

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. W. Solbach

---

Untersuchungen zur Regulation der Biofilmbildung in  
*Staphylococcus epidermidis*

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
Beate Jonas  
aus Greifswald

Lübeck 2009

Wissenschaftliche Betreuung:

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Knobloch
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Stefan Niemann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22.02.2010

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach  
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Johannes K.-M. Knobloch für die Überlassung des interessanten Themas und für die jederzeit freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit sowohl bei wissenschaftlichen Fragen als auch bei der praktischen Durchführung der Versuche. Ferner danke ich ihm für die zahlreichen Diskussionen, seine unschätzbare, fortwährende Unterstützung sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. Werner Solbach und Herrn Prof. Dr. Martin Aepfelbacher danke ich für die Möglichkeit die vorliegende Dissertation an den Instituten für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitäten Lübeck und Hamburg bearbeitet haben zu können.

Frau Dr. Susanne Engelmann, Herrn Dr. Harald Kusch und Herrn Stephan Fuchs danke ich herzlich für die Einführung in das experimentelle Arbeiten auf dem Gebiet der 2D-Gel-Analyse und für die Möglichkeit diese Arbeiten am Institut für Mikrobiologie der Universität Greifswald durchführen zu können.

Bei Frau Gesche Kroll und Frau Justina Schunke möchte ich mich für eine wunderbare Zusammenarbeit und für ihre stets hilfsbereite Unterstützung bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt sämtlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und Christiane Jugert für die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Darüber hinaus danke ich ihnen für das angenehme und harmonische Arbeitsklima und die schöne gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors, die ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Dr. Andrea Starke, Frau Franziska Albrecht und Frau Christiane Jugert danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern Sonja und Uwe Jonas sowie Herrn Tim Fresenborg, die mir während dieser Zeit zur Seite gestanden haben. Diese Arbeit verdanke ich ihnen durch ihre stets uneingeschränkte Unterstützung, Geduld und ermutigenden Ratschläge.

Vielen Dank.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis .....	VIII
1 Zusammenfassung .....	1
2 Theoretische Grundlagen .....	2
2.1 Staphylokokken .....	2
2.2 Fremdkörper-assoziierte Infektionen.....	3
2.3 Molekulare Grundlagen der Biofilmbildung .....	4
2.3.1 Anheftung.....	5
2.3.2 Akkumulation und Reifung.....	6
2.3.3 Ablösung .....	8
2.4 Regulation der Biofilmbildung.....	9
2.4.1 Umwelteinflüsse.....	9
2.4.2 Regulation der Exopolysaccharidsynthese.....	9
2.4.3 Regulationen durch das <i>agr</i> -System .....	12
2.5 Physiologie der Biofilme .....	14
2.6 Resistenz gegenüber Antibiotika und der Wirtsabwehr .....	14
3 Ableitung der Fragestellung.....	17
4 Material.....	18
4.1 Bakterienstämme .....	18
4.2 Plasmide.....	19
4.3 Antibiotika .....	22
4.4 Oligonukleotide .....	22
4.5 Antikörper.....	24
4.6 Enzyme .....	25
4.7 Kits.....	25
4.8 Chemikalien und Verbrauchsmittel .....	26
4.9 Geräte und Hilfsmittel .....	27
5 Methoden .....	29
5.1 Kultur bakterieller Zellen .....	29
5.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> Zellen.....	29
5.1.2 Kultivierung von Staphylokokken .....	29
5.2 Phänotypische Charakterisierung .....	29
5.2.1 Erstellung von Wachstumskurven der <i>S. epidermidis</i> Stämme .....	29
5.2.2 Semiquantitative Bestimmung der Biofilmbildung .....	30
5.2.3 Extraktion von PIA .....	31
5.2.4 Quantifizierung von PIA mittels Dot Blot .....	31
5.2.5 Bestimmung der Proteaseexpression auf Caseinagarplatten.....	32
5.3 Genetische Manipulation bakterieller Zellen.....	33
5.3.1 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	33
5.3.2 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen .....	34
5.3.3 Herstellung elektrokompenter <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> Zellen.....	34
5.3.4 Elektroporation von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> Zellen.....	35
5.3.5 Phagentransduktion .....	35
5.3.6 Mutagenese .....	37
5.4 Arbeiten mit DNA .....	38
5.4.1 Isolation chromosomaler DNA aus <i>S. epidermidis</i> .....	38

5.4.2	Isolation von Plasmid-DNA.....	38
5.4.3	Analyse von DNA im TBE-Agarosegel.....	39
5.4.4	Nukleinsäureaufreinigung.....	39
5.4.5	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	39
5.4.6	Polymerasenkettenreaktion (PCR).....	40
5.4.7	Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	41
5.4.8	Gatewayklonierungen.....	42
5.4.9	klassische Klonierung.....	46
5.5	Arbeiten mit RNA.....	47
5.5.1	Probennahme der <i>S. epidermidis</i> Zellen zur RNA-Aufreinigung.....	47
5.5.2	Isolation der Gesamtzell-RNA.....	47
5.5.3	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	48
5.5.4	Primer Extension Analyse.....	48
5.5.5	5' Kartierung der mRNA mittels RACE-Technologie.....	50
5.5.6	Quantitative Transkriptionsanalyse.....	51
5.6	Arbeiten mit Proteinen.....	54
5.6.1	Proteinüberexpression.....	54
5.6.2	Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	54
5.6.3	Probennahme der <i>S. epidermidis</i> Zellen zur Proteinaufreinigung.....	55
5.6.4	Aufreinigung intrazellulärer Proteine.....	56
5.6.5	Aufreinigung extrazellulärer Proteine.....	56
5.6.6	Herstellung polyklonaler Antiseren.....	56
5.6.7	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	58
5.6.8	Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel.....	59
5.6.9	Western Blot Analyse.....	59
5.6.10	Auftrennung von Proteinen über 2 Dimensionen.....	60
5.7	Computerbasierte Analyse.....	65
5.7.1	Blast-Suchen und Alignments.....	65
6	Ergebnisse.....	66
6.1	Nachweis des $\sigma^B$ abhängigen Promotors strangaufwärts von <i>barAB</i> .....	66
6.1.1	Nachweis mittels Primer Extension Analyse.....	66
6.1.2	Nachweis mittels RACE-Technologie.....	67
6.2	Generierung polyklonaler Antiseren in Hasen.....	68
6.2.1	Überexpression der Proteine in <i>E. coli</i> BL 21 und Aufreinigung der His-tag Proteine mittels Affinitätschromatographie.....	68
6.2.2	Aufreinigung der Antiseren.....	71
6.3	Etablierung der Deletionsmutanten des <i>purR</i> -Lokus in <i>S. epidermidis</i> .....	71
6.3.1	Generierung definierter Mutanten.....	72
6.3.2	Komplementierung der Mutanten.....	75
6.3.3	Nachweis der veränderten Proteinexpressionsmuster in den Mutanten.....	76
6.4	Charakterisierung der Biofilmbildung der Mutanten.....	76
6.4.1	Wachstumsverhalten.....	77
6.4.2	Biofilmbildung in 96well Polystyrolplatten.....	79
6.4.3	Transduktion der Deletionen in unabhängige genetische Hintergründe.....	80
6.4.4	PIA-Expression.....	83
6.4.5	Quantitative Transkriptionsanalyse der Gene <i>icaA</i> und <i>icaR</i> .....	84
6.5	Intrazelluläre Proteomanalyse mittels 2D Analyse.....	86
6.5.1	Die Deletionen von <i>barA</i> , <i>barB</i> und <i>barAB</i> .....	86
6.5.2	Die Deletionen von <i>sigB</i> und <i>sigBagr</i> .....	94

---

6.6	Änderungen der extrazellulären Expressionsmuster durch die Deletionen von <i>barA</i> , <i>barB</i> , <i>barAB</i> , <i>sigB</i> , <i>agr</i> und <i>sigBagr</i> .....	98
6.6.1	Analyse des extrazellulären Proteoms in der 1D SDS PAGE.....	98
6.6.2	Analyse der extrazellulären Proteaseaktivität auf Casein-Agar .....	100
6.6.3	Quantitative Transkriptionsanalyse der extrazellulären Proteasen ..	102
7	Diskussion.....	106
7.1	Kartierung des $\sigma^B$ -abhängigen Promotors vor <i>barA</i> .....	107
7.2	Generierung der Deletionsmutanten .....	109
7.3	Regulation der Biofilmbildung durch BarA und BarB.....	113
7.4	Einfluss der Regulatoren BarA, BarB, $\sigma^B$ und <i>agr</i> auf das intrazelluläre Proteom.....	116
7.5	Einfluss der Regulatoren BarA, BarB, $\sigma^B$ und <i>agr</i> auf das extrazelluläre Proteom.....	122
7.5.1	Proteasen .....	122
7.5.2	Weitere Proteine.....	126
7.6	Schlussbetrachtungen .....	128
	Literaturverzeichnis .....	130
	Anhang.....	147
I	Plasmidkarten .....	147
II	Sequenzierungen.....	149
III	Signifikant veränderte Proteine des intrazellulären Proteoms.....	158
IV	KEGG-Diagramme .....	175
V	Proteinalignment BarA und BarB.....	177
	Lebenslauf.....	178
	Veröffentlichungen .....	179

**Abkürzungsverzeichnis**

A <sub>xxxnm</sub>	Absorption bei xxxnm
A. dest	destilliertes Wasser
Aap	<i>accumulation associated protein</i>
AB	Antibiotikum
agr	<i>accessory gene regulator</i>
AI-2	<i>autoinducer-2</i>
AIP	<i>autoinducing peptide</i>
AMPs	antimikrobielle Peptide
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AtIE	Autolysin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bar	<i>biofilm associated regulator</i>
BCIP	3-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat
BHI	<i>brain heart infusin</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio] 1-propan-sulfonat
CHCA	$\alpha$ -4-cyano-hydroxy-Zimtsäure
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
Cp	<i>crossing point</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
Embp	<i>extracellular matrix binding protein</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
ica	<i>intercellular adhesin</i>

---

ID	Identifikationsnummer
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH Gradient
kDa	kiloDalton
KNS	koagulasenegative Staphylokokken
LB	Luria Bertani
LSC	<i>liquid scintillation counter</i>
MALDI	<i>matrix associated laser desorption ionization</i>
MS	Massenspektroskopie
MSCRAMMs	<i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
NB2	<i>nutrient broth no. 2</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
OD <sub>xnm</sub>	optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGA	Poly- $\gamma$ -glutaminsäure
PIA	<i>polysaccharide intercellular adhesin</i>
PNK	Polynukleotidkinase
PSMs	<i>phenol soluble modulins</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
Rsb	Regulator von $\sigma^B$
RT	<i>real-time</i>
Sar	<i>staphylococcal accesory regulator</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>sigB</i>	Genort des alternativen Sigmafaktors $\sigma^B$
STA	Staphylokokken-Typisierungssagar
SV	Säulenvolumen
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA-Zyklus	Tricarbonsäure-Zyklus
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

---

TFA	Tri-Fluoressigsäure
TIGR	<i>The Institute of Genomic Research</i>
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Trihydroxyaminomethan
TSA	<i>Tryptic Soy agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy broth</i>
TSB <sub>EtOH</sub>	TSB supplementiert mit 3 % EtOH
TSB <sub>NaCl</sub>	TSB supplementiert mit 3 % NaCl
TTBS	Tween-Tris gepufferte Salzlösung
U	<i>unit</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
ZVK	Zentraler Venenkatheter

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1	Phasen der Biofilmbildung nach M. Otto 2008 .....	5
Abb. 2-2	Modell der Biofilmregulation in <i>S. epidermidis</i> (Mack <i>et al.</i> , 2006) ....	12
Abb. 5-1	Primer für Expressionsvektoren.....	42
Abb. 5-2	Primer für Deletionsvektoren.....	44
Abb. 6-1	Schematische Darstellung der Primer Extension Analyse.....	66
Abb. 6-2	Primer Extension für <i>barA</i> .....	67
Abb. 6-3	5' Kartierung mit RACE für <i>barA</i> .....	68
Abb. 6-4	Aufreinigung der His-tag-Proteine .....	70
Abb. 6-5	Schematische Darstellung des homologen Genaustausches von <i>barAB</i> . 72	
Abb. 6-6	Fragmente zur Überprüfung der <i>erm</i> -Insertion.....	74
Abb. 6-7	Genetische Organisation der Deletionsmutanten.....	75
Abb. 6-8	Nachweis der Proteine BarA und BarB in den generierten Mutanten ....	76
Abb. 6-9	Wachstumskurven.....	78
Abb. 6-10	Biofilmbildung in 96well Nunclon $\Delta$ Zellkulturschalen.....	80
Abb. 6-11	Wachstumskurven.....	81
Abb. 6-12	Biofilmbildung der <i>S. epidermidis</i> Stämme 1057 und 8400.....	82
Abb. 6-13	PIA-Nachweis in <i>S. epidermidis</i> 1457 Stämmen.....	83
Abb. 6-14	<i>IcaA</i> und <i>icaR</i> Transkriptionsanalyse der Mutanten.....	85
Abb. 6-15	Änderungen des intrazellulären Proteoms in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>barA</i> . 87	
Abb. 6-16	Änderungen des intrazellulären Proteoms in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>barB</i> . 88	
Abb. 6-17	Änderungen des intrazellulären Proteoms in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>barAB</i> 89	
Abb. 6-18	Überlappung der differentiell exprimierten Proteinspots .....	90
Abb. 6-20	Änderungen des intrazellulären Proteoms in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>barAB</i> im Vergleich mit 1457 <i>barB</i> .....	93
Abb. 6-21	Änderungen des intrazellulären Proteoms in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>sigB</i> .. 95	
Abb. 6-22	Änderungen des intrazellulären Proteoms in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>sigB</i> <i>agr</i> . .....	96
Abb. 6-23	Änderungen des intrazellulären Proteoms in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>sigB</i> <i>agr</i> im Vergleich mit 1457 <i>sigB</i> .....	98
Abb. 6-24	Extrazelluläre Proteine in <i>S. epidermidis</i> .....	99
Abb. 6-25	Proteaseexpression verschiedener <i>S. epidermidis</i> 1457 Stämme.....	101
Abb. 6-26	Proteaseexpression in <i>S. epidermidis</i> 8400 und 1057 Stämmen.....	102
Abb. 6-27	Expression von SE0184, SE1543 und SE2219 nach 7 h .....	103
Abb. 6-28	Genexpression von SE0184, SE1543, SE2219 und RNAIII nach 24 h 105	
Abb. 7-1	Alignment der $\sigma^B$ -Proteine.....	109
Abb. 7-2	Modifiziertes Modell der Biofilmbildung.....	115
Abb. 7-3	Beziehung zwischen PIA-Synthese und Glykolyse /TCA-Zyklus .....	118
Abb. 7-4	Schema der Regulation der extrazellulären Proteasen in <i>S. epidermidis</i> .... .....	126
Abb. 8-1	Plasmidkarten der Expressionsplasmide.....	147
Abb. 8-2	Plasmidkarten der Gatewayplasmide zur Deletion .....	148
Abb. 8-3	Glykolyse / Glukoneogenese .....	175
Abb. 8-4	TCA-Zyklus .....	176
Abb. 8-4	Aminozucker-Metabolismus.....	176
Abb. 8-6	Proteinalignment von BarA und BarB.....	177

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 2-1</b>	Ausgewählte Oberflächenproteine, die extrazelluläre Matrix binden .....	6
<b>Tab. 4-1</b>	In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme .....	18
<b>Tab. 4-2</b>	In dieser Arbeit verwendete Plasmide .....	19
<b>Tab. 4-3</b>	In dieser Arbeit verwendete Antibiotika .....	22
<b>Tab. 4-4</b>	In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide .....	22
<b>Tab. 4-5</b>	In dieser Arbeit verwendete Antikörper .....	24
<b>Tab. 4-6</b>	In dieser Arbeit verwendete Enzyme .....	25
<b>Tab. 4-7</b>	In dieser Arbeit verwendete Kits .....	25
<b>Tab. 4-8</b>	In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel .....	26
<b>Tab. 4-9</b>	In dieser Arbeit verwendete Geräte und Hilfsmittel .....	27
<b>Tab. 5-1</b>	Hybridisierungstemperaturen von Primerpaaren .....	41
<b>Tab. 5-2</b>	Kombinationen der Entry- und Destinationsvektoren .....	43
<b>Tab. 5-3</b>	Zuordnung der att-sites zu den Fragmenten und resultierende Vektoren .....	44
<b>Tab. 5-4</b>	PCR-Bedingungen zur Amplifikation der dA-markierten cDNA .....	51
<b>Tab. 5-5</b>	PCR-Protokoll der Kontroll PCR .....	52
<b>Tab. 5-6</b>	Protokoll der reversen Transkription .....	53
<b>Tab. 5-7</b>	Zusammensetzung der RT-PCR Ansätze .....	53
<b>Tab. 6-1</b>	Größenveränderung der His-tag Proteine .....	70
<b>Tab. 6-2</b>	Zu erwartende Fragmentgrößen bei korrektem Genaustausch .....	73
<b>Tab. 6-3</b>	Wachstumsrate und Generationszeiten der 1457 Stämme .....	78
<b>Tab. 6-4</b>	Wachstumsrate und Generationszeiten der 1057 und 8400 Stämme .....	82
<b>Tab. 6-5</b>	Anzahl signifikant regulierter Proteinspots in 1457 <i>barAB</i> .....	91
<b>Tab. 6-6</b>	Anzahl signifikant regulierter Proteinspots in 1457 <i>sigB</i> und 1457 <i>sigBagr</i> .....	94
<b>Tab. 8-1</b>	Signifikant veränderte Proteine in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>barA</i> , 1457 <i>barB</i> und 1457 <i>barAB</i> im Vergleich zum Wildtyp .....	158
<b>Tab. 8-2</b>	Signifikant veränderte Proteine in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>barAB</i> im Vergleich zu 1457 <i>barA</i> und 1457 <i>barB</i> .....	162
<b>Tab. 8-3</b>	Signifikant veränderte Proteine in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>sigB</i> und 1457 <i>sigBagr</i> im Vergleich zum Wildtyp 1457 .....	167
<b>Tab. 8-4</b>	Signifikant veränderte Proteine in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>sigBagr</i> im Vergleich zu 1457 <i>sigB</i> .....	171

## 1 Zusammenfassung

Die Anheftung an Polymeroberflächen und die nachfolgende Biofilmbildung ist der Hauptpathogenitätsfaktor bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen durch *Staphylococcus epidermidis*. Die interzelluläre Adhäsion wird hauptsächlich durch das extrazelluläre Polysaccharid PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) vermittelt. Die Transkription des *icaADBC*-Lokus, welcher die für die Synthese von PIA verantwortlichen Gene codiert, unterliegt einem komplexen regulativen Netzwerk, das den spezifischen Negativregulator IcaR mit einschließt. In vorangegangenen Arbeiten wurde die *S. epidermidis* Transposon Mutante M12 charakterisiert, in der ein neuer regulatorischer Genort inaktiviert wurde. Das Transposon Tn917 war in *purR* inseriert und führte zum Verlust von zwei Transkripten, die insgesamt vier Gene umfassten: *ispE*, *purR*, *barA* und *barB*. Es wurde angenommen, dass das kleinere Transkript, welches für *barA* und *barB* kodierte von einem putativen  $\sigma^B$  abhängigen Promotor abgelesen wurde. Sowohl durch eine Primerverlängerungsanalyse als auch durch die RACE-Technologie konnte dieser Promotor bestätigt werden. Die Konstruktion von Deletionsmutanten der einzelnen Gene *ispE*, *purR*, *barA* und *barB* in *S. epidermidis* 1457 zeigte eine essenzielle Funktion von BarB für die PIA-Synthese. Wohingegen die Deletion von *barA* nur zu einer reduzierten Biofilmbildung führte. Der Verlust der Gene *ispE* und *purR* hatte keinen Einfluss auf die Biofilmbildung. Es konnte gezeigt werden, dass der biofilmnegative Phänotyp von *S. epidermidis* 1457*barB* aus einer stark verminderten *icaA*-Transkription nicht aber aus einer erhöhten *icaR*-Transkription resultierte. Die Biofilmbildung konnte auch durch Supplementierung des Wachstumsmediums mit 3 % NaCl oder 3 % Ethanol nicht wieder induziert werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Regulatoren BarA, BarB (einzeln und in Kombination beider),  $\sigma^B$  sowie das *agr*-System einen erheblichen Einfluss auf das intrazelluläre Proteom ausüben. In den entsprechenden Mutanten wurde ein Großteil der Proteine im Vergleich zum Wildtyp verändert reguliert. Leider konnte nur ein Teil der Proteine identifiziert werden, darunter befanden sich jedoch viele Enzyme des Energiemetabolismus. Auch das extrazelluläre Proteom wurde stark verändert. Hier wurde ein Paradoxon beschrieben, welches zeigt, dass die Einzeldelationen der Gene *barA* und *barB* jeweils zu einer Induktion der extrazellulären Proteaseexpression führten, jedoch die Doppelmutante *S. epidermidis* 1457*barAB* sowohl eine verminderte Proteaseaktivität als auch eine verringerte Transkription der extrazellulären Proteasen aufweist.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Staphylokokken

Nach aktueller Taxonomie werden Staphylokokken der Familie der *Staphylococcaceae* zugeordnet, welche die fünf Gattungen *Staphylococcus*, *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* und *Salinicoccus* umfasst. Derzeit werden 66 Spezies, inklusive Subspezies, der Gattung *Staphylococcus* zugeschrieben. Staphylokokken sind gram-positive, unbewegliche, kokkenförmige, nicht sporenbildende Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt, die, mit wenigen Ausnahmen, fakultativ anaerob wachsen. Haut, Hautdrüsen und Schleimhäute warmblütiger Tiere sind typische Habitate der Bakterien. So kommen sie auch beim Menschen als Kommensalen der Haut vor.

In der Humanmedizin werden Staphylokokken anhand des Plasma-Koagulase-Testes unterteilt (Sperber and Tatini, 1975). Der wichtigste Vertreter der Koagulase-positiven Staphylokokken ist *Staphylococcus aureus*. Er besiedelt bei 20-30 % der Bevölkerung als Kommensale die Nasenschleimhaut (Wertheim *et al.*, 2005; van Belkum A., 2006), besitzt jedoch ein hohes pathogenes Potential. Der Keim kann eine Reihe von verschiedenen Erkrankungen verursachen. Dazu zählen eitrige Hauterkrankungen (Furunkel, Karbunkel, Abszeß), Lungenentzündung, Endokarditis, Osteomyelitis, Mastitis sowie die Sepsis. Durch Toxine können weitere Erkrankungen wie Lebensmittelvergiftungen, das *staphylococcal-toxic-shock*-Syndrom oder das *staphylococcal-scaled-skin*-Syndrom ausgelöst werden (Projan and Novick, 1997; Tenover and R.Gaynes, 2000). Ein häufiger Vertreter der Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) ist *Staphylococcus epidermidis*. Der Keim ist opportunistischer Bewohner der Hautflora, der lange, mit Ausnahme der neonatalen Endokarditis, als apathogen galt (Caputo *et al.*, 1987). Da er nur bei Patienten mit supprimiertem Immunsystem, wie AIDS-Patienten oder Patienten mit immunsuppressiver Therapie zu Erkrankungen führte (Ziebuhr, 2001; Vadyvaloo and Otto, 2005). Bei gesunden Patienten verursacht *S. epidermidis* nur nach Penetration der Haut oder der mukösen Membranen Erkrankungen wie Sepsis oder Endokarditis (Arber *et al.*, 1994; Vuong and Otto, 2002; Kocianova *et al.*, 2005). Mittlerweile hat *S. epidermidis* als nosokomialer Erreger große Bedeutung gewonnen. KNS bilden heute eine der Hauptursachen nosokomial erworbener Bakteriämien und Fremdkörper-assoziiierter Infektionen, die zu erhöhter Morbidität und Mortalität führen (Kloos and Bannerman, 1994; Rupp and Archer, 1994). In etwa zwei Drittel

dieser Infektionen ist der Erreger *S. epidermidis* (Darouiche, 2004; Zimmerli *et al.*, 2004). Der Spezies kommt durch die Fähigkeit zur Biofilmbildung eine enorme Bedeutung bei Infektionen von intravasalen Kathetern, Liquorshunts, Endoprothesen sowie künstlichen Herzklappen oder Gelenken zu. Die Behandlung solcher Infektionen ist oft kompliziert und eine Heilung meist nur durch Entfernung des Fremdmaterials zu erreichen (Kloos and Bannerman, 1994).

## 2.2 Fremdkörper-assoziierte Infektionen

Die Fremdkörper-assoziierte Infektion zählt zu den häufigsten Infektionen durch *S. epidermidis* (Vuong and Otto, 2002). Dabei ist das klinische Bild der Infektion abhängig von der Insertionsstelle und der Art des Fremdkörpers (Heilmann and Peters, 2001). Sicherlich trägt auch der vermehrte Einsatz von Fremdmaterialien in der Humanmedizin und die steigende Zahl an ernsthaft erkrankten und immunkomprimierten Patienten zu dem Anstieg der Fremdkörper-assoziierten Infektionen bei (Raad *et al.*, 1998).

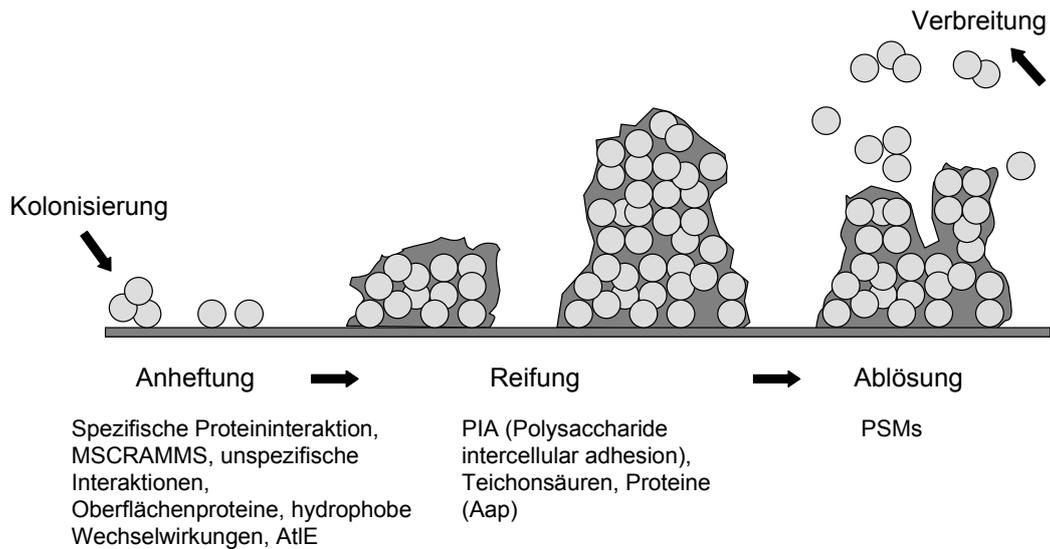
Der Ursprung der Organismen, die die Infektion auslösen, kann vielfältig sein. Zunächst kann es zu einer Verschleppung der Bakterien von der Haut in die Insertionsstelle kommen. Weiterhin kann es auch zu einer Kontamination aus der Luft kommen. Beschrieben wurden ebenfalls Übertragungen der Keime vom Operateur oder dem Pflegepersonal. Risiken stellen ein langer Krankenhausaufenthalt, mehrere chirurgische Eingriffe und die Dauer der Operation dar (Choong and Whitfield, 2000).

Insbesondere die Fähigkeit der Bakterien zur Bindung an implantierte Oberflächen und die Bildung von mehrschichtigen Biofilmen führt zu ihrem hohen pathogenen Potential. Biofilme sind charakterisiert durch eine Reduzierung der basalen zellulären Prozesse und durch eine Induktion von protektiven Faktoren (Kong *et al.*, 2006). Die Bakterien schützen sich durch eine verminderte Sensitivität gegenüber Antibiotika, Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden. Sie wechseln in einen weniger aggressiven Status (Transkription und Translation, verringerter Metabolismus sowie Wechsel zur Fermentation) und führen so zu einer verminderten Entzündung und Chemotaxis (Yao *et al.*, 2005). Ferner zeigen *S. epidermidis* Stämme in Fremdkörper-assoziierten Infektionen ein erhebliches Antibiotikaresistenzmuster gegenüber Methicillin, Chinolonen und Glycopeptiden (Raad *et al.*, 1998; Ziebuhr *et al.*, 2006). Biofilme sind deshalb nur sehr schwer zu eradizieren (Gilbert *et al.*, 1997; Costerton, 1999). Dafür gibt es verschiedene Ursachen, die in

Kapitel 2.6 näher vorgestellt werden. Zellen im Biofilm weisen eine verminderte Wachstumsrate auf und bieten somit Antibiotika, die in den Stoffwechsel der Bakterien eingreifen, kaum Angriffspunkte (Handke *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2004). Daher werden in der Behandlung derartiger Infektionen häufig Kombinationen aus zwei oder mehr Antibiotika eingesetzt (Saginur *et al.*, 2006). So wird ein breiteres Antibiotikasppektrum abgedeckt und es werden geringere Antibiotikakonzentrationen benötigt. Auch eine prophylaktische Antibiotikagabe vor Operationen wird eingesetzt, jedoch traten auch bei dieser Behandlung Infektionen auf (O'Gara and Humphreys, 2001). Zum anderen wird die Behandlung zusätzlich erschwert durch die Bestimmung der Resistenzspektren der planktonischen Zellen, die aufgrund der differentiellen Lebensweise der Zellen im Biofilm, nicht mit den Resistenzen des Biofilms übereinstimmen (Choong and Whitfield, 2000; Knobloch, 2005). Als Konsequenz muss in den meisten Fällen das Fremdmaterial für eine Ausheilung entfernt werden.

### **2.3 Molekulare Grundlagen der Biofilmbildung**

Weitreichende Biofilmforschung in vielen Organismen hat gezeigt, dass die Biofilmbildung einen mehrphasigen Prozess darstellt (Abbildung 2-1), der eine initiale Anheftung, eine Reifungsphase und das Ablösen der Bakterien aus dem Biofilm umfasst. Die Phasen unterscheiden sich physiologisch und benötigen verschiedene Faktoren. In der Ablösungsphase werden einzelne Zellen oder Zellaggregate aus dem Biofilm freigesetzt. Es wird angenommen, dass diese Phase entscheidend für die weitere Verbreitung der Bakterien ist.



**Abb. 2-1** Phasen der Biofilmbildung nach M. Otto 2008

Biofilme entstehen durch Anlagerung der Bakterien an eine Oberfläche. Diese Oberflächen können Gewebe aber auch abiotische Strukturen, nach Umhüllung dieser mit Matrixproteinen, darstellen. Die Anlagerung erfolgt unspezifisch direkt an die Polymeroberfläche oder über spezifische Proteininteraktionen. Anschließend wächst und reift der Biofilm. Dabei werden die Zellen hauptsächlich durch das extrazelluläre Polysaccharid PIA sowie durch Teichonsäuren und Proteine, wie das *accumulation associated protein* Aap, zusammengehalten. Schließlich kommt es zur Ablösung und Freisetzung von Zellen, die sich nun wieder weiter verbreiten können. Dabei spielen kleine Peptide sogenannte *phenol soluble modulins* (PSMs) eine wichtige Rolle (Otto, 2008).

### 2.3.1 Anheftung

Die Anheftung der Bakterien an den Fremdkörper ist ein komplexes Zusammenspiel von Bakterien-, Material- und Wirtsfaktoren. Die Beschaffenheit des Fremdmaterials scheint dabei von Bedeutung zu sein. Beispielsweise resultiert die Behandlung von Polyurethan mit Polyethylenoxid in einer verminderten Adhäsion, Kolonisation und Biofilmbildung (Patel *et al.*, 2007). Die Anheftung an abiotische Oberflächen ist abhängig von unspezifischen und physiochemischen Variablen, wie elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, van der Waals Kräfte, Oberflächenspannung, sterische Bedingungen und Temperatur (Dunne, Jr., 2002). Es konnten aber auch spezifische Wechselwirkungen mit den Oberflächenproteinen SSP-1 und SSP-2 gezeigt werden (Veenstra *et al.*, 1996). Außerdem scheint das Autolysin AtlE ebenfalls eine Rolle zu spielen, da es sowohl an konditionierten als auch an nicht-konditionierten Oberflächen aktiv ist (Heilmann *et al.*, 1997).

Schon kurz nach der Implantation des Fremdmaterials kommt es zu einer Überschichtung mit wirtseigener Matrix. Daher stellt sich die Frage, welche Bedeutung den oben geschilderten Interaktionen bei humanen Infektionen tatsächlich zukommt. Möglicherweise ist *in vivo* die spezifische Interaktion mit der

extrazellulären Matrix von entscheidenderer Bedeutung. Hierzu besitzt *S. epidermidis* zwölf sogenannte MSCRAMM Proteine (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (Gill *et al.*, 2005). Dabei handelt es sich um spezifische Bindeproteine, die Matrixproteine wie Fibrinogen und Fibronectin binden können (Patti and Hook, 1994; Patti *et al.*, 1994). Oftmals sind sie in der Lage verschiedene Proteine zu binden. Sie besitzen eine Binde- und eine Zellwanddomäne und einige werden kovalent durch Sortasen an das Peptidoglycan der Zellwand gebunden (Marraffini *et al.*, 2006). Tabelle 2-1 zeigt relevante Proteine, die mit der Matrix interagieren.

**Tab. 2-1** Ausgewählte Oberflächenproteine, die extrazelluläre Matrix binden

Protein	Matrixbestandteil	Referenz
AtlE	Vitronectin	Heilmann <i>et al.</i> , 1997
Aae	Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen	Heilmann <i>et al.</i> , 2003
Fbe (SdrG)	Fibrinogen	Nilsson <i>et al.</i> , 1998
SdrF, SdrH		McCrea <i>et al.</i> , 2000
Embp	Fibronectin	Williams <i>et al.</i> , 2002
GehD	Kollagen	Bowden <i>et al.</i> , 2002

Ferner wurde beschrieben, dass auch Teichonsäuren, Bestandteile der Zellwand, an immobilisiertes Fibronectin binden (Hussain *et al.*, 2001).

### 2.3.2 Akkumulation und Reifung

Die Akkumulation und Reifung des Biofilms ist charakterisiert durch interzelluläre Aggregation, die durch Exopolymere (Kohlenhydratstrukturen, aber auch Proteine) und durch strukturierende Kräfte innerhalb des Biofilms erreicht wird.

#### 2.3.2.1 Adhäsive Kräfte (Aggregation)

Die Produktion von Faktoren, die die interzelluläre Adhäsion vermitteln, führt zur Aggregation. Dazu zählt in erster Linie das extrazelluläre Polysaccharid PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) sowie die biofilmassoziierten Proteine Aap (*accumulation associated protein*) und Bhp (*Bap homologue protein*). PIA ist der Hauptbestandteil der extrazellulären Kohlenhydratmatrix von *S. epidermidis*, der essenziell für die Akkumulation der Bakterien ist (Mack *et al.*, 1992; Mack *et al.*, 1994; Ziebuhr *et al.*, 2006). PIA ist ein lineares  $\beta$ -1,6-verknüpftes Glukosaminglykan aus N-Acetylglukosaminresten. Das Molekül enthält ca. 15 % de-N-acetylierte

Aminogruppen und ist mit Succinat- und Phosphatresten substituiert. Das gesamte Molekül besitzt eine positive Ladung (Mack *et al.*, 1996a). Dadurch ist PIA in der Lage mit der negativ geladenen Zelloberfläche, bspw. benachbarten Polysaccharidsträngen, Zellwandbestandteilen wie Teichonsäuren oder Lektinen, zu interagieren. Synthetisiert wird PIA durch die Enzyme, die im *intercellular adhesin (ica)* Operon codiert werden (Mack *et al.*, 1994; Heilmann *et al.*, 1996; Mack *et al.*, 1996b). Das Operon besteht aus den vier Genen *icaADBC*. IcaA ist eine N-Acetylglukosaminyltransferase, die zur optimalen Aktivität IcaD benötigt (Gerke *et al.*, 1998). IcaB stellt die Deacetylase dar und IcaC ist ein Transmembranprotein und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Externalisierung, Elongation und Translokation des Polysaccharidstranges (Vuong *et al.*, 2004a).

Es wurde gezeigt, dass der *ica*-Lokus und die PIA-Expression wichtige Parameter für die Kolonisation von implantierten Kathetern im Tiermodell sind (Rupp *et al.*, 1999a; Rupp *et al.*, 1999b; Rupp *et al.*, 2001). In einem Modell, in dem Gewebekäfige mit Katheterstücken, die mit Wirtsproteinen bedeckt waren, implantiert wurden, führte die PIA-Expression jedoch zu einer geringeren Kolonisation (Fluckiger *et al.*, 2005). Diese Beobachtung gibt einen Hinweis darauf, dass *S. epidermidis* unterschiedliche Mechanismen der Biofilmbildung entwickelt hat.

In der Vergangenheit wurden *S. epidermidis* Isolate beschrieben, die einen biofilmpositiven Phänotyp aufwiesen, aber denen der *ica*-Lokus fehlte (Ninin *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2007). Es wurde ein alternativer Mechanismus der Biofilmbildung beschrieben, der eine extrazelluläre Matrix aus Proteinen besitzt (Hennig *et al.*, 2007). Aap ist in einigen Stämmen essenziell für die Entstehung eines Biofilms und entgegen früheren Annahmen konnte gezeigt werden, dass das Protein interzelluläre Adhäsion und einen PIA-unabhängigen Biofilm vermitteln kann (Rohde *et al.*, 2005). Aap ist ein Zellwandprotein, das auch in den Extrazellularraum sekretiert werden kann. Es besteht N-terminal aus 16 Aminosäure *repeats*, einer A-Region, einer B *repeat* Region, 19 prolinreichen *tandem repeats*, einer Sortase-Erkennungssequenz und einem positiv geladenen cytoplasmatischen Schwanz (Bowden *et al.*, 2005). In der B *repeat* Region kann die Anzahl der Wiederholungen variieren (Rohde *et al.*, 2004; Monk and Archer, 2007). Diese Region des Proteins enthält G5-Domänen, die N-Acetylglukosamin binden können (Bateman *et al.*, 2004) und damit die Verbindung zu PIA ermöglichen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Aap durch

Proteasen der Staphylokokken prozessiert werden muss, um die Bildung des Biofilms vermitteln zu können (Rohde *et al.*, 2005; Banner *et al.*, 2007). Ein weiteres Oberflächenprotein, Bap (*biofilm associated protein*) spielt eine Rolle im proteinvermittelten Biofilm und wurde bei Isolaten aus boviner Mastitis beschrieben (Cucarella *et al.*, 2004; Tormo *et al.*, 2005a). Ein Homolog von Bap tritt in humanen *S. epidermidis* Stämmen auf (Zhang *et al.*, 2003; Gill *et al.*, 2005), scheint aber bei humanen Infektionen keine entscheidende Rolle zu spielen (Rohde *et al.*, 2004; Hennig *et al.*, 2007).

### 2.3.2.2 Disruptive Kräfte (Biofilmstrukturierung)

Eine reife Biofilmstruktur enthält flüssigkeitsgefüllte Kanäle, die wahrscheinlich der Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie der Entfernung von metabolischem Abfall dienen (Habash and Reid, 1999). Möglicherweise trägt eine unterschiedliche PIA-Expression der Zellen im Biofilm zu dieser Strukturierung bei (Otto, 2008). Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, dass das *agr-Quorum sensing* System eine Schlüsselrolle bei der Ablösung und damit auch bei der Strukturierung der Biofilme einnimmt (Yarwood *et al.*, 2004; Vuong *et al.*, 2004b). Es kommt zur Expression einer Gruppe amphipatischer Peptide, den sogenannten *phenol soluble peptids* (PSMs). Diese lassen sich in zwei Klassen einteilen. Die  $\alpha$ -Gruppe hat eine Größe von etwa 20 Aminosäuren, wohingegen Peptide der  $\beta$ -Gruppe ca. eine Länge von 40-45 Aminosäuren aufweisen. In noch jungen Biofilmen kommt es zu einer Verschiebung zugunsten der  $\beta$ -Gruppe, die zu einem Ablösen von Zellclustern führt (Yao *et al.*, 2005) und wahrscheinlich Hohlräume in dem wachsenden Biofilm verursacht (Otto, 2008). PSMs sind oberflächenaktive Moleküle und wurden ursprünglich als proinflammatorische Peptide beschrieben, zu denen auch das  $\delta$ -Toxin, welches von der regulatorisch aktiven RNAIII kodiert wird, zählt (Mehlin *et al.*, 1999).  $\delta$ -Toxin hemmt hydrophobe Interaktionen zwischen Bakterien und verringert die Oberflächenspannung und führt damit zum Ablösen von Bakterien aus der Biofilmmatrix (Vuong *et al.*, 2003).

### 2.3.3 **Ablösung**

Kräfte, die zur Strukturierung des Biofilms genutzt werden, lassen sich kaum von den Mechanismen zur Ablösung von Zellen aus dem Biofilm trennen. Daher spielen die oben beschriebenen, durch das *agr*-System regulierten Faktoren, auch bei der Ablösung von Zellen aus dem Biofilm eine wichtige Rolle (Yarwood *et al.*, 2004;

Vuong *et al.*, 2004b). Es konnte gezeigt werden, dass Zellen in den oberen Schichten des Biofilms *agr* exprimieren und diese Zellen aus dem Biofilm freigesetzt werden. Weitere Faktoren, wie Wachstumsbedingungen, Scherkräfte oder ein Abbruch der Expression der biofilmbildenden extrazellulären Matrix können zur Herauslösung von Zellen aus dem Biofilm führen (Yarwood *et al.*, 2004; Otto, 2008).

## 2.4 Regulation der Biofilmbildung

Die Biofilmbildung ist eine komplexe Lebensweise, die zu großen Veränderungen in den Zellen führt. Daher wird dieser Prozess auch auf verschiedenen Ebenen und durch eine Vielzahl von Regulatoren gesteuert wird.

### 2.4.1 Umwelteinflüsse

Für eine große Anzahl an äußeren Bedingungen konnte ein Einfluss auf die Biofilmbildung gezeigt werden. So wird die Biofilmbildung bspw. durch Eisenmangel, Sauerstofflimitation und erhöhte Temperaturen gefördert (Deighton and Borland, 1993; Rachid *et al.*, 2000a; Rachid *et al.*, 2000b; Cramton *et al.*, 2001). Auch eine erhöhte Osmolarität und Glukosekonzentration im Wachstumsmedium induzieren die Biofilmbildung (Mack *et al.*, 1992; Rachid *et al.*, 2000b; Knobloch *et al.*, 2001; Fitzpatrick *et al.*, 2002; Dobinsky *et al.*, 2003). Des Weiteren kommt es zur Induktion der Biofilmbildung durch subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika, Desinfektionsmitteln und Ethanol (Rachid *et al.*, 2000c; Fitzpatrick *et al.*, 2002; Knobloch *et al.*, 2002b).

### 2.4.2 Regulation der Exopolysaccharidsynthese

Die meisten der oben beschriebenen Umwelteinflüsse wirken auf die Biofilmbildung durch Veränderungen der PIA-Expression. Es wurden einige Genorte gezeigt, deren Deletionen zu einer Erhöhung oder Abschaltung der PIA-Expression führten. Neben dem spezifischen Negativregulator IcaR, der die Transkription von *icaADBC* durch Bindung an die DNA reprimiert, gibt es noch weitere Regulatoren (Conlon *et al.*, 2002; Götz, 2002; Jefferson *et al.*, 2003). Der Verlust der globalen Regulatoren SarA bzw.  $\sigma^B$  wirkt sich negativ auf die Biofilmbildung aus (Knobloch *et al.*, 2001; Tormo *et al.*, 2005b), wohingegen die Deletion des *luxS* Gens, einem Bestandteil eines *Quorum sensing* Systems in Staphylokokken, zu einer gesteigerten Biofilmbildung führt (Xu *et al.*, 2006).

Durch Transposonmutagenese konnten, außer dem *icaADBC*-Lokus, noch drei weitere Genorte identifiziert werden, die ebenfalls zu einem biofilmmnegativen Phänotyp führten (Mack *et al.*, 2000; Knobloch *et al.*, 2003). Die *S. epidermidis* Mutante M15 trug die Tn917 Insertion in *rsbU*, dem Gen für den Positivregulator des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^B$  (Knobloch *et al.*, 2001). Durch Etablierung von Deletionsmutanten im  $\sigma^B$ -Operon konnte gezeigt werden, dass der Sigmafaktor die Transkription des Negativregulators IcaR reprimiert und damit die *icaADBC*-Transkription positiv beeinflusst (Knobloch *et al.*, 2004a). Jedoch kann diese Regulation durch Ethanol über einen noch unbekanntem Mechanismus aufgehoben werden und die Biofilmbildung wieder induziert werden. Dies spricht für zwei unabhängige Regulationswege, welche die PIA-Synthese beeinflussen.

*S. epidermidis* M12 trägt die Transposoninsertion in einem Homolog zu *purR* aus *S. aureus*, *Bacillus subtilis* und *Lactococcus lactis* (Knobloch *et al.*, 2003). PurR besitzt negativ-regulatorische Aktivität in der Purinsynthese in *B. subtilis* (Weng *et al.*, 1995; Weng and Zalkin, 2000) und wirkt positiv in *L. lactis* (Kilstrup and Martinussen, 1998). Eine direkte Wirkung von PurR auf *icaADBC* oder *icaR* ist unwahrscheinlich, da die Gene nicht über ein Bindemotif des Regulators verfügen. Vor der Insertionsstelle des Transposons befindet sich jedoch ein putativer  $\sigma^B$ -abhängiger Promotor und möglicherweise resultiert der biofilmmnegative Phänotyp aus dem Verlust der strangabwärts gelegenen Gene *barA* und *barB* (Knobloch *et al.*, 2003; Knobloch *et al.*, 2004b; Mack *et al.*, 2007). Dieser Fragestellung sollte in der vorliegenden Arbeit weiter nachgegangen werden.

Ein weiterer Positivregulator der PIA-Synthese wurde in der Mutante M17 inaktiviert. Das Transposon zerstört einen offenen Leserahmen unbekannter Funktion und der biofilmpositive Phänotyp kann durch Zugabe von N-Acetylglukosamin zum Wachstumsmedium wieder hergestellt werden (Rohde *et al.*, 2001; Knobloch *et al.*, 2003).

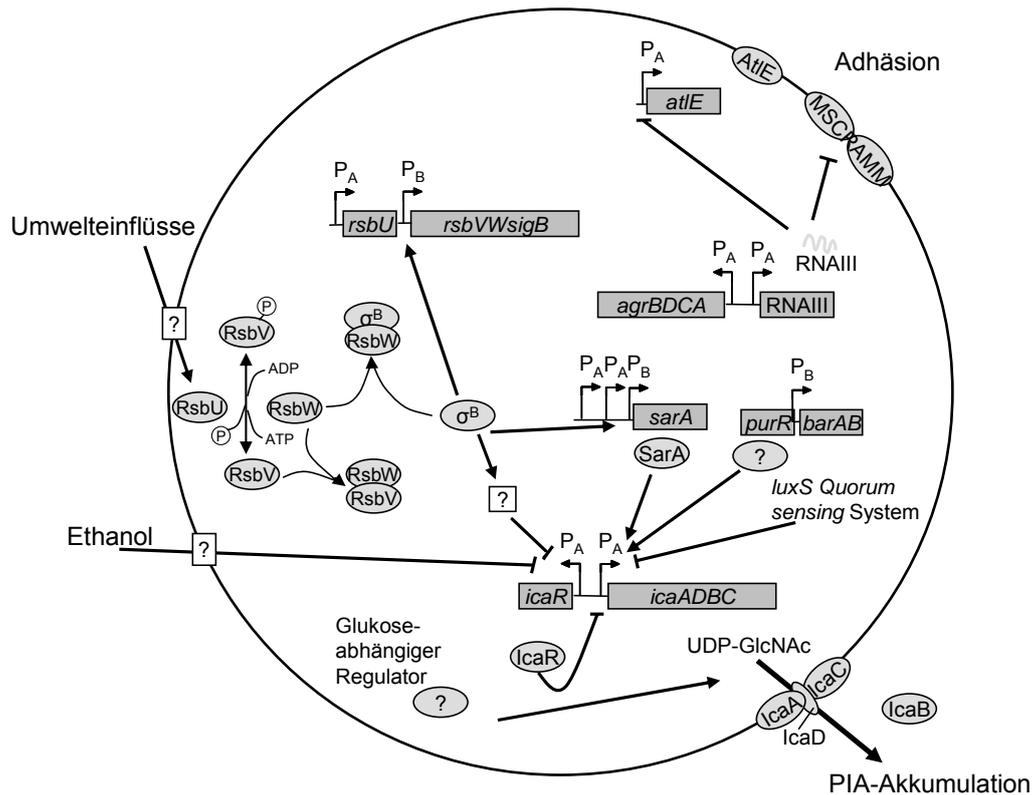
Bei SarA handelt es sich um einen Positivregulator der PIA-Synthese, der unabhängig von IcaR, durch Bindung an den Promotorbereich von *icaADBC* dessen Transkription beeinflusst (Tormo *et al.*, 2005b). *SarA* selbst besitzt drei Promotoren, von denen einer  $\sigma^B$ -abhängig transkribiert wird (Fluckiger *et al.*, 1998). Überraschenderweise scheinen jedoch die Mechanismen in denen SarA und  $\sigma^B$  auf die Biofilmbildung wirken unterschiedlich zu sein, da  $\sigma^B$ , wie schon beschrieben, über ein unbekanntes Intermediat die *icaR* Transkription reprimiert (Knobloch *et al.*,

2004e). Die unterschiedliche Regulation wird weiter verdeutlicht durch die Beobachtung, dass die *icaADBC* Transkription in einer *sarA* Mutante, welche durch Intergration eines Insertionselements (IS256) generiert wurde, unter bestimmten Umweltbedingungen das Wildtypniveau erreicht, aber trotzdem kein PIA synthetisiert (Conlon *et al.*, 2004). Dies deutet auf einen weiteren SarA-abhängigen Regulationsweg hin, der auf posttranskriptioneller Ebene erfolgen muss.

