTAAACAAGCAAAATCGTCAATTAGTGAAGACGTTCAAATCATTAATA
                                     *****

Sequenzierung   ATACGTTTCAAATGAAAAATTAGGAAC TATTATTACTACAGCAGGTGCTAGCGGTGGAG
pENTRYpurR      ATACGTTTCAAATGAAAAATTAGGAAC TATTATTACTACAGCAGGTGCTAGCGGTGGAG
                                     *****

Sequenzierung   TAACCTATAAGCCTATGATGAGTAAATCAGAGGCCACAGAGGTTGTTGATGAGGTGATAG
pENTRYpurR      TAACCTATAAGCCTATGATGAGTAAATCAGAGGCCACAGAGGTTGTTGATGAGGTGATAG
                                     *****

Sequenzierung   AGCAATTACAAGAGAAAAGACCGTTTGCTACCTGGAGGATATTTATTTTATCCGATTTAG
pENTRYpurR      AGCAATTACAAGAGAAAAGACCGTTTGCTACCTGGAGGATATTTATTTTATCCGATTTAG
                                     *****

Sequenzierung   TTGGTAATCCTTCTCTATTAATAAAGTAGGTAAGTTAATTGCTAGTATATATATGAACG
pENTRYpurR      TTGGTAATCCTTCTCTATTAATAAAGTAGGTAAGTTAATTGCTAGTATATATATGAACG
                                     *****

Sequenzierung   AAGAACTTGATGCTGTTGTTACCATAGCGACTAAAGGGATATCACTTGCGAATGCAGTCG
pENTRYpurR      AAGAACTTGATGCTGTTGTTACCATAGCGACTAAAGGGATATCACTTGCGAATGCAGTCG
                                     *****

Sequenzierung   CAAACGTATTAATTTACCTGTAGTGGTTATAAGAAAGGACAATAAAGTTACAGAAGGTT
pENTRYpurR      CAAACGTATTAATTTACCTGTAGTGGTTATAAGAAAGGACAATAAAGTTACAGAAGGTT
                                     *****

Sequenzierung   CTACGGTTTCAATCAATTATGTTTCAGGATCATCTAGAAAAATAGAAACAATGGTGTAT
pENTRYpurR      CTACGGTTTCAATCAATTATGTTTCAGGATCATCTAGAAAAATAGAAACAATGGTGTAT
                                     *****

Sequenzierung   CGAAACGAAC TTTAGCTGAGAAT TCTAATGTCC TCGTAGTAGACGATTTTATGAGGGCTG
pENTRYpurR      CGAAACGAAC TTTAGCTGAGAAT TCTAATGTCC TCGTAGTAGACGATTTTATGAGGGCTG
                                     *****

Sequenzierung   GTGGCTCAATTAATGGAGTAATGAATTTAATGAATGAGTTTAAAGCCCATGTAAAAGGGG
pENTRYpurR      GTGGCTCAATTAATGGAGTAATGAATTTAATGAATGAGTTTAAAGCCCATGTAAAAGGGG
                                     *****

Sequenzierung   TATCAGTACTTGTAGAATCAAAGAAGTAAAACAAAGATTAATTGAAGATTATACTTCTCT
pENTRYpurR      TATCAGTACTTGTAGAATCAAAGAAGTAAAACAAAGATTAATTGAAGATTATACTTCTCT
                                     *****

Sequenzierung   TAGTCAGATTGTCAGATGTCGACGAGTACAACCAAGAATTTAAAGTGAACCAGGCAACA
pENTRYpurR      TAGTCAGATTGTCAGATGTCGACGAGTACAACCAAGAATTTAAAGTGAACCAGGCAACA
                                     *****