Erst kürzlich wurde SarZ als wichtiger Transkriptionsregulator der Biofilmbildung in *S. epidermidis* 1457 beschrieben. Wang *et al.* haben gezeigt, dass SarZ sowohl die primäre Anheftung als auch die PIA Produktion reguliert. Untersuchungen der Genexpression ergaben, dass SarZ zu einer erheblichen Induktion aller Gene des *ica* Operons führte (Wang *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte eine verstärkte Expression der extrazellulären Proteasen von *S. epidermidis* gezeigt werden (Wang *et al.*, 2008). Weiterhin zeigen *sarZ* Mutanten von *S. epidermidis* und *S. aureus* eine reduzierte Virulenz in verschiedenen Modellen Biofilm-assoziiierter Infektionen (Kaito *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

Eines der beiden *Quorum sensing* Systeme in *S. epidermidis*, das LuxS-System, wirkt der PIA-Synthese entgegen (Xu *et al.*, 2006). LuxS ist verantwortlich für die Synthese des AI-2 (*autoinducer 2*), der der Kommunikation innerhalb der eigenen Spezies dient (Surette *et al.*, 1999; Winans, 2002). Die Deletion des Gens resultiert in einer verstärkten Transkription des *icaADBC*-Lokus und schließlich in einer verstärkten Biofilmbildung (Xu *et al.*, 2006).

Durch die intensive Forschung über die Regulation der PIA-Synthese und des *ica* Operons, wird immer deutlicher, dass dies ein komplexes Netzwerk darstellt (Abbildung 2-2). Ein besseres Verständnis der Mechanismen der Biofilmbildung wird zur Entwicklung von Methoden führen, die der Bekämpfung biofilmassoziiierter Infektionen dienen werden.



**Abb. 2-2** Modell der Biofilmregulation in *S. epidermidis* (Mack *et al.*, 2006)

PIA wird durch die Proteine IcaA, IcaD, IcaB und IcaC synthetisiert, die in einem gemeinsamen Operon codiert werden. Divergent zu dem Operon wird dessen spezifischer Repressor IcaR codiert. Die Transkription von *icaR* wird negativ durch  $\sigma^B$  über ein unbekanntes Intermediat und Ethanolstimulation reguliert. Die Aktivität des Sigmafaktors wird durch eine regulatorische Kaskade aus Antisigmfaktor RsbW, Anti-Antisigmfaktor RsbV und der RsbV-spezifischen Phosphatase RsbU reguliert. Transkription von *icaADBC* wird, außer durch IcaR, durch weitere Genprodukte beeinflusst. SarA und PurR (oder BarA und BarB) üben einen positiven Effekt auf die PIA-Synthese aus. Wohingegen das *luxS Quorum sensing* System reprimierend auf die *icaADBC* Transkription wirkt. Neben der transkriptionellen Regulation von *icaADBC* wird die PIA-Synthese durch ein Glukose-abhängiges regulatorisches Protein positiv beeinflusst. Die primäre Adhäsion (AtIE, MSCRAMM) wird negativ durch das *agr Quorum sensing* System reguliert (2.4.3). Gene sind in Rechtecken dargestellt und Proteine in Ovalen.

### 2.4.3 Regulationen durch das *agr*-System

Das *agr*-System (*accessory gene regulator*) stellt das zweite in Staphylokokken beschriebene *Quorum sensing* System dar (Novick, 2003). Das System besteht aus vier Genen (*agrA*, *agrC*, *agrD* und *agrB*), die kotranskribiert werden, und dem Effektormolekül RNAIII, welches auch für das  $\delta$ -Toxin kodiert (Peng *et al.*, 1988; Novick, 2003). *AgrD* kodiert für das *autoinducing peptide* (AIP), welches von AgrB proteolytisch prozessiert und exportiert wird. Für die Aktivität von AIP ist die Thiolaktonringstruktur essenziell. AIP bindet an den membrangebundenen Rezeptor ArgC des AgrC/AgrA Zwei-Komponenten-Systems. Wird ein Schwellenwert der AIP-Konzentration erreicht, kommt es zur Phosphorylierung des *response* Regulators

AgrA durch die Sensorkinase AgrC. Phosphoryliertes AgrA aktiviert zusammen mit SarA die zwei *agr* Promotoren P2 und P3, die zur Induktion bzw. Autoinduktion des *agr*-Systems und zur Synthese von RNAlII führen. Diese reguliert daraufhin die Transkription von weiteren Zielgenen direkt und über zusätzliche intrazelluläre Regulatoren, wie bspw. das Zweikomponentensystem *saeRS* (Novick, 2003).

Das System wird beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase aktiviert. Hier kommt es zu einer Herabregulation von Oberflächenproteinen und einer Induktion von Virulenzfaktoren (Vuong *et al.*, 2000). In *S. aureus* wurde gezeigt, dass homologe AIPs zu einer Induktion führen, wohingegen heterologe Peptide das System reprimieren (Ji *et al.*, 1997). Das *agr*-System reguliert zum großen Teil die Expression von extrazellulären Lipasen und Proteasen, wozu auch die Serinprotease (SE1543), die Cysteinprotease (SE0184) und die Metalloprotease (SE2219) zählen (Vuong *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2006; Batzilla *et al.*, 2006).

Es wurde gezeigt, dass es in der stationären Phase von in Biofilmen lebenden *S. epidermidis* Zellen zu einer geringeren Expression von *agr* kommt, verglichen zu planktonisch lebenden Zellen (Yao *et al.*, 2005). Die *agr* Deletion in *S. epidermidis* führte zu einer signifikant stärkeren Biofilmbildung verglichen zum Wildtyp (Vuong *et al.*, 2003). Die Zellen adhärten wesentlich besser an Polystyren und humane Epithelzellen (Vuong *et al.*, 2003; Vuong *et al.*, 2004b). AtlE, ein wichtiges Protein zur primären Anheftung der Zellen, wurde in den frühen Wachstumsphasen durch die *agr* Deletion klar induziert und akkumuliert, was die bessere Anheftung erklärt (Vuong *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2006; Batzilla *et al.*, 2006; Mack *et al.*, 2007). Weiterhin wurde beobachtet, dass die Biofilme der *agr* Deletionsstämme dicker waren als die des Wildtyps (Vuong *et al.*, 2004b). Dies weist auf eine Beteiligung von Faktoren hin, die in die Akkumulation des Biofilms involviert sind oder auf eine geringere Ablösung der Zellen aus dem Biofilm. Messungen von *icaADBC*, PIA und Aap zeigten allerdings keine signifikanten Veränderungen (Vuong *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2006; Batzilla *et al.*, 2006). Zur Aktivierung benötigt Aap Proteaseaktivität, wird aber bei sehr hoher proteolytischer Aktivität auch schnell abgebaut (Rohde *et al.*, 2005). Die Repression von Proteasen durch die *agr* Deletion könnte somit zu der verstärkten Akkumulation indirekt beitragen (Hussain *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2005).

Darüber hinaus reguliert das *agr*-System die Expression der PSMs und spielt auch dadurch bei der Strukturierung des Biofilm und der Ablösung von Zellen aus dem Biofilm eine entscheidene Rolle (2.3.2.2 und 2.3.3).

## 2.5 Physiologie der Biofilme

Mittlerweile gibt es drei Genomanalysen, die das Transkriptionsmuster von Staphylokokken im Biofilm darstellen. Davon wurden zwei in *S. aureus* und eine in *S. epidermidis* durchgeführt (Beenken *et al.*, 2004; Resch *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2005). Weiterhin wurden diese Studien durch eine Proteomanalyse bestätigt, allerdings arbeiteten Resch *et al.* sowohl in der Transkriptions- als auch in der Proteomanalyse mit einer natürlichen *agr* Mutante (Resch *et al.*, 2006). Übereinstimmend lässt sich sagen, dass die Zellen im Biofilm Prozesse aktiver Zellen herunterregulieren, wie Protein-, DNA- und Zellwandbiosynthese. Wohingegen Fermentationsprozesse, aufgrund der niedrigen Sauerstoffkonzentrationen im Biofilm, induziert werden. Die Induktion von Urease- und Arginindeiminase-Stoffwechselwegen führt zur Produktion von Ammonium, welches aus der Zelle in das umgebende Medium sezerniert wird. Dies wurde als Gegenregulation zu den niedrigen pH-Werten des Mediums, die durch fermentative Stoffwechselprodukte entstehen, erklärt (Beenken *et al.*, 2004). Alle Untersuchungen zeigten, dass sich Zellen im Biofilm stark von stationär wachsenden, planktonischen Zellen unterscheiden.

Darüber hinaus konnte ein Einfluss des Citratzyklus auf die Biofilmbildung gezeigt werden. Eine Hemmung des Citratzyklus führt zu einer Verschiebung von Kohlenstoffintermediaten hin zur Synthese von PIA (Vuong *et al.*, 2005). PIA wird aus mit UDP aktiviertem N-Acetylglukosamin synthetisiert (Gerke *et al.*, 1998), welches über mehrere Schritte aus Fruktose-6-Phosphat hergestellt wird. Fruktose-6-Phosphat ist ein Intermediat, welches aus Glukose in der Glykolyse entsteht und durch eine verminderte Aktivität des Citratzyklus akkumuliert und so vermehrt zur Synthese von PIA bereitsteht.

## 2.6 Resistenz gegenüber Antibiotika und der Wirtsabwehr

*S. epidermidis* Infektionen in Zusammenhang mit Biofilmen auf implantierten medizinischen Fremdkörpern sind schon lange bekannt (Peters *et al.*, 1981; Marrie *et al.*, 1982). Trotzdem steht die Medizin noch heute vor großen Problemen in der Therapie derartiger Infektionen (Götz and Peters, 2000). Es scheint, dass Zellen im

Biofilm resistenter gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika sind als planktonisch lebende Zellen (Costerton *et al.*, 1999). In der Literatur finden sich Studien über verschiedene Faktoren, die hieran beteiligt sein könnten. Dazu gehört, dass die Wirkstoffe nicht ihre Ziele erreichen, sei es durch verminderte Diffusion, blockierende Oberflächenmoleküle oder aktive Ausschleusung, aber auch die Expression spezifischer Resistenzfaktoren wird diskutiert (Yao *et al.*, 2005; de Araujo *et al.*, 2006; Saginur *et al.*, 2006; McCann *et al.*, 2008). In den meisten Studien wurde das Überleben der Zellen in einem etablierten Biofilm gemessen und nicht deren Wachstum. Vergleicht man dies zu exponentiell wachsenden planktonischen Zellen, ergibt sich schon aus dem aktiveren Metabolismus dieser Zellen eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber diversen Antibiotika, da die Targets antimikrobieller Substanzen aktive zelluläre Prozesse darstellen. Tatsächlich konnte aber gezeigt werden, dass Antibiotika, wie Fluorochinolone sehr gut durch die Kohlenhydratmatrix von Biofilmen Gram-negativer Bakterien diffundieren können (Shigeta *et al.*, 1997; Vransy *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 1998; Anderl *et al.*, 2000; Stewart and Costerton, 2001; Ehrlich *et al.*, 2004). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der Zellen im Biofilm durch klinisch erreichbare Konzentrationen der Antibiotika getötet werden kann (Brooun *et al.*, 2000). Durch diese Beobachtung stellte sich die Frage, warum es trotzdem sehr häufig zu Reinfektionen durch die Biofilmbildner nach Antibiotikabehandlung kommt.

In jeder Bakterienpopulation gibt es eine geringe Anzahl an sogenannten Persistern, deren Anteil von der Wachstumsphase der Bakterien abhängig ist (Bigger, 1944; Keren *et al.*, 2004). Persister weisen eine *multi drug tolerance* unabhängig vom Antibiotikum auf (Lewis, 2001). Bei diesen Zellen handelt es sich nicht um Mutanten oder Zellen, die sich in einem bestimmten Zellzyklus befinden. Vermutlich kommt es durch die Aktivität der Toxine, aus verschiedenen Toxin-Antitoxin-Systemen der Bakterien, in diesen Zellen zu einem fast vollständigen Stillstand der Translation und damit aller zellulären Prozesse (Lewis, 2005; Lewis, 2008). Da aber die Persister wieder in der Lage sind neue Populationen zu bilden, muss zumindest das Antitoxin noch gebildet werden, um die Wirkung des Toxins neutralisieren zu können (Pedersen *et al.*, 2002). Die Dormanz dieser Zellen führt somit zu einer Toleranz gegenüber antimikrobiellen Substanzen durch ein Abschalten der Targets.

Auch in *S. epidermidis* wurde das Vorkommen von Persistern beschrieben und gezeigt, dass nur eine kleine Subpopulation, sowohl biofilmpositiver Stämme als

auch deren biofilmmnegativer Mutanten, eine gewisse Toleranz gegenüber den getesteten Antibiotika aufwiesen (Knobloch *et al.*, 2002a; Knobloch *et al.*, 2008).

In einer Infektion mit planktonischen Zellen werden die Persister effizient vom Immunsystem erkannt und beseitigt. Für Zellen, die in einer Biofilmmatrix eingebettet sind, ist bekannt, dass sie vor dem Angriff durch das Immunsystem geschützt sind (Zimmerli *et al.*, 1984; Vaudaux *et al.*, 1985; Hoyle *et al.*, 1990; von Eiff *et al.*, 1999). Im Einzelnen wurde gezeigt, dass PIA die Zellen vor kationischen und anionischen antimikrobiellen Peptiden (AMPs) des angeborenen Immunsystems schützt (Vuong *et al.*, 2004b). Auch das Exopolymer Poly- $\gamma$ -Glutaminsäure (PGA), welches im Biofilm hochreguliert wird, trägt zur Resistenz gegenüber AMPs bei (Kocianova *et al.*, 2005). Letztlich schützen PIA und PGA die Bakterien auch vor der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten (Vuong *et al.*, 2004a; Kocianova *et al.*, 2005). Durch diese Mechanismen ist es den Persistern eines Biofilms möglich nach der Antibiotikatherapie wieder neue Populationen zu bilden und eine Reinfektion hervorzurufen.

### 3 Ableitung der Fragestellung

Trotz intensiver Forschungsarbeit auf dem Gebiet der Biofilmbildung von *S. epidermidis* bleiben immer noch viele Fragen zur Regulation dieser Lebensweise offen. Durch Transposonmutagenese wurden drei *icaADBC*-unabhängige Genorte identifiziert, die zum Verlust der PIA-Synthese führten. Für Mutanten der Klasse III (M15) konnte gezeigt werden, dass das Transposon in das Gen des Positivregulators des  $\sigma^B$ -Operons, *RsbU*, inserierte. Nähere Untersuchungen von Deletionmutanten des Operons ergaben, dass der Verlust der Aktivität des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^B$  verantwortlich ist für den biofilmm negativen Phänotyp der Mutante. Es kommt zu einer Induktion der *icaR*-Expression, die dann zur Reprimierung der *icaADBC* Transkription führt. Diese Regulation wird allerdings durch subinhibitorische Konzentrationen von Ethanol aufgehoben und führt wieder zu einem biofilmpositiven Phänotyp. Da  $\sigma^B$  als Sigmafaktor nur Gene induzieren, aber nicht reprimieren kann, stellt sich die Frage welches Intermediat diese Regulation bewerkstelligt.

Die Transposonmutante M12 trägt *Tn917* in einem Homolog zu *purR* von *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* und *Lactococcus lactis* direkt strangabwärts einer putativen  $\sigma^B$ -abhängigen Promotorsequenz. Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von D. Mack zeigten, dass es zum Verlust von zwei Transkripten in M12 kam, von denen eines anscheinend von diesem Promotor abgelesen wurde. Die beiden Gene, die von diesem Transkript kodiert wurden, sind Homologe zu *yabJ* und *spoVG* aus *B. subtilis* und *S. aureus*. Durch die Expression der beiden Gene *in trans* unter ihrem nativen Promotor konnte die Biofilmbildung wieder etabliert werden. Demnach wurden die Gene als *biofilm associated regulators A* und *B (barAB)* bezeichnet. Durch Generierung von Deletionsmutanten der einzelnen Gene des *purR*-Lokus sollte die Bedeutung der Genprodukte genauer untersucht werden. Außerdem sollte geklärt werden, ob die Genprodukte als Intermediate in der Regulation durch  $\sigma^B$  dienen.

Um die Regulons der Regulatoren  $\sigma^B$ , *BarAB* und es *agr*-Systems näher zu charakterisieren und mögliche Wirkungswege in Zusammenhang mit der Pathogenität von *S. epidermidis* zu klären, sollte die Proteinexpression der Mutanten global untersucht werden.

Das Verständnis über Funktion und Regulation der verschiedenen Genprodukte und deren mögliche Netzwerke in *S. epidermidis* stellt eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapiestrategien dar.

## 4 Material

### 4.1 Bakterienstämme

**Tab. 4-1** In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

	relevante Charakteristika	Referenz
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
1457	ZVK-Isolat, stark biofilmpositiv	Mack <i>et al.</i> , 1992
8400	Blutkulturisolat	Mack <i>et al.</i> , 1992
1057	ZVK-Isolat	Mack <i>et al.</i> , 1996b
1457-M10	<i>icaA</i> -Tn917 -Mutante, biofilm-negativ	Mack <i>et al.</i> , 1994
1457-M12	<i>purR</i> -Tn917 -Mutante, biofilm-negativ	Mack <i>et al.</i> , 1994
1457-M15	<i>rsbU</i> -Tn917 -Mutante, biofilm-reduziert	Mack <i>et al.</i> , 1994
1457 <i>rsbU</i>	<i>rsbU</i> ::erm, Biofilm-reduziert	Knobloch <i>et al.</i> , 2004a
1457 <i>sigB</i>	<i>sigB</i> ::erm, Biofilm-reduziert	Knobloch <i>et al.</i> , 2004a
1457 <i>agr</i>	<i>agr</i> ::spec, verstärkt biofilmpositiv	Vuong <i>et al.</i> , 2003
1457 <i>sigBagr</i>	<i>agr</i> ::spec <i>sigB</i> ::erm, Biofilm-reduziert	Schewe, unpubliziert
1457 <i>ispE</i>	<i>ispE</i> ::erm, biofilmpositiv	diese Arbeit
1457 <i>purR</i>	<i>purR</i> ::erm, biofilmpositiv	diese Arbeit
1457 <i>barA</i>	<i>barA</i> ::erm, Biofilm-reduziert	diese Arbeit
1457 <i>barB</i>	<i>barB</i> ::erm, biofilmnegativ	diese Arbeit
1457 <i>barAB</i>	<i>barAB</i> ::erm, biofilmnegativ	diese Arbeit
1457 <i>ispEpurRbarAB</i>	<i>ispEpurRbarAB</i> ::erm, biofilm-negativ	diese Arbeit
1057 <i>sigB</i>	<i>sigB</i> ::erm, Biofilm-reduziert	Schewe, unpubliziert
1057 <i>agr</i>	<i>agr</i> ::spec, verstärkt biofilmpositiv	Schewe, unpubliziert
1057 <i>sigBagr</i>	<i>agr</i> ::spec <i>sigB</i> ::erm, Biofilm-reduziert	Schewe, unpubliziert
8400 <i>sigB</i>	<i>sigB</i> ::erm, Biofilm-reduziert	Jäger, 2006
8400 <i>agr</i>	<i>agr</i> ::spec, verstärkt biofilmpositiv	Jäger, 2006
8400 <i>sigBagr</i>	<i>agr</i> ::spec <i>sigB</i> ::erm, Biofilm-reduziert	Jäger, 2006
8400 <i>barA</i>	<i>barA</i> ::erm, Biofilm-reduziert	diese Arbeit

*Staphylococcus aureus*

RN4220	NCTC8325-4 r <sup>-</sup> m <sup>+</sup> <i>rsbU</i>	Kreiswirth <i>et al.</i> , 1983
--------	--	------------------------------------

*Escherichia coli*

TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
Mach1	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>hsdR</i> Δ <i>recA1398</i> <i>endA1</i> <i>tonA</i>	Invitrogen
DH5α	F <sup>-</sup> <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> ) <i>hsdR17</i> λ <sup>-</sup> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Hanahan, 1985
BL21 A1	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>araB::T7RNAP-tetA</i>	Invitrogen
DB3.1	F <sup>-</sup> <i>gyrA462</i> <i>endA1</i> Δ( <i>sr1-recA</i> ) <i>mcrB</i> <i>mrr</i> <i>hsdS20</i> <i>supE44</i> <i>ara-14</i> <i>galK2</i> <i>lacY1</i> <i>proA2</i> <i>rpsL20</i> (sm <sup>R</sup> ) <i>xyl-5</i> λ- <i>leu</i> <i>mtl1</i>	Invitrogen

## 4.2 Plasmide

Tab. 4-2 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

	relevante Charakteristika	Referenz
pDONR 221	Gateway-Donorvektor; Kan <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> <i>ccdB</i> <i>attP1</i> <i>attP2</i>	Invitrogen
pDONR P4-P1R	Gateway-Donorvektor; Kan <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> <i>ccdB</i> <i>attP4</i> <i>attP1R</i>	Invitrogen
pDONR P2R-P3	Gateway-Donorvektor; Kan <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> <i>ccdB</i> <i>attP2R</i> <i>attP3</i>	Invitrogen
pDEST R4-R3	Gateway-Destinationsvektor; Amp <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> <i>ccdB</i> <i>attR4</i> <i>attR3</i>	Invitrogen
pDEST 17	Gateway-Destinationsvektor; Amp <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> T7 6xHis tag <i>ccdB</i> <i>attR1</i> <i>attR2</i>	Invitrogen
pDEST 15	Gateway-Destinationsvektor; Amp <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> T7 GST tag <i>ccdB</i> <i>attR1</i> <i>attR2</i>	Invitrogen
pBT2	Temperatur-sensitiver <i>shuttle</i> -Vektor aus pRB-Serie; Amp <sup>r</sup> in <i>E. coli</i> ; Cm <sup>r</sup> in Staphylokokken	Brückner, 1997
pTS1lac dest	Temperatur-sensitiver <i>shuttle</i> -Vektor, Destinationsvektor <i>attR4</i> <i>attR3</i> , Amp <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	Perehinec <i>et al.</i> , 2007
pENTRYfrag1	Klonierungsvektor mit Sequenz zw. den Koordinaten 2364577 – 2364074 (AE015929.1); Kan <sup>r</sup>	diese Arbeit
pENTRYfrag2	Klonierungsvektor mit Sequenz zw. den Koordinaten 2363376 – 2362907	diese Arbeit

	(AE015929.1); Kan <sup>r</sup>	
pENTRYfrag3	Klonierungsvektor mit Sequenz zw. den Koordinaten 2363804 – 2363249 (AE015929.1); Kan <sup>r</sup>	diese Arbeit
pENTRYfrag4	Klonierungsvektor mit Sequenz zw. den Koordinaten 2362523 – 2361945 (AE015929.1); Kan <sup>r</sup>	diese Arbeit
pENTRYfrag5	Klonierungsvektor mit Sequenz zw. den Koordinaten 2362906 – 2362372 (AE015929.1); Kan <sup>r</sup>	diese Arbeit
pENTRYfrag6	Klonierungsvektor mit Sequenz zw. den Koordinaten 2362139 – 2361785 (AE015929.1); Kan <sup>r</sup>	diese Arbeit
pENTRYfrag7	Klonierungsvektor mit Sequenz zw. den Koordinaten 2362523 – 2361945 (AE015929.1); Kan <sup>r</sup>	diese Arbeit
pENTRYfrag8	Klonierungsvektor mit Sequenz zw. den Koordinaten 2361742 – 2361251 (AE015929.1); Kan <sup>r</sup>	diese Arbeit
pENTRYerm	Klonierungsvektor mit <i>ermB</i> -Fragment aus Tn917; Kan <sup>r</sup>	diese Arbeit
pENTRYbarA	Klonierungsvektor mit <i>barA</i> -Gen; Kan <sup>r</sup>	diese Arbeit
pENTRYbarB	Klonierungsvektor mit <i>barB</i> -Gen; Kan <sup>r</sup>	diese Arbeit
pENTRYrsbU	Klonierungsvektor mit <i>rsbU</i> -Gen; Kan <sup>r</sup>	diese Arbeit
pENTRYsigB	Klonierungsvektor mit <i>sigB</i> -Gen; Kan <sup>r</sup>	diese Arbeit
pCOLIispE	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Fragmente zur Deletion von <i>ispE</i> , Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pCOLIpurR	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Fragmente zur Deletion von <i>purR</i> , Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pCOLIbarA	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Fragmente zur Deletion von <i>barA</i> , Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pCOLIbarB	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Fragmente zur Deletion von <i>barB</i> , Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pCOLIispEpurR	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Fragmente zur Deletion von <i>ispE</i> und <i>purR</i> , Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pCOLIbarAB	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Fragmente zur Deletion von <i>barA</i> und <i>barB</i> , Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pCOLIispEpurRbarAB	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Fragmente zur Deletion von <i>ispE</i> , <i>purR</i> , <i>barA</i> und <i>barB</i> , Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pTS1ispE	Deletionsvektor für <i>ispE</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von <i>ispE</i>	diese Arbeit
pTS1purR	Deletionsvektor für <i>purR</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von <i>purR</i>	diese Arbeit

pTS1 <i>barA</i>	Deletionsvektor für <i>barA</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von <i>barA</i>	diese Arbeit
pTS1 <i>barB</i>	Deletionsvektor für <i>barB</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von <i>barB</i>	diese Arbeit
pTS1 <i>ispEpurR</i>	Deletionsvektor für <i>ispE</i> und <i>purR</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> von <i>ispE</i> und <i>downstream</i> von <i>purR</i>	diese Arbeit
pTS1 <i>barAB</i>	Deletionsvektor für <i>barA</i> und <i>barB</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> von <i>barA</i> und <i>downstream</i> von <i>barB</i>	diese Arbeit
pTS1 <i>ispEpurRbarAB</i>	Deletionsvektor für <i>ispE</i> , <i>purR</i> , und <i>barAB</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von <i>ispE</i>	diese Arbeit
pBT2 <i>ispE</i>	Deletionsvektor für <i>ispE</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von <i>ispE</i>	diese Arbeit
pBT2 <i>purR</i>	Deletionsvektor für <i>purR</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von <i>purR</i>	diese Arbeit
pBT2 <i>barA</i>	Deletionsvektor für <i>barA</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von <i>barA</i>	diese Arbeit
pBT2 <i>barB</i>	Deletionsvektor für <i>barB</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von <i>barB</i>	diese Arbeit
pBT2 <i>ispEpurR</i>	Deletionsvektor für <i>ispE</i> und <i>purR</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> von <i>ispE</i> und <i>downstream</i> von <i>purR</i>	diese Arbeit
pBT2 <i>barAB</i>	Deletionsvektor für <i>barA</i> und <i>barB</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> von <i>barA</i> und <i>downstream</i> von <i>barB</i>	diese Arbeit
pBT2 <i>ispEpurRbarAB</i>	Deletionsvektor für <i>ispE</i> , <i>purR</i> , und <i>barAB</i> ; <i>ermB</i> -Fragment flankiert von Fragmenten <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von <i>ispE</i>	diese Arbeit
pEXPR <i>barA</i>	Expressionsvektor für BarA mit His-tag, T7, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pEXPR <i>barB</i>	Expressionsvektor für BarB mit His-tag, T7, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pEXPR <i>barA</i> -GST	Expressionsvektor für BarA mit GST-tag, T7, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pEXPR <i>barB</i> -GST	Expressionsvektor für BarB mit GST-tag, T7, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit

pEXPR <i>rsbU</i>	Expressionsvektor für RsbU mit His-tag, T7, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pEXPR <i>sigB</i>	Expressionsvektor für SigB mit His-tag, T7, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit

### 4.3 Antibiotika

**Tab. 4-3** In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Bezeichnung	Lösungsmittel	Selektionskonzentration
Kanamycin	A. dest	70 µg/ml <i>E. coli</i>
Ampicillin	A. dest	100 µg/ml <i>E. coli</i>
Erythromycin	100% Methanol	50 µg/ml Staphylokokken
Chloramphenicol	50% Methanol	10 µg/ml Staphylokokken

### 4.4 Oligonukleotide

**Tab. 4-4** In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
5' Kartierung	
frag5. <i>barA</i> .rv	ACCTGATGTAAAGACAAAACC
<i>barA</i> .pe.rv	GGTTGTACTCGTCGACATC
Klonierungen zu den Deletionsmutanten	
frag1.attB4.fw	<u>GGGGACAAC</u> TTTGTATAGAAAAGTTGGCAGTTGCACAC TAACAAAAAC
frag1.attB1.rv	<u>GGGGACTGC</u> TTTTTTGTACAAACTTGTTGTCATCACCA TTTCAATTTC
frag2.attB2.fw	<u>GGGGACAGC</u> TTTCTTGTACAAAGTGGTAATGCAGTGAA TGGTTGTTG
frag2.attB3.rv	<u>GGGGACAAC</u> TTTGTATAATAAAGTTGACAGCATCAAGT TCTTCGTTC
frag3.attB4.fw	<u>GGGGACAAC</u> TTTGTATAGAAAAGTTGGACGCTTTAGCT GCATTAGG
frag3.attB1.rv	<u>GGGGACTGC</u> TTTTTTGTACAAACTTGGGGTGGTTCATG AGGTATTG
frag4.attB2.fw	<u>GGGGACAGC</u> TTTCTTGTACAAAGTGGTTAAAGTGGAAC CAGGCAAA
frag4.attB3.rv	<u>GGGGACAAC</u> TTTGTATAATAAAGTTGCTAGCGTAATGG AAACGAGTG
frag5.attB4.fw	<u>GGGGACAAC</u> TTTGTATAGAAAAGTTGTGTTACCATAGC GACTAAAGGG
frag5.attB1.rv	<u>GGGGACTGC</u> TTTTTTGTACAAACTTGACCTGATGTAAA GACAAAACCG

frag6.attB2.fw	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGGTTGCCTAAAG</u> ACGTAAAGG
frag6.attB3.rv	<u>GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTACTTTCATCAC</u> TGCATCTTGG
frag7.attB4.fw	<u>GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTTAAAGTGGAAC</u> CAGGCAAC
frag7.attB1.rv	<u>GGGGACTGCTTTTTTTTGACAAACTTGCTAGCGTAATGG</u> AAACGAGTG
frag8.attB2.fw	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCAGATAACGAA</u> GAATCAGACG
frag8.attB3.rv	<u>GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGAAAACGAGGTC</u> ATCAAACC
ermR2.attB1.fw	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGACGGTGAC</u> ATCTCTCTATTG
ermL1.attB2.rv	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAAAAGGTA</u> CCATAAACGGTCG
frag1.PstI.fw	ATGGTACT <b>GCAGG</b> CAGTTGCACACTAACAAAAAC
frag2.BamHI.rv	ATGGTAG <b>GATCC</b> ACAGCATCAAGTTCTTCGTTC
frag3.PstI.fw	ATGGTACT <b>GCAGG</b> ACGCTTTAGCTGCATTAGG
frag4.BamHI.rv	ATGGTAG <b>GATCC</b> CTAGCGTAATGGAAACGAGTG
frag5.PstI.fw	ATGGTACT <b>GCAGT</b> GTTACCATAGCGACTAAAGGG
frag6.BamHI.rv	ATGGTAG <b>GATCC</b> TACTTTCATCACTGCATCTTGG
frag7.PstI.fw	ATGGTACT <b>GCAGT</b> TAAAGTGGAACCAGGCAAC
frag8.BamHI.rv	ATGGTAG <b>GATCC</b> GAAAACGAGGTCATCAAACC

## Klonierung der Expressionsplasmide

barA.attB1.fw	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAATTCATCA</u> TGAAAATAATCAACTCAG
barA.attB2.rv	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGAAAATTA</u> TAATTCCTTCACTTTACC
barB.attB1.fw	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACATGAAAG</u> TGACAGATGTAAGACT
barB.attB2.rv	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACATTTCTT</u> TAATTAAGCTTCGTCTGAT
rsbU.attB1.fw	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATTTTCGTGG</u> AAGAATTCACA
rsbU.attB2.rv	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACCTATAACC</u> CTACATGAATT
sigB.attB1.fw	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCAGGTGCG</u> AAATAATGGCG
sigB.attB2.rv	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTTTTTATT</u> GCGGTACGTTGC

## Sequenzierung und Kontrolle von Plasmiden

M13 rev	CAGGAAACAGCTATGACC
M13 uni	TGTAAAACGACGGCCAGT

T7 primer	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 rv primer	CCACCGCTGAGCAATAACTA
<i>erm</i> .fw1	AATTGGAACAGGTAAAGGGC
<i>erm</i> .rv1	AACATCTGTGGTATGGCGG
v.frag1.fw	GCTTACAGAAAATGTACAAG
h.frag8.rv	GGTTTGATAATTTTAGAAATTC
pRB.fw	GTTTTATTTGATGCCTCAAGC
pRB.rv	CTCCATCTGGATTTGTTTCAG

## RT-PCR

<i>icaA</i> .real1	TGTATCAAGCGAAGTCAATCTC
<i>icaA</i> .real2	GGCACTAACATCCAGCATAG
<i>icaR</i> .real1	TGAAGATGGTGTTTGATTTGTG
<i>icaR</i> .real2	CCATTGACGGACTTTACCAG
<i>gmk</i> .real1	AATTTCCAGATGCGTTGTTC
<i>gmk</i> .real2	CGATTCTTAGCGAGTTCAAC
SE1543.for1	TTCTCGCCACCAATATAGAC
SE1543.rev1	GTCACCAAACGAACATAATCAAC
SE2219.for1	TGAGAACGGTAAACAAGATTAGC
SE2219.rev1	AACTTCCAAGGTCAAGATAACAG
SE0184.for1	CGATGTTGCTTTGTGGTTGGAAG
SE0184.rev1	CAATAGTGCTCACGCCGACTC

---

einfach unterstrichen: *Attachment sites* zur Gateway-Klonierung  
 fett gedruckt: Erkennungsstellen der Restriktionsendonukleasen  
 Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen oder MWG bezogen.

## 4.5 Antikörper

**Tab. 4-5** In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Bezeichnung	Hersteller / Referenz	Verdünnung
Anti-Kaninchen-IgG, monoklonal, alkalische Phosphatase konjugiert	Roche	1 : 60 000
Anti-BarA_Sepi, polyklonal	diese Arbeit	1 : 1000
Anti-BarB_Sepi, polyklonal	diese Arbeit	1 : 1000
Anti-PIA, polyklonal	Mack <i>et al.</i> , 1996b	1 : 800

Alle polyklonalen Seren wurden in Kaninchen generiert

## 4.6 Enzyme

**Tab. 4-6** In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Enzyme	Konzentration	Hersteller
Restriktionsenzyme		
<i>AcuI</i>	5.000 U/ml	New England Biolabs
<i>AvaI</i>	10.000 U/ml	New England Biolabs
<i>BamHI</i>	20.000 U/ml	New England Biolabs
<i>HindIII</i>	20.000 U/ml	New England Biolabs
<i>NheI</i>	10.000 U/ml	New England Biolabs
<i>PstI</i>	20.000 U/ml	New England Biolabs
<i>XbaI</i>	20.000 U/ml	New England Biolabs
Klonasen		
Gateway BP-Clonase II Enzyme Mix	0,5 Reakt./ $\mu$ l	Invitrogen
Gateway LR-Clonase II Plus Enzyme Mix Invitrogen	0,5 Reakt./ $\mu$ l	Invitrogen
weitere Enzyme		
T4-Ligase	400000 U/ml	New England Biolabs
Calf Intestine alkalische Phosphatase	1 U/ $\mu$ l	Roche
DNase, amplification grade	20 $\mu$ g/ml	Invitrogen
Lysostaphin	1500 U/ml	Genmedics
Lysozym	0,2 mg/ml	Sigma
Proteinase K solution, RNA grade	20 $\mu$ g/ $\mu$ l	Invitrogen
SuperScript™ III Rnase H- reverse Transkriptase	200 U/ $\mu$ l	Invitrogen

## 4.7 Kits

**Tab. 4-7** In dieser Arbeit verwendete Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
5'/3' RACE Kit, 2 <sup>nd</sup> Generation	5' Kartierung von mRNA	Roche
DyNAzyme I DNA Polymerase Kit	Amplifikation von DNA-Fragmenten	Finnzymes
High Pure PCR Product Purification Kit	Aufreinigung von DNA-Fragmenten innerhalb der RACE-Technologie	Roche
iScript™ Select cDNA Synthesis Kit	reverse Transkription für RT-PCR	Bio-Rad
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	RT-PCR	Roche

NucleoSpin Extract II	Elution von DNA aus TBE-Agarosegelen, Aufreinigung von PCR-Fragmenten	Macherey & Nagel
NucleoSpin Tissue	Isolation chromosomaler DNA	Macherey & Nagel
peqGOLD Plasmid Midi Kit	Plasmid-Midipräparation	peqlab
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Plasmid-Minipräparation	peqlab
RNeasy Mini Kit	Isolation von mRNA	Qiagen
Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit	Sequenzierung von PCR-Fragmenten	USB
TripleMaster PCR System	Amplifikation von DNA-Fragmenten, <i>proofreading</i> PCR	Eppendorf

#### 4.8 Chemikalien und Verbrauchsmittel

**Tab. 4-8** In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller
12 <i>well</i> Gewebekulturplatten	Greiner bio one
1 mm Elektroporationsküvetten	peqlab
96 <i>well</i> NunclonΔ Mikrotiterplatten	Nunc
peqGOLD Universal Agarose	peqlab
Amicon Ultra 4 5k	Millipore
Ampholyte 3-10	GE Healthcare
Antihaf-Silan	Pharmacia
Bacto-Agar	BD
BCIP	peqlab
BHI	Oxoid
BIOMAX™MS (Röntgenfilm)	Kodak
Bio-Scale™ Mini Profinity™ IMAC Cartridges	Bio-Rad
Blutagarplatten, COS	Biomerieux
Quick Start™ Bradford dye reagent	Bio-Rad
BSA	New England Biolabs
CHAPS	Carl Roth
<i>complete mini</i>	Roche
Coomassie <i>brilliant blue</i> R250	Carl Roth
DTT	MP Biomedicals
<i>Electrode strips</i>	GE Healthcare
Filterpapier GB002	Schleicher & Schuell

Freundsches Asjuvants, komplett	Sigma
Freundsches Asjuvants, inkomplett	Sigma
[ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP	GE Healthcare
Glaskapillaren	Roche
Halb-Mikro-Küvetten	Sarstedt
HiTrap <sup>™</sup> NHS-aktivierte HP	GE-Healthcare
IPG-Streifen, linear pH 4-7, 17 cm	GE Healthcare
L(+)-Arabinose	Sigma
LB	Sigma
Lysing Matrix B	MP Biomedicals
MES-Puffer 20x	Invitrogen
Milchpulver	Carl Roth
Mineralöl	GE Healthcare
NBT	peqlab
NuPAGE Novex Bis Tris Mini Gels	Invitrogen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Rnasin	Promega
Roti <sup>®</sup> -Nanoquant	Carl Roth
Sterilfilter MILLEX.GV, 22 $\mu\text{m}$ Poren	Millipore
TSB	BD
UVette	Eppendorf

Alle weiteren Chemikalien, Salze und Nährstoffe wurden, wenn nicht anders ausgewiesen, von den Firmen Sigma, Carl Roth und Fluka bezogen.

#### 4.9 Geräte und Hilfsmittel

**Tab. 4-9** In dieser Arbeit verwendete Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Biofuge 22R	Roche
Brutschrank	Heraeus
Brutschüttelschrank	Edmund Bühler
Curix 60	Agfa
Elektroporator	Bio-Rad
Flexcycler	Analytik Jena
Gelelektrophoresekammer	peqlab
Infinite M200	Tecan
Lightcycler	Roche

---

Liquid Scintillationszähler	Packard
Multiphor II unit	Pharmacia
Novex Mini Cell	Invitrogen
PowerPac 3000	Bio-Rad
Power supply EV231	peqlab
Power supply EV233	peqlab
Precellys 24	peqlab
Protean® plus Dodeca™ Cell Gellaufsystem	Bio-Rad
Proteom Analyzer 4700	Applied Biosystems
ScannerX finity ultra	Quato Graphic
SmartSpec™ Plus Spectrophometer	Bio-Rad
Spot cutter Proteom Work™	GE Healthcare
Spot Handling Work Station	GE Healthcare
Ultraschallsonde	Bandelin Sonopuls
Ultraspec™ 3100 pro	GE Healthcare
UV-Transilluminator	Vilber Lourmat
Zentrifuge 5418	Eppendorf
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
Zentrifuge J2-21	Beckman

---

## 5 Methoden

### 5.1 Kultur bakterieller Zellen

#### 5.1.1 Kultivierung von *E. coli* Zellen

*E. coli* Zellen wurden standardmäßig als Vorkultur in 5 ml LB Medium (30 g/l, Sigma) mit entsprechendem Antibiotikum (AB) 16 h bei 37 °C und 150 Upm kultiviert. Aus der Vorkultur erfolgte das Animpfen der Hauptkultur in LB-Medium auf eine optische Dichte bei 600nm ( $OD_{600nm}$ ) von 0,05. Die Hauptkultur enthielt ebenfalls das entsprechende Antibiotikum und wurde unter den gleichen Bedingungen angezchtet.

#### 5.1.2 Kultivierung von Staphylokokken

Staphylokokken wurden, wenn nicht anders beschrieben, in TSB (30 g/l, BD) kultiviert. 37 °C und 150 Upm wurden als Standardkulturbedingungen gewählt. Eine 16stündige Kultur in 5 ml Medium mit entsprechendem AB diente als Vorkultur und wurde genutzt, um die Hauptkultur ohne AB auf eine  $OD_{600nm}$  0,05 anzuimpfen. Eine Ausnahme stellten dabei die Zellen dar, die zur Analyse der Biofilmbildung (5.2.2), zur Extraktion von PIA (5.2.3) und zur Extraktion von RNA (5.5.2) genutzt wurden. In diesen Fällen wurde die Vorkultur lediglich 6-8 h inkubiert und anschließend 1:100 für die Hauptkultur verdünnt. Das TSB der Hauptkulturen wurde für verschiedene Analysen mit 3 % NaCl ( $TSB_{NaCl}$ ) oder 3 % Ethanol ( $TSB_{EtOH}$ ) supplementiert.

### 5.2 Phänotypische Charakterisierung

#### 5.2.1 Erstellung von Wachstumskurven der *S. epidermidis* Stämme

Um die Wachstumseigenschaften verschiedener Mutanten zu analysieren wurden mit Hilfe des infinite M200 Wachstumskurven erstellt. In 12well-Platten wurden pro Vertiefung 2 ml TSB mit Vorkulturen der Stämme auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,05 angeimpft. Diese Berechnung erfolgte durch Messungen der OD in Halb-Mikro-Küvetten am Spektrophotometer (SmartSpec™ Plus Spectrophotometer) und stimmt somit nicht mit den Werten, die in der 12well-Platte ermittelt wurden, überein. Die Zellen wurden wie unter Kapitel 5.1.2 beschrieben bei 37 °C inkubiert. Allerdings konnten die Zellen nur vor jeder Messung geschüttelt werden (10 s, 57 Upm, Amplitude 2). Die Messung der  $OD_{600nm}$  erfolgte alle 30 min über einem Zeitraum von 16 h. In jedem Zyklus wurden in jeder Vertiefung, über ein Quadrat verteilt, 16

Messungen durchgeführt. Die Eckpunkte dieses Quadrates wurden bei der Berechnung des Mittelwertes nicht berücksichtigt, da diese eine große Abweichung aufwiesen. Zur Kontrolle wurde von jedem Stamm eine Verdünnung der Ausgangskultur von 1:10 ebenfalls auf der Platte inkubiert und gemessen.

Die Berechnung der Wachstumskonstanten und Generationszeiten erfolgte mittels folgender Formeln:

$$\begin{aligned} \text{Wachstumsrate (K)} & \quad K = (\log(\text{OD}_{600\text{nm}}\text{N}) - \log(\text{OD}_{600\text{nm}}\text{Nt}_0)) / \Delta t \\ \text{Generationszeit (t}_G\text{)} & \quad t_G = (\log(2) * \Delta t) / (\log(\text{OD}_{600\text{nm}}\text{N}) - \log(\text{OD}_{600\text{nm}}\text{Nt}_0)) \\ & \quad \Delta t = t_{\text{Ende der logPhase}} - t_{\text{Beginn der logPhase}}(t_0) \\ & \quad \text{OD}_{600\text{N}} \quad \text{OD}_{600\text{nm}} \text{ zum Ende der logPhase} \\ & \quad \text{OD}_{600\text{Nt}_0} \quad \text{OD}_{600\text{nm}} \text{ zum Beginn der logPhase} \end{aligned}$$

### 5.2.2 Semiquantitative Bestimmung der Biofilmbildung

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung der verschiedenen *S. epidermidis* Stämme wurde mit Hilfe eines semiquantitativen Tests der Adhärenz der Bakterien an Plastikoberflächen ermittelt (Christensen *et al.*, 1985). Die Vorkultur der Bakterien wurde in TSB, TSB<sub>NaCl</sub> und TSB<sub>EtOH</sub> verdünnt. Je Kultur wurden 4 *wells* einer 96well-Platte (NunclonΔ) mit jeweils 200 µl befüllt. Um die Verdunstung des supplementierten Ethanol zu verhindern, wurden die Platten mit einer Folie abgeklebt. Nach etwa 18-stündigem Wachstum bei 37 °C ohne Schütteln wurde das Medium aus der Platte geschlagen und diese dreimal mit PBS gewaschen (200 µl/*well*). Die Platte wurde getrocknet und die angehefteten Bakterien gefärbt. Dazu wurden in jede Kavität für 5 min 50 µl Gentianaviolettlösung gegeben. Die Färbelösung wurde unter fließendem Wasser vorsichtig abgespült und die Platte erneut getrocknet. Im Anschluss wurde die Absorption im infinite M200 bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm bestimmt. Pro untersuchten Stamm wurden die Ergebnisse aus mindestens drei Versuchsansätzen mit je vier Parallelwerten gemittelt. Lag der ermittelte Wert unter 0,1 wurden die Stämme als biofilmmnegativ gewertet. Zusätzlich wurde die Signifikanz der Beobachtungen durch einen Standard-t-Test ( $p > 0,05$ ) berechnet.

PBS	NaCl	140 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9 mM
	KCl	2 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM
		pH 7,4

### 5.2.3 Extraktion von PIA

Zur weiteren Charakterisierung des Biofilms wurden PIA-Rohextrakte hergestellt. 10 ml der 1:100 Verdünnung der Vorkultur in TSB, TSB<sub>NaCl</sub> und TSB<sub>EtOH</sub> wurden in Nunclon $\Delta$  Petrischalen stehend 18 h kultiviert. Mittels eines Einwegzellschabers wurden die Bakterien von der Plastikoberfläche gelöst und mit dem Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 15 min bei 3220  $\times g$  und 4 °C sedimentiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 2 ml PBS (5.2.2) mit 0,05 % NaN<sub>3</sub> resuspendiert und die auf Eis gekühlte Zellsuspension zweimal 30 s mit 30 s Pause mit Ultraschall bei einer Amplitude von 70 % homogenisiert. Anschließend wurden die Bakterien unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert und, der das PIA enthaltende, Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt geklärt und der gewonnene Überstand in einem sauberen Reaktionsgefäß bei -20 °C gelagert.

### 5.2.4 Quantifizierung von PIA mittels Dot Blot

Zur Quantifizierung der PIA-Expression wurden 1:2 Verdünnungsreihen der PIA-Rohextrakte mit PBS (5.2.2) + 0,05 % NaN<sub>3</sub> hergestellt. Als Trägermaterial wurde eine PVDF-Membran genutzt, die zuvor in Methanol aktiviert und anschließend in PBS überführt wurde. Die Membran wurde auf ein mit PBS getränktes Filterpapier gelegt und jeweils 5  $\mu$ l der Probe aufgetropft. Das Blocken der Membran erfolgte in PBS mit 3 % Milchpulver für 1 h bei Raumtemperatur. Im Folgenden wurde die Membran für 15 min in TTBS gewaschen. Der Blot wurde zur Inkubation mit dem primären Antikörper (gegen das jeweilige Protein gerichteter Antikörper) im gleichen Puffer in einer 1:800 Verdünnung für 1 h geschwenkt und danach dreimal für 15 min in TTBS gewaschen. Als Sekundärantikörper diente anti-*rabbit*-IgG konjugiert mit einer alkalischen Phosphatase. Dieser wurde 1:60 000 in TTBS verdünnt und unter Schwenken 1 h auf der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran wiederum dreimal für 15 min mit TTBS gewaschen. Zur Detektion der Antikörperbindung wurde der Blot 30 min in alkalischer Phosphatase (AP)-Puffer equilibriert, der anschließend verworfen wurden. Die Entwicklung erfolgte dann in 30 ml NBT/BCIP-Lösung (200  $\mu$ l NBT-Stammlösung, 100  $\mu$ l BCIP-Stammlösung auf 30 ml AP-Puffer).

TTBS	2,42 g	Tris
	7,42 g	NaCl
	1 ml	Tween20
	ad 1 l	A. dest
	pH 7,6	
NBT-Stammlösung	5% (w/v)	NBT
	70% (v/v)	Dimethylformamid
BCIP-Stammlösung	5% (w/v)	BCIP
	100%	Dimethylformamid
Die Lagerung der NBT- und BCIP-Stammlösungen erfolgte bei -20°C.		
AP-Puffer	0,1 M	Tris pH 9,5
	0,1 M	NaCl

1 M Tris pH 9,5 und 1 M NaCl-Lösung sind getrennt zu autoklavieren und werden mit sterilem A. dest. entsprechend verdünnt.

### 5.2.5 Bestimmung der Proteaseexpression auf Caseinagarplatten

Um festzustellen, ob die Deletion der Gene *sigB*, *agr*, *sigBagr*, *barA*, *barB* und *barAB* einen Einfluss auf die Proteaseaktivität der *S. epidermidis* Stämme 1457, 1057 und 8400 haben, wurde ein Screening auf Casein-Agarplatten durchgeführt. Mit dieser Methode kann auf optischem Wege die Aktivität denaturierender und lysierender Proteasen erkannt und unterschieden werden. Die denaturierenden Proteasen zersetzen das in dem Agar eingegossene Casein, sodass sich um die Kolonien ein weißer Hof bildet. Die lysierenden Proteasen sind dagegen in der Lage, das Casein vollständig umzusetzen, wodurch ein heller, durchscheinender Hof um die Bakterienkolonien erkennbar wird. Die verschiedenen *S. epidermidis* Stämme wurden in TSB-Medium mit entsprechendem AB für 7 h bei 37 °C und 150 Upm inkubiert. Anschließend wurden 5 µl der Vorkultur auf frisch hergestellte Casein-Platten aufgetropft und die Platten für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Platten fotografiert wurden, wurde zur besseren Darstellung der lysierenden Höfe, 10 % Essigsäure auf die Casein-Platten gegeben. Das Casein wird dabei denaturiert, die denaturierenden Proteasen treten dadurch in den Hintergrund, wobei die lysierenden Proteasen deutlicher an ihrem caseinfreien Hof zu identifizieren sind.

Caseinagar	Bacto-Agar	1,5 g
	TSB	3 g
	CaCl <sub>2</sub>	73,5 mg
	Cystein	12,1 mg
	A. dest	ad 50 ml

1 g Casein wurde in 50 ml A. dest gelöst und der pH mit NaOH zwischen 8 und 10 eingestellt. Die Lösungen wurden separat sterilisiert und anschließend zusammengefügt.

### 5.3 Genetische Manipulation bakterieller Zellen

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

Um die Zellen zur Aufnahme von Plasmiden zu befähigen, wurden sie durch eine chemische Methode kompetent gemacht. Die Kationen der Salze in den Puffern lockern die Zellwandstruktur. Zusätzlich wird die DNA als schwerlösliches Salz auf der Zelloberfläche ausgefällt, sodass die Aufnahme des Vektors erleichtert wird. Es wurden 100 ml Tym-Medium mit Zellen aus einer Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5-0,6 im Schüttelinkubator inkubiert. Die Kultur wurde auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 4 °C und 3220 ×g für 15 min zentrifugiert. Die Pellets wurden in 15 ml TbfI-Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert und unter gleichen Bedingungen wieder sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet in 4 ml TbfII-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden zu je 200 µl aliquotiert und die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Tym-Medium	2 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefe-Extrakt
	0,1 M	NaCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	30 mM	KOAc
TbfI-Puffer	50 mM	RbCl <sub>2</sub>
	100 mM	KCl
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>
	15% (v/v)	Glycerin
TbfII-Puffer	10 mM	Na-MOPS, pH 7,0
	75 mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	KCl
	15% (v/v)	Glycerin

### 5.3.2 Transformation von *E. coli* Zellen

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen diente zum einen der Amplifikation von Plasmiden. Bei den dafür genutzten Stämmen handelte es sich um *E. coli* TOP10, Mach1 und DH5 $\alpha$ . Zum anderen wurden *E. coli* BL21 Zellen mit Expressionsplasmiden transformiert, um rekombinante Proteine überexpressieren zu können. Die kompetenten Zellen des entsprechenden Stammes wurden schnell aufgetaut und sofort auf Eis transferiert. 200  $\mu$ l der kompetenten Zellen wurden mit 1-5  $\mu$ l (je nach DNA-Menge im Isolat) Plasmidisolat oder 15  $\mu$ l Ligationsansatz (um eine hohe Effizienz zu erreichen wurde der gesamte Ansatz eingesetzt) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 s auf 42 °C erhitzt und nach Zugabe von 500  $\mu$ l SOC-Medium für weitere 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann auf LB-Agarplatten, die das zur Selektion benötigte AB enthielten, ausplattiert.

SOC-Medium:	20,0 g/l	Trypton
	5,0 g/l	Hefextrakt
	0,6 g/l	NaCl
	0,5 g/l	KCl
	20 mM	Glukose
	20 mM	MgCl <sub>2</sub>
	pH 7,0	

### 5.3.3 Herstellung elektrokompenter *S. aureus* und *S. epidermidis* Zellen

Zur Präparation elektrokompenter Staphylokokken wurde sowohl die Vor- als auch die Hauptkultur in B2 Medium angezüchtet. 50 ml B2 Medium wurden mit 2 ml der Vorkultur inokuliert und die Zellen unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600nm</sub> 0,6-0,8 kultiviert. Nach einer Zentrifugation für 15 min, bei 3220  $\times$ g und 4 °C wurden die Zellen dreimal mit 25 ml eiskaltem A.dest gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml 10 % Glycerin resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen sedimentiert. Darauf folgte ein letzter Waschschrift mit 2,5 ml 10 % Glycerin. Abhängig von der Ausgangs-OD<sub>600nm</sub> wurde das Pellet in 600-800  $\mu$ l sterilem 10 % Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden zu je 70  $\mu$ l aliquotiert und im Falle von *S. aureus* RN4220 bei -80 °C gelagert. Elektrokompente *S. epidermidis* M12 und M15 wurden direkt im Anschluss zur Elektroporation genutzt.

B2 Medium	10 g/l	Caseinhydrolysat
	25 g/l	Hefeextrakt
	1 g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	5 g/l	Glukose
	25 g/l	NaCl

### 5.3.4 Elektroporation von *S. aureus* und *S. epidermidis* Zellen

Um Vektoren in *S. aureus* RN4220 und *S. epidermidis* M12 und M15 zu transformieren wurde die Zellmembran der Bakterien durch Elektroschock permeabilisiert. Dabei kommt es zu einem kurzfristigen reversiblen Zusammenbruch des Membranpotentials bzw. einer Desorganisation der Membranstruktur. Dies führt zur Verbesserung der Aufnahme von Vektoren in die Zelle. Es wurden 0,5 µl bis 1 µl des Vektors zu einem Aliquot elektrokompetenter Zellen gegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen in 0,1 cm-Elektroporationsküvetten überführt und im Elektroporator bei 100 Ω, 2,3 kV und 25 µF elektroporiert. Nach sofortiger Zugabe von 390 µl B2-Medium (5.3.3) wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und 150 Upm inkubiert. Je 100 µl der Ansätze wurden auf BHI-Agarplatten mit entsprechender Antibiotikaselektion ausplattiert und bei 30 °C für 24 - 48 h bebrütet. Die Inkubationstemperatur bei 30 °C sollte verhindern, dass die temperatursensitiven *E. coli/Staphylococcus-shuttle*-Vektoren eliminiert werden. Zum Nachweis der erfolgreichen Übertragung der Plasmide erfolgte eine Kolonie-PCR.

### 5.3.5 Phagentransduktion

Der Phagentransduktion ging eine Präparation von Phagenlysaten voraus, die zum einen die Herstellung des Phagenlysats und zum anderen dessen Titerbestimmung beinhaltete. Die Methode wurde zum einen genutzt, um die zur Mutagenese hergestellten pBT2-Plasmide aus *S. epidermidis* M15 oder M12 in den Zielstamm *S. epidermidis* 1457 zu übertragen. Zum anderen sollte die chromosomalen Deletion aus *S. epidermidis* 1457 in die beiden *S. epidermidis* Hintergründe 1057 und 8400 übertragen werden.

#### 5.3.5.1 Herstellung von Phagenlysaten

Für die Herstellung der Phagenlysate aus den Trägerstämmen wurden zunächst Vorkulturen in 5 ml NB2+ Medium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,1 bis 0,2 bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Stämme mit dem temperatursensitiven *shuttle*-Vektor

pBT2 wurden bei 30 °C unter Chloramphenicolselektion (10 µg/ml) kultiviert. Die Selektion für die Übertragung der chromosomalen Elemente erfolgte mittels Erythromycin (50 µg/ml). Es wurden 500 µl einer Vorkultur des Zielstammes mit 500 µl der optimalen Phagenverdünnung gemischt und zu 3 ml STA-Softagar mit entsprechendem AB gegeben. Die optimale Phagenverdünnung wurde zuvor durch eine Phagentitration bestimmt (Verdünnung mit der höchstmöglichen Plaquedichte)(5.3.5.2). Pro Stamm wurden drei STA-Platten vorbereitet und bei 37 °C bzw. 30 °C für 18 h bebrütet. Nach der Inkubation wurden 5 ml NB2+ Medium auf jede der drei Platten gegeben. Der Softagar wurde mit einem sterilen Glasspatel abgelöst und in einem Zentrifugenröhrchen zusammengefügt. Die Suspension aus NB2+ Medium und dem Softagar wurde 5 min kräftig geschüttelt, um die Phagen aus dem Softagar zu extrahieren. Die Phagensuspension wurde durch die anschließende Zentrifugation von 15 min bei 4 °C und 3220 ×g vom Agar und den Bakterien getrennt. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert (Porengröße der Sterilfilter 0,22 µm) und bei 4 °C gelagert.

NB2+ Medium	20 g/l Nutrient Broth No 2
	0,4 g/l CaCl <sub>2</sub>
STA-Softagar	20 g/l Nutrient Broth No 2 (Oxoid)
	5 g/l NaCl
	0,4 g/l CaCl <sub>2</sub>
	7 g/l Bacto-Agar
	Zur Herstellung von STA-Agar wurde der Bacto-Agar-Anteil auf 12 g/l erhöht.

#### 5.3.5.2 Bestimmung der Phagentiter

Zur Bestimmung des Phagentiters im Phagenlysat wurde dieses zehnerlogarithmisch von 10<sup>-2</sup> bis 10<sup>-8</sup> in NB2+ (5.3.5.1) verdünnt. Je 500 µl der Phagenverdünnung wurden mit 500 µl einer Suspension von *S. epidermidis* 1457 (OD<sub>600nm</sub> 0,1 – 0,2) und 3 ml STA-Softagar (5.3.5.1) vermischt und auf einer STA-Agarplatte ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C im Brutschrank über Nacht bebrütet und am folgenden Tag durch Auszählen der entstandenen Plaques unter Berücksichtigung der Vorverdünnung der Phagentiter berechnet. Ein optimaler Phagentiter sollte für die Transduktion im Bereich von 5x10<sup>8</sup>-10<sup>10</sup> liegen, wobei die Effizienz für die Übertragung chromosomaler Elemente schlechter ist und ein hoher Phagentiter noch wichtiger ist als für die Übertragung von Plasmiden.

### 5.3.5.3 Transduktion

Bakterienmaterial von mehreren Blutagarplatten der Zielstämme wurde in NB2+ Medium (5.3.5.1) bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 11 suspendiert. 1 ml dieser Bakteriensuspension wurde dann mit 1 ml des zuvor hergestellten Phagenlysats 30 min bei 37 °C inkubiert. Es wurden 40 µl 1 M Natriumcitrat hinzugefügt, um die Absorption der Phagen zu stoppen. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min bei 4 °C und  $3220 \times g$  zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal in 2 ml BHI+ Medium gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 3 ml BHI+ Medium resuspendiert und für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator (150 Upm) inkubiert. Der Kultur wurden zur Selektion des pBT2-Vektors 1,2 µl Chloramphenicol (10 mg/ml Stammlösung) zugefügt. 1,2 µl Erythromycin (50 µg/ml Stammlösung) dienten zur Selektion bei der Übertragung der Deletionen. Die Zellen wurden im Anschluss mit 3 ml des BHI+ Softagars versetzt und auf BHI-Agarplatten mit entsprechendem AB ausgebracht. Die Inkubation erfolgte bei 30 bzw. 37 °C für 24 - 48 h.

BHI+ Medium	30 g/l	Brain Heart Infusion Broth (Oxoid)
	20 mM	Natriumcitrat
BHI+ Softagar	30 g/l	Brain Heart Infusion Broth (Oxoid)
	20 mM	Natriumcitrat
	7 g/l	Bacto-Agar (Becton Dickinson)
	Zur Herstellung von BHI+-Agar wurde der Bacto-Agar-Anteil auf 12 g/l erhöht.	

### 5.3.6 **Mutagenese**

Mittels eines homologen Genaustausches durch Doppel-Crossingover sollten gezielt Gene deletiert und durch ein Erythromycinresistenzgen ersetzt werden. Die dazu nötigen DNA-Fragmente wurden in die *E. coli*/*Staphylococcus-shuttle*-Vektoren pBT2 und pTS1 opplac ligiert (5.4.9.2). Die Vektoren wurden zunächst in *E. coli* TOP 10 transformiert und weiter in den restriktionsdefizienten *S. aureus* RN4220 elektroporiert. Dadurch wurden die Plasmide so modifiziert, dass sie in *S. epidermidis* M12 oder M15 elektroporiert werden konnten, bevor sie über den Phagen  $\Phi 71$  in den Zielstamm *S. epidermidis* 1457 transduziert wurden.

Die Plasmid-tragenden *S. epidermidis* 1457 Stämme wurden in 5 ml TSB (25 µg/ml Erythromycin) über Nacht bei 30 °C vorkultiviert. In einem kleinen Kolben wurden dann 10 ml TSB (50 µg/ml Erythromycin) und 100 µl der Vorkultur gegeben und ca. 6 h bei 30 °C und 150 Upm inkubiert. Die Kultur wurde im

Verhältnis 1:100, 1:1 000, 1:10 000 und 1:100 000 mit TSB verdünnt und je 70 µl auf TSA-Platten mit 50 µg/ml Erythromycin ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei einer für die temperatursensitiven Vektoren nicht permissiven Temperatur von 44 °C. So konnte erreicht werden, dass nur Klone mit einer erfolgreichen Insertion des *erm*-Gens selektioniert wurden. Die Klone wurden separat auf TSA-Platten mit Erythromycin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (10 µg/ml) ausgestrichen. Die Mutanten wurden identifiziert durch den Verlust des Resistenzmarkers der Vektoren (Chloramphenicol) und gleichzeitigem Erwerb einer Erythromycinresistenz.

Durch zwei Kolonie-PCRs für den strangaufwärts (*v.frag1.fw* mit *erm.rv*) und stragabwärts (*erm.fw* mit *h.frag8.rv*) gelegenen Bereich der Insertionen wurde die korrekte Integration der Resistenzkassette überprüft. Die entstandenen PCR-Fragmente wurden im Anschluss sequenziert, um mögliche Basenverluste ausschließen zu können.

TSA-Platten	30 g/l	TSB
	12 g/l	Bacto-Agar

## 5.4 Arbeiten mit DNA

### 5.4.1 Isolation chromosomaler DNA aus *S. epidermidis*

Die Isolation chromosomaler DNA aus *S. epidermidis* erfolgte mit dem NucleoSpin Tissue Extraktionskit von Macherey & Nagel nach den Angaben des Herstellers mit dem Ergänzungsprotokoll für Bakterien. Dabei wurde der Lysisschritt durch eine zehnminütige Inkubation mit 10 µl Lysostaphin (1500 U/ml) bei 37 °C ergänzt, bevor die Proteinase K zugefügt wurde. Alle folgenden Schritte entsprechen dem Herstellerprotokoll.

### 5.4.2 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem NucleoSpin Tissue Kit von peqlab entsprechend den Angaben des Herstellers. Auch die Isolation von Plasmiden aus Staphylokokken wurde mittels dieses Kits durchgeführt. Allerdings wurden die Bedingungen für die Lyse der Zellen verändert. Der Lyseschritt wurde durch Zugabe von 10 µl Lysostaphin (1500 U/ml) ergänzt und zusätzlich erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 37 °C. Anschließend wurde mit den Proben weiter verfahren wie vom Hersteller empfohlen.

### 5.4.3 Analyse von DNA im TBE-Agarosegel

Zur Reinigung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte die Elektrophorese standardmäßig in 1,5 %igen (w/v) TBE-Agarose-Gelen, die 0,003 % (w/v) Ethidiumbromid enthielten. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese mit Probenpuffer verdünnt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde je nach Größe des Gels durch eine Spannung zwischen 100-150 V (Power supply EV233) erreicht. Als Größenstandard wurde ein Gemisch aus mit *Hind*III verdauter  $\lambda$ -DNA und mit *Hae*III verdaute DNA des Bakteriophagen  $\Phi$ X174 genutzt. Die durch Ethidiumbromid gefärbte DNA wurde durch UV-Licht sichtbar gemacht.

6x DNA-Probenpuffer	30% (v/v)	Glycerol
	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25% (w/v)	Xylencyanol
10x TBE	0,05 M	EDTA
	0,9 M	Tris
	0,9 M	Borsäure
	0,01 M	EDTA

### 5.4.4 Nukleinsäureaufreinigung

Zur Nukleinsäureaufreinigung von PCR-Produkten oder von DNA aus einem Agarose-Gel wurde das Kit NucleoSpin Extract II der Firma Macherey & Nagel verwendet. Die Methode basiert auf der Bindung der DNA an eine Silica-Membran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Mit diesem Kit können DNA-Fragmente bis zu einer Basenlänge von 10 kb gereinigt werden. Es wurde ausschließlich nach Angaben des Herstellers verfahren.

### 5.4.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration wässriger DNA-Lösungen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen ( $A_{260\text{nm}}$ ). Eine  $A_{260\text{nm}}$  von 1,0 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  für doppelsträngige DNA. Der Quotient aus  $A_{260\text{nm}}/A_{280}$  liefert eine Aussage über die Reinheit der DNA-Lösung. Bei reinen Nukleinsäurepräparationen liegt der Wert des Quotienten bei ca. 1,8 (reine DNA). Die Konzentration berechnet sich wie folgt:

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorption } 260 \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die DNA wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und die Konzentration in UV-durchlässigen Plastikküvetten (UVette) photometrisch (SmartSpec Plus Spektrophotometer) gemessen.

#### 5.4.6 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Amplifikation sequenzspezifischer DNA-Fragmente eingesetzt. Abhängig von der weiteren Nutzung der PCR-Produkte wurden diese durch verschiedene DNA-Polymerasen amplifiziert. Die DyNAzyme I DNA-Polymerase stammt aus *Thermus brockianus* und besitzt 5' → 3' DNA-Polymerase und Exonuklease-Aktivität, aber ihr fehlt die 3' → 5' *proofreading*-Aktivität. DNA-Fragmente, die auf diese Weise gewonnen wurden, dienten entweder zur Kontrolle, der Aufnahme von DNA in Bakterienzellen in Kolonie-PCR-Ansätzen oder zur Sequenzierung von DNA-Abschnitten durch die Firma MWG. DNA, die im Anschluss an die PCR zur weiteren Klonierung genutzt werden sollte, wurde hingegen mit dem TripleMaster PCR System (Eppendorf) amplifiziert. Der DNA-Polymerasemix besteht aus einem Gemisch verschiedener thermostabiler Polymerasen, die *proofreading*-Aktivität besitzen.

PCR-Ansätze, deren Produkt anschließend weiter verwendet wurde, wurden standardmäßig in 50 µl Ansätzen durchgeführt, die sich wie folgt zusammensetzten:

10x PCR-Puffer	5 µl
TripleMaster:	10x HighFidelity Puffer mit 2,5 mM Mg <sup>2+</sup>
DyNAzyme I:	10x optimierter DyNAzyme Puffer mit 1,5 mM Mg <sup>2+</sup>
<i>forward</i> Primer (10 pmol)	1,5 µl
<i>reverse</i> Primer (10 pmol)	1,5 µl
DNA <i>template</i>	2 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
DNA-Polymerase	0,5 µl
	TripleMaster: 5 U/µl
	DyNAzyme I: 2 U/µl
A. dest.	38,5 µl

Um zu kontrollieren ob DNA-Fragmente korrekt integriert oder überhaupt in die Zellen aufgenommen wurden, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Da diese DNA nicht weiter genutzt wurde, wurden die Ansätze auf 25 µl reduziert. Eine Einzelkolonie wurde in 10 µl A. dest aufgenommen und 2,5 µl dieser Suspension als *template* in der PCR eingesetzt. Die Mengenangaben für Primer, dNTPs, Puffer und Polymerasen wurden halbiert und der Ansatz entsprechend mit A. dest auf 25 µl aufgefüllt.

Alle PCR-Reaktionen wurden im Flexcycler durchgeführt. Die Ansätze durchliefen 30 – 35 Zyklen, dabei wurde die Temperatur für die Hybridisierung der Primer, mit der DNA, entsprechend ihrer Schmelztemperatur gewählt (Tabelle 5-1). Die Denaturierungstemperatur betrug 95 °C. Zur Verlängerung der DNA-Fragmente wurde die optimale Arbeitstemperatur der Polymerasen, 72 °C, gewählt, die Zeit richtete sich dabei nach der Länge der zu amplifizierenden Fragmente.

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Amplifikation wurden die PCR-Produkte im Anschluss auf TBE-Agarosegelen (5.4.3) kontrolliert.

**Tab. 5-1** Hybridisierungstemperaturen von Primerpaaren

<i>forward</i> Primer	<i>reverse</i> Primer	Temperatur
frag1.attB4.fw	frag1.attB1.rv	53 °C
frag2.attB2.fw	frag2.attB3.rv	52 °C
frag3.attB4.fw	frag3.attB1.rv	52 °C
frag4.attB2.fw	frag4.attB3.rv	54 °C
frag5.attB4.fw	frag5.attB1.rv	55 °C
frag6.attB2.fw	frag6.attB3.rv	52 °C
frag7.attB4.fw	frag7.attB1.rv	52 °C
frag8.attB2.fw	frag8.attB3.rv	52 °C
<i>ermR2</i> .attB1.fw	<i>ermL1</i> .attB2.rv	57 °C
<i>barA</i> .attB1.fw	<i>barA</i> .attB2.rv	58 °C
<i>barB</i> .attB1.fw	<i>barB</i> .attB2.rv	58 °C
<i>rsbU</i> .attB1.fw	<i>rsbU</i> .attB2.rv	55 °C
<i>sigB</i> .attB1.fw	<i>sigB</i> .attB2.rv	60 °C
<i>erm</i> .fw1	h.frag8.rv	46 °C
v.frag1.fw	<i>erm</i> .rv1	45 °C

#### 5.4.7 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit dem Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit von USB Corporation nach den Angaben des Herstellers. Die Sequenzierung wurde durch zufälligen Abbruch der Synthese des DNA-Fragments durch didesoxy-Nukleotide erreicht (Sanger *et al.*, 1977). Durchgeführt wurden die Sequenzierungen in Zusammenhang mit der Primer Extension Analyse (5.4.3). Im entsprechenden Kapitel ist das Sequenzgel näher beschrieben, auf das auch die Sequenzierungsproben aufgetragen wurden.

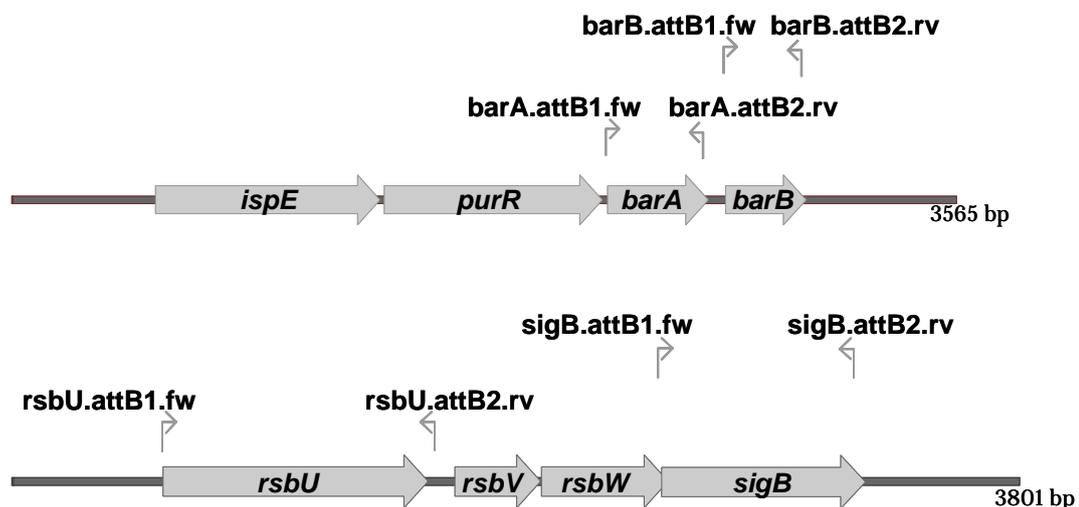
Die standardmäßige Sequenzierung zur Kontrolle von Klonierungen wurde von der Firma MWG durchgeführt. Dazu wurden 100 µg der zu sequenzierenden DNA in 1,5 ml Reaktionsgefäßen eingetrocknet und der Firma zugesandt.

#### 5.4.8 Gatewayklonierungen

Das Gateway-System der Firma Invitrogen stellt eine Klonierungstechnik dar, die auf dem natürlich vorkommenden sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen  $\lambda$  (Landy, 1989) beruht. Die Methode erlaubt einen schnellen und sehr effizienten Transfer von DNA-Fragmenten zwischen verschiedenen Vektoren unter Beibehaltung des Leserasters ohne den Einsatz von Restriktionsenzymen und Ligasen (Hartley *et al.*, 2000). In allen Anwendungen setzt sich die Klonierung aus zwei separaten Schritten zusammen. Der BP-Klonierung zur Generierung der Entry-Vektoren aus PCR-Produkt und Donorvektor. Und der LR-Klonierung zur Erzeugung der Expressionsvektoren.

In dieser Arbeit wurde das System genutzt, um Expressionsvektoren für die Überexpression der Proteine BarA, BarB, RsbU und SigB zu erzeugen sowie zur Herstellung von Vektoren, die der Deletion der Gene *ispE*, *purR*, *barA* und *barB* dienen sollten.

##### 5.4.8.1 Klonierung der Expressionsvektoren



**Abb. 5-1** Primer für Expressionsvektoren

Die Lage der Primer (  $\overleftarrow{\quad}$  ) und deren Orientierung, die zur Amplifikation der Gene genutzt wurden sind dargestellt. Die gefüllten Pfeile zeigen die verschiedenen offenen Leseraster, wie sie im Genom von *S. epidermidis* ATCC12228 (AE015929.1) vorliegen.

Die kodierenden Bereiche der Gene *barA*, *barB*, *rsbU* und *sigB* wurden mittels PCR (5.4.6) amplifiziert. In diesem Schritt wurden die DNA-Abschnitte mit den *att*-

*sites* zur Integration in pDONR221 versehen. Der *forward*-Primer fügte eine *attB1-site* an das 5'-Ende des PCR-Produktes und der *reverse*-Primer eine *attB2-site* an das 3'-Ende (Abbildung 5-1).

In der BP-Klonierung wurden 50 fmol des jeweiligen PCR-Produktes und 150 µg des Donorvektors pDONR221 eingesetzt. Den Ansätzen wurden jeweils 4 U der BP-Clonase zugefügt und sie wurden mit *A. bidest* auf 25 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation für 2 h bei RT, wurden die Ansätze in *E. coli* TOP 10 transformiert (5.3.2).

25 fmol der entstandenen Entryvektoren (Tab. 5-1) wurden für die LR-Klonierung mit 150 µg der jeweiligen Empfängervektoren eingesetzt. Durch die Empfängervektoren wurde den Proteinen ein *tag* angefügt (pDEST 17: His-*tag*, pDEST 15: GST-*tag*) und die Expression wurde unter Kontrolle des T7-Promotors gestellt (Tabelle 5-2).

**Tab. 5-2** Kombinationen der Entry- und Destinationsvektoren

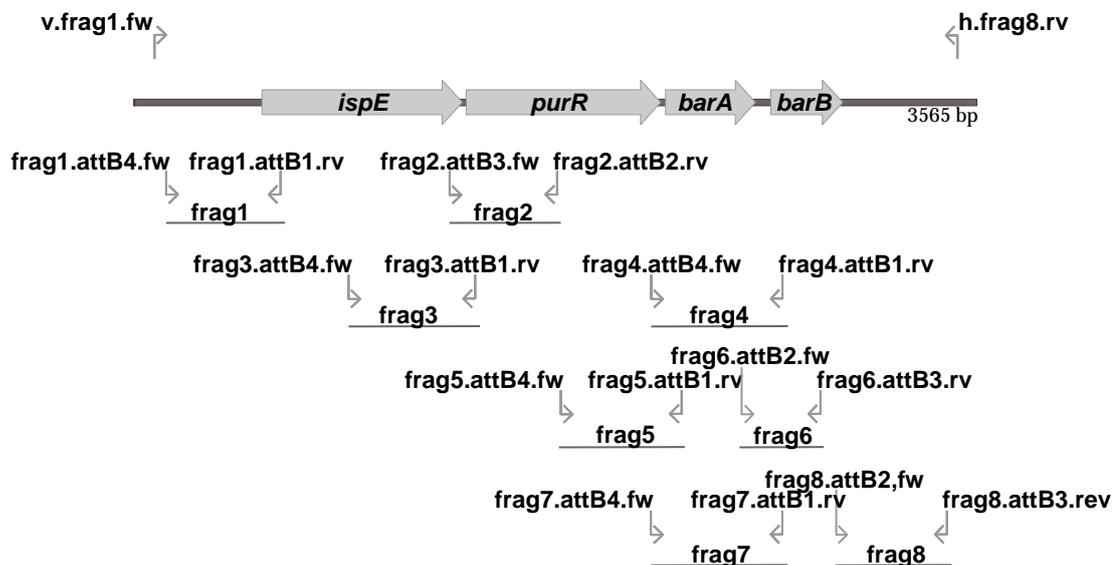
Entry-Vektor	Destinationsvektor	Expressionsvektor
pENTRY <i>barA</i>	pDEST 17	pEXPR <i>barA</i>
	pDEST 15	pEXPR <i>barA</i> -GST
pENTRY <i>barB</i>	pDEST 17	pEXPR <i>barB</i>
	pDEST 15	pEXPR <i>barB</i> -GST
pENTRY <i>rsbU</i>	pDEST 17	pEXPR <i>rsbU</i>
pENTRY <i>sigB</i>	pDEST 17	pEXPR <i>sigB</i>

Zu den Vektoren wurde die LR-Clonase (4 U) hinzugefügt und der Ansatz wurde mit *A. bidest* auf 20 µl aufgefüllt. Nach einer ca. 16 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurden die Klonierungsansätze in *E. coli* DH5α transformiert (5.3.2). Mittels PCR wurden die Plasmide zunächst überprüft, anschließend wurden die Plasmide mit Hilfe der T7 Primer sequenziert (5.4.7), um Mutationen ausschließen zu können. Bevor die Proteine überexprimiert werden konnten, wurden die Plasmide in den dafür besser geeigneten Stamm *E. coli* BL21 AI transformiert.

#### 5.4.8.2 Klonierung der Deletionsvektoren

Der Klonierung ging die Amplifikation der benötigten DNA-Fragmente durch eine PCR (5.4.6) voraus. Es wurden DNA-Abschnitte ausgewählt, die über einen Bereich von ca. 500 bp das zu deletierende Gen flankieren (Abbildung 5-2).

In der PCR-Reaktion wurden den Fragmenten durch die Primer *att-sites* angehängt, die zur Erkennung durch den Enzymmix sowie für die korrekte Insertion in den Empfängervektor notwendig waren (Tabelle 5-3).



**Abb. 5-2** Primer für Deletionsvektoren

Gezeigt ist die genomische Region um *purR* in *S. epidermidis* ATCC 12228 (AE015929.1). Die offenen Leserahmen sind durch gefüllte Pfeile gekennzeichnet. Es sind alle Primer (↗ ↘) sowie deren Lage und Orientierung und die daraus resultierenden DNA-Fragmente dargestellt, die zur Klonierung der Deletionsvektoren nötig sind. Des Weiteren sind die Oligonukleotide *v.frag1.fw* und *h.frag8.rev* eingezeichnet, die zur späteren Kontrolle der korrekten Insertion dienen.

**Tab. 5-3** Zuordnung der *att-sites* zu den Fragmenten und resultierende Vektoren

Bezeichnung	<i>att-sites</i>	Empfängervektor	Produkt
Frag 1	<i>attB4</i> und <i>attB1</i>	pDONR <sup>TMP4</sup> -P1R	pENTRYfrag1
Frag 2	<i>attB2</i> und <i>attB3</i>	pDONR <sup>TMP2R</sup> -P3	pENTRYfrag2
Frag 3	<i>attB4</i> und <i>attB1</i>	pDONR <sup>TMP4</sup> -P1R	pENTRYfrag3
Frag 4	<i>attB2</i> und <i>attB3</i>	pDONR <sup>TMP2R</sup> -P3	pENTRYfrag4
Frag 5	<i>attB4</i> und <i>attB1</i>	pDONR <sup>TMP4</sup> -P1R	pENTRYfrag5
Frag 6	<i>attB2</i> und <i>attB3</i>	pDONR <sup>TMP2R</sup> -P3	pENTRYfrag6
Frag 7	<i>attB4</i> und <i>attB1</i>	pDONR <sup>TMP4</sup> -P1R	pENTRYfrag7
Frag 8	<i>attB2</i> und <i>attB3</i>	pDONR <sup>TMP2R</sup> -P3	pENTRYfrag8
<i>erm</i>	<i>attB1</i> und <i>attB2</i>	pDONR <sup>TM</sup> 221	pENTRY <i>erm</i>

Ansätze für die BP-Klonierungen setzten sich wie folgt zusammen:

Aufgereinigtes PCR-Fragment	50 fmol
Donorvektor	150 µg
Enzymmix	2 µl
A. bidest.	ad 10 µl

Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in *E. coli* TOP 10 transformiert (5.3.2). Die Selektion der Klone mit den entsprechenden Entry-Vektoren erfolgte auf Kanamycin. Wurden in einer PCR-Reaktion die zu erwartenden Banden nachgewiesen, wurden die Entry-Plasmide durch eine Sequenzierung mit M13 Primern kontrolliert (5.4.7).

Anschließend wurden in der LR-Klonierung die einzelnen Fragmente aus den Entry-Vektoren in dem Empfängervektor zusammengefügt. Das Gateway-System enthält einen Destinationsvektor, pDEST R4-R3, der für *E. coli* geeignet ist. Des Weiteren stand ein Empfängervektor zur Verfügung, der die nötigen *att-sites* besaß und als *E. coli/Staphylococcus-shuttle*-Vektor genutzt werden konnte (pTS1 opplac). Dieser Vektor wurde in separaten Klonierungsansätzen als Alternative zu pDEST R4-R3 genutzt. Jeder Ansatz beinhaltete 4 Plasmide, den Destinationsvektor, den Entry-Vektor mit der Resistenzkassette, pENTRY*erm*, und die Entry-Vektoren mit den entsprechenden flankierenden Sequenzen und ergab die entsprechenden Expressionsvektoren (Tabelle 5-4).

**Tab. 5-4** Kombination der ENTRY-Vektoren und resultierende Vektoren

Ausgangsplasmide	Produkt pDEST <sup>TM</sup> R3-R4	Produkt pTS1 opplac
pENTRYfrag1 + pENTRYfrag2	pCOLI <i>ispE</i>	pTS1 <i>ispE</i>
pENTRYfrag1 + pENTRYfrag4	pCOLI <i>ispEpurR</i>	pTS1 <i>ispEpurR</i>
pENTRYfrag1 + pENTRYfrag8	pCOLI <i>ispEpurRbarAB</i>	pTS1 <i>ispEpurRbarAB</i>
pENTRYfrag3 + pENTRYfrag4	pCOLI <i>purR</i>	pTS1 <i>purR</i>
pENTRYfrag5 + pENTRYfrag6	pCOLI <i>barA</i>	pTS1 <i>barA</i>
pENTRYfrag5 + pENTRYfrag8	pCOLI <i>barAB</i>	pTS1 <i>barAB</i>
pENTRYfrag7 + pENTRYfrag8	pCOLI <i>barB</i>	pTS1 <i>barB</i>

Die LR-Ansätze enthielten jeweils 25 fmol der jeweiligen Entry-Vektoren, 60 ng pDEST R4-R3 bzw. pTS1 opplac dest, 4 µl der LR-Clonase und wurden mit *A. bidest* auf 16 µl aufgefüllt und für 18 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in *E. coli* TOP 10 oder Mach 1 transformiert (5.3.2). Die Selektion der Klone erfolgte auf Ampicillin.

Bei den pCOLI-Plasmiden handelte es sich nicht um *E. coli/Staphylococcus-shuttle*-Vektoren, demnach erfolgte eine Umklonierung in den Vektor pBT2 (5.4.9) in einem zusätzlichen Schritt.

### 5.4.9 klassische Klonierung

#### 5.4.9.1 Restriktionsverdau des Vektors und der DNA-Fragmente

Die durch die MultiSite-Gateway Technologie erzeugten pCOLI-Vektoren waren nicht als *E. coli/Staphylococcus-shuttle*-Vektoren geeignet, deshalb mussten die zusammengesetzten Fragmente in den Vektor pBT2 umkloniert werden. Dieser Vektor weist keine *att-sites* auf, besitzt jedoch eine *multi cloning site*. Hier wurden die Schnittstellen für *PstI* und *BamHI* genutzt, um den Vektor zu linearisieren. Der Ansatz mit Enzymen und Puffern (New England Biolabs) setzte sich wie folgt zusammen:

pBT2	30 µl
BSA	0,5 µl
<i>BamHI</i>	1,5 µl
<i>PstI</i>	1,5 µl
Neb3 Puffer	5 µl
A. dest	11,5 µl

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 3 h. Der linearisierte pBT2 hatte eine Länge von 6,97 kb. Nach dem Verdau wurde der Vektor pBT2 mittels CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) dephosphoryliert. Dem Ansatz wurden 5 µl CIAP (1 U/µl) zugefügt und die Inkubation erfolgte für eine weitere Stunde bei 37 °C. Darauf folgte eine Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 10 min.

Die pCOLI-Vektoren, die mit der Gateway-Technik erzeugt wurden, enthielten die zusammengesetzten drei DNA-Fragmente. Diese wurden als ein PCR-Amplifikat durch jeweils zwei spezifische Primer amplifiziert (5.4.6). Der *forward* Primer besaß am 5' Ende eine *PstI*-Schnittstelle und der *reverse* Primer eine *BamHI*-Schnittstelle. Auf diese Weise konnten die Insertionsfragmente genauso verdaut werden wie der Vektor. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA-Fragmente (5.4.4).

#### 5.4.9.2 Ligation

Die Ligation wurde zur Integration der 3-Fragment-Konstrukte in den linearisierten *shuttle*-Vektor pBT2 durchgeführt. Für die Verknüpfung wurde ein molares Verhältnis 1:6 von Vektor zu Insert (50 fmoles zu 300 fmoles) eingesetzt. Es wurden 2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer und 1 µl T4-Ligase zugegeben und auf 20 µl Gesamtvolumen mit A. dest aufgefüllt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und einer anschließenden Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65 °C (10 min) wurde eine Transformation in *E. coli* (5.3.2) angeschlossen.

## 5.5 Arbeiten mit RNA

### 5.5.1 Probennahme der *S. epidermidis* Zellen zur RNA-Aufreinigung

Um die RNA der verschiedenen *S. epidermidis* Stämme zu gewinnen, wurden 10 ml TSB, TSB<sub>NaCl</sub> und TSB<sub>EtOH</sub> mit den Vorkulturen in Zellkulturschalen (Nunclon $\Delta$ ) beimpft und die Hauptkulturen angezüchtet. Diese wurden für 7 bzw. 24 h bei 37 °C im Brutschrank stehend inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturschalen geerntet und in ein 50 ml Polystyrolröhrchen auf Eis überführt. Nach Zentrifugation bei 3220  $\times g$ , 4 °C für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml TE-Puffer gewaschen. Die Pellets biofilmpositiver Stämme wurden 20 s mit einer Frequenz von 20 kHz und einer Amplitude von 70 % mittels Ultraschallgerät sonifiziert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde der Überstand abgenommen und das Pellet bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl	pH 8,0
	0,1 mM	EDTA	

### 5.5.2 Isolation der Gesamtzell-RNA

Nachdem die Zellpellets auf Eis aufgetaut wurden, erfolgte die Zugabe von 180  $\mu$ l TE-Puffer (5.5.1). Eine Behandlung der Zellen mit Ultraschall (Frequenz: 20 kHz, Amplitude: 30 %) führte zur vollständigen Resuspension der Zellen in dem Puffer. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 U des antibakteriellen Enzyms Lysostaphin, das die Zellwand der Staphylokokken spaltet. Nach einer 10 minütigen Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Zellen 5 min auf Eis gestellt. Sie wurden anschließend mit jeweils 700  $\mu$ l RLT-Lysis-Puffer (Qiagen) (enthält 1:100 Mercaptoethanol) vermischt und in Lysing-Matrix-B-Säulen überführt. Bei 6800 Upm erfolgte der Aufschluss der Zellen mit dem Precellys 24. Anschließend wurden die Proben für 30 s auf Eis gekühlt und die Glas-beads der Lysing-Matrix-B-Röhrchen bei 4 °C und 25000  $\times g$  für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und unter gleichen Bedingungen 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 70 % versetzt.

Zur RNA-Isolation wurde RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Alle folgenden Schritte wurden laut Angaben des Herstellers zum Protokoll für Hefen

durchgeführt. Die RNA wurde mit 50 µl RNase freiem Wasser durch Zentrifugation bei 8000 ×g für 1 min in ein sauberes Reaktionsgefäß eluiert.

### 5.5.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentrationsbestimmung beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Konzentrationsbestimmung der DNA (5.4.5).

Für die Bestimmung der Konzentration der RNA wurde diese zunächst 1:100 in RNase freiem Wasser verdünnt. Unter Verwendung von UV-Küvetten wurde die Absorption bei 260 nm am SmartSpec Plus Spektrophotometer gemessen. Als Referenz diente RNase freies Wasser. Eine Absorption ( $A_{260\text{nm}}$ ) von 1,00 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Durch zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm wurde auf den Grad der Verunreinigung mit Protein geschlossen. Quotienten zwischen 1,9 und 2,2 weisen auf reine RNA-Präparationen hin. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Proben bei -80°C gelagert.

### 5.5.4 Primer Extension Analyse

Die Primer Extension Analyse wurde mittels eines radioaktiv markierten Primers, mit dessen Hilfe mRNA in markierte cDNA umgeschrieben wurde, durchgeführt. Die Methode wurde zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes genutzt. Zuerst erfolgte die Markierung des Primers mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP durch die T4-Polynukleotidkinase (PNK). Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5 µl	[ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP (50 µCi)
1 µl	Primer (100 ng/µl)
2,5 µl	Kinasepuffer (zehnfach)
0,4 µl	T4-PNK (entspricht 4 U)
16,1 µl	A. bidest.

Der Ansatz wurde für die Phosphorylierungsreaktion für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die PNK 5 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Die Fällung der markierten Oligonukleotide erfolgte durch Zugabe von 25 µl Ammoniumacetat (4 M) und 250 µl eiskaltem Ethanol (96 % v/v) für 30 min bei -70 °C. Danach wurden die Primer 15 min bei 13000 Upm und 4 °C sedimentiert. Nach Trocknen des Pellets wurde dieses in 20 µl A. bidest. aufgenommen und gelöst. 1 µl dieses Ansatzes wurde für die Messung der inkorporierten Radioaktivität am LSC eingesetzt. Für die Primerverlängerung wurde eine Aktivität von etwa 0,5-

$1 \times 10^6$  cpm eingesetzt. Der Ansatz für die Hybridisierung der mRNA mit dem markierten Primer setzte sich wie folgt zusammen:

10 <sup>6</sup> cpm	endmarkierter Primer
5 µg	RNA
1 µl	10x Hybridisierungspuffer
ad 10 µl	A. bidest.

Die Hybridisierung erfolgte für 60 min bei 52 °C. Anschließend wurde dem Ansatz 25 µl des Primer-Extension-Mix und 20 U der reversen Transkriptase (SuperScript III) zugefügt. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 min, um die nötigen Bedingungen für die reverse Transkription zu schaffen. Die nun entstandene cDNA wurde mit 200 µl eiskaltem Ethanol (96 % v/v) 30 min bei -70 °C gefällt und anschließend sedimentiert (15 min, 13000 Upm). Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl Stopppuffer resuspendiert. 2 µl jeder Probe wurden auf ein Sequenzgel aufgetragen. Das Gießen des Gels erfolgte zwischen zwei zuvor silanisierte (Antihaf-Silan) und mit Ethanol gereinigte Glasplatten. Vor dem Auftragen der Proben erfolgte ein Vorlauf des Gels von etwa 2 h, um eine Geltemperatur von ca. 55 °C zu erreichen. Die Proben wurden 3 min bei 70 °C denaturiert und zusammen mit den dazugehörigen Sequenzen auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x TBE (5.4.3) und die Elektrophorese erfolgte bei 80 W für 2 h (PowerPac 3000). Nach dem Gellauf wurde das Gel mit Hilfe eines Bogens Filterpapier (GB002) von der Glasscheibe entfernt und mit Saranfolie bedeckt, bevor ein Röntgenfilm (Kodak BIOMAX™ MS) aufgelegt wurde. Die Exposition fand über Nacht bei -80 °C statt. Des Röntgenfilms wurde im Curix 60 entwickelt.

Hybridisierungspuffer	10 mM	Tris-HCl pH 7,9	autoklavieren
	1 mM	EDTA	autoklavieren
	250 mM	KCl	autoklavieren
Primer-Extension-Mix	10 mM	Tris-HCl pH 8,7	autoklavieren
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>	autoklavieren
	5 µM	DTT	
	0,4 mM	dNTPs	
	1 U/µl	Rnasin	

Sequenzgel	40% (38%AA + 2%Bis)	Acrylamid	
	1x	TBE	
	42% (w/v)	Harnstoff	durch Papierfilter filtriert
	0,00025% (w/v)	APS	
	0,001% (v/v)	TEMED	

### 5.5.5 5' Kartierung der mRNA mittels RACE-Technologie

Mit dem 5'/3' RACE-Kit, 2nd Generation ist es möglich sowohl 5' als auch 3' Enden zu kartieren. In dieser Arbeit sollte der 5' Startpunkt des Transkripts von *barAB*, ausgehend vom putativen  $\sigma^B$  abhängigen Promotor strangaufwärts von *barA*, kartiert werden. Dazu wurde in einem ersten Schritt durch einen genspezifischen Primer und der im Kit enthaltenen Transcriptor reversen Transcriptase aus der RNA eine cDNA geschrieben. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

4 $\mu$ l	cDNA Synthesepuffer
2 $\mu$ l	dNTPs
1,25 $\mu$ l	frag5. <i>barA</i> .rv (10 $\mu$ M)
0,56 $\mu$ l	RNA (2 $\mu$ g)
1 $\mu$ l	Transcriptor rev. Transcriptase
11,2 $\mu$ l	A. dest.