Sequenzierung   GTTTGTCTAAATTTCTTAA-----
pENTRYpurR      GTTTGTCTAAATTTCTTAA-----
                                     *****
                                     Stop purR

```

## III. Plasmidkarten der Expressionsvektoren

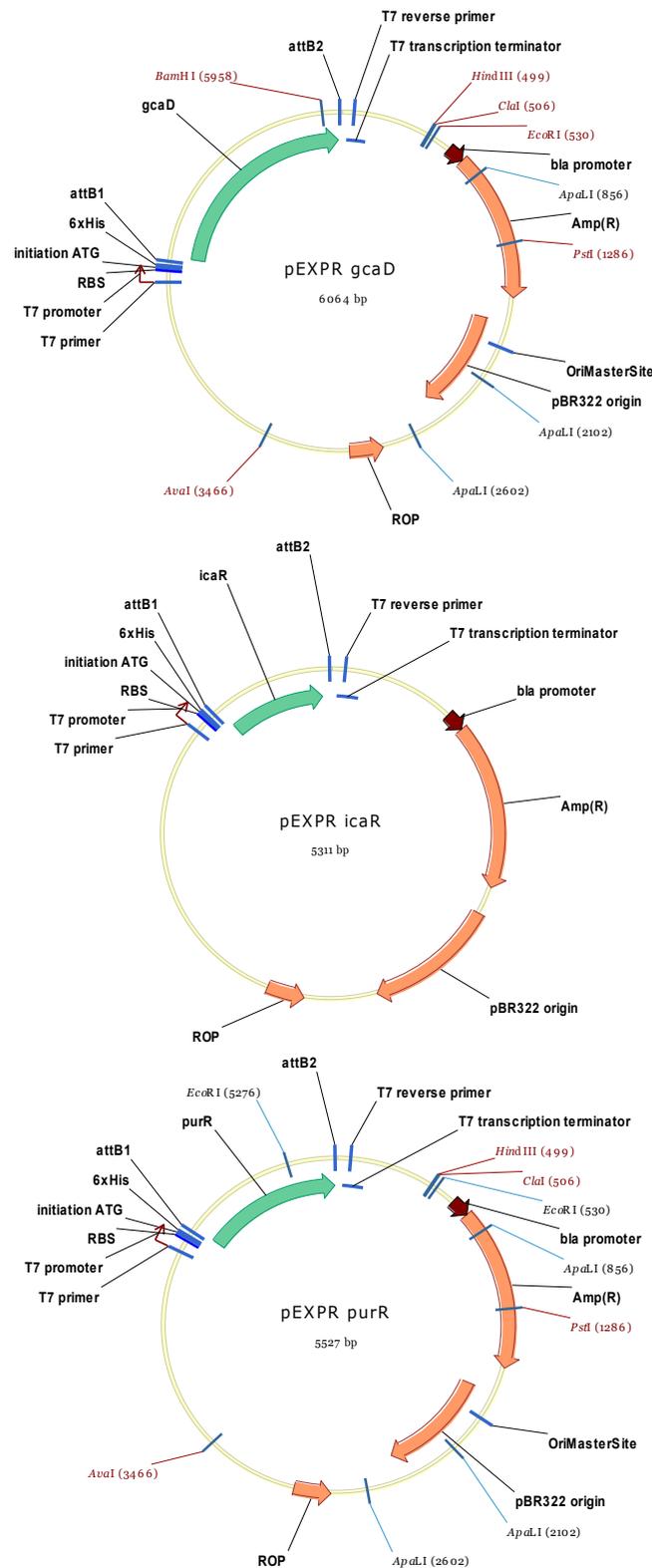


Abbildung 8-1 Plasmidkarten der Expressionsvektoren

Die Expressionsplasmide (Größe in bp) wurden nach dem entsprechenden überexprimierten Protein benannt. In grün ist das entsprechende Gen dargestellt, welches von den *att*-sites flankiert wird. Strangaufwärts findet sich der His-tag, Start-Codon, der T7-Promotor und die Ribosomen-Bindungsstelle (RBS). Die Plasmide enthalten zusätzlich eine Ampicillinresistenz.

## IV. Tierversuchsgenehmigung

  
Ministerium für Landwirtschaft,  
Umwelt und ländliche Räume  
des Landes Schleswig-Holstein

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |  
Postfach 50 09 | 24062 Kiel

Herrn  
Prof. Dr. Johannes Karl-Mark Knobloch  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
und Hygiene  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

Ihre Anträge vom: 12.06.2007  
Mein Zeichen: V 313 – 72241.122-19  
Frau Hinz  
Telefon: 0431 988-7224  
Telefax: 0431 988-7042

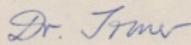
nachrichtlich:  
Herrn  
Dr. R. Noël  
Gemeinsame Tierhaltung  
der Universität zu Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

28. Juni 2007

**Anzeige von Versuchsvorhaben**

Sehr geehrter Herr Prof. Knobloch,  
gegen die Durchführung der Versuchsvorhaben  
„Untersuchungen zur Regulation der Proteine LukS und LukF in *Staphylococcus aureus*“  
unter Verwendung von bis zu vier Kaninchen  
und  
„Untersuchungen zur Regulation der Biofilmbildung in *S.epidermidis* durch die regulatori-  
schen Proteine RsbU und SigB“ unter Verwendung von bis zu vier Kaninchen  
erhebe ich keine Einwände.

Mit freundlichen Grüßen

  
Dr. Imer

Dienstgebäude Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7239 | poststelle@mlur.landsh.de  
www.landesregierung.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch signierte oder verschlüsselte Dokumente

## **9 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Johannes K.-M. Knobloch für das Überlassen des spannenden Themas sowie für die unermüdliche und freundschaftliche Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit führte.

Herrn Prof. Dr. Werner Solbach, als auch seinem Nachfolger Prof. Dr. Jan Rupp danke ich, dass ich diese Arbeit an der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie der Universität zu Lübeck durchführen durfte.

Frau Dr. Beate Fresenborg danke ich nicht nur für die unersetzliche Anleitung zum praktischen Teil dieser Arbeit, sondern auch für das Heranführen an die theoretische Arbeit.

Ich danke allen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Atmosphäre, die harmonische Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft und für zahlreiche unvergessliche Momente.

Frau Dr. Marta Heydorn danke ich, dass sie mir während des gesamten Studiums unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite stand und mich bei meinen Entscheidungen immer unterstützt hat.

Herrn Hanns-Uwe Heydorn danke ich für die Hilfe beim Formatieren dieser Arbeit.

Herrn Tobias Sabottka danke ich für die Unterstützung während der praktischen Arbeit.

Herrn Simon Brannath danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie die moralische und liebevolle Unterstützung während des Schreibens dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls meinen Eltern Frau Elwira und Herrn Tomasz Zienkiewicz, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und mich immer motiviert und unterstützt haben. Nicht zuletzt danke ich meinem jüngerem Bruder Philip Zienkiewicz für das Verständnis, dass er mich so häufig entbehren musste.

**Lebenslauf**