Der Ansatz wurde 60 min bei 55 °C und anschließend 5 min bei 85 °C inkubiert. Im Folgenden wurde die cDNA mit dem High Pure PCR Product Purification Kit laut Angaben des Herstellers aufgereinigt. Im nächsten Schritt wurde ein polyA-Schwanz an das 3'-Ende der aufgereinigten cDNA mit Hilfe einer terminalen Transferase nach dem Protokoll des Herstellers angefügt. In einer *nested*-PCR (Tabelle 5-4) wurde das spezifische DNA-Fragment amplifiziert, anschließend aufgereinigt und bei der Firma MWG sequenziert (5.4.7).

Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5 $\mu$ l	dA-markierte DNA
1 $\mu$ l	oligo dT Primer
1,25 $\mu$ l	<i>barA</i> .pe.rv (10 $\mu$ M)
1 $\mu$ l	dNTPs
5 $\mu$ l	Reaktionspuffer (mit Taq DNA-Polymerase)
36,25 $\mu$ l	A. bidest.

**Tab. 5-4** PCR-Bedingungen zur Amplifikation der dA-markierten cDNA

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	120	1
Denaturierung	94	15	} 10
Anlagerung	55	30	
Verlängerung	72	40	
Denaturierung	94	15	} 25
Anlagerung	55	30	
Verlängerung	72	40 + 20 / Zyklus	
Finale Verlängerung	72	420	1

Die so ermittelte Sequenz konnte für ein Alignment mit der aus der Datenbank bekannten genomischen Sequenz genutzt werden und der Startpunkt ermittelt werden.

### 5.5.6 Quantitative Transkriptionsanalyse

Zur Analyse der Transkription der Gene *icaA* und *icaR* sowie der extrazellulären Protease SE0184, SE1543 und SE2219 wurde die reverse Transkription *real time* PCR (RT-PCR) genutzt. Dabei diente das Gen der Guanylatcyclase (*gmk*) als unreguliertes Referenzgen (*house keeping gene*).

Die aus den Bakterien gewonnene RNA enthielt Kontaminationen genomischer DNA. Um die Quantifikation nicht zu beeinträchtigen, wurde diese DNA durch die Behandlung der Proben mit RNase-freier DNase I entfernt. 5 µg RNA wurden mit 2 µl DNase-I-Puffer und 4 µl DNase (1 U/µl) versetzt und auf 20 µl mit A. dest. aufgefüllt. Der Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zusatz von 1 µl 25 mM EDTA und 10 min Erhitzen auf 65 °C wurde die Reaktion abgestoppt. Der Ansatz wurde für die weitere Behandlung 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Um den Erfolg des DNA-Verdaus zu prüfen, erfolgte eine Kontroll-PCR im Light Cycler. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2 µl	LightCycler® FastStart Reaction Mix SYBR Green
0,8 µl	MgCl <sub>2</sub> , 25 mM
1,5 µl	<i>forward-gmk</i> -Primer (10 pmol/µl)
1,5 µl	<i>reverse-gmk</i> -Primer (10 pmol/µl)
2 µl	DNase behandelte RNA-Probe
12.2 µl	A. dest

Dem LightCycler® FastStart Reaction Mix SYBR Green wurde dem Protokoll entsprechend vor der Verwendung 10 µl LightCycler® FastStart Enzyme zugesetzt, welches die Taq DNA Polymerase enthält. Als Positivkontrolle diente ein cDNA-Gemisch aus vorangegangenen RNA-Isolationen. Zur Negativkontrolle wurde dem Ansatz lediglich Wasser zugefügt. Die Durchführung und Auswertung der RT-PCR erfolgte mit dem Programm LightCycler Data Analysis Das Protokoll der PCR am LightCycler ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

**Tab. 5-5** PCR-Protokoll der Kontroll PCR

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anstieg [°C/s]	Zyklen
Denaturierung			
95	600	20	1 x
Amplifizierung			
95	10	20	} 52 x
50	10	20	
72	10	20	
Schmelzkurven			
95	0	20	1 x
50	30	20	1 x
95	0	0,2	1 x
Kühlung			
40	15	20	1 x

Wurde die Kontroll-PCR erst nach 35 oder mehr Zyklen positiv bzw. blieb negativ, konnten die Proben zur weiteren Analyse verwendet werden. Dabei muss die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Die reverse Transkription zur Synthese der cDNA erfolgte mit dem iScript™ Select cDNA Synthesis Kit. Für die Denaturierung der RNA und Anlagerung der Primer, wurden 5 µl der 1:5 verdünnten RNA mit 2 µl *random* Primern sowie mit 8 µl A. dest versetzt und 5 min bei 65 °C inkubiert. Nachdem der Ansatz 1 min auf Eis stand, wurde ein Reaktionsmix, bestehend aus 4 µl 5x iSript Reaktions-Puffer und 1 µl iSript reverser Transkriptase, hinzupipettiert. Im Thermocycler erfolgte die Inkubation des Reaktionsmixes bei folgenden Temperaturen:

**Tab. 5-6** Protokoll der reversen Transkription

Zeit [s]	Temperatur [°C]
5 min	25 °C
30 min	42 °C
5 min	84 °C
∞	4 °C

Die erhaltenen cDNA wurde 1:4 verdünnt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Die RT-PCR setzte sich für alle Primerpaare entsprechend der optimalen Bedingungen zusammen. In Tabelle 5-7 sind die verschiedenen Zusammensetzungen zusammengefasst.

**Tab. 5-7** Zusammensetzung der RT-PCR Ansätze

PCR-Komponenten	Ansätze [µl]					
	<i>icaA</i>	<i>icaR</i>	SE0184	SE1543	SE2219	<i>gmk</i>
LightCycler <sup>®</sup> FastStart Reaction Mix SYBR Green	2	2	2	2	2	2
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	0,8	1,6	0,8	0,8	0,8	0,8
<i>forward</i> -Primer (10 pmol/µl)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
<i>reverse</i> -Primer (10 pmol/µl)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
cDNA	2	2	2	2	2	2
A. dest	15,2	15	14,2	13,4	14	13,2

Das Protokoll für die PCR erfolgte wie in Tabelle 5-1 dargestellt mit kleinen Abweichungen. In der PCR für *icaR* wurde während der Amplifikation die *annealing*-Zeit auf 8 s reduziert und die Temperatur auf 52 °C erhöht. Für die Gene SE0184, SE1543 und SE2219 wurde die *annealing*-Temperatur auf 53 °C erhöht, aber das Protokoll ansonsten beibehalten.

Die LightCycler Software 4.05 errechnet über die Fluoreszenz der Probe mit der 2. Ableitung des Maximums einen Cp-Wert, der den Zyklus darstellt, in dem die Fluoreszenz der jeweilige Probe aus dem Hintergrund tritt. Dieser wird zur weiteren Quantifizierung genutzt. Das Modul der Software zur relativen Quantifizierung ermittelt das Verhältnis der *target*-Konzentration zur Konzentration der jeweiligen Referenzprobe. Außerdem wurde der PCR-Lauf auf einen Kalibrator normiert. Diese Probe wurde für jedes Primerpaar in jedem Lauf zusätzlich mitgeführt. Des Weiteren diente der Berechnung die wahre Effizienz der PCR der verschiedenen PCR-Ansätze.

Um die Effizienz der Primerpaare zu bestimmen wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe einer cDNA hergestellt (1:2 bis 1:256) und diese für die PCR analog zu den in Tabelle 5-3 dargestellten Ansätzen, eingesetzt. Die Software konnte diese Informationen nutzen, um eine Regressionsgerade zu erstellen, deren Anstieg die Effizienz der jeweiligen Primer darstellte. Weiterhin wurde die Signifikanz der Beobachtungen durch einen Standard-t-Test ( $p > 0,05$ ) berechnet.

## 5.6 Arbeiten mit Proteinen

### 5.6.1 Proteinüberexpression

Mit der Proteinüberexpression wurde infolge einer induzierten Proteinsynthese in der Zelle die erhöhte Konzentration eines rekombinanten Proteins erzielt. Es wurden 3 l LB-Medium (100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin) mit einer Vorkultur des Vektor-tragenden *E. coli* BL21 Stammes auf eine  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  0,05 inokuliert und bei 37 °C und 150 Upm kultiviert. Nach Erreichen einer Zelldichte von  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  0,6 wurde zur Induktion der Expression des rekombinanten Proteins, Arabinose zugegeben (0,02 % Endkonzentration). Die Bakterien wurden unter gleich bleibenden Bedingungen weitere 3 h kultiviert. Die Zellen wurden anschließend auf Eis geerntet und durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und  $3220 \times g$  pelletiert.

### 5.6.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Das Zellpellet wurde in 30 ml Lysispuffer aufgenommen. Der Zellsuspension wurden 3  $\mu\text{l}$  DNase I, 20  $\mu\text{l}$  Lysozym (10 mg/ml), 10  $\mu\text{l}$  Proteaseinhibitor (25x complete mini) und 30  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (Endkonzentration 1 mM) hinzugefügt. Nach 30 min Inkubation auf Eis unter leichtem Schütteln wurden die Zellen durch dreimaliges Sonifizieren für 30 s mit einer Amplitude von 70 % und jeweils 30 s Pause aufgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 11000 Upm und 4 °C für 45 min sedimentiert (J2-21). Zusätzlich wurde der Überstand durch Filter mit einer Porengröße von 0,22  $\mu\text{m}$  filtriert. Der so gewonnene Überstand, mit der darin enthaltenen löslichen Proteinfraction, wurde durch Affinitätschromatographie über 1 ml Bio-Scale Mini Profinity IMAC Säulen aufgereinigt. Die rekombinanten Proteine wurden mit einem N-terminalen 6xHis-tag versehen, der mit Metallionen auf der Säulenmatrix interagiert. Dazu wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen (SV) Lysispuffer equilibriert bevor mittels einer peristaltischen Pumpe die Proteinlösung (2 ml/min) über die Säule lief. Im Anschluss wurde die Säule mit 6 SV Lysispuffer und 6 SV Waschpuffer gewaschen, um

unspezifisch gebundene Proteine zu verdrängen. Das rekombinante Protein wurde dann mit 10 SV Elutionspuffer von der Säule eluiert und in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Die Eluate wurden auf einer SDS-PAGE (5.6.8) aufgetrennt und diese 10 min unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur mit Coomassie gefärbt. Das Entfärben der Gelmatrix erfolgte über Nacht unter den gleichen Bedingungen. Eluate mit großer Menge Protein und ohne sichtbare Verunreinigung wurden mittels Amicon Ultra 4 5k aufkonzentriert und umgepuffert, da Imidazol durch die Poren des Filters nicht aufgehalten wurde. Bevor die Proteine bis zur weiteren Nutzung bei 4 °C gelagert wurden, wurde der Proteingehalt bestimmt (5.6.7).

Die Proteine BarA, BarB und  $\sigma^B$  konnten unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden. RsbU wurde nach dem gleichen Protokoll aufgereinigt, allerdings wurde mit denaturierenden Puffern (6 M Harnstoff) gearbeitet.

Die Säulen wurden nach der Aufreinigung chaotrop gereinigt, indem sie mit 2 SV Wasser, 5 SV 6 M Guanidin-HCl und nochmals 2 SV Wasser gespült wurden. Bis zur nächsten Nutzung wurden die Säulen in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert. Eine Säule wurde immer nur für das gleiche Protein wieder verwendet.

Lysispuffer	300 mM	KCl
	50 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	5 mM	Imidazol
Waschpuffer	300 mM	KCl
	50 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM	Imidazol
Elutionspuffer	300 mM	KCl
	50 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	250 mM	Imidazol

Denaturierende Puffer waren ebenso zusammengesetzt und enthielten zusätzlich 6 M Harnstoff.

Coomassie	800 ml	Methanol
	140 ml	Essigsäure
	2 g	Coomassie brilliant blue G250
	ad 2 l	A. dest

Die Entfärberlösung war ebenso zusammengesetzt, aber enthielt kein Coomassie.

### 5.6.3 Probennahme der *S. epidermidis* Zellen zur Proteinaufreinigung

Zellen zur Proteingewinnung wurden aus einer 250 ml TSB Hauptkultur zu verschiedenen Zeitpunkten entlang der Wachstumskurve entnommen. Für die Probe in der logarithmischen Phase wurden nach 5,5 h Wachstum 50 ml Kultur

entnommen. Nach 24 h wurden 30 ml für die Probe aus der spätstationären Phase des Wachstums geerntet. Alle Proben wurden sofort auf Eis gekühlt und für 15 min bei 4 °C und 3220 ×g zentrifugiert. Die Pellets wurden zweimal mit 10 ml TE-Puffer (5.5.1) gewaschen. biofilmpositive Stämme wurden zur vollständigen Auflösung der Pellets für 20 s bei einer Amplitude von 70 % sonifiziert. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand vollständig entfernt und die Pellets bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Zur Gewinnung der extrazellulären Proteine wurde der Überstand der verschiedenen Proben nicht verworfen, sondern wenn nötig ein weiteres Mal zentrifugiert und daraus die Proteine gefällt (5.6.5).

#### **5.6.4 Aufreinigung intrazellulärer Proteine**

Die gewaschenen Zellpellets (5.6.3) wurden in 1 ml TE-Puffer (5.5.1) aufgenommen und in Lysing-Matrix-B-Röhrchen überführt. Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte im Precellys 24 bei 6800 Upm für 30 s. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt und die Glas-beads durch Zentrifugation bei 25200 ×g für 25 min sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugationsgefäß überführt und nochmals bei 25200 ×g und 4 °C für 45 min zentrifugiert. Der Überstand mit dem löslichen Protein wurde vorsichtig in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und nach der Konzentrationsbestimmung (5.6.7) bei -20 °C gelagert.

#### **5.6.5 Aufreinigung extrazellulärer Proteine**

Der zellfreie Überstand der Bakterienkulturen (5.6.3) wurde mit frisch angesetzter 100 % TCA (Endkonzentration 5 %) über Nacht bei 4 °C gefällt. Am folgenden Tag wurden die gefällten Proteine durch Zentrifugation bei 3200 ×g sedimentiert. Das Pellet wurde zweimal mit 20 ml und zweimal mit 10 ml 100 % eiskaltem Ethanol gewaschen. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 10 ml 70 % eiskaltem Ethanol. Der Überstand wurde vorsichtig vollständig abgenommen und das Pellet komplett getrocknet bevor es in 1 ml 8 M Harnstoff / 2 M Thioharnstoff aufgenommen wurde. Bevor die Proteinlösung bei -20 °C gelagert wurde, wurde die Konzentration (5.6.7) bestimmt.

#### **5.6.6 Herstellung polyklonaler Antiseren**

Um die Möglichkeit zu haben, die Proteine BarA, BarB, SigB und RsbU in Western Blot Analysen nachweisen zu können, wurden polyklonale Antiseren in Kaninchen generiert. Dazu wurden 100 µg der aufgereinigten rekombinanten

Proteine genutzt, um Hasen zu immunisieren (Versuchsnummer/A10/06). Die erste Proteingabe erfolgte 1:1 in vollständigem Freundschens Adjuvans. Ca. 4 Wochen später wurden die Kaninchen ein weiteres Mal mit 100 µg Protein immunisiert, wobei dieses 1:1 mit unvollständigem Freundschens Adjuvans verdünnt wurde. Nach 4 Wochen wurde eine Serumprobe entnommen und als Antiserum für eine Western Blot Analyse (5.6.9) getestet. Dazu wurden jeweils 10 µg Gesamtzellprotein von *S. epidermidis* 1457 und einer entsprechenden Mutante genutzt und das Antiserum in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt (1:500 – 1:10000). Waren die spezifischen Banden in der 1:5000 Verdünnung noch gut erkennbar, wurden die Hasen entblutet und das gesamte Blut zur Gewinnung des Serums (Überstand nach 15 min Zentrifugation bei 3220 ×g) verwendet. War das Antiserum noch nicht ausreichend reaktiv, wurden weitere Immunisierungen in unvollständigem Freundschens Adjuvans vorgenommen, bis eine ausreichende Reaktivität gegeben war.

Mit den polyklonalen Antiseren wurden viele unspezifische Reaktionen detektiert. Um dies zu minimieren, wurden die Seren gegen die entsprechenden Proteine aufgereinigt. Dabei wurden in einem ersten Schritt die rekombinanten Proteine kovalent an HiTrap NHS-aktivierte HP-Säulen gebunden. Das Protein wurde in Bindepuffer auf eine Konzentration von ca. 0,5 mg/ml verdünnt. Bevor der Ligand auf der Säule für 30 min inkubiert wurde, wurde die Säule dreimal mit 2 SV eiskalter HCl (1 mM) gewaschen. Im Anschluss wurde die Säule mit 6 SV Blockpuffer und weiter mit 6 SV Waschpuffer gespült. Diese Schritte wurden dreimal wiederholt, wobei die Blocklösung in der zweiten Wiederholung für 30 min auf der Säule inkubiert wurde, um überschüssige aktive Gruppen zu inaktivieren. Zur Lagerung und weiteren Verwendung der Säule wurden 2-5 SV des Bindepuffers injiziert. Vor der ersten Aufreinigung eines Antiserums wurde ein Leerlauf mit 2 SV Bindepuffer II und 3 SV Elutionspuffer durchgeführt. 10 SV Bindepuffer II dienten zur Equilibrierung der Säule bevor das Antiserum mit 0,5 ml/min über die Säule lief. Unspezifisch festgehaltene Proteine wurden mit 10 SV Bindepuffer entfernt und spezifisch gebundene Antikörper mit 3 SV Elutionspuffer eluiert, der in 1 ml Fraktionen auf 30 µl 1 M Tris/HCl pH 9,0 aufgefangen wurde. Die Säule wurde sofort mit 10 SV Bindepuffer II reequilibriert.

Die drei Fraktionen wurden, wie auch oben für die Testseren beschrieben, in Western Blot Analysen getestet und die zur Nutzung bestmögliche Verdünnung ermittelt. Die Antikörperlösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Bindepuffer	0,2 M NaHCO <sub>3</sub> 0,5 M NaCl pH 8,3
Blockpuffer	0,5 M Ethanolamin 0,5 M NaCl pH 8,3
Waschpuffer	0,1 M Acetat 0,5 M NaCl pH 4,0
Bindepuffer II	0,02 M N <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 M NaCl pH 7,4
Elutionspuffer	0,1 M Glycin pH 3,0

### 5.6.7 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinproben wurde mit Hilfe der Bradfordreagenz (Quick Start™ Bradford dye reagent) bestimmt. Diese Methode beruht auf der Bindung von Proteinen an Coomassie Brillantblau G-250, wodurch sich im sauren Milieu das Absorptionsmaximum von  $\lambda = 465$  nm (ohne Protein) nach  $\lambda = 595$  nm (mit Protein) verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei letzterer Wellenlänge ist das Maß für den Proteingehalt.

Hierzu wurden 1 ml Bradfordreagenz und 20  $\mu$ l Proteinextrakt durch starkes Vortexen gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde dann bei 595 nm gemessen (SmartSpec™ Plus Spectrophotometer). Zur Ermittlung der Konzentrationswerte wurde eine Eichgerade ( $y = 0,8918x + 0,0425$ ) genutzt, die zuvor mit BSA erstellt wurde.

Zur Quantifizierung von Proteinextrakten, die zur 2D-Gel-Analyse genutzt wurden, musste eine genauere Konzentrationsbestimmung vorgenommen werden. Hierzu wurde Roti®-Nanoquant genutzt, welches ebenfalls nach dem Prinzip von Bradford funktioniert. Das fünffache Konzentrat wurde mit A. dest verdünnt. Davon wurden 800  $\mu$ l gemischt mit 200  $\mu$ l der in A. dest verdünnten Probe. Am Photometer wurde die Adsorption in 1 ml Küvetten bei 450 nm und 590 nm bestimmt (Ultraspec™ 3100 pro). Der sich daraus ergebende Quotient sollte immer bei 0,8 liegen, um den Fehler, den photometrische Messungen bergen, zu minimieren. Dies führte dazu, dass bei verschiedenen Messungen auch unterschiedliche Volumina der Proteinproben in den 200  $\mu$ l enthalten waren. Dieser Faktor musste in der

Berechnung der Konzentration berücksichtigt werden, die ebenfalls durch eine zuvor mit BSA erstellte Eichkurve, erreicht wurde:

$$\text{Konzentration}[\mu\text{g} / \mu\text{l}] = \left( \left( \frac{\lambda_{590\text{nm}}}{\lambda_{450\text{nm}}} - 0,3864 \right) / 0,054845 \right) * Vd / x$$

Vd     Verdünnung in der die Probe eingesetzt wurde  
x       eingesetzte  $\mu\text{l}$ -Menge

### 5.6.8 Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel

Mit der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine in einer vertikalen Elektrophoresekammer nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Als Größenstandard diente ein Protein-Molekulargewichtsmarker der Firma Invitrogen (SeeBlue Plus2) oder Spectra MultiColor *broad range Protein ladder* (Fermentas). Die Proteinproben wurden mit 3x Probenpuffer nach Laemmli (Laemmli, 1970) versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min bei 95 °C denaturiert. Es wurden ausschließlich Precast-Gele der Firma Invitrogen verwendet (NuPAGE Novex BisTris). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 150 V für ca. 1 h in 1x MES-Puffer (Power supply EV231).

3x Laemmli-Probenpuffer	15 % (v/v)	Glycerol
	1,5 % (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
	0,15 M	Tris, pH 6,8
	7,5 % (w/v)	SDS
	0,03 % (w/v)	Bromphenolblau

### 5.6.9 Western Blot Analyse

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Proteine aus einem SDS-Gel nach der Größentrennung bei 30 V für 1 h auf eine PVDF-Membran übertragen (Power supply EV231). Anschließend wurde die Membran für 30 min in Blotto equilibriert und der primäre Antikörper dazugegeben. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (gegen das nachzuweisende Protein gerichtet) erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht unter leichtem Schwenken. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal mit Blotto für etwa 10 Minuten gewaschen bevor der sekundäre Antikörper (gegen Hasen-IgG gerichtet), an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt war, zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken für 1 h. Nachdem der Western Blot nochmals mit Blotto gewaschen wurde und die Rückstände des Blottos durch dreimaliges kurzes Spülen mit A. bidest

entfernt wurden, wurde der Western Blot mit NBT/BCIP (5.2.4) entwickelt. Dazu wurde die Membran für 30 Minuten in AP-Puffer inkubiert, der anschließend verworfen wurden. Die Entwicklung erfolgte dann in 30 ml NBT/BCIP-Lösung. Die alkalische Phosphatase katalysiert die enzymatische Abspaltung der Phosphatgruppe von BCIP und es entsteht das entsprechende Indoxyl, welches zum Keton tautomerisiert und dimerisiert (blaues Indigo), wobei  $H^+$ -Ionen frei werden, die NBT zum purpurnen Difarmazan reduzieren. Beide Farbstoffe fallen in unmittelbarer Nähe der AP-Moleküle aus. Die Reaktion wurde bei ausreichender Farbentwicklung durch Zugabe von A. dest abgestoppt.

10x TBS	0,49 M	Tris pH 7,6
	9 % (w/v)	NaCl
Blotto	1x	TBS
	2,5 % (w/v)	Milchpulver
	20 mg/l	NaN <sub>3</sub>
	0,05 % (v/v)	TWEEN 20

### 5.6.10 Auftrennung von Proteinen über 2 Dimensionen

#### 5.6.10.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Die Proteinproben, die mit dieser Technik untersucht werden sollten, wurden nach 5,5 h und 24 h geerntet (5.6.3) und aufgereinigt (5.6.4). Die Konzentrationsbestimmung der Extrakte erfolgte mit Roti<sup>®</sup>-Nanoquant (5.6.7). 350 µg Protein wurden, wenn nötig, auf ein Volumen von etwa 20 µl eingeengt und anschließend in 360 µl Rehydratisierungslösung aufgenommen. Um eine bessere Lösung zu erhalten, wurden die Proben 20 min geschüttelt und anschließend für 5 min bei 21000 ×g und Raumtemperatur zentrifugiert, um ungelöste Bestandteile zu eliminieren. Die Proben wurden gleichmäßig in der Rehydratisierungskammer verteilt und der IPG-Streifen (17 cm, linearer pH-Gradient 4-7) mit der Gelseite nach unten auf die Lösung aufgelegt. Dabei wurde das Entstehen von Luftblasen vermieden. Die Rehydratisierung erfolgte über Nacht für ca. 15 h bei Raumtemperatur. Um ein Austrocknen der Streifen zu verhindern, wurden die Rehydratisierungskammern mit Parafilm abgedeckt.

Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) erfolgte in der Multiphor II *unit* bei 20 °C. Die rehydratisierten IPG-Streifen wurden mit einer Pinzette aus der Kammer entnommen und mit der Gelseite nach oben in die Vertiefungen des Trägers der

Multiphor II *unit* gelegt. Die Streifen wurden so positioniert, dass die anodischen Enden in einer Linie abschlossen. Sowohl über die anodischen als auch über die katodischen Enden der Streifen wurde ein mit 0,5 ml A. bidest getränkter 11 cm langer Elektrodenstreifen gelegt, so dass der Elektrodenstreifen Kontakt zur Gelfläche aller IPG-Streifen hatte. Auf diese Fläche wurden die Elektroden aufgesetzt und deren Kontakte wurden mit dem Transformator verbunden. Anschließend wurden die IPG-Streifen mit Mineralöl überschichtet. Die IEF erfolgte nach folgendem Protokoll:

Schritt 1	500 V (Gradient)	2 mA	5 W	für 2 Vh
Schritt 2	3500 V (Gradient)	2 mA	5 W	für 3 kVh
Schritt 3	3500 V	2 mA	5 W	für 23,5 kVh

Nach ca. 8 h war die IEF beendet und die IPG-Streifen wurden mit Pinzetten aus dem Träger gehoben und seitlich auf ein Filterpapier gestellt, um das überschüssige Öl zu entfernen. Die Streifen wurden sofort für die zweite Dimension verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Rehydratisierungslösung	100 mg	CHAPS
	30 mg	DTT
	8 M	Harnstoff
	2 M	Thioharnstoff
	52 µl	Ampholyte 3-10

#### 5.6.10.2 Zweite Dimension: Gelelektrophorese

Die in der IEF separierten Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht in 12,5 %igen Acrylamid- und 2,6 %igen Bisacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gele wurden im Protean®plus Dodeca™Cell Gelsystem gegossen. Dazu wurde die Kammer bis etwa einen cm unter der Glaskante mit der Trenngellösung befüllt, dabei wurden Luftblasen möglichst vermieden. Die Gele wurden dann unverzüglich mit 1 ml A. dest überschichtet, um gerade Gelkanten zu erhalten. Die Polymerisation der Gele dauerte mindestens 3 h. Danach wurde das Wasser abgekippt und die Gelkanten mit A. dest gespült. Anschließend wurde die Sammelgellösung auf die Gele bis zur Glaskante gegeben. Dies wurde wiederum mit 1 ml A. bidest überschichtet. Die Polymerisation erfolgte innerhalb einer Stunde. Bevor die fertigen Gele genutzt wurden, wurde kontrolliert, ob die Kanten gerade und keine Luftblasen im Gel zu finden waren.

Die IPG-Streifen mussten vor dem Lauf equilibriert werden. Dazu wurden die Streifen mit der Gelseite nach oben in Equilibrierungsschalen gelegt und mit je 4 ml Äqui-Lösung A für 20 min geschwenkt. Anschließend wurde der Vorgang mit Äqui-Lösung B wiederholt.

Die equilibrierten Streifen wurden zwischen die Glasplatten mit den Gelen gelegt und mit einem Spatel vorsichtig auf das Sammelgel geschoben. Die Enden der Streifen wurden jeweils mit einem Tropfen 2 %iger Agarose fixiert. Die Gele wurden dann in der mit Laufpuffer gefüllten Kammer positioniert und der Lauf erfolgte bei konstanter Leistung (19 W) und konstanter Temperatur (12 °C) über ca. 16 h (PowerPac 3000).

Trenngellösung	335,3 ml	40 % Acrylamid
	179 ml	2 % Bis-Acrylamid
	272,54 ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
	11,48 ml	10 % SDS
	300 ml	A. bidest
zur Polymerisation wurden vor dem Gießen 2,8 ml 10 % APS und 0,55 ml TEMED zugefügt		
Sammelgellösung	10,8 ml	40 % Acrylamid
	3,4 ml	2 % Bis-Acrylamid
	30 ml	4x upper buffer
	76 ml	A. bidest
zur Polymerisation wurden vor dem Gießen 0,44 ml 10 % APS und 0,066 ml TEMED zugefügt		
4x upper buffer	0,4 % (w/v)	SDS
	0,5 M	Tris/HCl pH 6,8
Äqui-Lösung	36 g	Urea
	10 ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
	30 ml	Glycerol
	40 ml	10 % SDS
	ad 100 ml	A. bidest
für Lösung A werden in 50 ml Äqui-Lösung 175 mg DTT zugefügt; für Lösung B werden auf 50 ml 2,25 g Iodacetamid und eine Spur Bromphenolblau zugefügt		

10x Laufpuffer	150 g	Tris
	720 g	Glycin
	50 g	SDS
	ad 5 l	A. dest

### 5.6.10.3 Proteinidentifikation und Analyse

Nach der Elektrophorese wurden die Gele von den Glasplatten entfernt und in Coomassie-Lösung für ca. 18 h gefärbt. Durch viermaliges 30minütiges Spülen mit A. dest wurden die Gele wieder entfärbt und die Proteinspots wurden sichtbar.

Anschließend wurden die Gele in Folien eingeschweißt und am Scanner X finity ultra im *transmission* Modus mit 200 dpi gescannt. Bis zur weiteren Nutzung wurden die Gele bei 4 °C gelagert.

Die Gelbilder wurden in die Software Delta 2D (Decodon) importiert, in der alle Bilder fiktiv in einem Fusionsgel zusammengefügt wurden und darauf eine Spotmaske erstellt wurde. Die *dual-channel-imaging* Technik ermöglichte es unterschiedlich exprimierte Proteinspots im Vergleich zweier Mutanten darzustellen. Für jede Mutante lagen für jeden Zeitpunkt 3 Gele unabhängiger biologischer Replikate vor, die zur Berechnung der Änderungen der Proteinspot herangezogen wurden. Die Software ermöglichte eine Quantifizierung der Spots und berechnete über einen t-Test ( $p < 0,01$ ) signifikante Änderungen der Spotintensitäten. Manuell wurden Spots aus der Analyse ausgeschlossen, die unterhalb einer zweifachen Änderung signifikant waren. Spots, die in der Massenspektrometrie identifiziert werden sollten, wurden aus Gelen mit möglichst hohem Spotvolumen mit dem Proteom Work™ mit einem 2 mm Kopf ausgestochen. Dazu wurden zuvor Picklisten in Delta 2D erstellt, die dem *cutter* die Koordinaten der Spots lieferten.

Die ausgestochenen Spots wurden zur weiteren Bearbeitung in 96 *well* Platten transferiert. Der Verdau der Proteine mit Trypsin und das danach folgende Spotten der Peptide auf die MALDI *targets* wurde automatisiert an der Spot Handling Workstation durchgeführt. Dabei wurden die Gelstücke zweimal mit 100 µl 50 mM Ammoniumbikarbonat / 50 % Methanol für 30 min und einmal mit 100 µl 75 % (v/v) Acetonitril für 10 min gewaschen. Nach 17minütigem Trocken wurden 10 µl Trypsinlösung (20 ng/µl in 2 mM Ammoniumcarbonat) auf den Proteinspot gegeben. Der Verdau erfolgte für 120 min bei 37 °C. Zur Peptidextraktion wurden die Gelstücke mit 60 µl 50 % (v/v) Acetonitril / 0,1 % (w/v) TFA bedeckt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in eine

neue Mikrotiterplatte überführt und die Extraktion mit 40 µl wiederholt. Die Proteinlösung wurde bei 40 °C für 220 min vollständig eingetrocknet und anschließend in 2,2 µl 0,5 % (w/v) TFA / 50 % Acetonitril gelöst. 0,7 µl dieser Lösung wurden direkt auf das MALDI *target* gespottet und dort mit 0,4 µl der Matrixlösung gemischt. Vor der Messung der Proben im MALDI-TOF wurde das *target* für 10 – 15 min getrocknet.

Die MALDI-TOF-MS-Analyse erfolgte im Proteom Analyser 4700. Die Spektren wurden im Reflektor-Modus in einem Massenbereich von 900 bis 3700 Da aufgenommen. Die Peaklisten wurden mit dem *peak to mascot* Script der 4700 Explorer™ Software mit folgenden Einstellungen erstellt:

Massenbereich	900 – 3700 Da
Peakdichte	50 / 200 Da
minimaler Bereich von	100 und
maximal	200 peaks / Proteinspot
minimale <i>Signal to noise ratio</i> von	6

Die Peaklisten wurden mit Hilfe des *mascot search engine* (Matrix Science) mit der Organismus-spezifischen Fusionsdatenbank aus den Genomen von *S. epidermidis* 12228 und *S. epidermidis* RP62A (NC\_004461, NC\_005003, NC\_005008) verglichen. Peptidmixe, die zweimal einen *mowse score* von mindestens 49 und eine Sequenzübereinstimmung von mindestens 30 % aufzeigten wurden als positiv identifiziert gewertet.

Coomassie-Lösung	40 ml	85 % o-Phosphorsäure
	40 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	0,48 g	Coomassie Blue G-250
	ad 360 ml	A. dest
	die Lösung wurde gerührt und 30 min vor Nutzung wurden 100 ml Methanol hinzugefügt	
Matrixlösung	50 % (v/v)	Acetonitril
	0,5 %	TFA (gesättigt mit CHCA)

## 5.7 Computerbasierte Analyse

### 5.7.1 Blast-Suchen und Alignments

Die Sequenz aller Proteine und Gene wurden von der TIGR-Webseite bezogen (<http://www.tigr.org>). Mit den entsprechenden Sequenzen wurden Blast-Suchen auf dem NCBI-Server (Altschul *et al.*, 1997) und auf dem ExPASy Proteomics Server des Swiss Institute of Bioinformatics (Gasteiger *et al.*, 2003) durchgeführt. Mit Hilfe des ClustalW-Programms auf dem EBI-Server wurden die Alignments erstellt (Thompson *et al.*, 1994). Arbeiten in DNA-Sequenzen und theoretische Pasmidkonstruktionen wurden mit der Software Vektor NTI 10 (Invitrogen) durchgeführt.

## 6 Ergebnisse

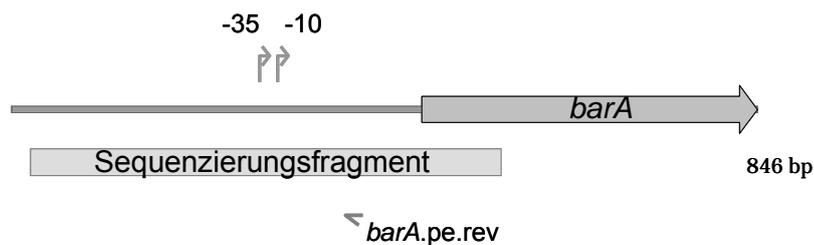
### 6.1 Nachweis des $\sigma^B$ abhängigen Promotors strangaufwärts von *barAB*

Aus einer dieser Arbeit vorhergegangenen Promotorkonsensusuche war bekannt, dass sich stragaufwärts von *barA* ein putativer  $\sigma^B$  abhängiger Promotor befindet (Knobloch *et al.*, 2003). Dieser sollte experimentell nachgewiesen werden. Dazu wurden zwei unterschiedliche Techniken genutzt. Zum einen die Primer Extension Analyse und zum anderen ein Kit, das von der Firma Roche (RACE kit, 2nd Generation) angeboten wird zur Kartierung von 5' und 3' Enden beliebiger mRNAs.

#### 6.1.1 Nachweis mittels Primer Extension Analyse

Die Primer Extension Analyse basiert auf der Verlängerung eines markierten spezifischen Primers, die am Anfang der mRNA abbricht und in einer markierten cDNA resultiert. Gleichzeitig wird der Primer für eine Sequenzierungsreaktion genutzt, die zusammen mit dem markierten cDNA auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen wird. Dadurch lässt sich anhand der Größe der Startpunkt der mRNA auf dem Gel ablesen.

Der Primer *barA.pe.rev* wurde mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP und der PNK radioaktiv markiert. Dieser wurde dann für die Hybridisierungsreaktion mit der cDNA eingesetzt (Abbildung 6-1). Der gleiche Primer wurde für die vier Sequenzierungs-reaktionen genutzt.

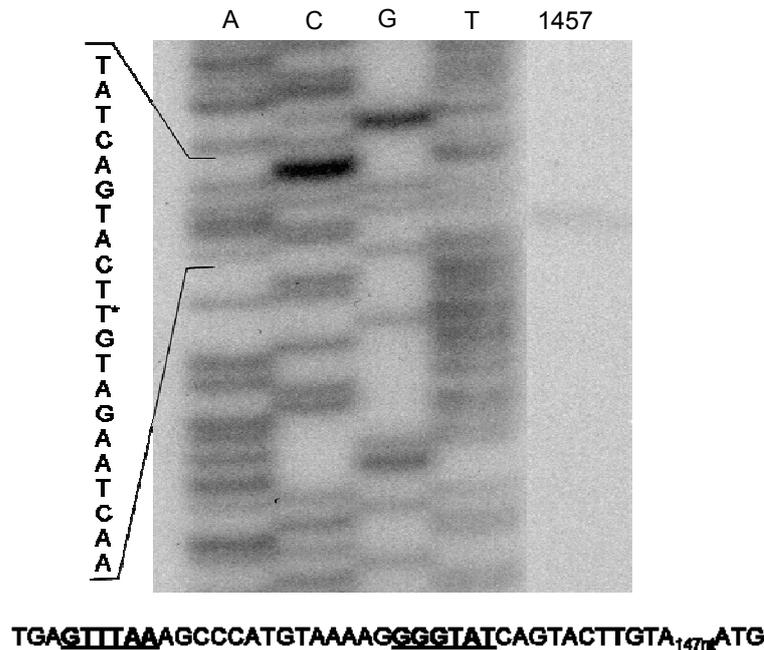


**Abb. 6-1** Schematische Darstellung der Primer Extension Analyse

Dargestellt ist ein Ausschnitt des *S. epidermidis* Genoms mit dem Gen *barA* (GenBank ID AAO05928). Die Pfeile kennzeichnen die -10 und -35 Regionen des putativen  $\sigma^B$  abhängigen Promotors. Das Sequenzierungsfragment (656 bp) wurde in einer PCR-Reaktion aus dem Genom von 1457 amplifiziert und diente als *template* für den markierten Primer *barA.pe.rev*, der sowohl für die Primerverlängerung als auch für die Sequenzierung genutzt wurde.

Nachdem die Proben der Größe nach auf einem Gel aufgetrennt wurden, wurden die radioaktiven Banden mit Hilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht (Abbildung 6-2). Die Analyse konnte den putativen Promotor bestätigen. Mit einer -10 Region GGGTAT und einer -35 Region GTTTAA entspricht er exakt der Konsensussequenz

für  $\sigma^B$  abhängige Promotoren, die für *S. aureus* beschrieben wurde (Homerova *et al.*, 2004).



**Abb. 6-2** Primer Extension für *barA*

(A) Gezeigt ist die Auftrennung der Sequenzierungsreaktionen (A C G T) und der Primerverlängerungsreaktion (1457) in einem Harnstoff-Acryamidgel. Die Sequenz des Größenbereiches der markierten cDNA ist dargestellt und der putative Startpunkt gekennzeichnet (\*). (B) Die Sequenzen der -10 und -35 Regionen des Promotors (fett und unterstrichen) liegen 14 Nukleotide voneinander entfernt. Weitere sieben Nukleotide strangabwärts liegt der vermutete Startpunkt, der in einer Distanz von 151 Nukleotiden zum Startcodon von *barA* liegt.

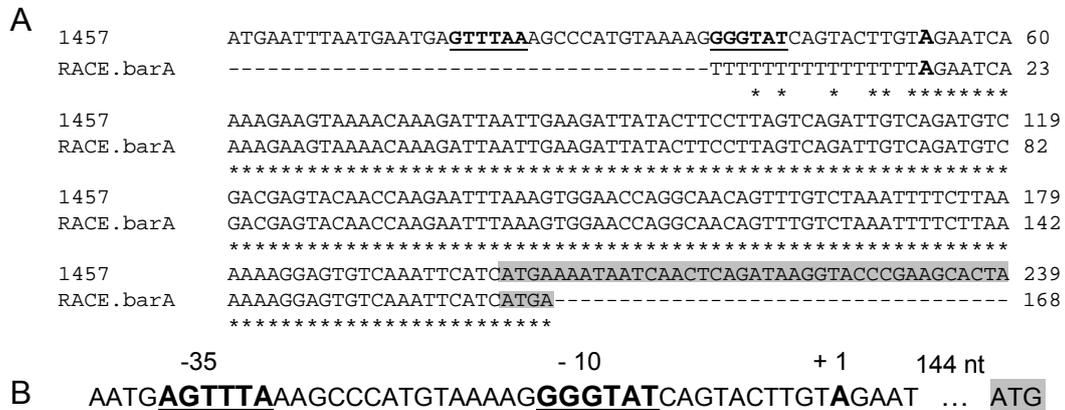
Die Methode lieferte nur eine ungefähre Startpunktkartierung der mRNA, da aufgrund der schwachen Auftrennung der Banden, die genaue Zuordnung der markierten cDNA zu einem Nukleotid nicht erreicht werden konnte. Deshalb wurde zur exakten Kartierung die RACE-Technologie als eine zusätzliche Methode genutzt.

### 6.1.2 Nachweis mittels RACE-Technologie

Bei der RACE-Technologie (*rapid amplification of cDNA ends*) wird die RNA mit einem genspezifischen Primer in eine cDNA umgeschrieben. Dieser wird an dem zu untersuchenden Ende ein polyA-Schwanz angehängt. Dies ermöglicht es in einer einfachen PCR-Reaktion mit einem polyT-Primer und dem genspezifischen Primer das 5' Ende der mRNA zu amplifizieren, welches dann zu einer Sequenzierung genutzt werden kann.

Mit Hilfe des Primers *frag5.barA.rv* wurde aus der Gesamtzell-RNA von *S. epidermidis* 1457 eine cDNA erstellt, die dem 5' Ende der mRNA von *barA*

entsprach. Der gleiche Primer wurde nach der polyA-Verlängerung in der PCR eingesetzt, um ein Fragment von ca. 250 bp zu amplifizieren. Nach der Aufreinigung des Fragmentes erfolgte die Sequenzierung mit dem Primer *barA.pe.rv* (Abbildung 6-3). Auch mit dieser Methode wurde der angenommene Promotor bestätigt.



**Abb. 6-3** 5' Kartierung mit RACE für *barA*  
 In Teil A der Abbildung ist das Alignment des in der RACE-Reaktion entstandenen Fragmentes mit der Genomequenz von 1457 dargestellt. Übereinstimmende Nukleotide sind gekennzeichnet (\*). Grau hinterlegt ist der codierende Bereich von *barA*. Der Transkriptionsstartpunkt ist fett gedruckt und der Promotorbereich unterstrichen. Teil B zeigt die Distanzen zwischen den Bereichen.

Es konnte ein genauerer Startpunkt ermittelt werden, der sich elf Nukleotide strangabwärts der -10 Region befand und 148 Nukleotide strangaufwärts des kodierenden Bereiches. Es konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der Startpunkt 10 Nukleotide entfernt von der -10 Region lag, da es sich bei diesem Nukleotid um ein T handelte und unklar war, ob dieses in der komplementären Sequenz schon zu dem polyA-Schwanz zu zählen war oder nicht.

## 6.2 Generierung polyklonaler Antiseren in Hasen

Um die Bedeutung der Proteine BarA und BarB näher zu untersuchen ist es notwendig die Proteine in zellulären Lysaten nachweisen zu können. Dazu werden Antikörper benötigt, die in dieser Arbeit generiert werden sollten. Des Weiteren sollten auch Antiseren gegen die Proteine RsbU und SigB hergestellt werden, um einen möglichen Zusammenhang der Regulation der verschiedenen Proteine nachweisen zu können.

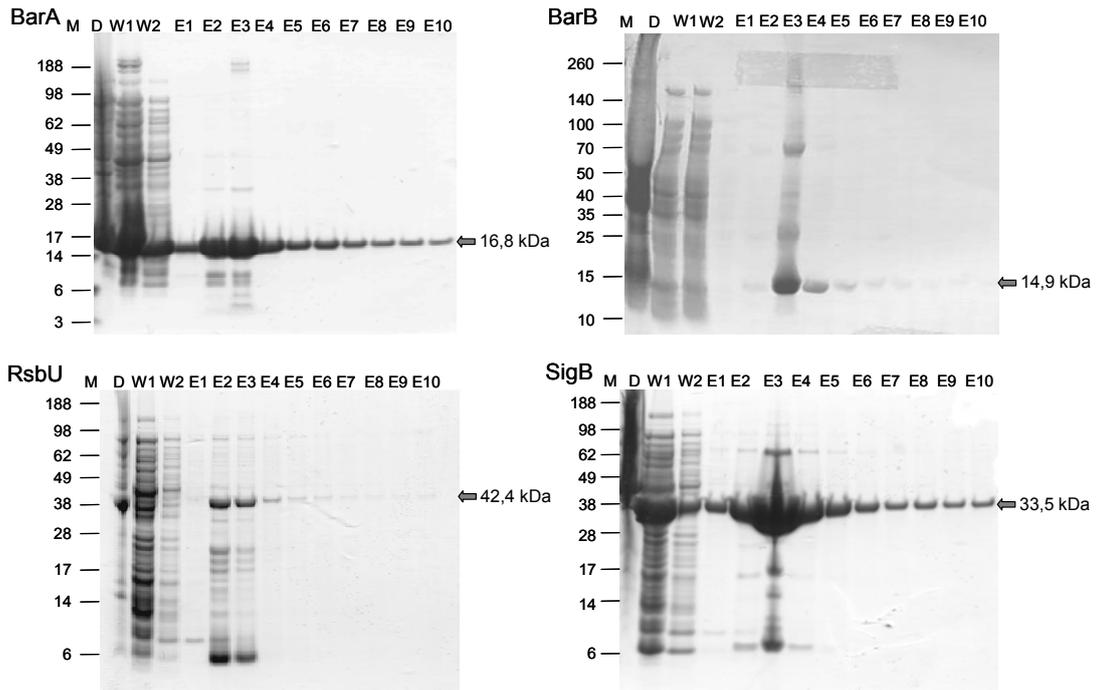
### 6.2.1 Überexpression der Proteine in *E. coli* BL 21 und Aufreinigung der His-tag Proteine mittels Affinitätschromatographie

Die kodierenden Sequenzen der Gene wurden mittels PCR so amplifiziert, dass sie *in frame* in den Vektor pDEST17 kloniert werden konnten, von dem die Gene

durch einem induzierbaren T7-Promotor expremiert wurden. Zusätzlich wurden die Proteine in diesem Vektor mit einem N-terminalen His-tag versehen, der ihre Aufreinigung über eine Affinitätschromatographie ermöglichte. Zunächst wurden die konstruierten Plasmide sequenziert, um die korrekte Klonierung zu prüfen. Die sequenzierten Fragmente wurden mit der Sequenz von *S. epidermidis* RP62A verglichen (Anhang I), da die vollständige Sequenz von *S. epidermidis* 1457 noch nicht in den Datenbanken zur Verfügung steht. Sowohl in der Sequenz von *barA* als auch in der Sequenz von *barB* wurde eine Punktmutation (Transition) festgestellt. Im Falle von BarA kam es zu einer Aminosäureveränderung von Glycin zu Aspartat. In BarB handelte es sich um eine stille Mutation. Die Sequenz von *rsbU* wies keine Fehler auf. Jedoch wurden sowohl eine Transition als auch eine Transversion in der *sigB*-Sequenz festgestellt. Dabei wurde ein Cystein zu einem Arginin und Glutamatsäure zu Histidin. Bei diesen Mutationen handelt es sich wahrscheinlich nicht um Fehler, sondern um individuelle Unterschiede zwischen den *S. epidermidis* Stämmen RP62A und 1457.

Anschließend wurden die Vektoren in *E. coli* BL21 AI transformiert, einen Stamm der aufgrund seiner Proteasedefizienz optimal geeignet ist für eine Überexpression. Weiterhin besitzt der Stamm das Gen für die T7-Polymerase unter einem Arabinose induzierbaren Promotor, sodass die Expression der Proteine durch Zugabe von Arabinose zum Wachstumsmedium angeschaltet werden konnte.

Nachdem die Kulturüberstände geerntet wurden, wurden die Zellen aufgeschlossen und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde dann aufgereinigt, alle Fraktionen aufgefangen und zur Kontrolle auf eine SDS-PAGE aufgetragen (Abbildung 6-4). Alle vier Proteine befanden sich im Überstand. Bei der Größenbestimmung der Proteine konnte nicht von der ursprünglichen Größe der nicht-markierten Proteine ausgegangen werden. Durch den His-tag und weitere Aminosäuren, die durch die Klonierung an die jeweiligen Proteine N-terminal angehängt wurden, war von einer Größenverschiebung auszugehen, die auch in der Auftrennung der Proteine beobachtet wurde (Tabelle 6-1).



**Abb. 6-4** Aufreinigung der His-tag-Proteine

Zur besseren Kontrolle der Aufreinigungen wurden auch Fraktionen der nicht an die Säule gebundenen Proteine (D) und der in den Waschschritten von der Säule gewaschenen Proteine (W1, W2) zusätzlich zu den Elutionsfraktionen 1 bis 10 (E1-10) auf SDS-PAGES (4-12 %) aufgetrennt. Die durch Coomassie dargestellten Proteinbanden fanden sich auf den zu erwartenden Größen der jeweiligen mit dem His-tag versehenen Proteine. Die Größe der Markerbanden (M) wurde in kDa dargestellt.

**Tab. 6-1** Größenveränderung der His-tag Proteine

Protein	ursprüngliche Größe	Größe des His-tag-Proteins
BarA	14 kDa	16,8 kDa
BarB	11,5 kDa	14,9 kDa
RsbU	38,4 kDa	42,4 kDa
SigB	29,4 kDa	33,5 kDa

BarA und SigB konnten in großen Mengen aufgereinigt werden, sodass ein Großteil der Proteine nicht mehr an die Säule binden konnte und in der Durchlaufprobe auf den 1D-Gelen zu sehen war. Außerdem ging zusätzlich ein erheblicher Teil der Proteine in den Waschschritten verloren. Trotzdem waren in den Elutionsfraktionen noch geraume Mengen an Protein vorhanden, die allerdings durch andere Proteine verunreinigt waren. Die Proteinmengen in den Elutionsfraktionen 4 und 5, in denen die Verunreinigungen stark ausgedünnt waren, reichten jedoch aus um eine Immunisierung der Hasen vornehmen zu können. Die Ausbeute der Aufreinigung von BarB war etwas geringer als die der Proteine BarA und SigB. Die Eluatfraktion 3 enthielt das meiste Protein, war allerdings auch durch weitere

Proteine verunreinigt. In Fraktion 4 war die Verunreinigung stark verdünnt und genug Protein für die Immunisierung enthalten. Die Aufreinigung von RsbU lieferte nur geringe Mengen an Protein, die zusätzlich stark verunreinigt waren. Nur durch eine weitere Aufreinigung der zusammengeführten Elutionsfraktionen konnte eine Proteinfraction hergestellt werden (Daten nicht gezeigt), die zur Immunisierung genutzt werden konnte.

### 6.2.2 Aufreinigung der Antiseren

Bevor das gesamte Antiserum eines Kaninchens gewonnen werden konnte, musste dessen Reaktivität geprüft werden. Erst nach einer zweiten Immunisierung waren große Mengen, der durch den Sekundärantikörper nachweisbaren, IgG Antikörper zu erwarten. Jede weitere Immunisierung sollte einen Anstieg der jeweiligen Antikörpertiter zur Folge haben. Daher wurden vor jeder weiteren Immunisierung die Antiseren in Western Blot Analysen (5.6.9) getestet (Daten nicht gezeigt). Das Antiserum gegen BarA wurde nach viermaliger Immunisierung des Hasen gewonnen. Hingegen konnte das BarB-Antiserum schon nach zweimaliger Immunisierung genutzt werden. Die Antiseren gegen RsbU und SigB konnten ebenfalls nach zwei Immunisierungen geerntet werden.

Da es sich bei den gewonnenen Antiseren um polyklonale Seren aus Tieren handelte, die nicht keimfrei gehalten wurden, fanden sich außer der spezifischen Bande für das jeweilige Protein noch eine große Anzahl weiterer unspezifischer Banden. Um eine möglichst saubere Detektion, ohne starken Hintergrund, der Proteine zu erreichen, wurden die Seren gegen das jeweilige Proteine aufgereinigt. Dazu wurde das Protein kovalent an eine NHS-aktivierte Säule gekoppelt und das Antiserum darüber gegeben. Dadurch gingen unspezifische Antikörper verloren und die spezifischen Antikörper konnten von der Säule eluiert werden. So konnte der Hintergrund für alle Antiseren minimiert werden, wenn auch kreuzreaktive Banden auf den Western Blots bestehen blieben (Daten nicht gezeigt).

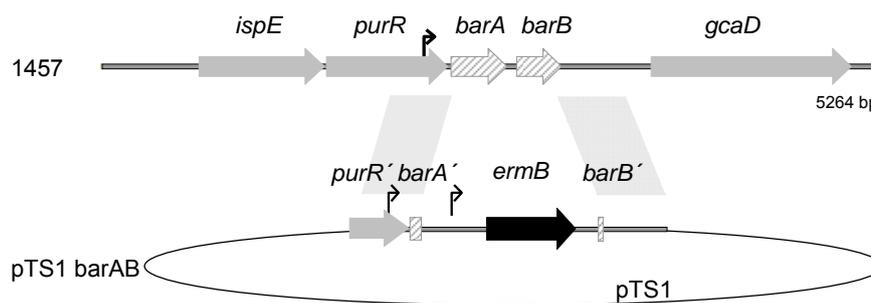
## 6.3 Etablierung der Deletionsmutanten des *purR*-Lokus in *S. epidermidis*

Die biofilmbegative *S. epidermidis* Mutante M12 trägt eine Transposoninsertion im *purR*-Gen. Es war bekannt, dass die Transposoninsertion zu einem Verlust der Transkription von insgesamt vier Genen führte. Dabei handelte es sich um *ispE*, *purR*, *barA* und *barB*. Da nicht geklärt werden konnte welcher Genverlust für den biofilmbnegativen Phänotyp von M12 verantwortlich war oder dies sogar auf einem

polaren Effekt der Transposoninsertion beruhte, sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit die Einzelgene des *purR*-Lokus gezielt inaktiviert werden. Des Weiteren sollten zwei Doppelmutanten generiert werden, in denen *ispE* in Zusammenhang mit *purR* und *barA* in Zusammenhang mit *barB* deletiert werden sollte. Eine Mutante mit der Deletion aller vier Gene sollte dem Vergleich zu der Transposonmutante dienen.

### 6.3.1 Generierung definierter Mutanten

Um definierte Gene selektiv inaktivieren zu können, wurde die Methode des homologen Genaustausches gewählt. Hierfür wurden 355 – 579 bp große Fragmente amplifiziert, welche das jeweilige zu deletierende Gen flankierten. Zwischen zwei solcher Fragmente wurde als Selektionsmarker für eine erfolgreiche homologe Rekombination eine Erythromycin-Resistenzkassette (*ermB*) in den temperatursensitiven *E. coli*/*Staphylococcus-shuttle*-Vektor pTS1opplac dest kloniert (Abbildung 6-5).



**Abb. 6-5** Schematische Darstellung des homologen Genaustausches von *barAB*. Die genomische Organisation in *S. epidermidis* 1457 ist dargestellt. Die flankierenden Bereiche der Gene wurden mit der Resistenzkassette in den pTS1-Vektor kloniert, in denen ein Doppel-*crossover* stattfinden soll.

Um eine Transkription der in Richtung 3' Ende liegenden Gene zu ermöglichen und die Bildung von *antisense*-RNA zu vermeiden, wurde die *erm* Kassette in positiver Orientierung in Bezug zu den umliegenden Genen kloniert. Der Vektor pTS1opplac dest hatte zusätzlich die *att sites* eines Gateway-Destinationsvektors und konnte somit direkt in der LR-Klonierung eingesetzt werden. Die in *E. coli* TOP 10 klonierten Plasmide wurden zunächst mittels Elektroporation in den restriktionsdefizienten *S. aureus* Stamm RN4220 transformiert. Nach der Passage in diesem Zwischenwirt konnten die Plasmide durch Elektroporation in *S. epidermidis* M15 transformiert und aus diesem Stamm durch Phagentransduktion mit  $\Phi 71$  in den eigentlichen Zielstamm *S. epidermidis* 1457 transduziert werden. Durch Kultivierung bei für den temperatursensitiven *shuttle*-Vektor nicht permissiven Temperaturen

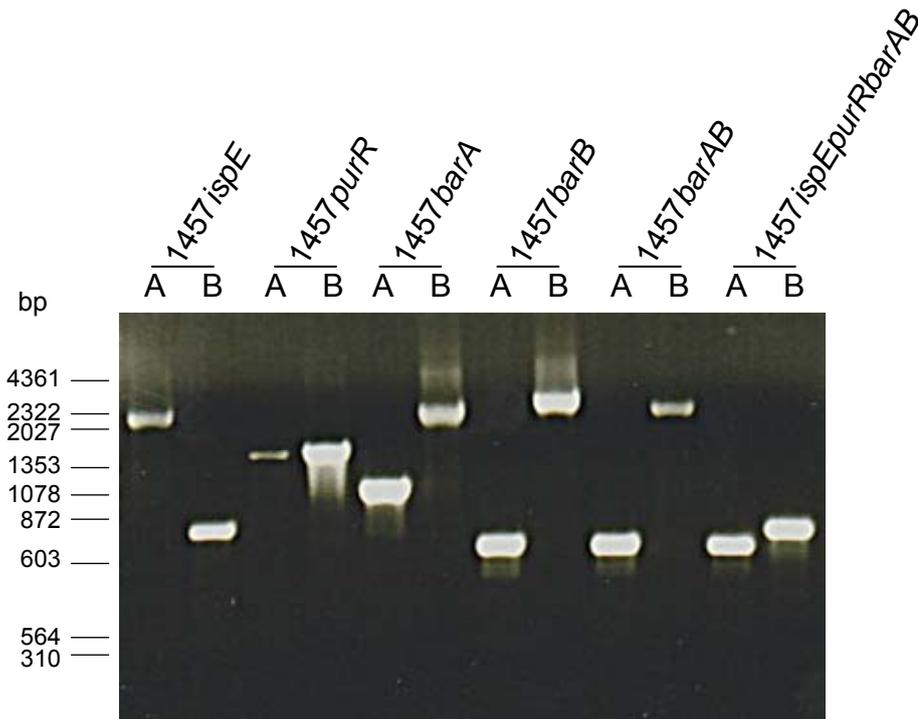
sollte dieser verloren gehen und durch entsprechende Antibiotikasupplementierung, die Mutanten mit einem erfolgreichen homologen Genaustausch selektioniert werden. Zur Kontrolle wurden die Klone zur Doppelselektion auf Erythromycin und Chloramphenicol ausgestrichen. Eine erfolgreich generierte Mutante zeichnet sich dabei durch eine Resistenz gegenüber Erythromycin und eine Chloramphenicol-sensibilität aus. Leider blieb der Vektor auch bei 45 °C in den Zellen erhalten, was durch ein Wachstum der Bakterien auch auf Chloramphenicol verdeutlichte. Deshalb wurden die klonierten Abschnitte aus den verschiedenen Plasmiden amplifiziert und in die *PstI/BamHI* Schnittstelle des temperatursensitiven *E. coli/Staphylococcus-shuttle*-Vektors pBT2 ligiert. Dieser wurde in gleicher Weise in 1457 eingebracht wie oben geschildert und die Mutagenese durchgeführt. Dieser Vektor wurde dabei erfolgreich aus den Zellen eliminiert.

Mittels PCR wurde die korrekte Insertion der *erm*-Resistenzkassette überprüft, wobei von den Primerpaaren ein Primer jeweils innerhalb der *erm*-Kassette lag und sich der andere Primer außerhalb der manipulierten Region befand. Die Größen der Amplifikate entsprachen den zu erwartenden Größen bei einer korrekten Insertion (Tabelle 6-2, Abbildung 6-6)

**Tab. 6-2** Zu erwartende Fragmentgrößen bei korrektem Genaustausch

Mutante	3'-Fragment	5'-Fragment
1457 <i>ispE</i>	2286 bp	751 bp
1457 <i>purR</i>	1456 bp	1599 bp
1457 <i>barA</i>	1072 bp	2476 bp
1457 <i>barB</i>	675 bp	2903 bp
1457 <i>barAB</i>	675 bp	2476 bp
1457 <i>ispEpurRbarAB</i>	675 bp	751 bp

Die 3'-Fragmente wurden mit den Primern *erm.fw* und *h.frag8.rv* amplifiziert, die 5'-Fragment mit den Primern *v.frag1.fw* und *erm.rv* (Tabelle 4-4).

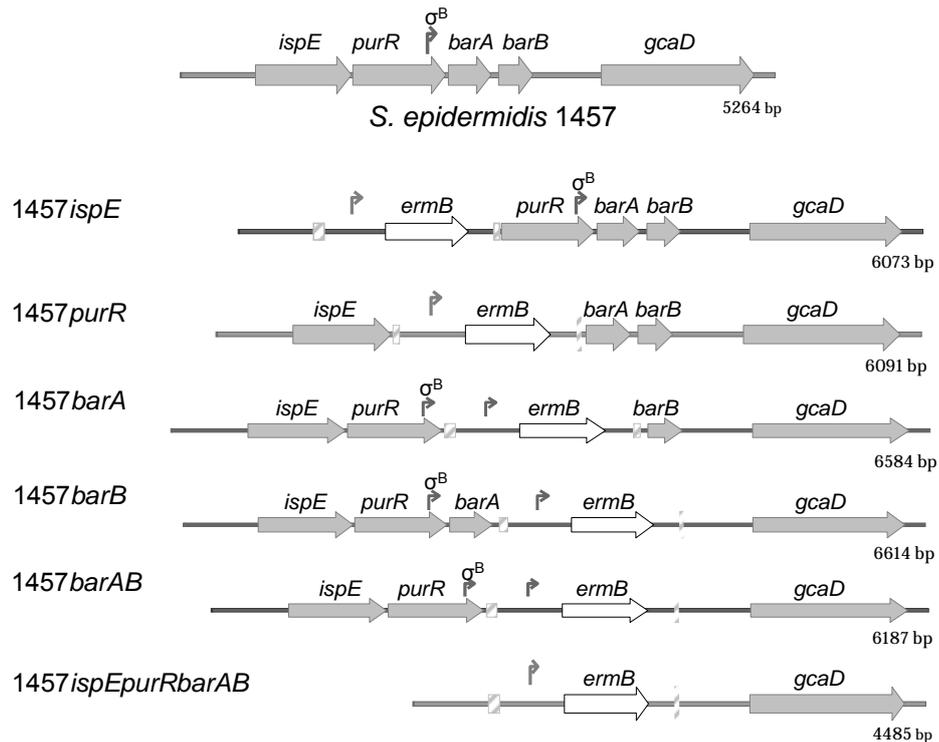


**Abb. 6-6** Fragmente zur Überprüfung der *erm*-Insertion

Es sind zwei PCRs für jede Mutante dargestellt. Im Ansatz A wurde der 3'-Bereich der Insertion bis in den Bereich hinter *barB* amplifiziert. Ansatz B ergab das 5'-Fragment der Insertion bis vor den manipulierten Bereich von *ispE*. Die Größe der Amplifikate entsprach der zu erwartenden Größe bei einer korrekten Insertion (Tabelle 6-2).

Um die Integrität der benachbarten Gene sicherzustellen, wurde der manipulierte Bereich aller Mutanten anschließend sequenziert. Alle überprüften Mutanten zeigten eine korrekte Insertion der Resistenzkassette ohne Veränderungen der flankierenden Gene (Anhang II).

Trotz wiederholter Versuche die Mutante *1457ispEpurR* herzustellen, gelang dieses Vorhaben nicht. Es steht fest, dass die Deletion der Gene nicht letal für die Zellen ist, da diese in anderen Mutanten etabliert werden konnten. Daher bleibt unklar, warum die Doppelmutante nicht generiert werden konnte. Es wurden sechs Deletionsmutanten erfolgreich etabliert, deren genetische Organisation (Abbildung 6-7).



**Abb. 6-7** Genetische Organisation der Deletionsmutanten  
 Gezeigt ist die Anordnung der Gene in *S. epidermidis* 1457 und die *erm*-Insertionen und die resultierenden Verlust einzelner Gene in den verschiedenen Mutanten. Gene und Promotoren sind gekennzeichnet, verbliebene Genfragmente sind gestreift dargestellt.

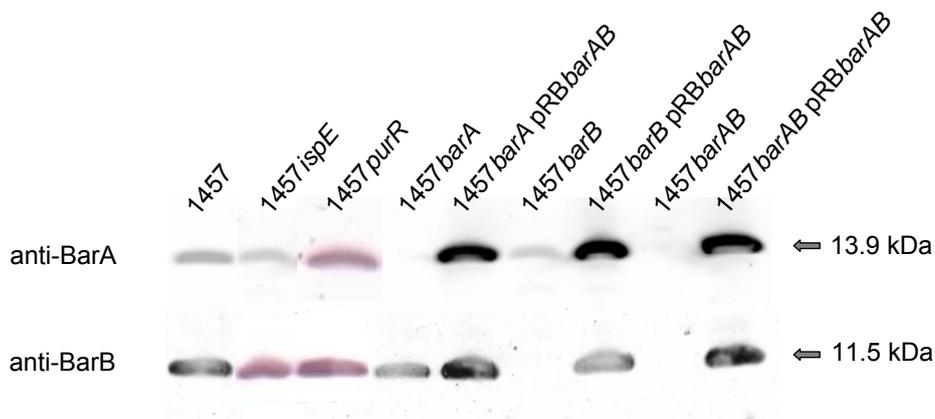
### 6.3.2 Komplementierung der Mutanten

Aus einer vorhergegangenen Doktorarbeit (Bartscht, 2001) standen Vektoren zur Verfügung, die die Gene *barA* und *barB* unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors trugen. Ein weiterer Vektor, pRB-*barAB* trug beide Gene unter deren nativem  $\sigma^B$  abhängigem Promotor. Die Plasmide wurden mittels Elektroporation und Phagentransduktion über *S. aureus* RN4220 in die Mutanten eingeschleust. Durch eine PCR mit den Primern pRB.fw und pRB.rv, die sich an einen Abschnitt der Vektoren anlagerten, der allen gemeinsam war, konnte geprüft werden, ob die Stämme die jeweiligen Plasmide trugen. Mit Plasmiden, die nur eines der beiden Proteine konstitutiv exprimierten, konnte keine Rekonstitution der Biofilmbildung beobachtet werden (Daten sind nicht gezeigt). Mutanten, die mit dem Plasmid pRB-*barAB* komplementiert wurden, wiesen wieder einen biofilmpositiven Phänotyp auf (6.4.2). Ferner konnte die Expression der Proteine im Western Blot nachgewiesen werden (6.3.3) und eine wiederhergestellte PIA-Expression gezeigt werden (6.4.4).

### 6.3.3 Nachweis der veränderten Proteinexpressionsmuster in den Mutanten

Auch bei einer korrekten Sequenzierung der im Genom manipulierten Abschnitte der Mutanten, könnte die Insertion der Resistenzkassette zu veränderten Expressionen der darauf folgenden Gene führen. Um die generierten Mutanten weiter zu kontrollieren, sollte die Expression der Proteine BarA und BarB mit Hilfe, der in den Hasen generierten Antiseren überprüft werden. Ferner sollte getestet werden, ob die beiden Proteine auch *in trans* in den, das pRB-*barAB* Plasmid tragenden, komplementierten Mutanten 1457*barA*, 1457*barB* und 1457*barAB* expremiert werden.

In den Stämmen 1457, 1457*ispE* und 1457*purR* konnten beide Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 6-8). Auch alle komplementierten Mutanten wiesen beide Proteine auf. Allerdings schienen die Mengen der Proteine in diesen Stämmen im Vergleich zum Wildtyp erhöht zu sein. Das Expressionsmuster in den Mutanten 1457*barA*, 1457*barB* und 1457*barAB* zeigte sich, wie es zu erwarten war. In den Einzelmutanten konnte jeweils das Protein nicht nachgewiesen werden, für welches das entsprechende Gen deletiert wurde. Das jeweils andere Protein wurde weiterhin in der Zelle transkribiert und translatiert. In der Doppelmutante konnte keines der beiden Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 6-8).



**Abb. 6-8** Nachweis der Proteine BarA und BarB in den generierten Mutanten  
In einem Proteinlysats aus logarithmisch wachsenden Zellen, konnten im Western Blot die Proteine BarA und BarB durch die polyklonalen Antiseren nachgewiesen werden. Die Deletionstämmen wiesen die entsprechende Bande nicht mehr auf. Durch Expression der Proteine vom Vektor pRB*barAB* konnten die Proteine wieder nachgewiesen werden.

## 6.4 Charakterisierung der Biofilmbildung der Mutanten

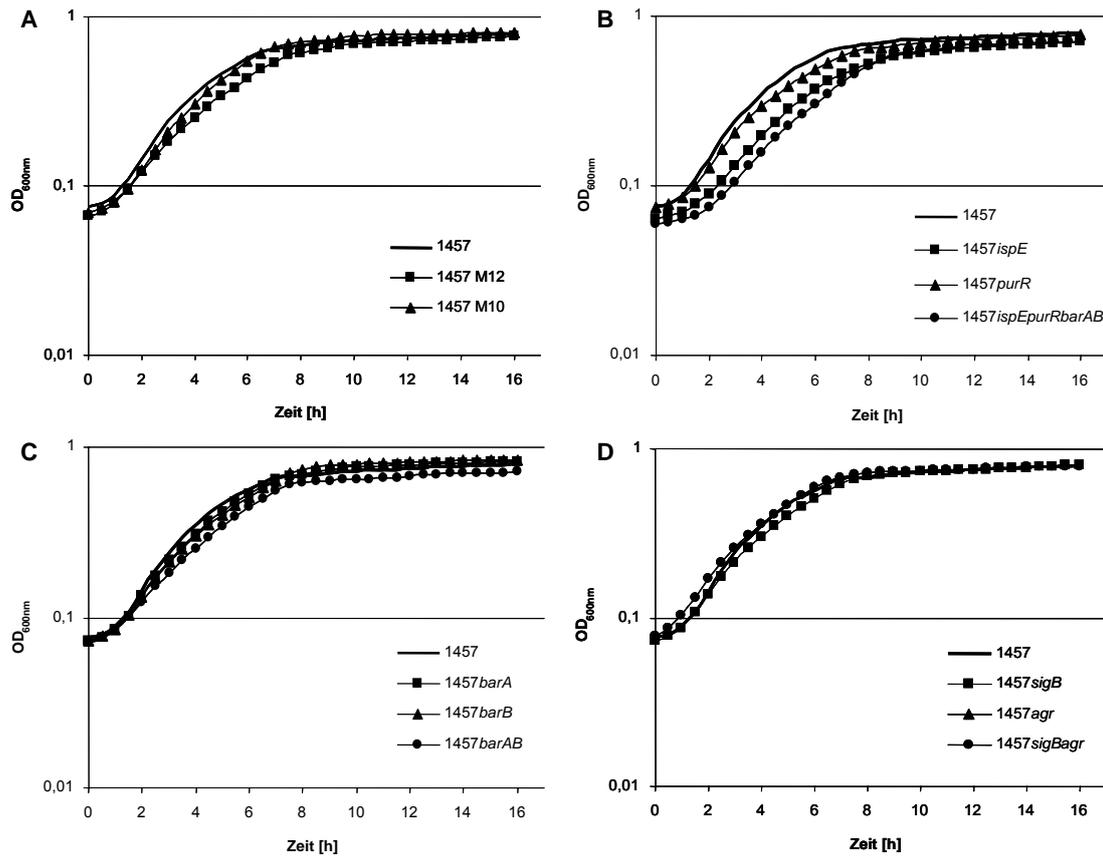
Die *S. epidermidis* 1457 Transposonmutante M12 wies einen biofilmm negativen Phänotyp auf, der aus der fehlenden Expression von PIA resultierte. Allerdings fehlen der Mutante vier Proteine und es konnte nicht eindeutig festgestellt werden

welcher Verlust für diesen Phänotyp verantwortlich ist. Um die zu klären wurden die verschiedenen Deletionsmutanten hinsichtlich ihrer Biofilmbildung analysiert

#### 6.4.1 Wachstumsverhalten

Zunächst war es wichtig das Wachstumsverhalten der Mutanten zu betrachten, damit ausgeschlossen werden konnte, dass ein vermindertes Wachstum zu einer schwächeren Biofilmbildung führen könnte. Das Wachstum der Stämme wurde in TSB in 12well Platten über 16 h durch Messungen der optischen Dichte bei 600 nm in 30minütigem Abstand erfasst. Die Messungen erfolgten automatisiert im infinit M200. Es wurden alle Mutanten getestet, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, um auch für weitere Experimente die Gewissheit zu haben, dass sie keine erheblichen Wachstumsunterschiede aufwiesen.

Für die Stämme 1457, M10, 1457*purR*, 1457*barA*, 1457*barB*, 1457*sigB*, 1457*agr*, 1457*sigBagr* konnte gezeigt werden, dass sie nach einer kurzen *lag*-Phase mit nur geringem Wachstum nach ca. 1,5 h in die *log*-Phase mit einem exponentiellen Wachstum übergangen (Abbildung 6-9). Nach ca. 5,5 h verlangsamte sich das Wachstum wieder und verlief über eine transiente Phase von ca. 2 h in die stationäre Phase. Damit erreichten die Stämme nach 8 h Wachstum eine optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) von etwa 0,7 (0,64 – 0,73). Diese Dichte stieg innerhalb der folgenden 8 h, über die das Wachstum beobachtet wurde, nur noch geringfügig an und erreichte Werte zwischen 0,77 und 0,84. Die Wachstumskurven der Stämme M12, 1457*ispE*, 1457*barAB* und 1457*ispEpurRbarAB* verliefen ähnlich, allerdings wurde eine leicht verlängerte *lag*-Phase von ca. 2 h beobachtet (Abbildung 6-9). Der weitere zeitliche Verlauf war zu den anderen Stämmen vergleichbar, wenn auch nicht so hohe Werte erreicht wurden. Nach 8 h lag deren  $OD_{600nm}$  zwischen 0,5 und 0,61. Nach 16 h konnte ebenfalls nur eine Dichte von etwa 0,7 erreicht werden. Damit lagen die Kurven geringfügig unter denen der anderen Gruppe und zeigten zusätzlich keine Veränderungen im Kurvenverlauf. Der geringe Unterschied im Wachstum der Stämme sollte somit keinen wesentlichen Einfluss auf die mögliche Bildung eines Biofilms haben.



**Abb. 6-9** Wachstumskurven

Die optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) wurde logarithmisch gegen die Zeit (h) aufgetragen. Alle Diagramme zeigen den Wildtyp 1457 (-) zum Vergleich zu den einzelnen Mutanten. Die einzelnen Diagramme zeigen die biofilmnegativen Transposonmutanten (A), die Einzelmutanten *1457ispE*, *1457purR* sowie die vierfach-Mutante *1457ispEpurRbarAB* (B), die Mutanten des *barAB*-Lokus (C) sowie die *sigB* und *agr* Mutanten (D). Es sind jeweils Mittelwerte aus drei Experimenten dargestellt.

**Tab. 6-3** Wachstumsrate und Generationszeiten der 1457 Stämme

Stamm	Wachstumsrate [ $OD_{600}/h$ ]	Generationszeit [h]
1457	0,169	1,33
1457 M10	0,157	1,44
1457 M12	0,115	1,96
<i>1457ispE</i>	0,138	1,63
<i>1457purR</i>	0,159	1,42
<i>1457barA</i>	0,167	1,35
<i>1457barB</i>	0,161	1,40
<i>1457barAB</i>	0,125	1,81
<i>1457ispeEpurRbarAB</i>	0,137	1,65
<i>1457sigB</i>	0,156	1,44
<i>1457agr</i>	0,165	1,37
<i>1457sigBagr</i>	0,151	1,49

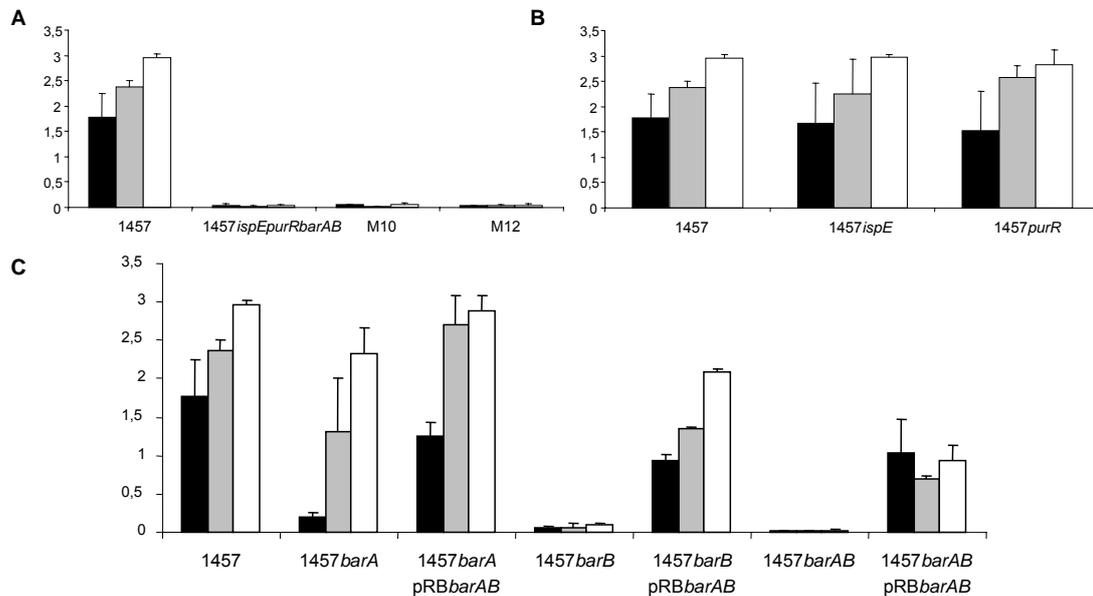
Aus den ermittelten Wachstumskurven konnten für die logarithmische Phase des Wachstums die Wachstumsraten und Generationszeiten errechnet werden (Tabelle 6-3). Die Wachstumsrate stellt die Verdopplung der Zelldichte pro Zeiteinheit dar. Wohingegen die Generationszeit die Zeit ist, die zur Verdopplung der Zelldichte benötigt wird. Auch Wachstumsraten und Generationszeiten bestätigten, dass es keine erheblichen Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten gab. Es ließen sich allerdings wiederum die beiden Gruppen finden, die auch schon oben beschrieben wurden. Die Gruppe um den Wildtyp 1457 wies Generationszeiten zwischen 1,33 h und 1,49 h auf. Die Werte der anderen Mutanten lagen zwischen 1,63 h und 1,96 h. Allerdings war zu erkennen, dass alle Werte nur in einem geringen Bereich schwankten und nicht zu einem bedeutsamen Wachstumsunterschied führten.

#### 6.4.2 Biofilmbildung in 96well Polystyrolplatten

Um den Einfluss der generierten Deletionen auf die Biofilmbildung zu untersuchen, wurden semiquantitative Biofilmtests in 96well-Zellkulturplatten mit einer Nunclon $\Delta$  Oberfläche durchgeführt.

Die Mutanten 1457*barB*, 1457*barAB* und 1457*ispEpurRbarAB* zeigten in TSB eine signifikant ( $p < 0.05$ ) stark verminderte Biofilmbildung gegenüber dem Wildtyp. Die Mutante 1457*barA* wies ebenfalls eine verminderte Biofilmbildung auf, diese war, wenn auch von geringerem Ausmaß, statistisch signifikant (Abbildung 6-10 A und C). Im Gegensatz dazu zeigten die Mutanten 1457*ispE* und 1457*purR* in TSB eine im Vergleich zum Wildtyp leicht gesteigerte Biofilmbildung, die aber nicht statistisch signifikant war (Abbildung 6-10 B). Weiterhin wurden die Mutanten 1457 M10 und 1457 M12 als Kontrollen mitgeführt, für die keine Biofilmbildung nachweisbar war (Abbildung 6-10 A). Durch Supplementierung von TSB mit 3 % NaCl konnte die Biofilmproduktion des Wildtypstammes induziert werden. Eine weitere Steigerung der Biofilmbildung wurde durch Zugabe von 3 % Ethanol zum Wachstumsmedium erreicht. In den *S. epidermidis* Mutanten 1457*ispE*, 1457*purR* und 1457*barA* konnte diese Induktion ebenfalls gezeigt werden. Keine der Mutanten wies in den supplementierten Medien statistisch signifikante Unterschiede zur Biofilmbildung des Wildtyps auf. Trotzdem konnte ein Trend gezeigt werden. Die Mutanten 1457*ispE* und 1457*purR* wiesen leicht höhere Werte im Vergleich zum Wildtyp auf, wohingegen 1457*barA* etwas weniger Biofilm als der Wildtyp bildete. Mutanten, die in TSB keinen Biofilm bilden konnten, konnten weder durch die Supplementierung durch NaCl noch durch Ethanol zur Biofilmbildung angeregt

werden. Somit konnte auch im Vergleich zum Wildtyp eine starke statistische Signifikanz errechnet werden.



**Abb. 6-10** Biofilmbildung in 96well Nunclon $\Delta$  Zellkulturschalen

Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457, dessen Deletionsmutanten und den Transposonmutanten M10 und M12 in TSB (■), TSB supplementiert mit 3 % NaCl (■) und 3 % Ethanol (□). Die Limitation des Messgerätes erlaubte es nur Werte bis zu einer Absorption von 3 zu messen. Stärkere Färbungen konnten nicht unterschieden werden, daher kommt es in diesem Bereich auch nur zu geringen Standardabweichungen. Es sind jeweils Mittelwerte aus drei Experimenten dargestellt.

Die Analyse der drei mit dem Plasmid pRB-*barAB* komplementierten Mutanten ergab wieder einen biofilmpositiven Phänotyp, der allerdings nicht das Niveau des Wildtyps erreichte (Abbildung 6-10 C). Die Komplementierung von *1457barA* führte im Vergleich zur nicht komplementierten Mutante zu einer verstärkten Biofilmbildung und erreichte somit dem Wildtyp ähnliche Werte. Dieser Biofilm konnte durch NaCl und Ethanol auch wieder induziert werden. In *1457barB* führte die Expression der Proteine BarA und BarB *in trans* zu einer Biofilmbildung, die dem Wildtyp ähnlich war und ebenfalls mit NaCl und Ethanol induziert werden konnte, aber nicht das gleiche Niveau erreichte. In *1457barAB* pRB-*barAB* wurde ebenfalls ein biofilmpositiver Phänotyp erreicht, allerdings ist unklar, warum hier keine weitere Induktion gezeigt werden konnte.

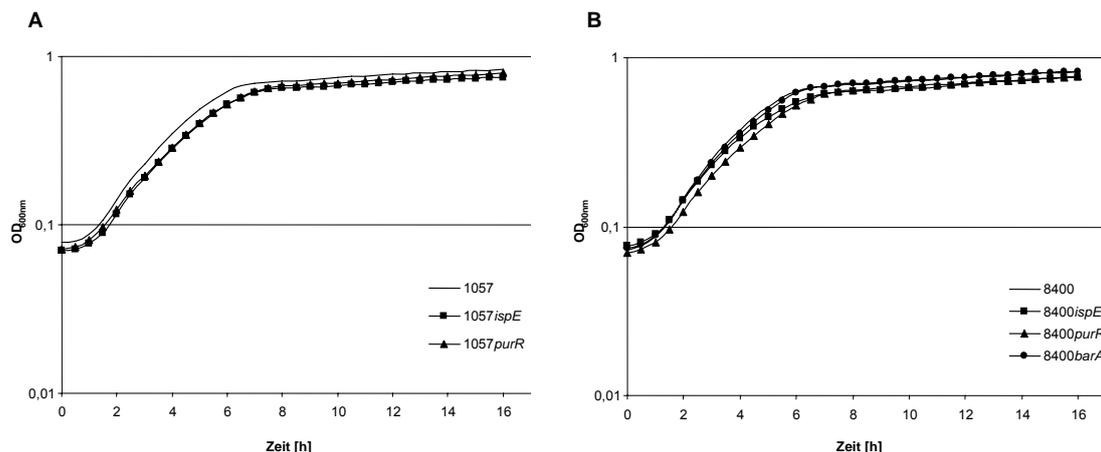
### 6.4.3 Transduktion der Deletionen in unabhängige genetische Hintergründe

Die Übertragung der verschiedenen Deletionen in weitere *S. epidermidis* Hintergründe sollte die Möglichkeit geben die Beobachtungen in *S. epidermidis* 1457 zu verifizieren um individuelle Ergebnisse in diesem Hintergrund ausschließen zu

können. Als alternative *S. epidermidis* Stämme dienten die Hintergründe 1057 und 8400.

Dazu wurden die Mutanten mit dem Phagen  $\Phi 71$  infiziert, um Phagenlysate herzustellen. Aus den Stämmen *S. epidermidis* 1457*ispE*, 1457*purR* und 1457*barA* konnte der Phage erfolgreich wieder aufgereinigt und in den Hintergrund 8400 übertragen werden. In *S. epidermidis* 1057 konnten nur die Deletionen der Gene *ispE* und *purR* transduziert werden. In den *S. epidermidis* Deletionsmutanten 1457*barB*, 1457*barAB* und 1457*ispEpurRbarAB* konnte kein Phagenlysate generiert werden. Phagentitrationen auf diesen Stämmen ergaben im Softagar keine Plaques, in denen Zellen lysiert wären und neue Phagen freigesetzt würden.

Für die generierten Transduktanten und deren Wildtypen wurden ebenso wie für die Mutanten im Hintergrund von *S. epidermidis* 1457 Wachstumskurven erstellt und Wachstumsraten sowie Generationszeiten berechnet (Abbildung 6-11, Tabelle 6-4). Dabei zeigten sich keine Unterschiede. Die geringe Verschiebung der *lag*-Phase, die in 1457*ispE* beobachtet wurde, konnte in 1057*ispE* und 8400*ispE* nicht gefunden werden. Die Zellen erreichten nach ca. 1,5 h die log-Phase mit einem exponentiellen Wachstum, das nach etwa 5,5 h in eine transiente Wachstumsphase überging. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Zellen eine  $OD_{600nm}$  zwischen 0,46 und 0,56 erreicht, die in den folgenden 2 h auf Werte zwischen 0,64 und 0,70 weiter anstieg. In dem weiter beobachteten Zeitraum der stationären Wachstumsphase erhöhten sich die Werte nur noch geringfügig auf 0,75 bis 0,83.



**Abb. 6-11** Wachstumskurven

Die optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) wurde logarithmisch gegen die Zeit (h) aufgetragen. Teil A zeigt das Wachstum von *S. epidermidis* 1057 und den isogenen Mutanten 1057*ispE* und 1057*purR*. In den *S. epidermidis* Hintergrund 8400 konnte zusätzlich eine Deletion von *barA* untersucht werden (B). Es sind jeweils Mittelwerte aus drei Experimenten dargestellt.

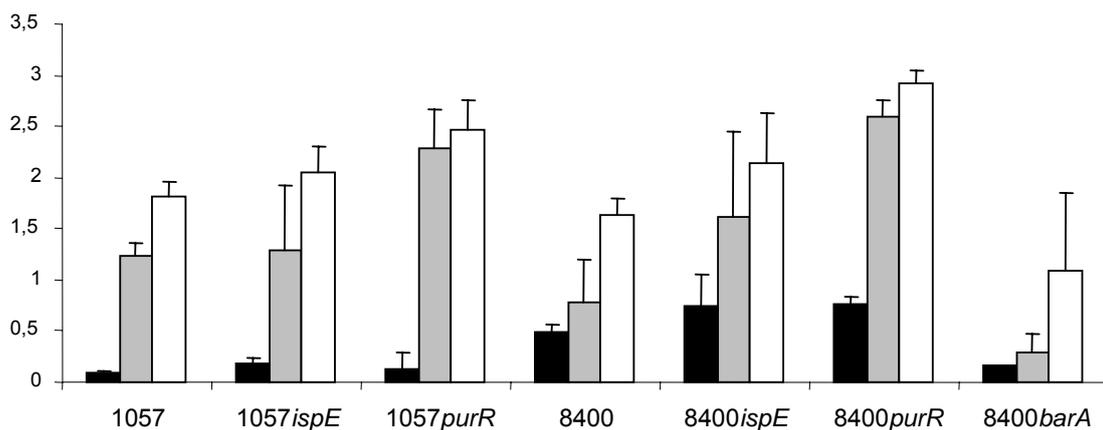
**Tab. 6-4** Wachstumsrate und Generationszeiten der 1057 und 8400 Stämme

Stamm	Wachstumsrate [OD <sub>600</sub> /h]	Generationszeit [h]
1057	0,179	1,26
1057 <i>ispE</i>	0,177	1,27
1057 <i>purR</i>	0,170	1,33
8400	0,182	1,24
8400 <i>ispE</i>	0,165	1,37
8400 <i>purR</i>	0,171	1,32
8400 <i>barA</i>	0,176	1,28

Die Wachstumsraten der Transduktanten und ihrer Wildtypstämme lagen zwischen 0,170 und 0,182 und unterschieden sich damit kaum voneinander. Auch die Generationszeiten lagen mit Werten von 1,24 bis 1,33 eng beieinander.

Der Vergleich von Wachstumsraten und Generationszeiten der verschiedenen Wildtypen zeigte, dass es keine erheblichen Unterschiede in ihrem Wachstum gab. Es konnte lediglich ein Trend beobachtet werden, dass *S. epidermidis* 1057 und 8400 (Wachstumsraten: 0,179; 0,182 / Generationszeiten: 1,26 h; 1,24 h) scheinbar etwas schneller wuchsen als *S. epidermidis* 1457 (Wachstumsrate: 0,169 Generationszeit: 1,33 h).

Des Weiteren wurden die Transduktanten auch hinsichtlich ihrer Biofilmbildung untersucht (Abbildung 6-12).

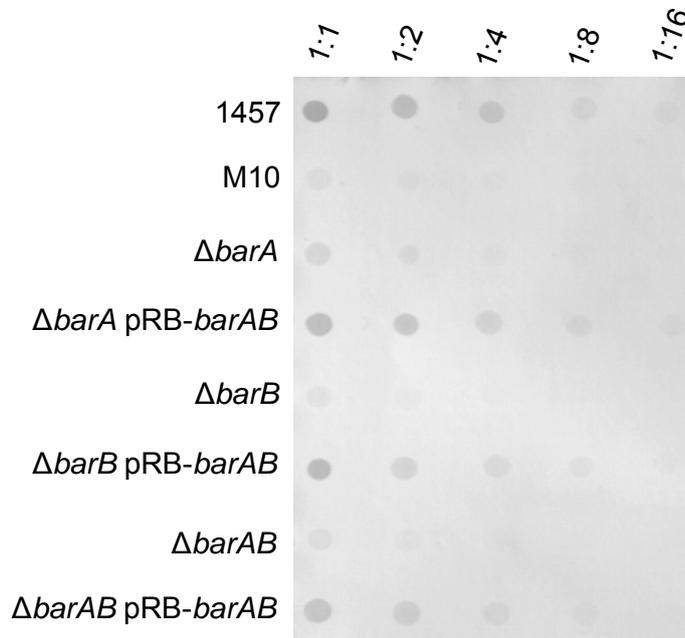
**Abb. 6-12** Biofilmbildung der *S. epidermidis* Stämme 1057 und 8400

Biofilmbildung der *S. epidermidis* Stämme 1057 und 8400 und den darin generierten Transduktanten in TSB (■) und TSB supplementiert mit 3 % NaCl (■) und 3 % Ethanol (□). Die Limitation des Messgerätes erlaubte es nur Werte bis 3 zu messen. Stärkere Färbungen konnten nicht unterschieden werden, daher kommt es in diesem Bereich auch nur zu geringen Standardabweichungen. Es sind jeweils Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten dargestellt.

Bei *S. epidermidis* 1057 handelt es sich im Vergleich zu den Hintergründen 1457 und 8400 um einen schwächeren Biofilmbildner. Trotzdem konnte in allen Hintergründen die Induktion der Biofilmbildung durch NaCl und Ethanol gezeigt werden. Ferner führten auch die verschiedenen Deletionen zu vergleichbaren Veränderungen der Biofilmbildung, wie sie auch schon in *S. epidermidis* 1457 gezeigt werden konnten. Zusätzlich wurde jedoch, in Medien, die NaCl oder Ethanol enthielten, eine verstärkte Biofilmbildung der *purR*-Deletionsstämme im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen beobachtet, die auch statistisch signifikant war. Dies konnte in *S. epidermidis* 1457 nicht beobachtet werden.

#### 6.4.4 PIA-Expression

Das interzelluläre Polysaccharidadhäsion PIA vermittelt maßgeblich die Zell-zu-Zell Adhäsion in Biofilmen von *S. epidermidis* (Mack *et al.*, 1994; Heilmann *et al.*, 1996; Mack *et al.*, 1996a; Mack *et al.*, 1996b). Um zu prüfen, ob die beobachteten Unterschiede der Biofilmbildung auf eine differentielle PIA-Synthese zurückzuführen sind, wurde PIA im extrazellulären Überstand mittels eines Dotblots durch ein spezifisches anti-PIA-Antiserum (Mack *et al.*, 1992; Mack *et al.*, 1994) nachgewiesen.



**Abb. 6-13** PIA-Nachweis in *S. epidermidis* 1457 Stämmen

Verdünnungsreihen der aufgereinigten PIA-Faktionen wurden mittels eines spezifischen anti-PIA-Antiserums detektiert. *S. epidermidis* 1457 diente als Positivkontrolle. Die Transposonmutante M10 besitzt keinen funktionellen *icaADBC*-Lokus und zeigt daher nur die unspezifische Hintergrundreaktion des Antiserums.

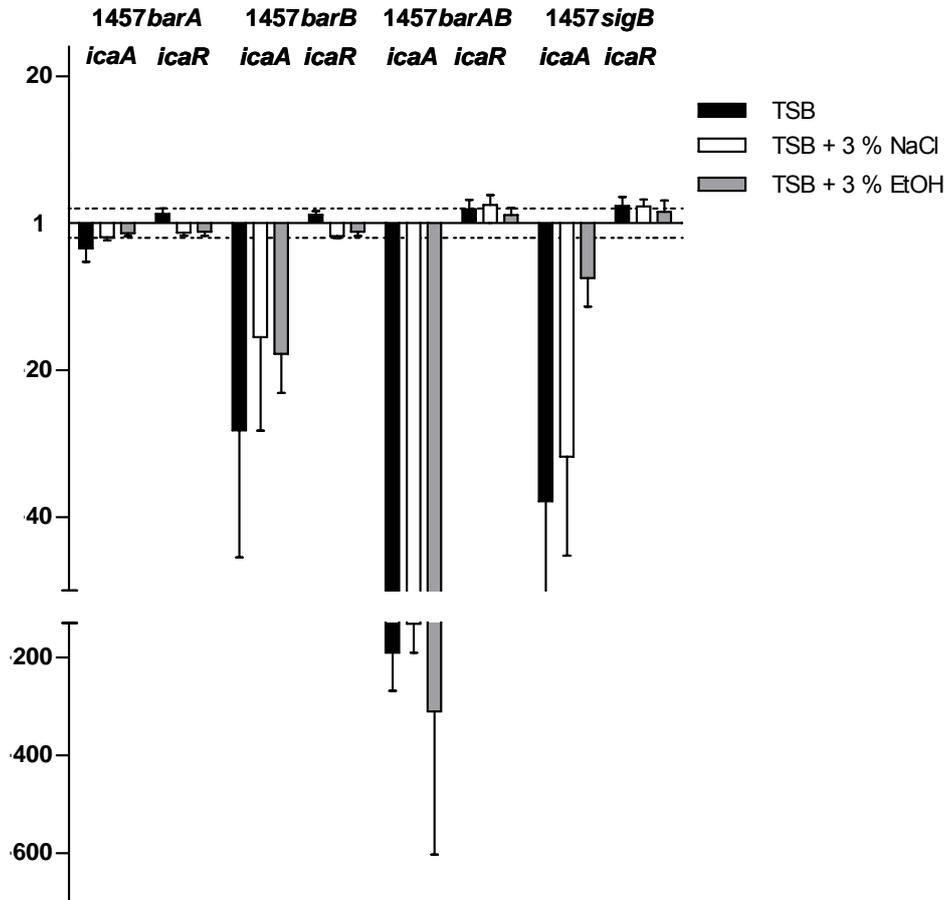
In den Mutanten *1457barA*, *1457barB* und *1457barAB* war die PIA-Expression Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Abbildung 6-13). Schon in der unverdünnten Probe der *barB* und *barAB* Deletionsstämme konnte nur der Hintergrund, der auch in der PIA-negativen Mutante M10 sichtbar war, detektiert werden. In *1457barA* war noch eine Restexpression nachweisbar, die allerdings auch schon in der 1:2 Verdünnung nicht mehr den Hintergrund überragte. Alle mit dem pRB-*barAB* Plasmid komplementierten Mutanten produzierten wieder PIA, wenn auch geringfügig weniger als der Wildtyp. Das PIA-Extrakt der komplementierten Mutanten erreichte bei einer 1:8 Verdünnung nur noch die Hintergrundreaktion, wohingegen der Wildtyp erst bei einer weiteren zweifachen Verdünnung nicht mehr aus dem Hintergrund hervortrat.

#### 6.4.5 Quantitative Transkriptionsanalyse der Gene *icaA* und *icaR*

Zur weiteren Charakterisierung der Mutanten bezüglich ihrer Biofilmbildung sollte die Transkription des, für die PIA-Synthese verantwortlichen, *icaADBC* Operons und dessen spezifischen Repressors *icaR* näher untersucht werden. Hierzu wurde RNA aus Zellen isoliert, die 7 h in Nunclon $\Delta$  beschichteten Petrischalen gewachsen waren. Verglichen wurde die Transkription in TSB, in TSB<sub>NaCl</sub> und TSB<sub>EtOH</sub> in Bezug auf den Wildtyp.

*S. epidermidis 1457barA* zeigte eine Reduktion der *icaA* Transkription in TSB (3,43-fach) im Vergleich zum Wildtyp. Auch in TSB<sub>NaCl</sub> und TSB<sub>EtOH</sub> war die *icaA* Transkription ebenfalls leicht reduziert (TSB<sub>NaCl</sub>: 1,91-fach; TSB<sub>EtOH</sub>: 1,38-fach), jedoch unter einer biologisch relevanten zweifachen Veränderung (Abbildung 6-14). Eine statistische Signifikanz ließ sich allerdings in allen drei Medien zeigen. Die *icaA* Transkription in *S. epidermidis 1457barB* und *1457barAB* war signifikant stark reduziert unter allen Bedingungen. *S. epidermidis 1457barB* zeigte eine 28,18-fache (TSB), eine 15,53-fache (TSB<sub>NaCl</sub>) und eine 17,76-fache (TSB<sub>EtOH</sub>) Reduktion der *icaA* Transkription im Vergleich zu *S. epidermidis 1457*. In *S. epidermidis 1457barAB* wurde *icaA* 190,30-fach (TSB), 131,25-fach (TSB<sub>NaCl</sub>) und 310,17-fach (TSB<sub>EtOH</sub>) vermindert transkribiert (Abbildung 6-14). Aus der relativen Quantifizierungsmethode ergaben sich solche hohen Werte, die aber wahrscheinlich eine abgeschaltete Transkription des Operons in *S. epidermidis 1457barAB* darstellen. Auch die Deletion des *sigB* Gens führte zu einer drastischen Reduktion der *icaA* Transkription. In TSB wurde *icaA* 37,86-fach weniger und in TSB<sub>NaCl</sub> 31,8-fach weniger transkribiert als im Wildtyp. Auch in TSB<sub>EtOH</sub>, ein Medium in dem

1457*sigB* Biofilm bildet, war die Transkription 7,47-fach vermindert im Vergleich zum Wildtyp.



**Abb. 6-14** *IcaA* und *icaR* Transkriptionsanalyse der Mutanten

Relative Transkriptionsunterschiede in *S. epidermidis* 1457*barA*, 1457*barB*, 1457*barAB* und 1457*sigB* in Bezug auf den Wildtyp 1457 nach 7 h Wachstum in TSB. Die Expression gilt als signifikant, wenn ein 2-facher Unterschied zum Wildtyp gezeigt werden konnte (gestrichelte Linie). Die Analyse der Genexpression basiert auf der Auswertung von drei unabhängigen Experimenten.

Die *icaR* Transkription wurde in *S. epidermidis* 1457*barA* und 1457*barB* in keinem Medium über den Faktor 2 hinaus beeinflusst (Abbildung 6-14). *S. epidermidis* 1457*barAB* zeigte in TSB und TSB<sub>EtOH</sub> ebenfalls keine relevanten Änderungen der *icaR* Transkription. Allerdings wurde die Transkription in TSB<sub>NaCl</sub> signifikant leicht erhöht, auf das 2,51-fache der Wildtyp-Transkription. Der *sigB* Deletionsstamm wies in den Medien TSB und TSB<sub>NaCl</sub> eine statistisch signifikante Erhöhung des *icaR* Transkriptes auf (TSB: 2,33-fach; TSB<sub>NaCl</sub>: 2,31-fach). Dies konnte in TSB<sub>EtOH</sub> nicht beobachtet werden.

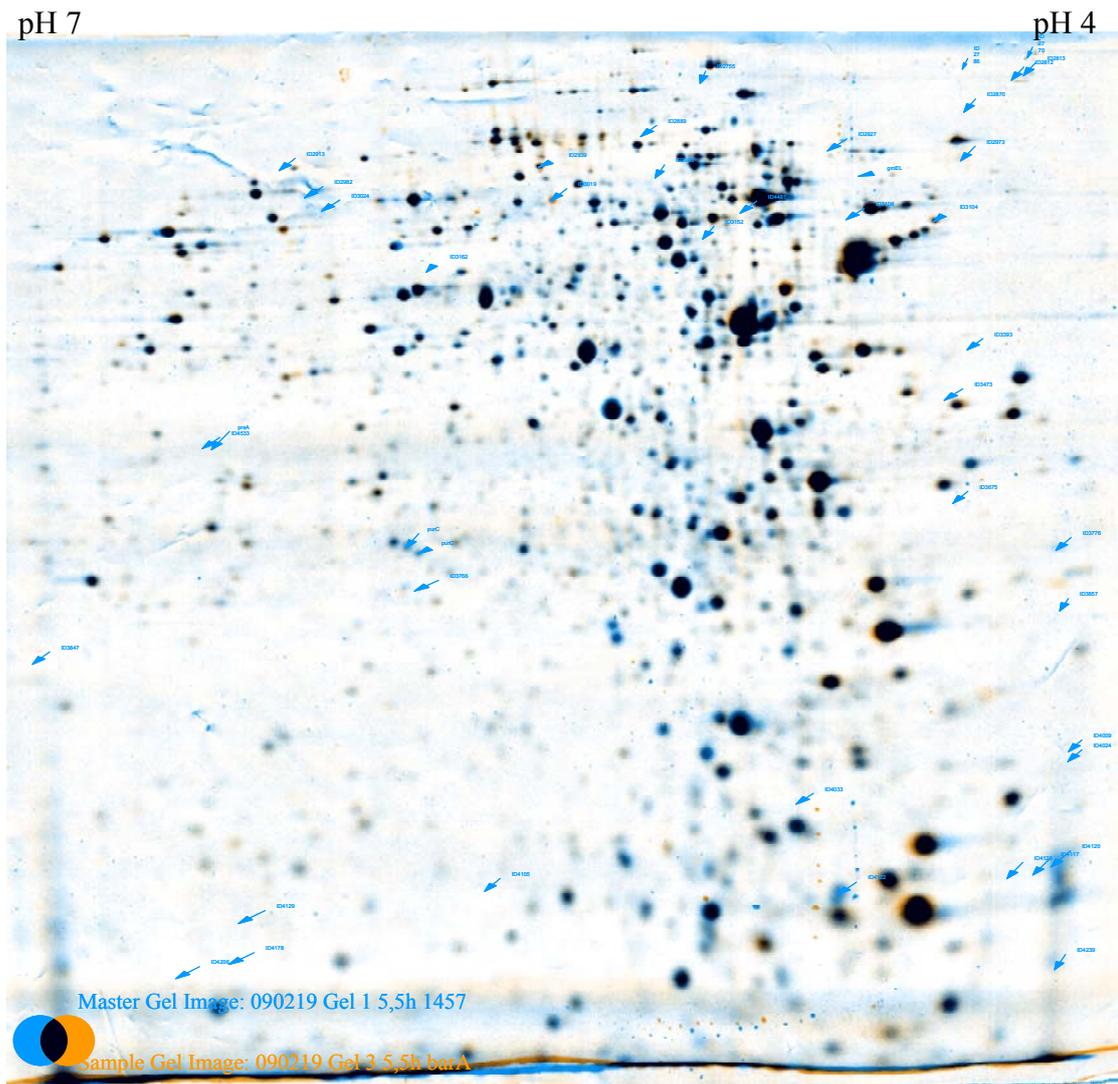
## 6.5 Intrazelluläre Proteomanalyse mittels 2D Analyse

Die 2D-Gel-Analyse eignet sich sehr gut, um Veränderungen der Proteinexpression verschiedener Stämme global zu untersuchen. Die Gesamtzellextrakte aus exponentieller und spätstationärer Phase wurden aufgetrennt und die einzelnen Proteinspots quantifiziert. Signifikant veränderte Spots der exponentiellen Phase wurden aus den Gelen ausgeschnitten und in einer Massenspektroskopie(MS)-Analyse identifiziert. Die Untersuchungen wurden im Wildtyphintergrund *S. epidermidis* 1457 durchgeführt. Von Interesse waren Änderungen des Proteinexpressionsmusters durch den Verlust der Gene *barA* und *barB* sowie des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^B$  und des *agr-Quorum sensing* Systems.

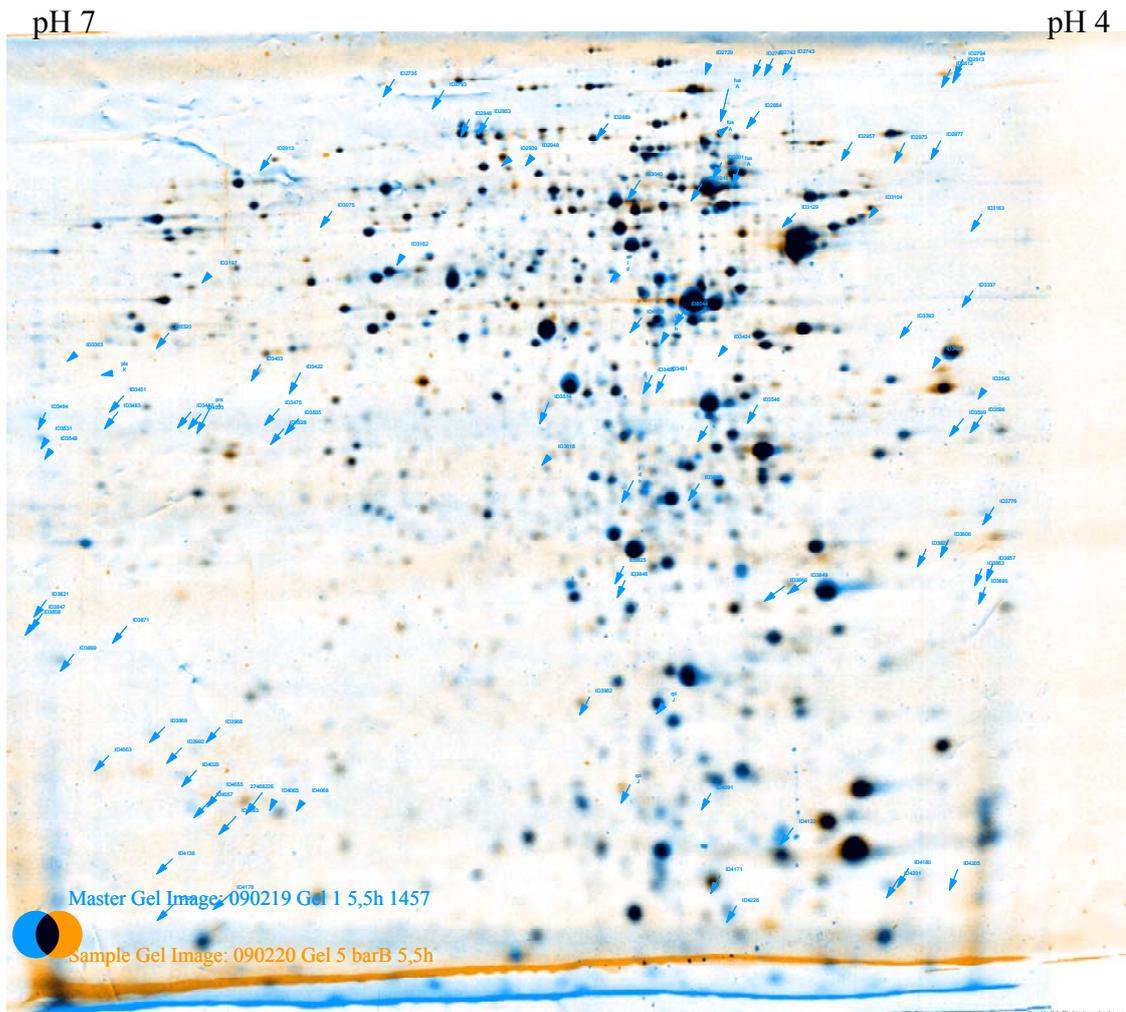
### 6.5.1 Die Deletionen von *barA*, *barB* und *barAB*

Die Deletion der Einzelgene *barA* und *barB* führte in der exponentiellen Phase schon zu einer erheblichen Veränderung der Proteinmuster (Abbildung 6-15 und 6-16). In *S. epidermidis* 1457*barA* wurden 27 Proteinspots signifikant herabreguliert und 16 Proteinspots hochreguliert. Die *barB* Deletionsmutante wies 100 veränderte Spots auf von denen 49 vermindert exprimiert wurden. Der gleichzeitige Verlust beider Gene führte zu einer enormen Veränderung des intrazellulären Proteoms. 446 Proteinspots wurden im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich exprimiert (Abbildung 6-17). Davon wurden 262 Spots schwächer und 186 Spots stärker exprimiert. Alle Spots wurden aus zwei Gelen ausgeschnitten und zur MS-Analyse genutzt. Leider konnte, aus noch ungeklärten Gründen, nur ein kleiner Anteil der Proteine identifiziert werden.

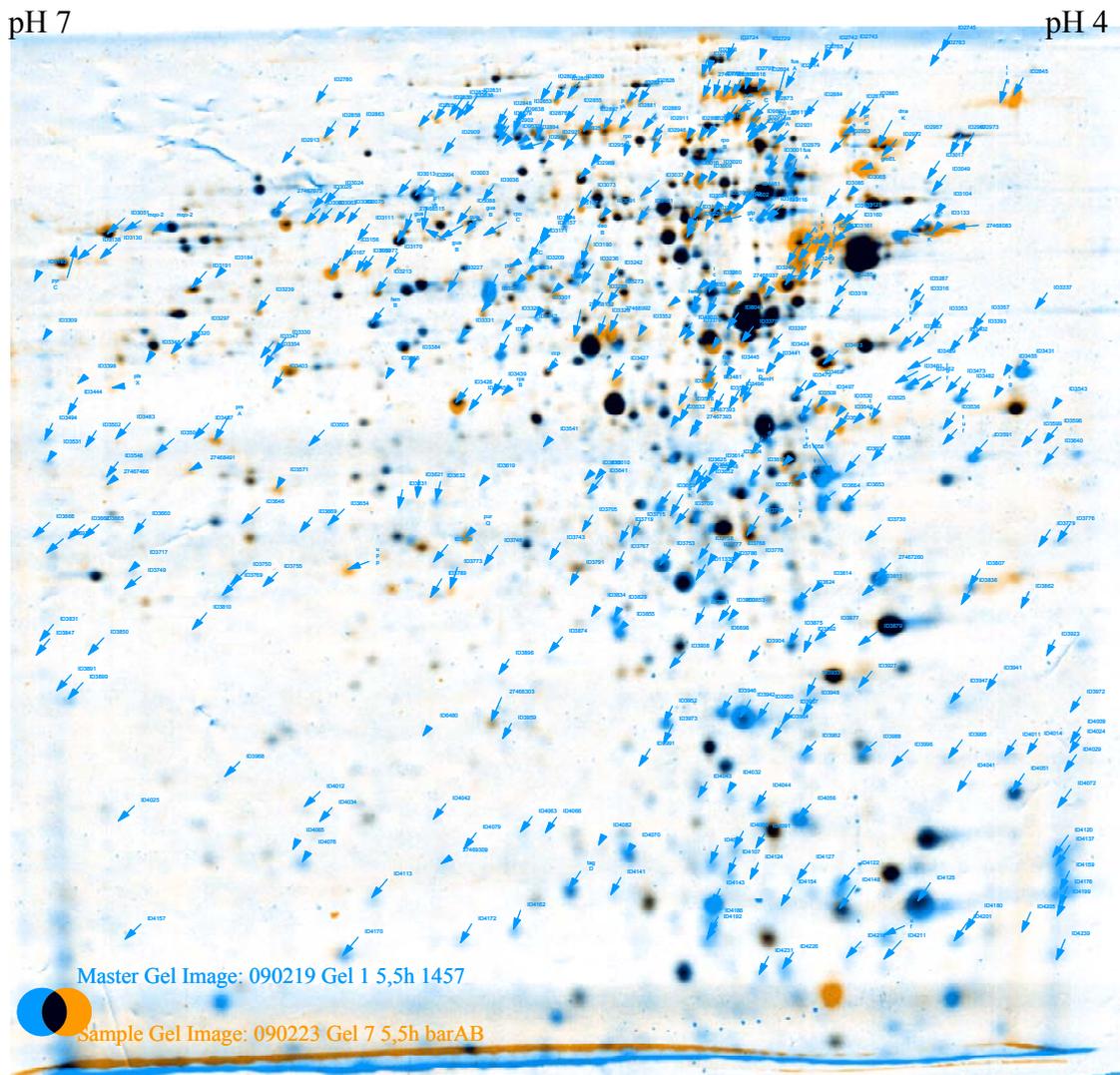
Für *S. epidermidis* 1457*barA* wurden nur zwei Proteine aus dem Nukleotidstoffwechsel (PrsA un PurC) und ein Protein mit Chaperonfunktion (GroEL) identifiziert (Anhang III Tabelle 8-1). Alle drei Proteine waren vermindert exprimiert. Sieben Proteine konnten in *S. epidermidis* 1457*barB* identifiziert werden. Davon war eines auch unter den regulierten Proteinen in 1457*barA*, ein Protein aus dem Nukleotidstoffwechsel (PrsA), das ebenfalls herunterreguliert wurde. Des Weiteren wurden zwei Proteine des Energiemetabolismus (Alanindehydrogenase und Laktatdehydrogenase) und ein Elongationsfaktor (FusA) herabreguliert. Ein Enzym des Fettsäurestoffwechsels (PlsX), ein ribosomales Protein (RplJ) und ein hypothetisches Protein wurden erhöht gefunden (Anhang III Tabelle 8-1).



**Abb. 6-15** Änderungen des intrazellulären Proteoms in *S. epidermidis* 1457*barA*  
Dargestellt ist ein Beispiexperiment für den Vergleich des intrazellulären Proteoms zwischen *S. epidermidis* 1457 und der isogenen *barA* Mutante in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Wildtyp ist in blau dargestellt, die Mutante in orange. Überlagerte Spots erscheinen schwarz. Alle signifikant veränderten Proteinspots sind mit einem Pfeil gekennzeichnet und wurden über drei biologische Replikate ermittelt.



**Abb. 6-16** Änderungen des intrazellulären Proteoms in *S. epidermidis* 1457 *barB*  
Dargestellt ist ein Beispielerperiment für den Vergleich des intrazellulären Proteoms zwischen *S. epidermidis* 1457 und der isogenen *barB* Mutante in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Wildtyp ist in blau dargestellt, die Mutante in orange. Überlagerte Spots erscheinen schwarz. Alle signifikant veränderten Proteinspots sind mit einem Pfeil gekennzeichnet und wurden über drei biologische Replikate ermittelt.

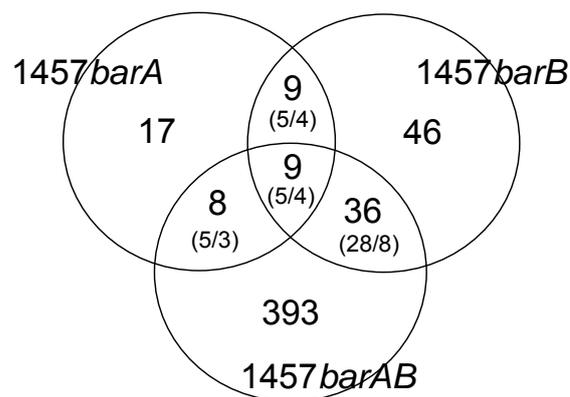


**Abb. 6-17** Änderungen des intrazellulären Proteoms in *S. epidermidis* 1457*barAB*  
 Dargestellt ist ein Beispielerperiment für den Vergleich des intrazellulären Proteoms zwischen *S. epidermidis* 1457 und der isogenen *barAB* Mutante in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Wildtyp ist in blau dargestellt, die Mutante in orange. Überlagerte Spots erscheinen schwarz. Alle signifikant veränderten Proteinspots sind mit einem Pfeil gekennzeichnet und wurden über drei biologische Replikate ermittelt.

Für *S. epidermidis* 1457*barAB* konnten 64 Spots identifiziert werden, die verschiedenen biologischen Prozessen zugeordnet wurden (Anhang III Tabelle 8-1). Im Nukleotidstoffwechsel wurden sechs Proteine hochreguliert und nur die Phosphopentomutase (DeoB) herunterreguliert. Aus der Proteinsynthese wurden Elongationsfaktoren und ribosomale Proteine identifiziert. Dabei fielen viele Fragmente des Elongationsfaktors EF-Tu auf, die allerdings sowohl induziert als auch reprimiert wurden. Proteine, die der Proteinmodifikation und Faltung dienen, wurden mit Ausnahme von DnaK alle induziert. Dabei wurde GroEL sogar 10,14-fach stärker exprimiert als im Wildtyp. Vermehrt exprimiert wurden ebenfalls die Phosphoenolpyruvat-Proteinphosphatase (PtsI) und Proteine zur Synthese von Cofaktoren und prosthetischen Gruppen (bspw.: HemH und HemL-1). Außerdem

wurden zwei schwächer exprimierte Proteine identifiziert, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind. Auch Enzyme des Energiemetabolismus unterlagen der Regulation. Die Fruktosebisdiphosphataldolase, Phosphoglyceratkinase und die Laktatdehydrogenase der Glykolyse bzw. Glukoneogenese wurden verstärkt exprimiert. Ebenso wie die Isocitratdehydrogenase und die Malat:Quinon-Oxidoreduktase des TCA-Zyklus. Ferner wurden zwei Enzyme der Fettsäurebiosynthese und das *catabolite control protein A* (CcpA) induziert.

Um die Überlappung der Expressionsveränderungen in den einzelnen Mutanten zu betrachten, wurden auch die nicht identifizierten Proteine miteinbezogen. Diese wurde in der Analyse durch eindeutige IDs gekennzeichnet und konnten somit verglichen werden. Dabei fiel auf, dass nur neun der Proteinspots in allen drei Mutanten gemeinsam reguliert wurden (Abbildung 6-18). Ferner wurden diese nicht immer in gleicher Weise reguliert. Fünf der Spots wurden in gleicher Richtung reguliert (3 herab, 2 herauf). Die anderen 4 Spots wurden in den Einzelmutanten gleichermaßen reguliert, aber in der Doppelmutante in entgegengesetzter Richtung. Unter diesen Proteinen konnte PrsA, ein Protein aus der Purin-Ribonukleotidsynthese, als einziges Protein identifiziert werden. PrsA wurde in den Einzelmutanten vermindert exprimiert und in der Doppelmutante induziert. Es wurden keine Proteinspots gefunden, die zusätzlich zur differentiellen Regulation im Vergleich zur Doppelmutante auch zwischen den Einzelmutanten in entgegengesetzter Richtung reguliert wurden. Allerdings fanden sich unter den Spots, die nur in den Einzelmutanten überlappten auch entgegengesetzt regulierte Spots.



**Abb. 6-18** Überlappung der differentiell exprimierten Proteinspots

Die Zahlen geben die Anzahl differentiell regulierter Proteinspots in den *S. epidermidis* Mutanten 1457barA, 1457barB und 1457barAB im Vergleich zum Wildtyp 1457 wieder. Die Überlappungen der Kreise zeigen die Anzahl an Spots, die in mehreren Mutanten reguliert wurden. Dabei fanden nicht alle Regulationen in gleicher Richtung statt (in gleicher Richtung reguliert / entgegengesetzt reguliert).

Weiterhin konnten Proteinspots gefunden werden, die nur in einer der Einzelmutanten und der Doppelmutanten differentiell exprimiert wurden. Dabei war die Überlappung zwischen 1457*barA* und 1457*barAB* (acht Spots) deutlich geringer als die Überlappung der Doppelmutante mit 1457*barB* (36 Spots).

Um einen noch besseren Einblick in die Abhängigkeiten der Proteinregulationen zu bekommen, wurde die Doppelmutante auch experimentell mit den Einzelmutanten verglichen. Dabei sollten Proteinspots, die in gleicher Weise reguliert wurden in der Analyse herausfallen und entgegengesetzt regulierte Proteine stärker in den Vordergrund treten. Sowohl für die den Vergleich von 1457*barAB* zu 1457*barA* als auch zu 1457*barB* ergab sich eine erhebliche Veränderung des intrazellären Proteinmusters (Abbildung 6-19, 6-20). Die zusätzliche Deletion von *barB* in 1457*barA* ergab 458 signifikant unterschiedlich exprimierte Proteinspots und der Vergleich der Doppelmutante zur *barB* Deletion ergab 464 signifikant veränderte Spots (Tabelle 6-5).

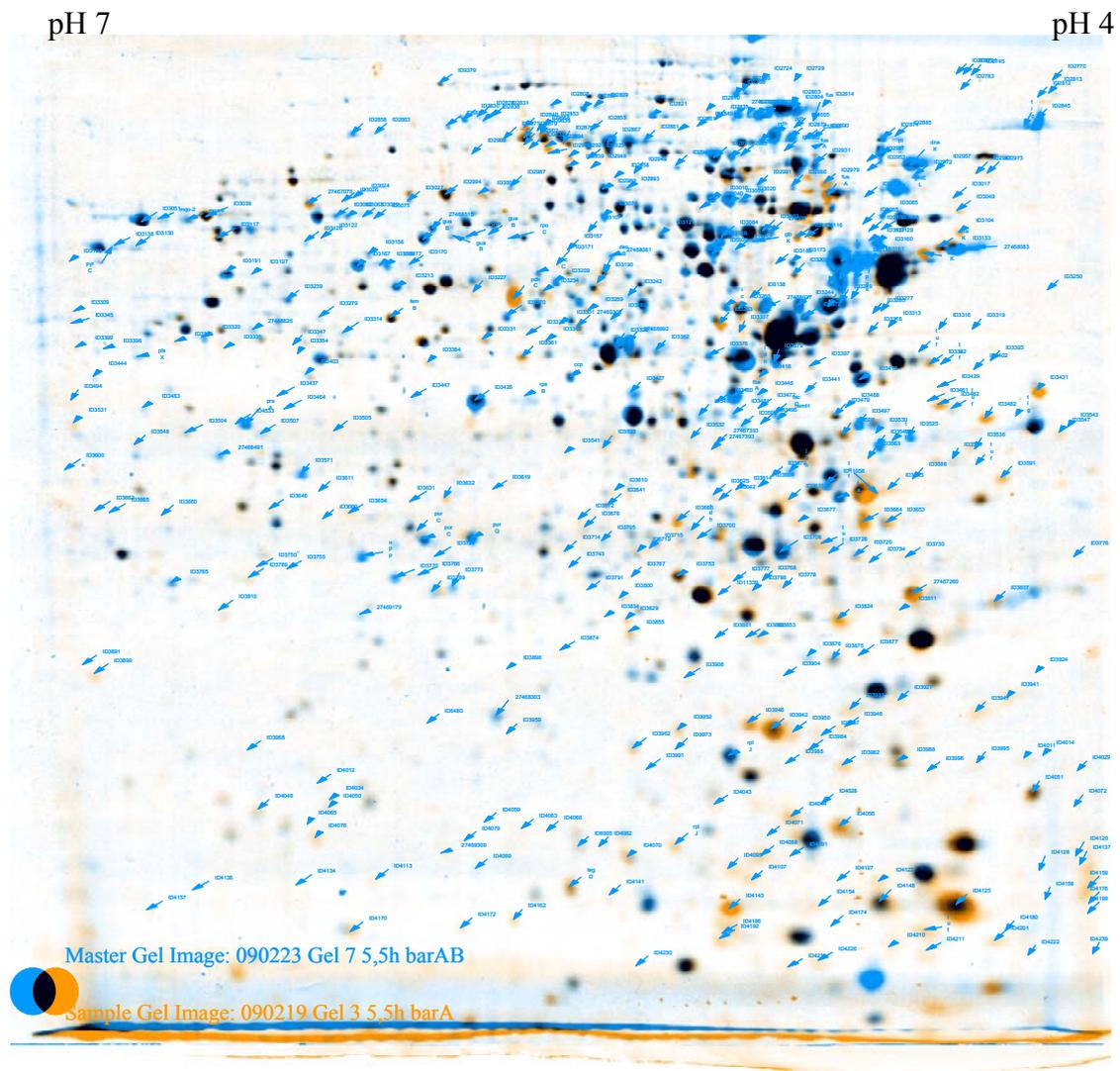
**Tab. 6-5** Anzahl signifikant regulierter Proteinspots in 1457*barAB*

1457 <i>barAB</i> vs	signifikante Spots (herab/hoch)	identifizierte Proteine (herab/hoch)
1457 <i>barA</i>	458 (277/181)	62 (18/44)
1457 <i>barB</i>	464 (276/188)	70 (23/47)

Wiederum konnte nur ein Teil der Proteinspots in der MS-Analyse auch identifiziert werden. Die gezeigten Ergebnisse beziehen sich hier auf identifizierte Proteine (Anhang III Tabelle 8-2). Insgesamt ergab der Vergleich der veränderten Proteinexpression in *S. epidermidis* 1457*barAB* zu den jeweiligen Einzelmutanten in den identifizierten Proteinen eine große Überlappung. 29 Proteine, die nicht in multiplen Spots identifiziert wurden, wurden in 1457*barAB* im Vergleich zu beiden Einzelmutanten in gleicher Weise reguliert. Es fanden sich keine Proteine, die signifikant in beiden Vergleichen verändert waren und in den Einzelvergleichen entgegengesetzt reguliert wurden.

Es konnten zehn Proteine identifiziert werden, die in den Nukleotidstoffwechseln involviert sind. Die Proteine wurden in 1457*barAB* im Vergleich zu beiden Einzelmutanten verstärkt exprimiert. Lediglich die Phosphopentomutase (DeoB) aus diesem Stoffwechselweg wurde in beiden Fällen reprimiert. An der Transkription beteiligte Proteine und eine große Anzahl, der aus der Proteinbiosynthese

identifizierten Proteine, wurden ebenfalls in *S. epidermidis* 1457*barAB* induziert. Jedoch fanden sich auch in der Proteinsynthese eine erhebliche Anzahl an Spots, hauptsächlich Fragmente des Transkriptionsfaktors EF-Tu, die reprimiert waren.

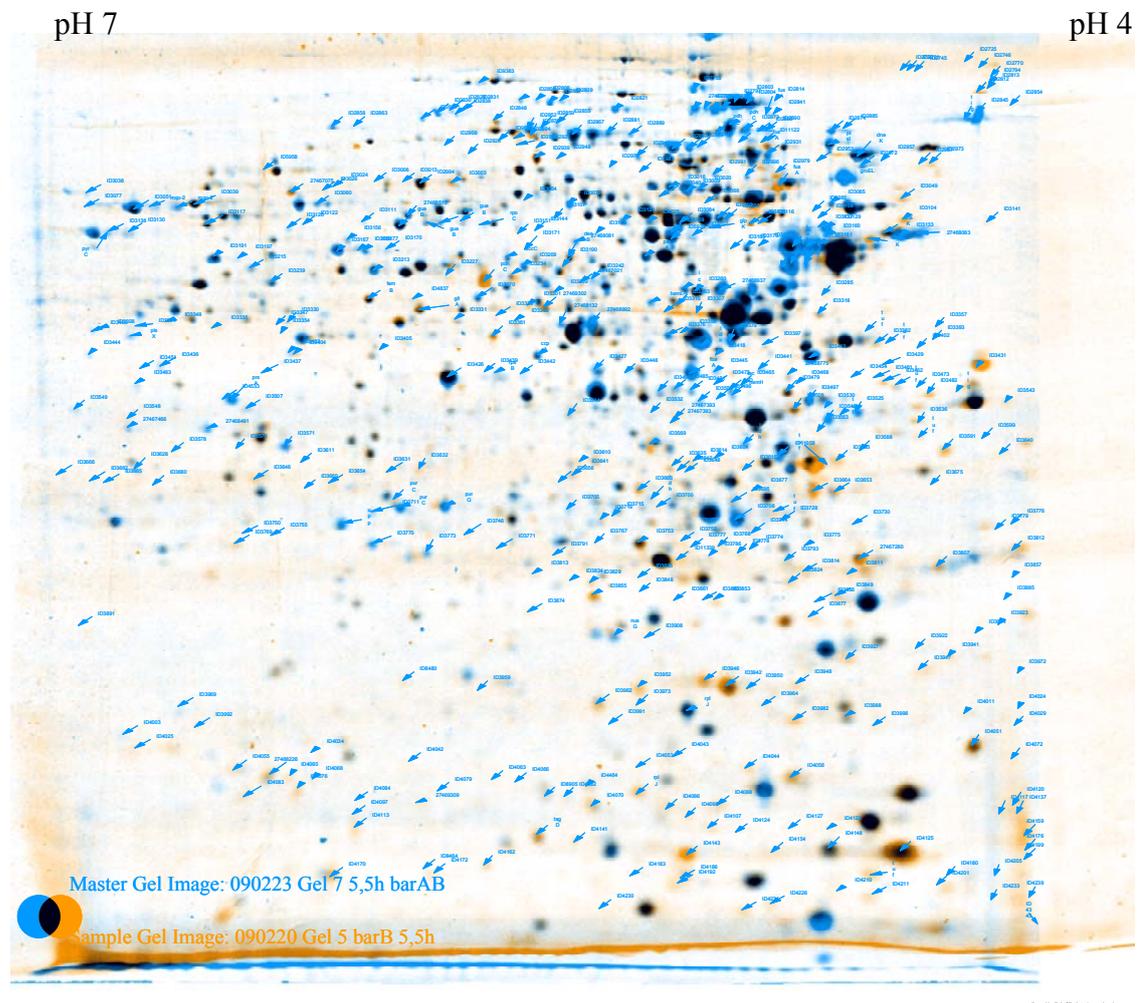


**Abb. 6-19** Änderungen des intrazellulären Proteoms in *S. epidermidis* 1457*barAB* im Vergleich mit 1457*barA*

Dargestellt ist ein Beispielexperiment für den Vergleich des intrazellulären Proteoms zwischen den *S. epidermidis* Mutanten 1457*barAB* und 1457*barA* in der exponentiellen Wachstumsphase. 1457*barAB* ist in blau dargestellt, 1457*barA* in orange. Überlagerte Spots erscheinen schwarz. Alle signifikant veränderten Proteinspots sind mit einem Pfeil gekennzeichnet und wurden über drei biologische Replikate ermittelt.

Des Weiteren wurde GroEL, ein Protein mit Chaperonfunktion im Vergleich zu beiden Einzelmutanten stark vermehrt exprimiert. Der Vergleich der Mutanten zum Wildtyp hatte für dieses Protein auch schon eine Induktion in 1457*barAB* und eine leichte Repression in 1457*barA* gezeigt. Wie zu erwarten, war die Induktion in 1457*barAB* im Vergleich zu 1457*barA* noch stärker. Zusätzlich wurde eine vermehrte Expression gegenüber 1457*barB* gezeigt, die ebenfalls stärker war als die

Induktion gegenüber dem Wildtyp. Vermutlich wurde das Protein in 1457*barB* im Vergleich zum Wildtyp auch schwächer exprimiert, diese Regulation lag aber wahrscheinlich unter dem Faktor 2, der für die Analyse ausschlaggebend war.



**Abb. 6-20** Änderungen des intrazellulären Proteoms in *S. epidermidis* 1457*barAB* im Vergleich mit 1457*barB*

Dargestellt ist ein Beispielexperiment für den Vergleich des intrazellulären Proteoms zwischen den *S. epidermidis* Mutanten 1457*barAB* und 1457*barB* in der exponentiellen Wachstumsphase. 1457*barAB* ist in blau dargestellt, 1457*barB* in orange. Überlagerte Spots erscheinen schwarz. Alle signifikant veränderten Proteinspots sind mit einem Pfeil gekennzeichnet und wurden über drei biologische Replikate ermittelt.

Ferner wurde auch die Proteinkinase Enzyme I (PtsI), welche für die Phosphorylierung von HPr verantwortlich ist, in beiden Vergleichen in 1457*barAB* hochreguliert (1457*barA* vs 1457*barAB*: 4,95-fach, 1457*barB* vs 1457*barAB*: 6,74-fach). Interessanterweise wurde auch CcpA jeweils leicht induziert. In der Biosynthese von Häm, Porphyrin und Cobalamin wurden zwei Proteine identifiziert, HemH und HemL-1. Beide Proteine wurden verglichen zum *barB* Deletionsstamm induziert, im Vergleich zu *S. epidermidis* 1457*barA* konnte nur HemH als signifikant

verstärkt exprimiert gezeigt werden. Im Energiemetabolismus fanden sich eine Reihe an Proteinen aus Glykolyse/Glukoneogenese, Pentosephosphatweg, TCA-Zyklus und Fermentation, die in beiden Vergleichen verstärkt auf den Gelen von 1457*barAB* nachgewiesen wurden. Mit Ausnahme einer putativen Malat:Quinon-Oxidoreduktase, deren Expression in beiden Fällen vermindert war, und der Citratsynthase (GtlA), die nur im Vergleich zu *S. epidermidis* 1457*barA* signifikant reguliert wurde und deren Expression leicht herunterreguliert wurde.

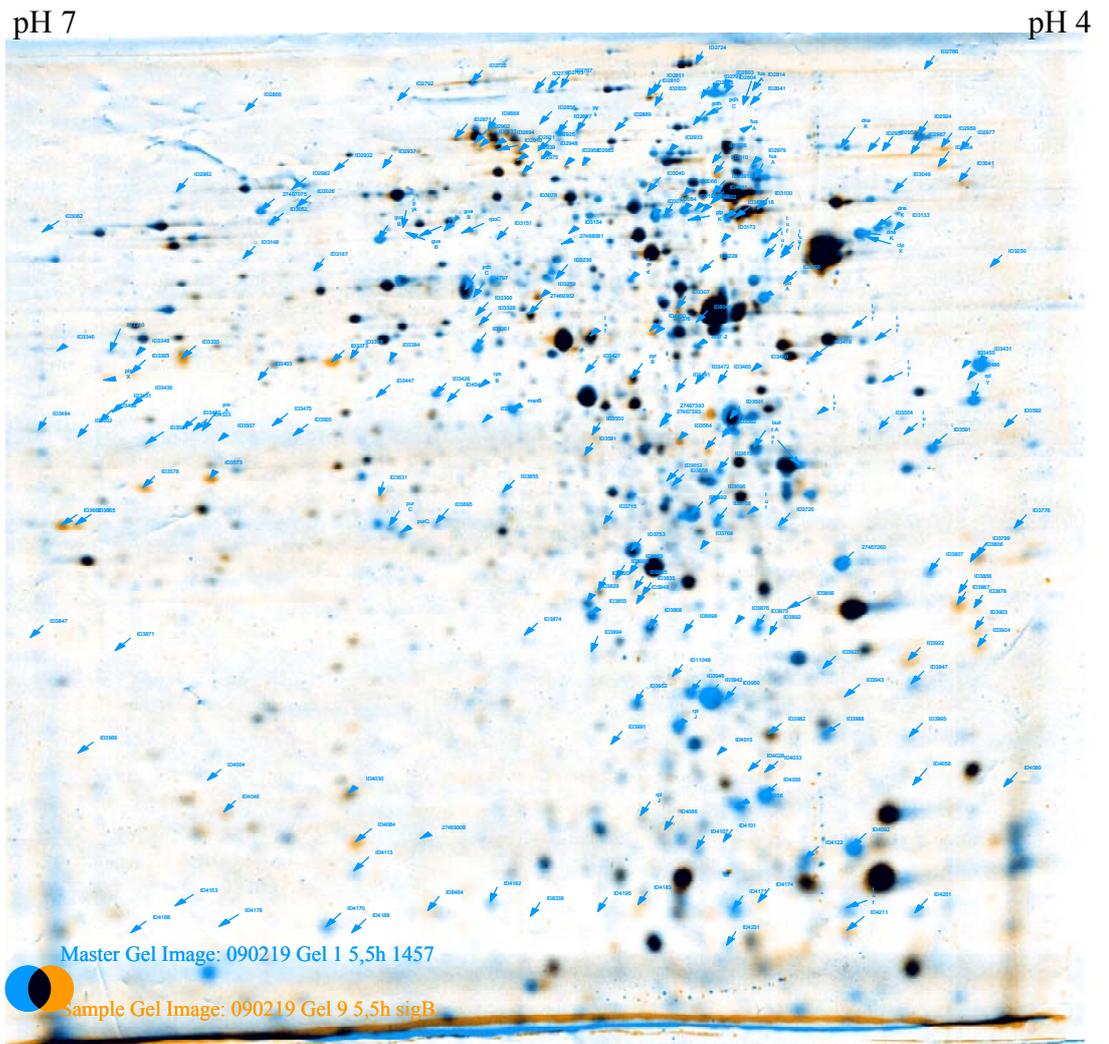
### 6.5.2 Die Deletionen von *sigB* und *sigBagr*

Die Deletion des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^B$  einzeln und in Kombination mit dem *agr-Quorum sensing* System führte zu einer erheblichen Änderung des intrazellulären Proteoms sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase im Vergleich zum Wildtyp. Der Verlust von aktivem  $\sigma^B$  resultiert in einer erhöhten Aktivität des *agr*-Systems (Jäger, 2006). Demnach konnten, durch die Untersuchung der Doppelmutante, Proteine identifiziert werden, die in 1457*sigB* *agr*-abhängig reguliert wurden.

Da die veränderten Proteinspots der stationären Phase bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht untersucht werden konnten, wurden hier lediglich die Ergebnisse der Analyse der exponentiellen Phase gezeigt (Abbildung 6-21 und 6-22). Die Mehrheit der regulierten Proteine konnte in beiden Mutanten nicht identifiziert werden (ca. 17 % bzw. 13 % identifiziert, (AnhangIII Tabelle 8-3)). Allerdings wurden in beiden Stämmen fast gleich viele Proteinspots im Vergleich zum Wildtyp verändert, die allerdings schon in der Verteilung der verminderten und verstärkten Spots große Unterschiede zeigten (Tabelle 6-6).

**Tab. 6-6** Anzahl signifikant regulierter Proteinspots in 1457*sigB* und 1457*sigBagr*

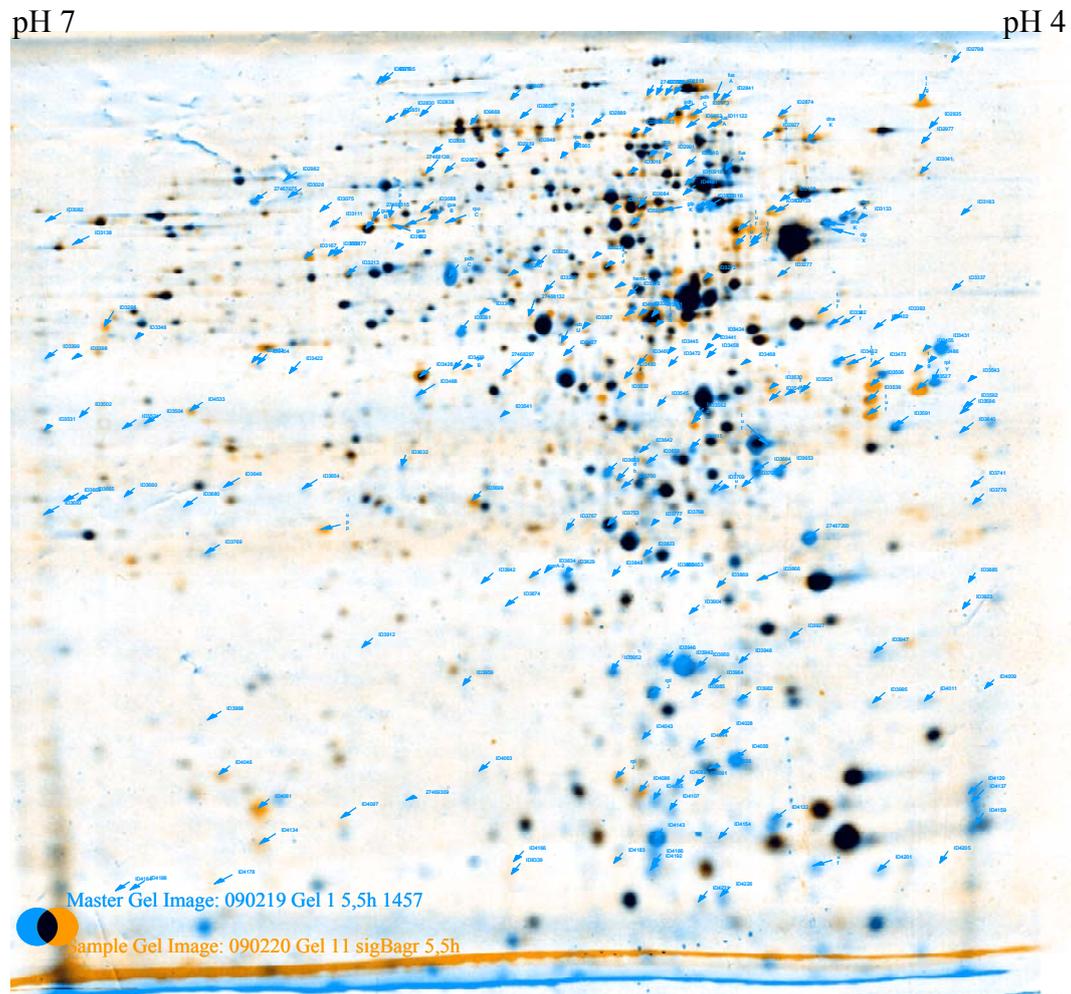
1457 vs	signifikante Spots (runter/hoch)	identifizierte Proteine (runter/hoch)
1457 <i>sigB</i>	252 (149/102)	32 (27/5)
1457 <i>sigBagr</i>	246 (116/130)	42 (13/29)



**Abb. 6-21** Änderungen des intrazellulären Proteoms in *S. epidermidis* 1457sigB  
 Dargestellt ist ein Beispielerperiment für den Vergleich des intrazellulären Proteoms zwischen *S. epidermidis* 1457 und der isogenen sigB Mutante in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Wildtyp ist in blau dargestellt, die Mutante in orange. Überlagerte Spots erscheinen schwarz. Alle signifikant veränderten Proteinspots sind mit einem Pfeil gekennzeichnet und wurden über drei biologische Replikate ermittelt.

In beiden Mutanten fanden sich in den zellulären Prozessen Nukleotidstoffwechsel, Transkription und Proteinbiosynthese Proteine, die sowohl induziert als auch reprimiert wurden. Auffällig war jedoch ein Fragment des trigger Faktors, der in *S. epidermidis* 1457sigBagr sehr stark erhöht war (20,06-fach) und in *S. epidermidis* 1457sigB gar nicht signifikant reguliert wurde. Aus dem Energiemetabolismus wurden ebenfalls in beiden Mutanten einige Proteine identifiziert. In *S. epidermidis* 1457sigB wurden die Proteine vermindert exprimiert, wohingegen in *S. epidermidis* 1457sigBagr weitere Proteine des Energiemetabolismus signifikant verändert waren und lediglich mit Ausnahme einer putativen Malat:Quinon-Oxidoreduktase, verstärkt exprimiert wurden. Es konnten weiterhin zwei hochregulierte Proteine des Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus

identifiziert werden, die nur durch die *sigB*-Deletion reguliert wurden. Der Positivregulator der  $\sigma^B$  Kaskade, RsbU, wurde dahingegen nur in dem *agr*-Deletionsstamm verstärkt exprimiert.

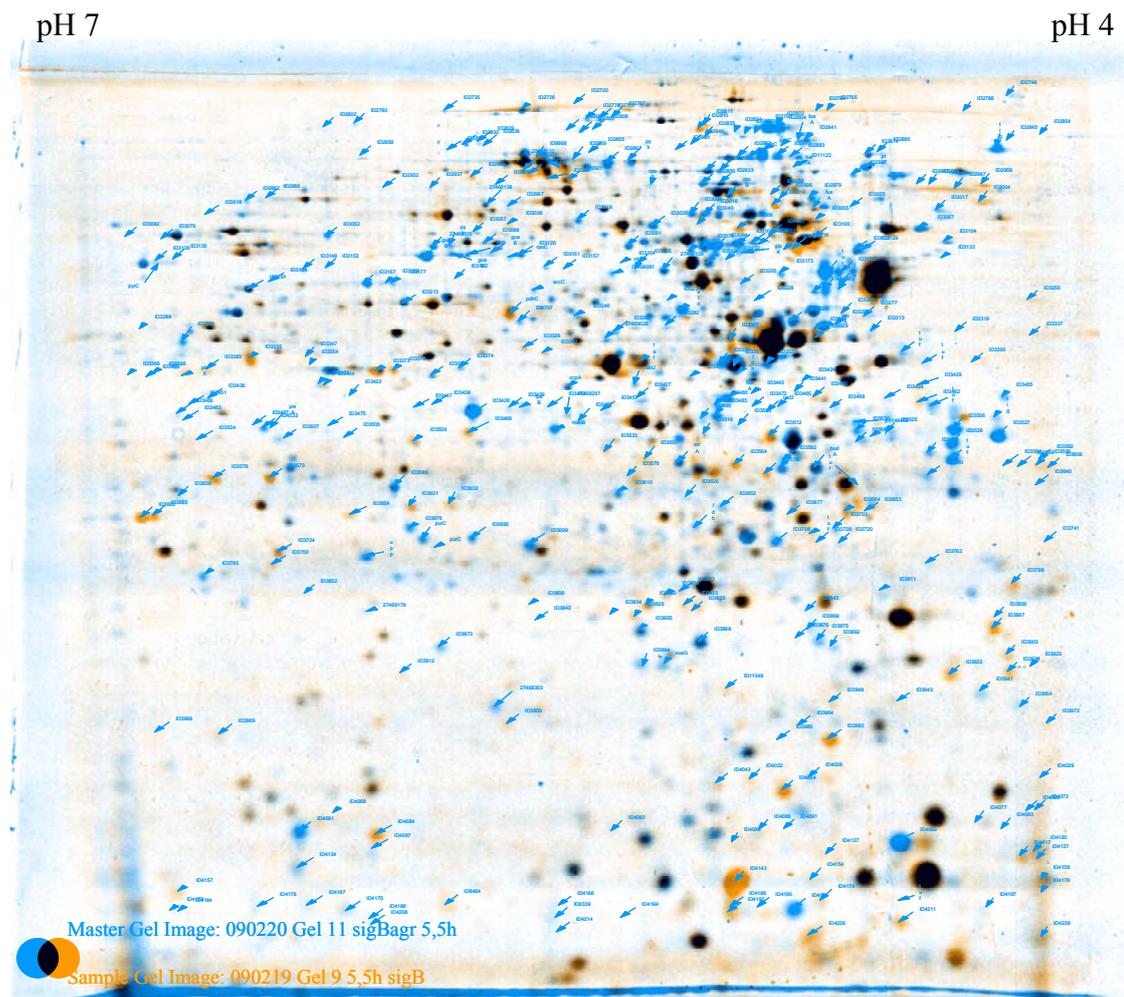


**Abb. 6-22** Änderungen des intrazellulären Proteoms in *S. epidermidis* 1457*sigBagr*. Dargestellt ist ein Beispielexperiment für den Vergleich des intrazellulären Proteoms zwischen *S. epidermidis* 1457 und der isogenen *sigBagr* Doppelmutante in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Wildtyp ist in blau dargestellt, die Mutante in orange. Überlagerte Spots erscheinen schwarz. Alle signifikant veränderten Proteinspots sind mit einem Pfeil gekennzeichnet und wurden über drei biologische Replikate ermittelt.

Da bekannt war, dass die Deletion von *sigB* eine Induktion des *agr*-Systems zur Folge hat, sollten die Stämme 1457*sigB* und 1457*sigBagr* auch untereinander verglichen werden (Abbildung 6-23), um Proteine identifizieren zu können, die ausschließlich durch den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  reguliert wurden. Durch die *agr* Induktion könnten Proteine sowohl reprimiert als auch induziert werden. Eine zusätzliche Deletion von *agr* sollte diesen Effekt aufheben und ein Protein, das ausschließlich durch  $\sigma^B$  reguliert wird, sollte in der Doppelmutante in gleicherweise beeinflusst sein wie in 1457*sigB*. Zusätzlich sollte dieses Protein bei einem Vergleich der Mutanten untereinander nicht mehr signifikant reguliert sein. Im Gegenzug

sollten Proteine, deren Expression in *1457sigB* reguliert wurde und die in *1457sigBagr* entgegengesetzt reguliert wurden, wahrscheinlich *agr*-abhängig exprimiert werden. Demnach sollte deren Regulation im Vergleich der Mutanten noch stärker hervortreten. Es konnten sechs nicht redundante Proteine identifiziert werden, deren Expression in *1457sigB* und *1457sigBagr* im Vergleich zum Wildtyp in gleicher Richtung reguliert wurde und die beim Vergleich der Mutanten nicht mehr signifikant verändert waren. Zu diesen Proteinen zählten ein ribosomales Protein (RplY), die ATP-abhängige Protease ClpX, eine putative Malat:Quinon Oxidoreduktase, ein putatives Stressprotein und zwei konservierte hypothetische Proteine. In der zweiten Gruppe wurden fünf Proteine identifiziert, die beta-Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase (RpoC), ebenfalls ein ribosomales Protein (RpsB) und drei Enzyme des Energiemetabolismus (Glycerolkinase, Alanindehydrogenase und Pyruvatkinase).

Der direkte Vergleich von *1457sigB* und *1457sigBagr* zeigte größere Veränderungen des intrazellulären Proteoms, als der Vergleich der jeweiligen Mutanten zum Wildtyp. 394 Proteinspots wurden unterschiedlich reguliert. Davon wurden im Vergleich zu *S. epidermidis* *1457sigB* in *1457sigBagr* 150 Spots schwächer und 244 Spots stärker exprimiert. Identifiziert wurden nur 57 Proteinspots (36 Proteine) von denen sich 51 unter den stärker exprimierten befanden (Anhang III Tabelle 8-4). Auffällig waren einige Proteine, die in *1457sigBagr* extrem stark induziert wurden. Die Inositol-monophosphat-dehydrogenase (GuaB) wurde in vier Spots nachgewiesen, von denen zwei stark induziert waren (22,77-fach und 41,05-fach). Des Weiteren wurde die beta-Untereinheit der DNA-abhängigen Polymerase (RpoC) 23,83-fach stärker exprimiert. Im Energiemetabolismus kam es jedoch zur stärksten Induktion. Die Glycerolkinase (GlpK) wurde um das 60,68-Fache und ein Fragment des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (PdhC) wurde um das 36,53-Fache induziert.



**Abb. 6-23** Änderungen des intrazellulären Proteoms in *S. epidermidis* 1457sigBagr im Vergleich mit 1457sigB

Dargestellt ist ein Beispielerperiment für den Vergleich des intrazellulären Proteoms zwischen den *S. epidermidis* Mutanten 1457sigBagr und 1457sigB in der exponentiellen Wachstumsphase. 1457sigBagr ist in blau dargestellt, 1457sigB in orange. Überlagerte Spots erscheinen schwarz. Alle signifikant veränderten Proteinspots sind mit einem Pfeil gekennzeichnet und wurden über drei biologische Replikate ermittelt.

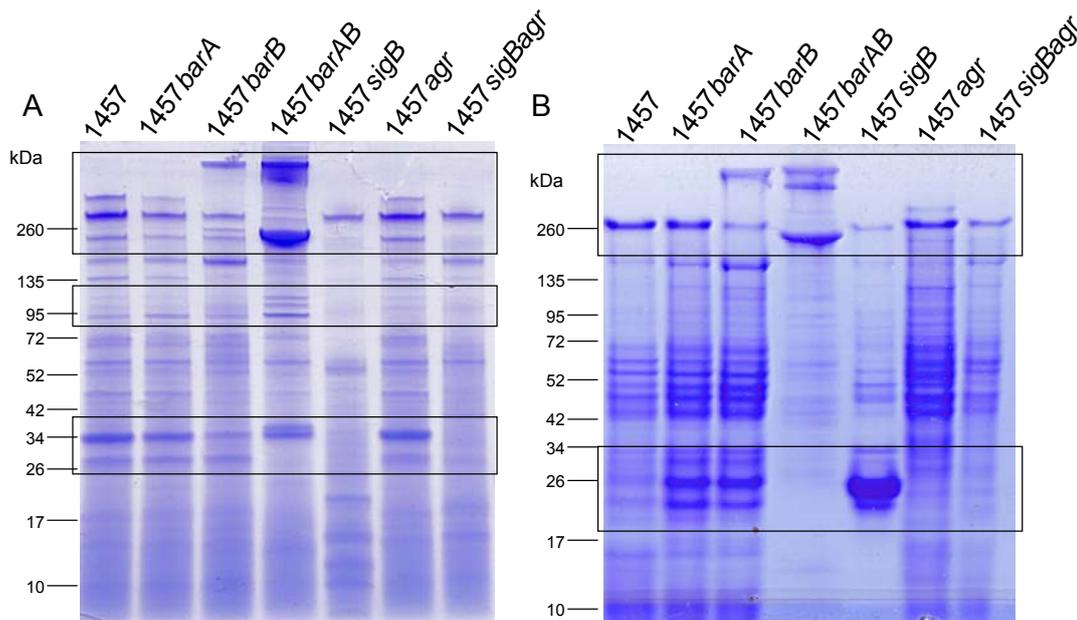
## 6.6 Änderungen der extrazellulären Expressionsmuster durch die Deletionen von *barA*, *barB*, *barAB*, *sigB*, *agr* und *sigBagr*

Neben dem intrazellulären Proteom sollte auch das extrazelluläre Proteom der Mutanten untersucht werden. Hierzu wurden die Kulturüberstände aus exponentieller und stationärer Wachstumsphase in 1D-SDS-Gelen aufgetrennt, um differentielle Banden im Proteinmuster aufzeigen zu können.

### 6.6.1 Analyse des extrazellulären Proteoms in der 1D SDS PAGE

Sowohl in der exponentiellen Phase als auch in der stationären Phase kam zu erheblichen Veränderungen des extrazellulären Proteinmusters. In beiden

Wachstumsphasen fielen besonders zwei Bereiche mit großen Veränderungen auf (Abbildung 6-24). Im hochmolekularen Bereich über und um 260 kDa fanden sich mehrere Banden, die in *S. epidermidis* 1457*barB*, 1457*barAB*, 1457*sigB* und 1457*sigBagr* nicht zu erkennen waren. In der stationären Phase wurde die größte dieser Banden in *S. epidermidis* 1457*agr* im Vergleich zum Wildtyp stärker exprimiert. Weiterhin sind exponentiell und stationär extrem große zusätzliche Banden in *S. epidermidis* 1457*barB* und 1457*barAB* beobachtet worden. In *S. epidermidis* 1457*barAB* konnte eine Proteinbande von ca. 220 kDa gezeigt werden, die nur in diesem Stamm induziert wurde und stationär und exponentiell zu beobachten war. Im Bereich von 90 – 120 kDa wurden in dieser Mutante in der exponentiellen Phase ebenfalls zwei Banden beobachtet, die in den anderen Stämmen, wenn überhaupt nur in wesentlich geringerer Stärke zu finden waren. In den Kulturüberständen der stationär gewachsenen Zellen ließen sich in diesem Bereich keine wesentlichen Änderungen feststellen.



**Abb. 6-24** Extrazelluläre Proteine in *S. epidermidis*

10 µg extrazellulärer Proteinfractionen von *S. epidermidis* 1457 und dessen isogene Mutanten mit Deletionen der Genen *barA*, *barB*, *sigB* und *agr* wurden in eindimensionaler SDS-PAGE (4-12 %) aufgetrennt und mit Coomassie sichtbar gemacht. Die Proteine wurden aus dem zellfreien Kulturüberständen nach 5,5 h (A) und 24 h (B) Wachstum in TSB gewonnen. Bereiche mit starken Veränderungen sind eingerahmt.

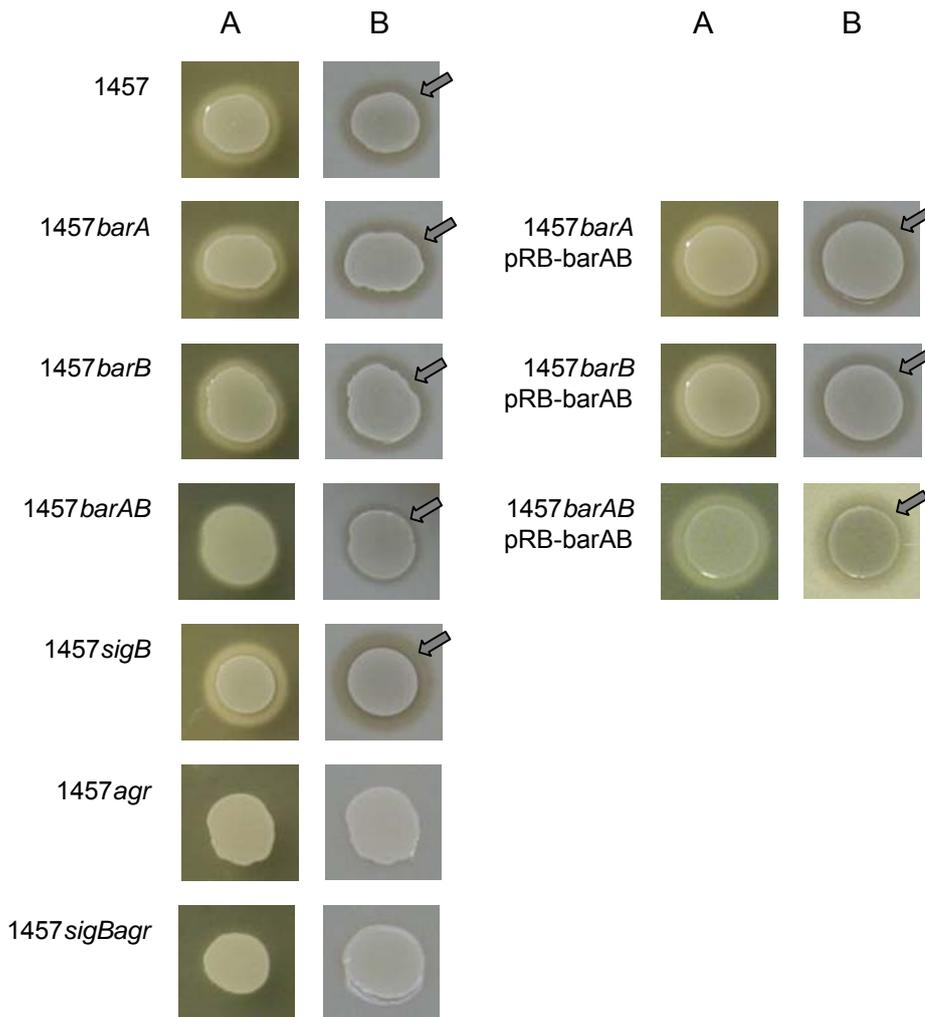
Zwischen 40 und 25 kDa wurden wiederum in beiden Wachstumsphasen Unterschiede beobachtet. In diesem Größenbereich sollten sich die extrazellulären Proteasen befinden. In den *S. epidermidis* Stämmen 1457, 1457*barA*, 1457*barB*, 1457*agr* zeigten sich zwei dominante Banden, von denen die kleinere in 1457*barAB*

nicht mehr zu erkennen war. Zusätzlich wurde in diesem Stamm aber eine weitere Bande mit etwas höherem Molekulargewicht detektiert. In *S. epidermidis* 1457*sigB* und 1457*sigBagr* konnte keine der beiden Banden ausgemacht werden. In diesem Bereich konnten auch in Proteinproben der Stationärphase Unterschiede gefunden werden. Hier lässt sich zu *S. epidermidis* 1457*barAB* sagen, dass kaum Banden gesehen wurden. Auffällig war jedoch eine Bande von ca. 25 kDa, die in *S. epidermidis* 1457*sigB* massiv induziert wurde.

### 6.6.2 Analyse der extrazellulären Proteaseaktivität auf Casein-Agar

Da die Analyse des extrazellulären Proteoms einen Hinweis auf Änderungen der Proteaseexpression in den Mutanten lieferte, sollte diese mit Hilfe von Casein-Agarplatten untersucht werden. Auf den Platten können sowohl denaturierende als auch lytische Zonen sichtbar gemacht werden.

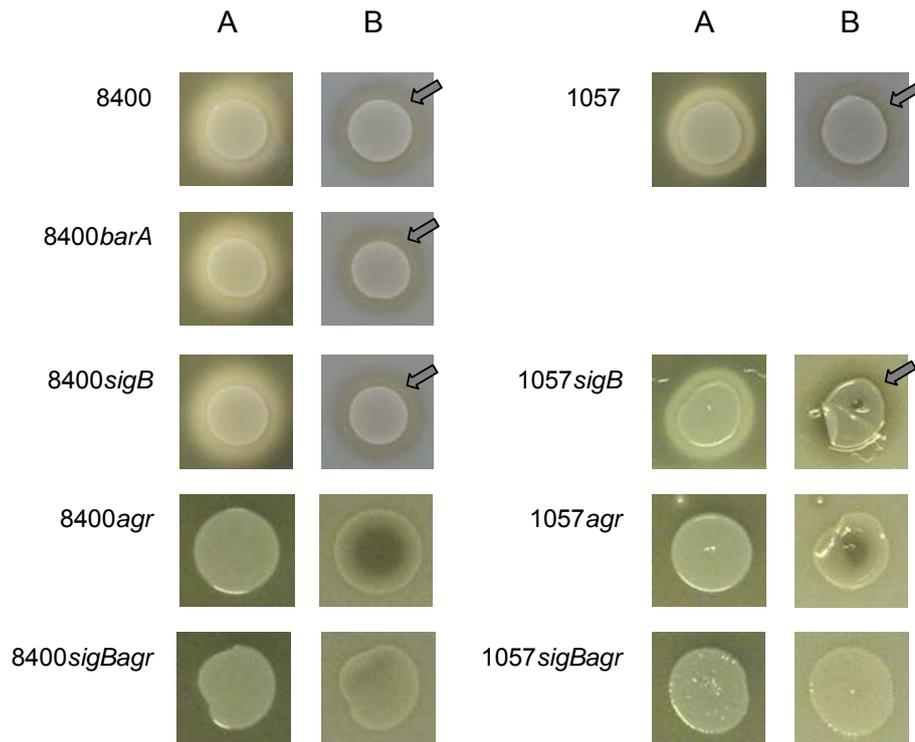
Die Analyse des Caseinabbaus durch *S. epidermidis* 1457 zeigte sowohl auf dem nativen als auch auf dem denaturierten Agar schmale Lysezonen um den Bakterienrasen (Abbildung 6-25). Verglichen mit *S. epidermidis* 1457 besaßen die Mutanten 1457*barA* und 1457*barB* eine leicht stärkere lytische und denaturierende Aktivität, die jedoch phänotypisch keine Unterscheidung zwischen *barA* und *barB* zuließ. Die Doppelmutante 1457*barAB* zeigte dagegen kaum einen denaturierenden Bereich und nur einen sehr schmalen lysierten Ring um die Bakterien auf den Caseinplatten. Die komplementierten Mutanten zeigten auf den Caseinagar wieder einen mit dem Wildtyp vergleichbaren Abbau. Der Agar um 1457*sigB* wies dagegen im nativen Zustand schon denaturierte und lytische Zonen auf, deren Breite wesentlich größer war als die des Wildtyps. Die Aktivität war auch stärker im Vergleich zu 1457*barA* und 1457*barB*. Die Mutanten 1457*agr* und die 1457*sigBagr* zeigten keine Lysezonen auf nativem oder denaturiertem Caseinagar.



**Abb. 6-25** Proteaseexpression verschiedener *S. epidermidis* 1457 Stämme  
 Es wurden zweimal 10  $\mu$ l der Vorkultur auf den Agar aufgetropft und für 24 h bei 37 °C bebrütet. Die denaturierenden Höfe sind auf dem nativen Agar erkennbar (A). Die lysierenden Höfe wurden durch Behandlung des Agars mit 10 %iger Essigsäure sichtbar gemacht (B). Die Pfeilspitzen kennzeichnen das Ausmaß eines lysierenden Hofes.

Um die Änderungen der Proteaseexpression auf die verschiedenen Deletionen und nicht auf spezifische Expressionsmuster des Stammes 1457 zurückführen zu können, wurde diese auch in den *S. epidermidis* Hintergründen 8400 und 1057 durchgeführt.

Die Proteaseaktivität dieser beiden Wildtypstämme war im Vergleich zu 1457 wesentlich höher (Abbildung 6-26). Die Expressionsmuster der verschiedenen Mutanten verhielten sich allerdings vergleichbar. Der Verlust des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^B$  führte zu einer erhöhten Expression der Proteasen, die allerdings nicht mehr so deutlich wird, da das Expressionsniveau schon sehr hoch lag. Die Deletion des *agr*-Systems sowohl in 1457*agr* als auch in der Doppelmutante 1457*sigBagr* führte zu einer drastischen Reduzierung der Proteaseexpression, die auf den Caseinplatten nicht mehr nachgewiesen werden konnte.



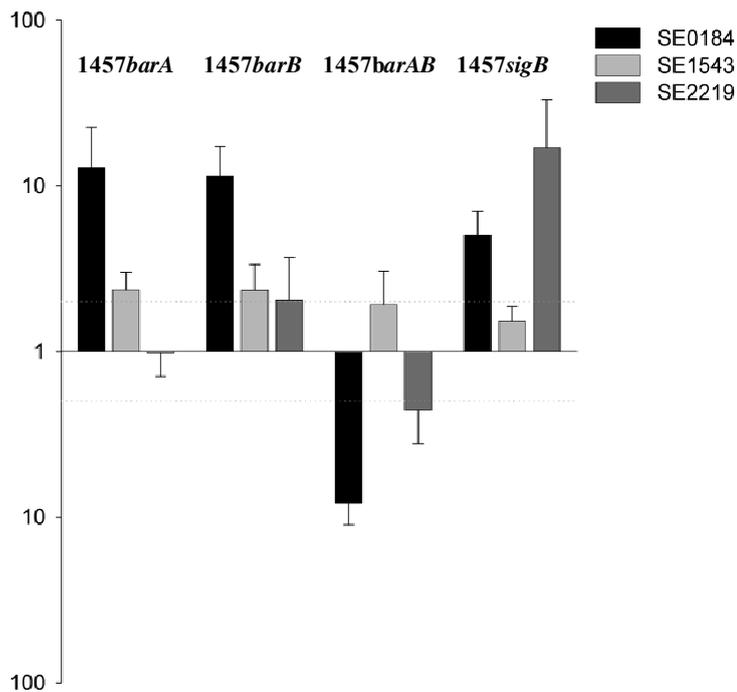
**Abb. 6-26** Proteaseexpression in *S. epidermidis* 8400 und 1057 Stämmen  
 Es wurden zweimal 10 µl der Vorkultur auf den Agar aufgetropft und für 24 h bei 37 °C bebrütet. Die denaturierenden Zonen sind auf dem nativen Agar erkennbar (A). Die lysierenden Zonen wurden durch Behandlung des Agars mit 10 %iger Essigsäure sichtbar gemacht (B). Die Pfeilspitzen kennzeichnen das Ausmaß eines lysierenden Hofes.

### 6.6.3 Quantitative Transkriptionsanalyse der extrazellulären Proteasen

Die Ergebnisse des Proteasescreenings auf den Casein-Agarplatten ließen eine stark veränderte Expression verschiedener Proteasen vermuten. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Transkription der Proteasen in *S. epidermidis* 1457 näher untersucht. Mittels RT-PCR wurde die Transkription der Cysteinprotease SE0184, der Serinprotease SE1543 und der Metalloprotease SE2219 in den Deletionsmutanten verglichen zum Wildtyp genauer analysiert.

Zunächst wurde die Transkription in *S. epidermidis* 1457, 1457barA, 1457barB, 1457barAB und 1457sigB untersucht (Abbildung 6-27), nachdem sie für 7 h (exponentiell) in TSB kultiviert wurden. Die relative Quantifizierung ergab, dass SE0184 in 1457barA 12,8-fach und in 1457barB 11,5-fach verglichen zum Wildtyp hochreguliert wurde. SE1543 wurde in beiden Mutanten nur leicht stärker exprimiert (2,3-fach). Die Expression von SE2219 war in 1457barA mit der des Wildtyps vergleichbar, während sie in 1457barB leicht, jedoch nicht signifikant hochreguliert wurde. Die Doppelmutante 1457barAB zeigte dagegen eine signifikant 8-fach geringere Expression von SE0184 und eine 2,2-fach geringere Expression der

Metalloprotease SE2219. Die Analyse für SE1543 ergab eine 1,9-fache und damit eine biologisch nicht signifikante Hochregulation im Vergleich zum Wildtyp. Der Verlust des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^B$  führte zu einer 5-fach erhöhten Expression von SE0184 und einer 17-fach erhöhten Expression von SE2219 gegenüber dem Wildtyp. SE1543 erfuhr keine signifikante Veränderung in Bezug auf *S. epidermidis* 1457.



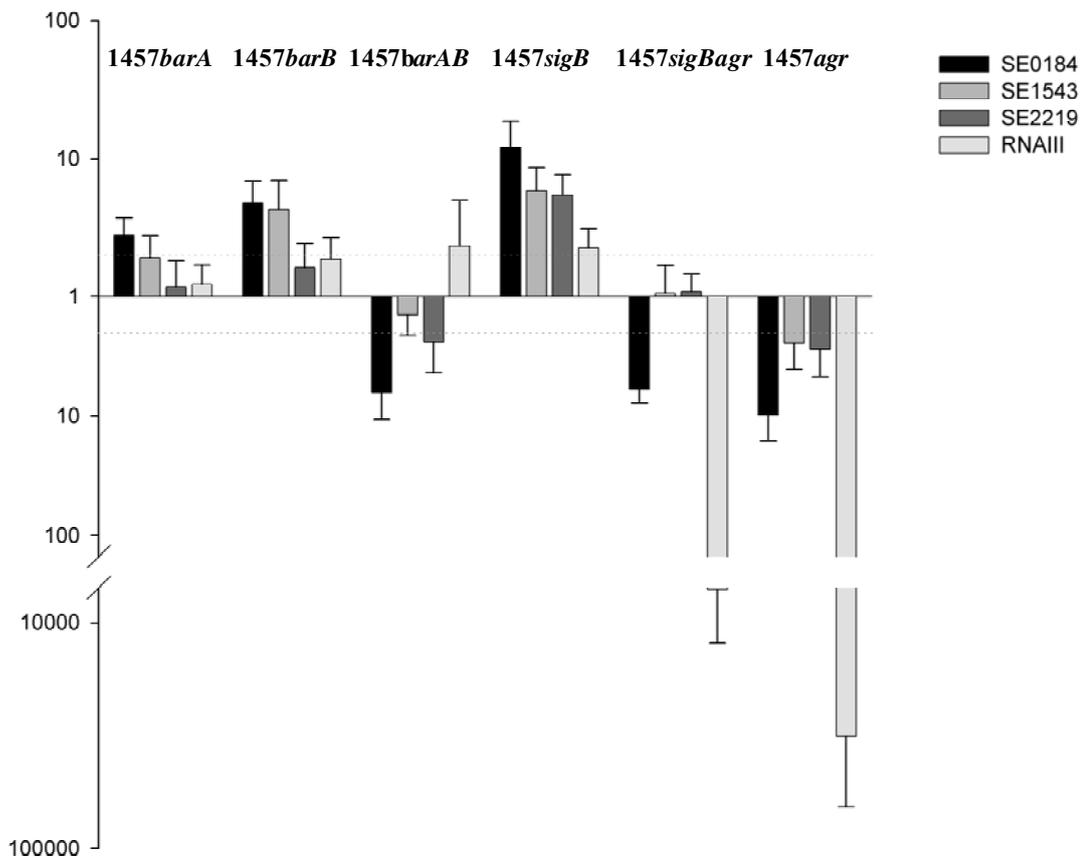
**Abb. 6-27** Expression von SE0184, SE1543 und SE2219 nach 7 h

Relative Transkriptionsanalyse der Stämme *S. epidermidis* 1457barA, 1457barB, 1457barAB und 1457sigB nach 7 h Wachstum in TSB. Die dargestellte x-fache Regulation bezieht sich stets auf die Expression in *S. epidermidis* 1457 und gilt bei mind. 2-fach erhöhter oder verminderter Expression als signifikant (gestrichelte Linie). Als nicht reguliertes Haushaltsgen wurde die Guanylatkinase für die Auswertung mitgeführt. Die Analyse der Genexpression basiert auf der Auswertung von drei unabhängigen Versuchen.

Die Proteaseexpression wird in *S. epidermidis* in der stationären Phase stark durch das *agr*-System induziert (Vuong *et al.*, 2000; Batzilla *et al.*, 2006; Kneschke, 2007). Demnach wurde die Transkription der Proteasen auch nach 24 h untersucht. Zusätzlich wurde die Expression der RNAIII, dem Effektormolekül des *agr*-Systems, beobachtet, um eine mögliche Abhängigkeit der Proteasetranskription nachzuweisen. Des Weiteren wurden die Mutanten 1457agr und 1457sigBagr in die Analyse miteinbezogen.

In der stationären Phase wurde, wie auch in der exponentiellen Phase, die Expression der Protease SE0184 in 1457barA signifikant erhöht 4 (2,7-fach). SE1543 und SE2219 zeigten keine biologisch signifikante Veränderung gegenüber

dem Wildtyp (Abbildung 6-28). In *1457barB* wurde die Transkription von SE0184 und SE1543 um das 4,7- bzw. 4,2-Fache gegenüber *S. epidermidis* 1457 hochreguliert. Die Metalloprotease wurde auch in dieser Mutante stationär nicht beeinflusst. Die Expression der RNAIII wurde in den beiden Einzelmutanten *1457barA* und *1457barB* nicht relevant verändert. In *1457barB* war das mRNA Niveau etwas höher, jedoch blieb es unter einer 2-fachen Änderung. Hingegen wurde in *1457barAB* die RNAIII 2,3-fach hochreguliert gegenüber dem Wildtyp. Trotzdem wurde die Transkription der Gene SE0184 (6,4-fach) und SE2219 (2,4-fach) herunterreguliert. Die Expression von SE1543 war mit der des Wildtyps vergleichbar. In *1457sigB* kam es zu einer verstärkten Expression aller drei Proteasen. Die Transkription von SE0184 war mit einer 12-fachen Hochregulation am stärksten induziert, während SE1543 5,8-fach und SE2219 5,5-fach vermehrt transkribiert wurde als in 1457. Die relative Menge des RNAIII-Transkripts war 2,3-fach höher als im Wildtyp und demnach vergleichbar mit der Hochregulation in *1457barAB*. In der Doppelmutante *1457sigBagr* wurde SE0184 signifikant 6-fach weniger exprimiert, dahingegen waren die Transkriptmengen von SE1543 und SE2219 mit denen im Wildtyp vergleichbar. Der Verlust des *agr*-Systems führte zu einer signifikanten Herabregulation aller Proteasen. Die Expression von SE0184 war 9,8-fach, die von SE1543 2,8-fach und die von SE2219 2,7-fach reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutanten *1457sigBagr* und *1457agr* weisen beide kein funktionstüchtiges *agr*-Operon mehr auf, demnach konnte auch in beiden Fällen keine Transkription von RNAIII nachgewiesen werden.



**Abb. 6-28** Genexpression von SE0184, SE1543, SE2219 und RNAIII nach 24 h  
Relative Transkriptionsunterschiede in *S. epidermidis* 1457barA, 1457barB, 1457barAB, 1457sigB, 1457sigBagr und 1457agr in Bezug auf den Wildtyp 1457 nach Wachstum der Zellen in TSB für 24 h. Die Expression gilt als signifikant, wenn eine 2-fach erhöhte bzw. verminderte Expression nachgewiesen werden konnte (gestrichelte Linie). Als nicht reguliertes Haushaltsgen fungierte die Guanylatkinase. Die Analyse der Genexpression basiert auf der Auswertung von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

## 7 Diskussion

Die breite Anwendung von medizinischen Implantaten und die steigende Zahl von immunsupprimierten Patienten in der modernen Medizin führten dazu, dass *Staphylococcus epidermidis* als Pathogen an Bedeutung gewonnen hat und mittlerweile zu den fünf häufigsten Verursachern nosokomialer Infektionen zählt (Rupp and Archer, 1994). Hierbei werden am häufigsten Infektionen von implantierten Fremdkörpern beobachtet. Der wichtigste Pathomechanismus dieser Fremdkörper-assoziierten Staphylokokken-Infektionen ist die Fähigkeit von *S. epidermidis* auf polymeren Oberflächen mehrschichtige Biofilme auszubilden (reviewed in von Eiff *et al.*, 2002; Mack *et al.*, 2006; Mack *et al.*, 2007; O'Gara, 2007). Die Biofilmbildung auf polymeren Oberflächen verläuft in mehreren Phasen. Zunächst heften sich die Zellen durch spezifische und unspezifische Mechanismen an die Oberfläche an. Nachfolgend akkumulieren die Zellen als mehrschichtiger Biofilm, in dem sich die Zellen durch interzelluläre Adhäsine miteinander verbinden und die Mehrheit der Zellen keinen direkten Kontakt zu der Polymeroberfläche besitzt. In der vorgestellten Arbeit wurde maßgeblich die Phase der Akkumulation weitergehend untersucht. In den letzten Jahren sind für *S. epidermidis* mehrere Faktoren, die als interzelluläre Adhäsine fungieren, beschrieben worden. Von diesen Faktoren hat sich das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin (PIA) als entscheidende Komponente für die Zellaggregation und die Biofilmbildung erwiesen. PIA wird durch einen Syntheseparat gebildet, der in dem *icaADBC*-Operon kodiert wird (Heilmann *et al.*, 1996; Mack *et al.*, 1996b). Zusätzlich zu *icaADBC* scheinen noch weitere Faktoren an der Synthese von PIA beteiligt zu sein (Mack *et al.*, 1994; Dobinsky *et al.*, 2003).

Die Synthese von PIA wird durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Umwelteinflüssen beeinflusst und unterliegt einer komplexen Regulation, die bisher nicht vollständig verstanden ist. Es konnten drei von *icaADBC* unabhängige Genorte identifiziert werden, deren Inaktivierung zu einer verminderten Bildung von PIA führte (Mack *et al.*, 1994; Knobloch *et al.*, 2003). Diese Mutationen konnten durch Komplementation mit *icaADBC* unter einen induzierbaren Promotor in ihrer Biofilmbildung rekonstituiert werden. Dies wies darauf hin, dass es sich bei den inaktivierten Genorten um regulative Faktoren handelte. In der vorgelegten Arbeit wurde der, in der biofilmnegativen Mutante M12, inaktivierte Genort weitergehend charakterisiert. In dieser Mutante inserierte das Transposon in das homologe *purR*-

Gen von *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* und *Lactococcus lactis*. In *B. subtilis* und *L. lactis* konnte dem *purR*-Gen eine Funktion zugewiesen werden, während in Staphylokokken bisher keine Funktion dieses Gens beschrieben wurde. In *B. subtilis* wurde eine negative regulatorische Aktivität in der Purinsynthese gezeigt, wohingegen in *L. lactis* eine positive Aktivität nachgewiesen werden konnte (Weng *et al.*, 1995; Kilstrup and Martinussen, 1998; Weng and Zalkin, 2000). Hierbei erfolgt die Regulation durch PurR über spezifische Bindung an sog. PurR-Bindestellen. Da in der Promotorregion von *icaADBC* oder dessen negativem Regulator IcaR keine homologen Sequenzen zu diesen PurR-Bindestellen gefunden werden konnten, ist eine direkte Regulation dieser Gene durch PurR unwahrscheinlich (Knobloch *et al.*, 2003). Durch vorangegangene Untersuchungen der Mutante M12 konnte gezeigt werden, dass die Transposoninsertion hinter einer putativen  $\sigma^B$ -abhängigen Promotorsequenz lag, und es wurde vermutet, dass der biofilmnegative Phänotyp möglicherweise durch Inaktivierung von Genen unterhalb von *purR* verursacht wurde. Da durch andere Arbeiten aus der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass der alternative Sigmafaktor  $\sigma^B$  an der Regulation der Biofilmbildung von *S. epidermidis* durch negative Regulation des negativen Regulators IcaR beteiligt ist (Knobloch *et al.*, 2001; Knobloch *et al.*, 2004a), wurde vermutet, dass die Gene unterhalb von *purR* regulative Intermediate in dem Regulationsnetzwerk darstellen könnten. Der in *S. epidermidis* gefundene putative  $\sigma^B$ -abhängige Promotor ist innerhalb der kodierenden Sequenz von *purR* konserviert und wurde somit auch in *B. subtilis* und *S. aureus* beschrieben (Petersohn *et al.*, 1999a; Bischoff *et al.*, 2004). Interessanterweise konnte in *B. subtilis* gezeigt werden, dass dieser Promotor nicht  $\sigma^B$ -abhängig transkribiert wird, während er in *S. aureus* einer Kontrolle durch  $\sigma^B$  unterliegt. Deshalb wurde zunächst untersucht, ob der putative Promotor in *S. epidermidis* aktiv ist.

### 7.1 Kartierung des $\sigma^B$ -abhängigen Promotors vor *barA*

Es war bekannt, dass in *S. epidermidis* ein Transkript gebildet wurde, welches möglicherweise von der putativen Promotorsequenz ausging. Das Transkript kodiert für die Gene *barA* und *barB* und wird in der biofilmnegativen Transposonmutante M12 nicht mehr abgelesen (Bartscht, 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dieses Transkript sowohl in exponentiell als auch in stationär wachsenden *S. epidermidis* 1457 Zellen vorhanden ist. Im Gegensatz zu einem weiteren, größeren

Transkript, welches außer für *barA* und *barB* auch für *ispE* und *purR* kodiert, das nur in exponentiellen Zellen nachgewiesen werden konnte (Bartscht, 2001; Knobloch *et al.*, 2004b; Knobloch, 2005). Demnach gab es schon eine Reihe von Hinweisen auf den Promotor. Auch die  $\sigma^B$ -Abhängigkeit konnte durch Verlust des Transkriptes in Mutanten des  $\sigma^B$ -Operons gezeigt werden (Jäger, 2006). In dieser Arbeit sollte der Transkriptionsstartpunkt experimentell nachgewiesen werden.

In der Primer Extension Analyse wurde der Bereich um einen Thyminrest 151 Nukleotide vor dem Startcodon als 5'-Ende der mRNA kartiert. Es konnte jedoch nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob der Startpunkt nicht auch wenige Nukleotide daneben liegen könnte. Die RACE-Technologie lieferte als Startpunkt einen Adeninrest 148 Nukleotide vor dem Startcodon von *barA*. Davor befindet sich in der Sequenz ein Thymin, da in dieser Technik ein PolyA-Schwanz an die mRNA gehängt wird und diese dann mit einem reversen Primer sequenziert wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Startpunkt auch auf diesem Nukleotid liegen könnte. Somit konnte durch die zweite Technik der Startpunkt auf 148 bzw. 149 Nukleotide vor dem Startcodon festgelegt werden. Da nur zwei oder drei Nukleotide die Ergebnisse trennen, wurde jeweils der gleiche Promotor zugeordnet. Es konnte der schon durch die Konsensussuche vermutete Promotor bestätigt werden. Die Sequenzen der -35 und -10-Regionen entsprechen perfekt der Konsensussequenz und sind durch 14 Nukleotide voneinander getrennt.

Die Promotorkonsensussequenz für  $\sigma^B$  in *B. subtilis* wurde wie folgt beschrieben: GTTTWW 13-16 Nukleotide GGGWAW (Petersohn *et al.*, 1999b). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der  $\sigma^B$ -Proteine in *S. aureus* und *B. subtilis* von 77 %, war anzunehmen, dass  $\sigma^B$  in *S. aureus* eine ähnliche Sequenz erkennt (Kullik and Giachino, 1997). Mittlerweile wurde auch eine Konsensussequenz für *S. aureus* publiziert (GttTaa 12/15 Nukleotide gGGTAt), die der von *B. subtilis* entspricht (Homerova *et al.*, 2004). Daher konnte mit hoher Sicherheit angenommen werden, dass diese Sequenz auch in *S. epidermidis* erkannt wird. Einen weiteren Hinweis darauf geben die hohen Ähnlichkeiten der Proteine aus den verschiedenen Organismen. Ein Vergleich der Proteinsequenzen von  $\sigma^B$  zwischen *B. subtilis* und *S. aureus*, in den auch *S. epidermidis* mit einbezogen werden kann, ergab, dass sich die Ähnlichkeit nicht gleichmäßig über das Protein verteilt (Kullik and Giachino, 1997) (Abbildung 7-1).

```

RP62A      --MAKESKSASEVSPEQINQWIKQHQENEDSQAQDKLVKHYRKLIESLAYRYSKQSHHEDLVQVG
ATCC 12228 --MAKESKSASEVSPEQINQWIKQHQENEDSQAQDKLVKHYRKLIESLAYRYSKQSHHEDLVQVG
N315      --MAKESKSANEVSPEQINQWIKQEHQENKNTDAQDKLVKHYQKLIESLAYKYSKQSHHEDLVQVG
Mu50      --MAKESKSANEVSPEQINQWIKQEHQENKNTDAQDKLVKHYQKLIESLAYKYSKQSHHEDLVQVG
COL       --MAKESKSANEISPEQINQWIKQEHQENKNTDAQDKLVKHYQKLIESLAYKYSKQSHHEDLVQVG
168      MIMTQPSK-TTKLTKDEVDRLLISDYQTKQDEQAQETLVRVYTNLVDMLAKKYSKQKSFHEDLRQVG
          *:: ** .::: .::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *:::
          2.1                                     2.2
RP62A      MVGLIGAINRFDLSFDRKFEAFVPTVIGEIKRYLRDKTWSVHVPRRIKEIGPRIKKVSDLELTNEL
ATCC 12228 MVGLIGAINRFDLSFDRKFEAFVPTVIGEIKRYLRDKTWSVHVPRRIKEIGPRIKKVSDLELTNEL
N315      MVGLIGAINRFDMSFERKFEAFVPTVIGEIKRYLRDKTWSVHVPRRIKEIGPRIKKVSDLELTAE
Mu50      MVGLIGAINRFDMSFERKFEAFVPTVIGEIKRYLRDKTWSVHVPRRIKEIGPRIKKVSDLELTAE
COL       MVGLIGAINRFDMSFERKFEAFVPTVIGEIKRYLRDKTWSVHVPRRIKEIGPRIKKVSDLELTAE
168      MIGLGAIKRYDPVVGKSFFAFAPTIIGEIKRFLRDKTWSVHVPRRIKELGPRIKKAVDQLTET
          *:::***:***: . . .**** :*:*****:*****.*****:***** . *:: **
          2.3                                     2.4
RP62A      ERSPSISEIAQRLEVSDEEVLEAMEMGQSYNALSVDHSIEADKDGSTVTLLDIMGQQDDNYDLTEK
ATCC 12228 ERSPSISEIAQRLEVSDEEVLEAMEMGQSYNALSVDHSIEADKDGSTVTLLDIMGQQDDNYDLTEK
N315      ERSPSISEIANRLEVSEEVLEAMEMGQSYNALSVDHSIEADKDGSTVTLLDIMGQQDDHYDLTEK
Mu50      ERSPSISEIANRLEVSEEVLEAMEMGQSYNALSVDHSIEADKDGSTVTLLDIMGQQDDHYDLTEK
COL       ERSPSISEIADRLEVSEEVLEAMEMGQSYNALSVDHSIEADKDGSTVTLLDIMGQQDDHYDLTEK
168      QRSPLKVEIAEFLDVSEEVLETMEMGKSYQALSVDHSIEADSDGSTVTLLDIVGSQEDGYERNQ
          :***. . .***: *:::*****:*****:*****:*****.*****:***:*. *:: * . .:
          3.1                                     3.2
RP62A      RMILERILPILSERERQIIQCTFIEGLSQKETGERIGLSQMHSRLQRTAIKKLQEAARQ-----
ATCC 12228 RMILERILPILSERERQIIQCTFIEGLSQKETGERIGLSQMHSRLQRTAIKKLQEAARQ-----
N315      RMILEKILPILSDREREIIQCTFIEGLSQKETGERIGLSQMHSRLQRTAIKKLQEAHAK-----
Mu50      RMILEKILPILSDREREIIQCTFIEGLSQKETGERIGLSQMHSRLQRTAIKKLQEAHAK-----
COL       RMILEKILPILSDREREIIQCTFIEGLSQKETGERIGLSQMHSRLQRTAIKKLQEAHAK-----
168      QLMLQSVLHVLSDREKQIIDLTYIQNKSQKETGDILGISQMHSRLQRKAVKKLREALIEDPSMELM
          ::*: *:::***:***: *::: . *****: :*:*****.*****:***:*. *:: * . .:
          4.1                                     4.2

```

### Abb. 7-1 Alignment der $\sigma^B$ -Proteine

Dargestellt sind die  $\sigma^B$ -Sequenzen von zwei *S. epidermidis* Stämmen (RP62A und ATCC 12228), von drei *S. aureus* Stämmen (N315, Mu50 und COL) und *B. subtilis* 168. Die höchste Konservierung ist durch einen Stern unter der Aminosäure gekennzeichnet. Ähnlichkeiten sind durch : und . markiert. Die Einteilung des Proteins in die verschiedenen Unterregionen wurde durch senkrechte Striche erreicht. Die Ziffern geben die postulierten Bereiche des Proteins an (Kullik and Giachino, 1997).

Sigmafaktoren vereinen mehrere Aktivitäten in einem Protein, z.B. Bindung der RNA-Polymerase (RNAP), Erkennung der -10 und -35 Promotorsequenzen und das Schmelzen der DNA. All diese Aktivitäten werden durch verschiedenen Unterregionen des Sigmafaktors bewerkstelligt (Helmann and Chamberlin, 1988; Lonetto *et al.*, 1992). Beispielsweise die Region 2.4, die für die Erkennung der -10-Region verantwortlich ist, sowie die Regionen 4.1 und 4.2, die für das Erkennen der -35-Region wichtig sind, sind dabei besonders konserviert (Kullik and Giachino, 1997).

## 7.2 Generierung der Deletionsmutanten

Der Nachweis des  $\sigma^B$ -abhängigen Promotors lieferte noch keinen Hinweis darauf, ob tatsächlich der Verlust der von *purR* strangabwärts gelegenen Gene zu dem biofilmmnegativen Phänotyp von M12 führte. Um diese Hypothese zu testen, sollten Deletionsmutanten generiert werden, in denen die Gene, die in *S. epidermidis* M12

nicht mehr transkribiert wurden, einzeln ausgeschaltet werden sollten. Da durch den Verlust der zwei Transkripte (siehe oben) insgesamt vier Gene inaktiviert wurden, wurden Mutanten generiert, in denen die Einzelgene *ispE*, *purR*, *barA* und *barB* deletiert wurden (1457*ispE*, 1457*purR*, 1457*barA* und 1457*barB*). Außerdem wurde eine Mutante hergestellt, in der der gesamte Lokus ausgeschaltet wurde (1457*ispEpurRbarAB*) sowie eine Doppelmutante des *barAB*-Operons (1457*barAB*). Eine weitere Doppelmutante, deren *ispE* und *purR* Gene ausgeschaltet werden sollte, konnte trotz mehrfacher Mutagenese nicht isoliert werden. Da die Gene sowohl einzeln als auch zusammen in anderen Mutanten deletiert werden konnten, kann es sich nicht um letale Deletionen handeln. Der Grund für das nicht erfolgreiche Isolieren dieser Mutante blieb bis zu diesem Zeitpunkt unklar. In allen konstruierten Mutanten konnte die korrekte Insertion der Erythromycinresistenzkassette durch Sequenzierung des manipulierten Bereiches nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte mit Hilfe der erzeugten Antiseren gegen die Proteine BarA und BarB die Expression der Proteine überprüft werden (Abbildung 6-8). Auch hier konnte gezeigt werden, dass nur die zu erwartenden Proteine exprimiert wurden und in den entsprechenden Mutanten keine Banden detektiert wurden.

Des Weiteren sollten die Deletionen in zwei weitere *S. epidermidis* Hintergründe, 1057 und 8400, übertragen werden, um stammspezifische Beobachtungen in späteren Analysen ausschließen zu können. Die Übertragung der Deletionen von *ispE* und *purR* war in beide Stämme erfolgreich (1057*ispE*, 8400*ispE*, 1057*purR* und 8400*purR*). Die Deletion von *barA* konnte, aus ungeklärten Gründen, lediglich in *S. epidermidis* 8400 übertragen werden. Die Mutationen der Stämme 1457*barB*, 1457*barAB* und 1457*ispEpurRbarAB* konnten in keinen Hintergrund übertragen werden, da es nicht möglich war aus diesen Stämmen Phagenlysate aufzureinigen. Allen Stämmen fehlt das *barB* Gen, möglicherweise führt dieser Verlust zu einer veränderten Oberfläche der Bakterienzelle, sodass der Phage, der zur Übertragung der Deletionen genutzt wurde, nicht mehr an seinen Rezeptor auf der Zelle binden konnte und somit die Mutanten auch nicht mehr infizieren konnte. Naheliegend wären Veränderungen der Lipoteichonsäure, da diese von Phagen erkannt werden. Als Konsequenz könnten dann auch keine neuen Phagen mehr freigesetzt werden. Gestützt wird diese Hypothese durch einen weiteren Hinweis auf mögliche Oberflächenveränderungen der Mutante M12. Ursprünglich wurde angenommen, dass es sich bei M12, um eine adhäsionsdefiziente Mutante handeln könnte. Dabei

fiel auf dass, die Zellen hydrophiler als der Wildtyp waren und zusätzlich weniger Oberflächenantigene exprimierten, da sie im Immunfluoreszenztest eine deutlich geringere Fluoreszenz gegenüber dem Wildtyp aufwiesen (Bartscht, 2001). Sollte in einer zukünftigen Arbeit dieser Fragestellung weiter nachgegangen werden, sollten die Oberflächenstrukturen der Mutanten näher charakterisiert werden. Zur Generierung der entsprechenden Mutanten in den verschiedenen Hintergründen, müsste die Mutagenese in jedem Hintergrund erfolgen oder ein anderer Phage gefunden werden, dessen Rezeptor nicht von den Veränderungen der Oberfläche betroffen ist.

Um für nachfolgende Experimente ausschließen zu können, dass veränderte Wachstumseigenschaften der verschiedenen Mutanten einen Einfluss auf die Bildung des Biofilms haben, wurden zunächst Wachstumskurven erstellt (Abbildungen 6-9, 6-11). Hier zeigten sich nur leichte Unterschiede in den Stämmen 1457*ispE*, 1457*barAB*, 1457*ispepurRbarAB*. Es kam zu einer leichten Verlängerung der *lag*-Phase, die Zellen wuchsen dann jedoch exponentiell und erreichten annähernd die gleichen optischen Dichten wie der Wildtyp. Diese geringen Abweichungen der Wachstumskurven sollten keinen Einfluss auf die mögliche Ausbildung und Stärke eines Biofilms haben.

Die Biofilmteste für die konstruierten Mutanten ergaben, dass die Deletion von *ispE* und *purR* keinen Einfluss auf die Ausbildung eines Biofilms in *S. epidermidis* 1457 hatten (Abbildung 6-10). Die gemessenen Adsorptionen waren eher etwas höher als die des Wildtyps. In *S. epidermidis* 1057 und 8400 war die Induktion der Biofilmbildung durch die Deletionen von *ispE* bzw. *purR*, zumindest in TSB<sub>NaCl</sub> und TSB<sub>EIOH</sub>, sogar statistisch signifikant (Abbildung 6-12). Da es sich bei *S. epidermidis* 1457 schon um einen starken Biofilmbildner handelt und die Messung auf einen Maximalwert einer Absorption von 3 limitiert ist, ist es möglich, dass auch in diesem Stamm signifikante Änderungen zu beobachten wären, würde die Möglichkeit bestehen höhere Messungen vornehmen zu können. Die leicht verstärkte Biofilmbildung in Stämmen mit Deletionen in *ispE* und *purR* lässt sich evtl. durch eine stärkere Expression der Gene *barAB* durch ein Herauslesen aus der Resistenzkassette erklären. Diese Hypothese wurde allerdings nicht näher untersucht, da sich diese Arbeit auf die Gene konzentrieren sollte, deren Verlust für den biofilmm negativen Phänotyp von *S. epidermidis* M12 verantwortlich war. Der Verlust von *BarA* in *S. epidermidis* 1457*barA* resultierte in einer verminderten

Biofilmbildung im Vergleich zum Wildtyp *S. epidermidis* 1457 (Abbildung 6-10). Diese war jedoch weiterhin sowohl durch NaCl als auch durch Ethanol induzierbar. Dahingegen führte die Deletion von *barB* in der Einzel- und in der Doppelmutante 1457*barAB* zu einem biofilmmnegativen Phänotyp, der auch durch NaCl und Ethanol nicht aufgehoben werden konnte.

Zum weiteren Nachweis, dass der Verlust der Gene *barA* / *barB* für den biofilmmnegativen Phänotyp der *S. epidermidis* Mutanten 1457*barA*, 1457*barB* und 1457*barAB* verantwortlich war, wurden die Stämme mit dem Plasmid pRB*barAB* komplementiert. Von dem Plasmid aus wurden beide Gene mit ihrem nativen Promotor *in trans* exprimiert. In allen Mutanten konnte eine Biofilmbildung rekonstituiert werden. Die Induktion durch NaCl und Ethanol konnte in den pRB*barAB* tragenden 1457*barA* und 1457*barB* Stämmen wieder gezeigt werden. In 1457*barAB* mit dem Plasmid konnte die Induktion nicht wieder beobachtet werden. Es wäre denkbar, dass durch veränderte Konzentrationen der Proteine in den komplementierten Mutanten, die Regulation der Biofilmbildung nicht genauso wie im Wildtyp ablaufen kann. Western Blot Experimente zeigten, dass die Proteinmenge von BarA und BarB im Cytosol der komplementierten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp höher war. Dies führt zu der Annahme, dass die Proteinmenge in der Zelle eine kritische Rolle bei der Wirkungsweise der Proteine spielt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtungen in der Arbeitsgruppe von J. Knobloch, dass BarA und BarB trotz ihrer gemeinsamen Transkription, entlang der Wachstumskurve differentiell exprimiert werden, zusätzlich gestützt (Zienkiewicz, unpubliziert). BarA scheint einer Regulation entlang der Wachstumskurve zu unterliegen mit einem Höhepunkt der Expression in der exponentiellen Phase. In der stationären Phase wurde das Protein nicht mehr nachgewiesen. Dahingegen ist BarB während des gesamten Wachstums gleichmäßig präsent, möglicherweise weil das Protein sehr stabil ist und nicht abgebaut wird (Zienkiewicz, unpubliziert). Weiterhin wurde versucht die Mutanten mit Plasmiden zu komplementieren, die nur eines der beiden Proteine unter einem konstitutiven Promotor trugen. Mutantenstämme, die diese Vektoren trugen, waren nicht in der Lage einen Biofilm zu bilden. Da diese Plasmide aus einer anderen Arbeit stammten, konnte nicht genau geklärt werden, ob möglicherweise fehlerhafte Plasmide für diese Beobachtung verantwortlich waren. Allerdings ist es auch denkbar, dass auch in diesen Stämmen die artifizelle Menge an

BarA oder BarB im Verhältnis zur Menge des Proteins, welches aus dem Genom transkribiert wurde, nicht zu einer sinnvollen Regulation in der Zelle führt.

Zusammenfassend konnte eindeutig gezeigt werden, dass BarA und BarB die Biofilmbildung in *S. epidermidis* 1457 positiv regulieren, wobei BarB essenziell ist. Der Verlust von funktionellem IspE und PurR war in *S. epidermidis* M12 nicht für den biofilmmnegativen Phänotyp der Mutante verantwortlich.

### 7.3 Regulation der Biofilmbildung durch BarA und BarB

In der Folge stellte sich die Frage, ob eine verminderte PIA-Synthese Ursache für den biofilmmnegativen Phänotyp der Mutanten *S. epidermidis* 1457*barA*, 1457*barB* und 1457*barAB* war. Dotblot-Experimente mit einem PIA-spezifischen Antiserum zeigten in allen Stämmen eine verminderte oder fehlende PIA-Expression (Abbildung 6-13).

Die PIA-Synthese erfolgt durch die Produkte des Genlokus *icaADBC* (Heilmann *et al.*, 1996; Mack *et al.*, 1996b). Aus der *sarA* Mutante war bekannt, dass die PIA-Expression nicht gleichbedeutend zur *icaADBC* Transkription ist, da es in dieser Mutante, trotz *icaADBC*-Transkripten auf Wildtypniveau, nicht zu einer PIA-Synthese kam. Um einen möglichen Einfluss von BarA und BarB auf *icaADBC* weiter zu analysieren, wurde die Transkription von *icaA* durch RT-PCR untersucht (Abbildung 6-14). Dazu wurde eine relative effizienzkorrigierte Quantifizierung genutzt, um die Veränderungen der Transkription der Gene im Vergleich zum Wildtyp zu berechnen. Es konnte gezeigt werden, dass die *icaA*-Transkription in TSB in allen drei Mutanten im Vergleich zum Wildtyp herabreguliert wurde. Die Repression der *icaA*-Transkription in 1457*barA* war mit einer 3,4-fach geringeren Transkription verglichen zum Wildtyp, am geringsten unter den Mutanten. In 1457*barB* wurde *icaA* 28,2-fach und in 1457*barAB* sogar 190,3-fach weniger transkribiert als im Wildtyp. Eine vergleichbare Regulation von *icaA* in den Mutanten war auch zu beobachten, wenn die Zellen in TSB<sub>NaCl</sub> angezüchtet wurden. In TSB<sub>EiOH</sub> war die verminderte Transkription von *icaA* nur noch in *S. epidermidis* 1457*barB* und 1457*barAB* signifikant. *S. epidermidis* 1457*barA* bildete in diesem Medium wieder Biofilme, die nur etwas niedrigere Adsorptionswerte als die des Wildtyps erreichten, was darauf hindeutet, dass BarA bei der Ethanol-bedingten Regulation der Biofilmbildung keinen Einfluss hat. In dieser Methode errechnete hohe Werte, die eine Repression der Transkription von weit über dem 100-fachen

ergeben, resultieren aus der Berechnung und stellen in sicherlich eine Abschaltung der Transkription dar.

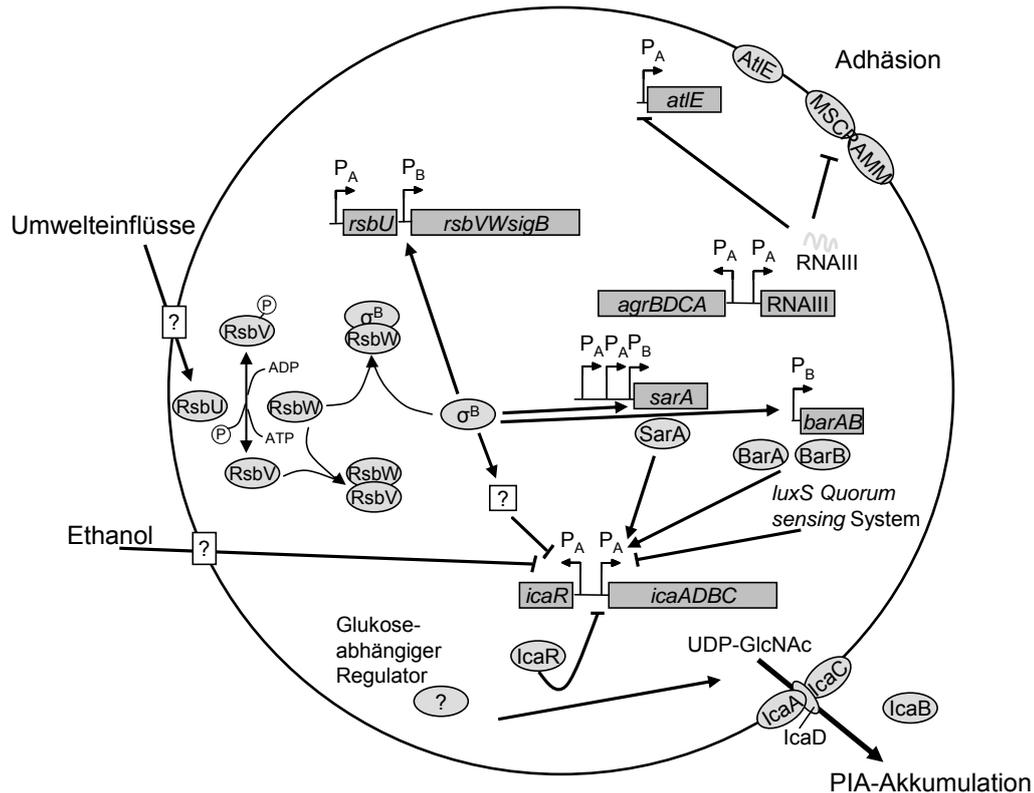
Da IcaR einen bekannten Negativregulator des *icaADBC*-Lokus darstellt (Conlon *et al.*, 2002), wäre es denkbar, dass die Repression der *icaA*-Transkription durch eine Induktion der *icaR*-Transkription zustande kommt. Deshalb wurde auch diese in allen Mutanten untersucht. Die *icaR*-Transkription wurde, mit einer Ausnahme, in keinem der Stämme signifikant beeinflusst (Abbildung 6-14). Lediglich in *S. epidermidis* 1457*barAB* konnte in TSB<sub>NaCl</sub> eine 2,3-fache Induktion der *icaR*-Transkription beobachtet werden. Allerdings war diese nicht in allen Einzelexperimenten zu beobachten und es lässt sich abschließend daher nicht sagen, ob diese Beobachtung tatsächlich von Bedeutung ist. Es kann also angenommen werden, dass die Repression der *icaA*-Transkription in den Mutanten unabhängig von IcaR erfolgte.

Wie schon zuvor durch Northern Blots gezeigt wurde, konnte die Reprimierung der *icaA*-Transkription in *S. epidermidis* 1457*sigB* bestätigt werden (Knobloch *et al.*, 2004a). Diese Regulation ist Folge der fehlenden Repression der *icaR*-Transkription in TSB und TSB<sub>NaCl</sub>. In TSB<sub>EtOH</sub> wird von dieser Mutante wieder Biofilm gebildet und die *icaA*-Transkription nur noch schwach reprimiert. Die *icaR*-Transkription wurde in diesem Medium nicht mehr signifikant beeinflusst. Demnach erfolgt die Induktion der Biofilmbildung in TSB<sub>EtOH</sub> durch Repression der *icaR*-Transkription unabhängig von  $\sigma^B$ .

Obwohl *barB* unter Kontrolle von  $\sigma^B$  steht, zeigen die beiden Mutanten nicht denselben Phänotyp hinsichtlich ihrer Biofilmbildung. *S. epidermidis* 1457*sigB* konnte mit subinhibitorischen Ethanolkonzentrationen wieder Biofilm bilden, während *S. epidermidis* 1457*barB* auch unter diesen Bedingungen biofilmbildungsfähig war. Damit konnte gezeigt werden, dass BarB ein essenzieller Regulator der Biofilmbildung in *S. epidermidis* ist. Die Transkriptionsanalysen zeigten weiterhin, dass BarB, unabhängig von IcaR, die *icaADBC*-Expression positiv beeinflusst. Dabei kann nicht gesagt werden, ob BarB direkt oder über ein weiteres Genprodukt vermittelt, die Regulation der *icaA*-Transkription bewerkstelligt. Zur Induktion der Biofilmbildung in *S. epidermidis* 1457*sigB* scheint die Expression von BarB über das zweite, nicht  $\sigma^B$ -abhängige Transkript ausreichend zu sein (Zienkiewicz, unpubliziert). Da  $\sigma^B$  selbst nicht in der Lage ist die Transkription von *icaR* zu

induzieren, ist anzunehmen, dass ein  $\sigma^B$ -abhängiges Intermediat diese Regulation vermittelt. Weder BarA noch BarB scheinen dieses Intermediat darzustellen.

Das vereinfachte Modell der Biofilmregulation, das schon in den theoretischen Grundlagen das Netzwerk verdeutlichte, konnte durch die gewonnenen Erkenntnisse, die diese Arbeit liefert, erweitert werden (Abbildung 7-2). PurR hat keinen Einfluss auf die Regulation der Biofilmbildung, sondern der  $\sigma^B$ -abhängige *barAB*-Lokus reguliert das *icaADBC*-Operon positiv.



**Abb. 7-2** Modifiziertes Modell der Biofilmbildung

PIA wird durch die Proteine IcaA, IcaD, IcaB und IcaC synthetisiert, die in einem gemeinsamen Operon codiert werden. Divergent zu dem Operon wird dessen spezifischer Repressor IcaR codiert. Die Transkription von *icaR* wird negativ durch  $\sigma^B$  über ein unbekanntes Intermediat und Ethanolstimulation reguliert. Die Aktivität des Sigmafaktors wird durch eine regulatorische Kaskade aus Antisigmafaktor RsbW, Anti-Antisigmafaktor RsbV und der RsbV-spezifischen Phosphatase RsbU reguliert. Transkription von *icaADBC* wird, außer durch IcaR, durch weitere Genprodukte beeinflusst. SarA sowie BarA und BarB üben einen positiven Effekt auf die PIA-Synthese aus. Wohingegen das *luxS Quorum sensing* System reprimierend auf die *icaADBC* Transkription wirkt. Neben der transkriptionellen Regulation von *icaADBC* wird die PIA-Synthese durch ein Glukose-abhängiges regulatorisches Protein positiv beeinflusst. Die primäre Adhäsion (AtIE, MSCRAMM) wird negativ durch das *agr Quorum sensing* System reguliert (2.4.3). Gene sind in Rechtecken dargestellt und Proteine in Ovalen.

#### 7.4 Einfluss der Regulatoren BarA, BarB, $\sigma^B$ und *agr* auf das intrazelluläre Proteom

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass der Metabolismus der Staphylokokken, die in einem Biofilm leben, entscheidend verändert ist (Beenken *et al.*, 2004; Resch *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2005). In dieser Arbeit sollte durch Proteomanalysen untersucht werden, ob die Regulatoren BarA, BarB,  $\sigma^B$  und das *agr*-System an dieser Regulation beteiligt sind. Da sowohl  $\sigma^B$  als auch *agr*-System ein großes Regulon aufweisen, war anzunehmen, dass durch die Deletion der Gene eine Vielzahl von Proteinen beeinflusst wird. Für BarA und BarB stellte sich die Frage, ob sie ebenfalls als globale Regulatoren identifiziert werden könnten. In der Analyse wurden, um nur Expressionsmuster zu detektieren, die abhängig von den jeweiligen Regulatoren verändert wurden und um biofilmspezifische Effekte auszuschließen, die Bakterien als planktonische Zellen kultiviert und deren Proteinextrakte der Proteomanalyse zugeführt.

Für die Deletionsstämme 1457*barA* und 1457*barB* wurden 43 bzw. 100 Proteinspots gezeigt, die im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich exprimiert wurden. Von diesen konnten drei bzw. sechs Proteine in der MS-Analyse identifiziert werden. In der Mutante 1457*barAB* wurden 447 Proteinspots im Vergleich zum Wildtyp differentiell exprimiert, von denen 64 identifiziert werden konnten. Aufgrund der geringen Anzahl an identifizierten Proteinen in den Einzelmutanten soll hier nur der Verlust beider Regulatoren in 1457*barAB* näher betrachtet werden, für den aus 64 veränderten Proteinspots 47 nicht redundante Proteine gezeigt werden konnten. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass die Überlappung der Veränderungen in den Einzelmutanten mit denen der Doppelmutante nur sehr gering war und das Expressionsmuster nicht auf einen der beiden Regulatoren zurück zu führen ist.

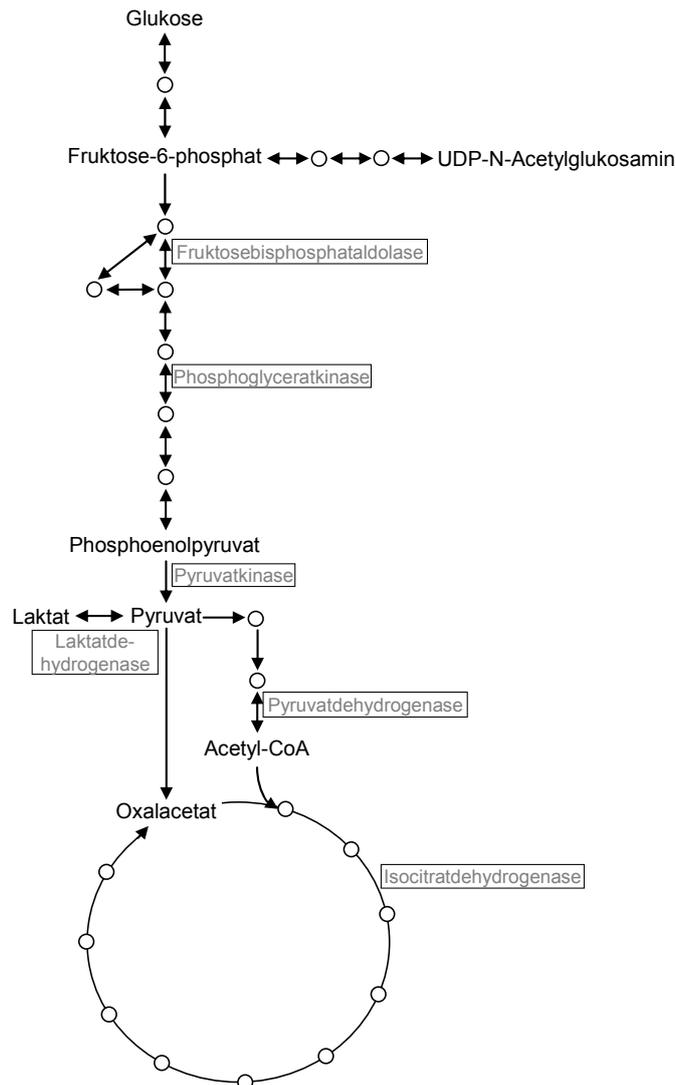
Auffällig war, dass verschiedene Enzyme der Glykolyse und des Tricarbonsäure (TCA)-Zyklus induziert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass in *S. epidermidis* 1457*barAB* die Enzyme Fruktosebisphosphataldolase, Phosphoglyceratkinase, Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase, Pyruvatdehydrogenase und Isocitratdehydrogenase im Vergleich zum Wildtyp induziert wurden. Die Aktivität des TCA-Zyklus ist wichtig für den vollständigen Katabolismus von bevorzugten Kohlenstoffquellen und den Aufbau eines reduzierenden Potentials sowie die Herstellung biosynthetischer Intermediate. Es ist bekannt, dass viele Faktoren, wie Nährstoffstatus der Zellen und Stressestimuli, die Aktivität des TCA-Zyklus

beeinflussen. Die Aktivität wird durch Nährstoffmangel, verminderte Sauerstoffverfügbarkeit und Eisenmangel, da Eisen als Cofaktor benötigt wird, aber auch durch Hitze und Ethanol reprimiert (Collins and Lascelles, 1962; Tomlins *et al.*, 1971; Somerville *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2001; Kornmann *et al.*, 2003; Varghese *et al.*, 2003; Somerville *et al.*, 2003). Interessanterweise wurden eben diese Bedingungen auch zur Induktion der Biofilmbildung beschrieben (reviewed in O'Gara, 2007). Vuong *et al.* konnten den Zusammenhang des TCA-Zyklus mit der Biofilmbildung durch Hemmung von dessen Aktivität und einer resultierenden Induktion der PIA-Expression zeigen (Vuong *et al.*, 2005). Sie vermuten, dass es durch eine Beeinträchtigung des TCA-Zyklus zu einer Verschiebung der Metabolite in Richtung PIA-Synthese kommt. Da PIA ein 1,6-verknüpftes N-Acetylglukosamin-Polymer aus 130 Resten ist (Mack *et al.*, 1996a; Maira-Litran *et al.*, 2002), wird zur Synthese UDP-aktiviertes N-Acetylglukosamin benötigt, welches in einem ersten Schritt durch Transaminierung von Fruktose-6-Phosphat gebildet wird (Gerke *et al.*, 1998). Ist Glukose im Medium vorhanden entsteht Fruktose-6-Phosphat in großen Mengen in der Glykolyse. Ohne Glukose kann es in der Glukoneogenese aus Oxalacetat, einem Intermediat des TCA-Zyklus hergestellt werden (Anhang IV, <http://www.genome.jp/KEGG>). Dabei geht allerdings viel Kohlenstoff verloren. Dies erklärt möglicherweise auch die in der postexponentielle Wachstumsphase beobachtete Repression der *icaADBC*-Expression (Dobinsky *et al.*, 2003).

Die beobachtete Induktion von Glykolyse und Citratzyklus bzw. deren Enzymen in *S. epidermidis* 1457*barAB* könnte somit zu einer Verschiebung des Intermediates Fruktose-6-Phosphat zu Stoffwechselprodukten des TCA oder einem vollständigen Katabolismus von Glukose führen (Abbildung 7-3). Damit stünde zur Synthese von UDP-N-Acetylgluosamin kein Fruktose-6-Phosphat mehr zur Verfügung, welches zur Synthese von PIA genutzt werden könnte. Allerdings ist UDP-N-Acetylglukosmanin für die Synthese der Zellwand essenziell, da *S. epidermidis* 1457*barAB* nur einer verlängerte Wachstumsphase, aber keinen Wachstumsdefekt aufweist, muss hierfür das Vorläufermolekül in ausreichender Menge bereit stehen. Es ist also denkbar, dass zusätzlich zu der Verschiebung von Intermediaten, die Staphylokokken einen Mechanismus aufweisen, der es ihnen ermöglicht zu entscheiden für welchen Stoffwechselprozess aktiviertes N-Acetylglukosamin genutzt wird. Da für das Überleben der Bakterien eine intakte Zellwand notwendig

ist, ist anzunehmen, dass bei einem geringen Angebot von UDP-N-Acetylglukosamin, dieser Biosyntheseweg als erstes versorgt wird.

Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zur Eisenverfügbarkeit gezeigt werden. HemH und HemL-1 wurden in *1457barAB* im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert. Die Proteine sind beteiligt an der Synthese von Kofaktoren (Ferrochelatase und Aminomutase in der Häm-Biosynthese), die auch von Enzymen des TCA-Zyklus benötigt werden.



**Abb. 7-3** Beziehung zwischen PIA-Synthese und Glykolyse /TCA-Zyklus

Simplifiziertes Modell, das die Glykolyse und den Citratzyklus mit der Biosynthese von PIA verbindet. Alle Enzyme, die in der Proteomanalyse in *1457barAB* im Vergleich zum Wildtyp als induziert identifiziert wurden sind aufgeführt. Kommt es zu einer Induktion des Citratzyklus wird Fructose-6-phosphat vermehrt zu Pyruvat und Acetyl-CoA umgesetzt und steht nicht mehr für eine Synthese von UDP-N-Acetylglukosamin, welches zur Synthese von PIA benötigt wird, zur Verfügung.

Die Acetyl-CoA-Carboxylase (AccC) und ein Fettsäuresyntheseprotein (PlsX) wurden ebenfalls induziert. Daher ist denkbar, dass durch die hohe Aktivität des Citratzyklus vermehrt Metabolite, bspw. für die Fettsäuresynthese, entzogen werden.

Ferner ist eine höhere Aktivität des Citratzyklus mit einem höheren Redoxstatus der Zelle verbunden. Vuong *et al.* sehen hier einen möglichen Regulationsweg und vermuten, dass ein bis jetzt unbekanntes Protein als Sensor des Redoxpotentials agieren könnte und so die Regulation der PIA-Synthese vermitteln könnte (Vuong *et al.*, 2005). Derartige NADH-Sensorproteine wurden in anderen Organismen schon beschrieben (bspw. Rex (Brekasis and Paget, 2003), NmrA (Lamb *et al.*, 2003), CcpA (Gaudu *et al.*, 2003)). CcpA kontrolliert die Nutzung von Glukose als bevorzugte Kohlenstoffquelle und spielt eine Rolle bei der Expression einiger Virulenzfaktoren in *S. aureus* und der Oxacillinresistenz (Seidl *et al.*, 2006; Seidl *et al.*, 2008a). Weiterhin führt die Deletion von *ccpA* in *S. aureus* zu einer verminderten Biofilmbildung (Seidl *et al.*, 2008b). Interessanterweise wurde in der Proteomanalyse von *S. epidermidis* 1457*barAB* ein Spot als CcpA identifiziert, der leicht induziert wurde. Da dieser Stamm jedoch biofilmbildungsfähig ist, ist eine differentielle Regulation der Biofilmbildung in *S. epidermidis* und *S. aureus* denkbar. In Bezug auf die beobachteten Stoffwechselveränderungen untermauert eine Induktion von CcpA die verstärkte glykolytische Aktivität zusätzlich. Unklar ist jedoch, warum Enzyme des TCA-Zyklus induziert wurden, da für diese in *B. subtilis* gezeigt werden konnte, dass sie der C-Kataboliten-Repression durch CcpA unterliegen (Tobisch *et al.*, 1999). Weiterhin reguliert CcpA die Exkretion von überschüssigem Kohlenstoff als Lactat, Acetat oder anderer organischer Säuren im Sinne des *overflow* Metabolismus (Grundy *et al.*, 1993). Somit stellt sich die Frage, ob diese Regulation in 1457*barAB* modifiziert ist. Hier müssen weiterführende Experimente den Metabolismus der Mutanten näher charakterisieren. Transkriptionsanalysen der Enzyme könnten deren Aktivität bestätigen. Außerdem könnten die Verwertung von Kohlenstoffquellen und die, in das Medium abgegebenen, Stoffwechselprodukte sowie der NADH-Gehalt der Zellen gemessen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es in 1457*barAB* zu einer Hochregulation von PtsI kam. Diese Phosphoenolpyruvat-proteinphosphotransferase ist verantwortlich für die Phosphorylierung von HPr am Histidinrest (reviewed in Fujita, 2009; Sonenshein, 2007). Diese Phosphorylierung wiederum ist notwendig für die Aufnahme und gleichzeitige Phosphorylierung von Glukose. HPr besitzt eine weitere Phosphorylierungsstelle an einem Serinrest,

derartig phosphoryliertes HPr interagiert mit CcpA und dient als Co-Repressor (Deutscher and Saier, 1983). Es ist also vorstellbar, dass aufgrund der gesteigerten Aktivität von PtsI nur eine geringe Menge an Serin-phosphoryliertem HPr in der Zelle vorliegt, welches mit CcpA interagieren kann, und somit trotz einer Induktion von CcpA, dieses nicht wirken kann.

Darüber hinaus wurde PtsI schon zuvor in Zusammenhang mit der Pathogenität von *S. epidermidis* beschrieben (Duggirala *et al.*, 2007). Es handelt sich dabei um ein spezifisches Gen in allen Endophthalmitis-Isolaten. Ferner konnte gezeigt werden, dass ein *ptsI* Deletionsstamm von *S. aureus* in der Maus weniger virulent ist als der Wildtyp (Kok *et al.*, 2003). TagD ist ein weiteres Protein, welches in *S. epidermidis* Isolaten aus Endophthalmitiden essenziell zu sein scheint (Duggirala *et al.*, 2007). In der Proteomanalyse von 1457*barAB* konnte TagD als vermindert exprimiert gezeigt werden. TagD ist ein Vorläuferprotein, das in die Synthese von Teichonsäuren in *S. aureus* involviert ist (Badurina *et al.*, 2003). Welche Rolle TagD dabei spielt und warum es durch die Deletion von *barAB* zu einer verminderten Expression kommt, bedarf weiterer Forschung.

Des Weiteren wurden die *S. epidermidis* Deletionsstämme 1457*sigB* und 1457*sigB**agr* in der Proteomanalyse untersucht. Da bekannt war, dass die Deletion von *sigB* zu einer Induktion des *agr*-Systems in *S. epidermidis* führt (Jäger, 2006), wurde die Doppelmutante in der Analyse mitgeführt, um Proteine zu identifizieren, die ausschließlich durch  $\sigma^B$  und unabhängig von *agr* reguliert wurden. Eine Studie zur Transkriptions- und Proteomanalyse einer *agr* Mutante von *S. epidermidis* 567 konnte zeigen, dass das *agr*-System die Proteinexpression global beeinflusst (Batzilla *et al.*, 2006). Der untersuchte Hintergrund scheint sich von *S. epidermidis* 1457 jedoch zu unterscheiden, da Batzilla *et al.* von einem Wachstumsvorteil durch die *agr*-Deletion berichten, der in 1457*agr* in dieser Arbeit nicht detektiert werden konnte.

Die Proteomanalyse ergab für 1457*sigB* 251 Spots, die in ihrer Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp variierten. In der Doppelmutante fanden sich 245 differentiell exprimierte Proteinspots. Aus der Purin-Ribonukleotidbiosynthese wurden einige Proteine identifiziert, die in *S. epidermidis* 1457*sigB* reprimiert wurden, aber auch eines das induziert wurde. Dahingegen fanden sich in der Doppelmutante hauptsächlich GuaB-Fragmente, die induziert wurden. Dieses Protein wurde auch schon in der Studie von Batzilla *et al.* beschrieben, sie vermuten eine

übergeordnete Funktion von CodY in dieser Regulation. CodY ist ein Protein, welches in *B. subtilis* den GTP-Spiegel der Zelle wahrnimmt und als Repressor von Genen der frühen stationären Phase agiert (Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte CodY jedoch bislang nicht identifiziert werden, möglicherweise findet sich das Protein in einem der noch nicht identifizierten Spots. Enzyme aus Glykolyse und TCA-Zyklus wurden in beiden Mutanten gefunden (Glycerolkinase, Pyruvatdehydrogenase-Komplex, Pyruvatkinase). Der Verlust von funktionellem  $\sigma^B$  führte zu einer verminderten Expression der Enzyme. Die zusätzliche Deletion von *agr* induzierte deren Expression über das Wildtypniveau hinaus. Dies deutet darauf hin, dass das *agr*-System bei der Regulation des Energiemetabolismus übergeordnet zu  $\sigma^B$  arbeitet oder  $\sigma^B$  sogar keinen regulatorischen Einfluss auf die Proteine hat. Darüber hinaus wurden zwei Proteine identifiziert, die in die Biosynthese von Fettsäuren involviert sind (GI 27469302, PlsX). Beide Proteine wurden in der Doppelmutante nicht signifikant verändert exprimiert. Daher kann angenommen werden, dass ihre differentielle Expression durch die Induktion des *agr*-Systems in 1457*sigB* zustande kommt.

Interessanterweise wurde in *S. epidermidis* 1457*sigBagr* RsbU leicht induziert. RsbU ist der Positivregulator der  $\sigma^B$ -Regulationskaskade in *S. epidermidis* (Knobloch *et al.*, 2001). Über die Aktivierung von RsbU in Staphylokokken ist kaum etwas bekannt (Pané-Farré *et al.*, 2006; Pané-Farré *et al.*, 2009). Da die Proteomdaten auf eine schwache negative Regulation durch das *agr*-System deuten, bietet sich hier ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen, die zeigen könnten, ob die Beobachtungen auch von physiologischer Bedeutung für die Zelle wären. Denkbar wäre z. B. ein regulatorischer Rückkopplungsmechanismus, da es durch  $\sigma^B$  zu einer Repression des *agr*-Systems kommt, könnte dieses im Gegenzug den Positivregulator von  $\sigma^B$ , RsbU, hemmen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nicht nur die Deletionen von *sigB* und *sigBagr*, sondern auch die Deletionen der Gene *barA*, *barB* und deren Kombination in *S. epidermidis* 1457 zu globalen Veränderungen der Proteinexpression im Vergleich zum Wildtyp führen. Dabei wurde die größte Veränderung in 1457*barAB* beobachtet und es konnte geschlussfolgert werden, dass es sich bei den Proteinen BarA und BarB um globale Regulatoren handelt. Aufgrund einer geringen Identifizierungseffizienz, die in den verschiedenen Mutanten zwischen 6 % und 17 % lag, konnte jedoch keine Aussage zu globalen

Veränderungen des Metabolismus gemacht werden, wie bspw. einem Shift zu verstärkt oxidativem Metabolismus oder der Synthese verschiedener Aminosäuren. Damit konnte ein Einblick in kleinere Prozesse gewonnen werden, deren vollständige Aufklärung weitere interessante Forschungsgebiete hinsichtlich der Pathogenitätsmechanismen in *S. epidermidis* bietet. In erster Linie sollten die bislang nicht identifizierten Proteinspots in einer erneuten MS-Analyse untersucht werden, die die Intensität der Spots berücksichtigt und so möglicherweise zu einer besseren Identifikationseffizienz führt. Die zusätzliche transkriptionelle Expressionsanalyse der Mutanten könnte nachfolgend zur Bestätigung der Beobachtungen auf der Proteinebene genutzt werden. Außerdem werden im Transkriptionsprofil auf Microarrays auch Gene eingebunden, deren Produkte in der Proteomanalyse nicht berücksichtigt wurden (extrazelluläre Proteine, Zellwand-assoziierte Proteine, Proteine mit sehr niedrigem oder sehr hohem pI).

## **7.5 Einfluss der Regulatoren BarA, BarB, $\sigma^B$ und *agr* auf das extrazelluläre Proteom**

Die Etablierung einer Infektion und das Überleben der Bakterien in einem Wirt sind abhängig von der Möglichkeit der Erreger in das Wirtsgewebe einzudringen und der Immunabwehr des Wirtes zu entgehen. Hierzu haben Staphylokokken eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt u. a. die Produktion von extrazellulären Proteinen und Enzymen. *S. aureus* produziert ProteinA, Lipasen, Proteasen, Esterase, Phospholipasen, Fettsäure-modifizierende Enzyme, Hämolyse und Toxine mit superantigenen Eigenschaften (Ziebandt *et al.*, 2001; von Eiff *et al.*, 2002; Dubin, 2002). Im Gegensatz dazu ist *S. epidermidis* wesentlich weniger toxisch. *S. epidermidis* produziert  $\delta$ -Toxin, das sich nur in drei Aminosäuren von dem von *S. aureus* unterscheidet (McKevitt *et al.*, 1990). Weiterhin exprimiert *S. epidermidis* drei extrazelluläre Proteasen, die zur Virulenz beitragen (Dubin *et al.*, 2001).

### **7.5.1 Proteasen**

Bei den drei in *S. epidermidis* beschriebenen extrazellulären Proteasen handelt es sich um eine Metalloprotease (SE2219), für die eine Elastase-Aktivität gezeigt werden konnte (Teufel and Götz, 1993). Außerdem eine Cysteinprotease (SE0184), die humanes sIgA, IgM, Serumalbumin, Fibrinogen und Fibronectin abbaut und somit auch als Virulenzfaktor eine Rolle spielt (Sloot *et al.*, 1992). Die dritte Protease ist eine Serinprotease (SE1543) (Geissler *et al.*, 1996). Alle Proteasen

besitzen eine hohe Ähnlichkeit zu den entsprechenden Proteinen in *S. aureus* (Aureolysin, Staphopain, V8-Protease), allerdings sezerniert *S. aureus* noch weitere Serinproteasen (Spl) und Staphopain A (Dubin, 2002).

Die Proteasen werden ähnlich wie in *S. aureus* als Prä-pro-Enzyme synthetisiert. Die Pro-Formen der Enzyme, werden durch proteolytische Spaltung im Extrazellularraum aktiviert. Dabei kommt es sowohl zur gegenseitigen Prozessierung als auch zu autokatalytischen Spaltungen der Proteasen in *S. aureus* (Bjoorklind and Jornvall, 1974; Drapeau, 1978; Rice *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2004; Nickerson *et al.*, 2007). Über die Aktivierung der Proteasen in *S. epidermidis* ist kaum etwas bekannt, aber aufgrund der hohen Homologie der Proteine ist ein ähnlicher Prozessierungsvorgang anzunehmen. Auch zur Regulation der Proteaseexpression wurden die meisten Untersuchungen in *S. aureus* durchgeführt. Als die wichtigsten Regulatoren der extrazellulären Proteine wurden *agr* und SarA identifiziert (Peng *et al.*, 1988; Cheung and Projan, 1994; Morfeldt *et al.*, 1996; Cheung *et al.*, 1997; Ziebandt *et al.*, 2001). Es konnte eine negative Regulation der extrazellulären Proteasen durch SarA und eine positive Regulation durch *agr* gezeigt werden (Chan and Foster, 1998; Vuong *et al.*, 2000; Said-Salim *et al.*, 2003; Batzilla *et al.*, 2006). Unabhängig davon konnte eine positive Regulation der RNAlII-Expression durch Bindung von SarA an das *agr*-Operon nachgewiesen werden (Morfeldt *et al.*, 1996; Cheung *et al.*, 1997; Bischoff *et al.*, 2001). Ferner werden beide Regulatoren auch durch den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  beeinflusst. Die Transkription von *sarA* wird direkt über einen  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor induziert (Bischoff *et al.*, 2001). Dies konnte auch in *S. epidermidis* gezeigt werden (Fluckiger *et al.*, 1998). Dahingegen wird das *agr*-System trotz des positiven Einflusses durch SarA durch den Sigmafaktor indirekt negativ reguliert (Bischoff *et al.*, 2001). In weiteren Dissertationsarbeiten aus der Arbeitsgruppe von J. Knobloch konnte der Einfluss der verschiedenen Regulatoren auf die Proteaseexpression auch in *S. epidermidis* bestätigt werden (Kneschke, 2007; Schewe, 2009).

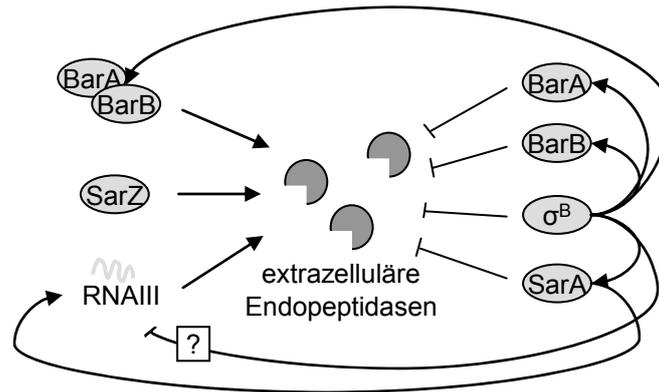
In dieser Arbeit wurde zusätzlich die Bedeutung der Regulatoren BarA und BarB, die durch  $\sigma^B$  induziert werden, für die Expression der extrazellulären Proteasen betrachtet. Die Analyse der Proteaseexpression wurde zunächst mit einem Casein-Agarplatten-Screening vorgenommen, mit dem phänotypische Unterschiede der Expression erkennbar waren (Abbildung 6-25). *S. epidermidis* 1457 zeigte auf den Platten leichte lytische Aktivität, denaturierende Proteasen waren im nativen Agar

kaum erkennbar. *S. epidermidis* 1457agr zeigte erwartungsgemäß weder lysierende noch denaturierende Zonen um die aufgetropften Bakterien. Die Mutante verfügt nicht über ein funktionelles agr-System und exprimiert demnach keine RNAIII. Dies konnte auch in der transkriptionellen Analyse der RNAIII bestätigt werden (Abbildung 6-27). Demnach wurde auch die Transkription aller Proteasen signifikant herunterreguliert. Die Cysteinprotease zeigt mit einer 9-fach geringeren Expression gegenüber dem Wildtyp den größten Effekt auf die fehlende agr-Funktion. Es ist denkbar, dass die Cysteinprotease verstärkt durch das agr-System reguliert wird und die Serin- und Metalloproteasen durch weitere regulatorische Elemente positiv beeinflusst werden. Wie zu erwarten war, zeigten sich um die 1457sigB-Zellen auf den Agarplatten große denaturierte und lytische Zonen, was für eine starke proteolytische Aktivität des Stammes spricht. Die Analyse der Genexpression ergab, dass RNAIII induziert wurde. Ebenso wie alle drei Proteasen. Auch in dieser Mutante war der stärkste Effekt auf die Cysteinprotease zu beobachten. Damit konnte der negative Einfluss von  $\sigma^B$  auf das agr-System, der schon zuvor beschrieben wurde, bestätigt werden (Bischoff *et al.*, 2001; Kneschke, 2007). Da Sigmafaktoren die Transkription direkt lediglich positiv regulieren können, bedarf es eines weiteren Faktors, der durch  $\sigma^B$  induziert wird und die RNAIII-Transkription hemmt. Die Doppelmutante 1457sigBagr, die weder über den funktionellen Sigmafaktor  $\sigma^B$  noch über ein funktionelles agr-System verfügte, zeigte auf dem Caseinagar wie 1457agr keine lysierten oder denaturierten Zonen. Während jedoch in *S. epidermidis* 1457agr die Transkription aller Proteasen signifikant herunterreguliert wurde, war die Expression der Metallo- und Serinprotease in 1457sigBagr vergleichbar mit der des Wildtyps. Dies deutet darauf hin, dass die beiden Proteasen nur bedingt von agr, aber auch unabhängig von  $\sigma^B$  reguliert werden und ihre Regulation auch einem bislang unbekanntem Faktor unterliegt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass SarZ einen positiven Effekt auf die proteolytische Aktivität von *S. epidermidis* ausübt, aber nicht die RNAIII-Expression beeinflusst (Wang *et al.*, 2008). Möglicherweise übernehmen auch die Regulatoren BarA und BarB in diesem Netzwerk eine Aufgabe. Deshalb wurden sowohl die Mutanten mit Einzeldelationen der Gene als auch die Doppelmutante untersucht. Überraschend war, dass die Einzelmutanten 1457barA und 1457barB auf dem Caseinagar eine stärkere proteolytische Aktivität zeigten als der Wildtyp, in der Doppelmutante aber keine Abbauzonen erkennbar waren. Auch in der Transkriptionsanalyse zeigte sich,

dass die Metallo- und die Cysteinprotease in *S. epidermidis* 1457*barAB* signifikant herunterreguliert wurden. Diese Beobachtungen sind konform mit denen von Meier *et al.*, die nach Inaktivierung des homologen *yabJ-spoVG*-Lokus in *S. aureus* ebenfalls eine Supprimierung der extrazellulären Proteaseaktivität beobachten konnten (Meier *et al.*, 2007). Trotz der verminderten Proteaseexpression konnte in stationären Zellen eine leichte Induktion der RNAIII-Transkription in 1457*barAB* im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden. Demnach scheinen die Regulatoren BarA und BarB zusammen einen positiven Effekt auf die Proteaseexpression auszuüben, der unabhängig von *agr* vermittelt wird. Wird die Deletion jedoch auf eines der beiden Gene beschränkt, kommt es zu einer Erhöhung der Proteaseaktivität. Es wurde gezeigt, dass auch hier die Cysteinprotease am stärksten betroffen war und die RNAIII-Expression nicht verändert war. Eine geringere Expression der Proteasen bei Verlust beider Genprodukte, aber einer Induktion der Proteasen bei einer Einzeldelation, stellt ein Paradoxon dar, das mit dem derzeitigen Stand der Forschung nicht erklärt werden kann. Ohne Zweifel stellt diese Beobachtung ein sehr interessantes Phänomen dar und bietet ein spannendes Forschungsfeld. Um diese Regulation besser verstehen zu können, müssen die molekularen Mechanismen in denen BarA und BarB wirken aufgeklärt werden. Es sollten mögliche Interaktionspartner identifiziert werden, da vorstellbar wäre, dass BarA und BarB miteinander agieren, aber evtl. auch andere Partner besitzen, die zu einer anderen Funktion führen könnten.

Zusammengenommen konnte aber sicher gezeigt werden, dass BarA und BarB einen Einfluss auf die Expression der Proteasen ausüben, der unabhängig von *agr* ist.

Das Netzwerk der Regulation der extrazellulären Proteaseaktivität scheint sehr komplex zu sein (Abbildung 7-4). Außer des Phänomens, welches BarA und BarB zeigen, bleiben weitere Fragen offen. Unklar ist z. B. warum Regulatoren widersprüchlich wirken können. SarA bspw. reprimiert die Aktivität der Proteasen, induziert aber gleichzeitig das *agr*-System, welches Proteasen induziert. Eine vollständige Aufklärung dieser Regulationsmechanismen bedarf weiterer intensiver Forschung. Eine bessere Charakterisierung der einzelnen Regulons, könnte zu einem besseren Verständnis der Regulationsnetzwerke beitragen.



**Abb. 7-4** Schema der Regulation der extrazellulären Proteasen in *S. epidermidis*. Vereinfachtes Schema der Regulation, dem die extrazellulären Proteasen unterliegen. BarAB, SarZ und das *agr*-System induzieren die Proteaseaktivität. BarA, BarB,  $\sigma^B$  und SarA üben einen negativen Einfluss auf die Proteaseexpression aus. Die Regulatoren beeinflussen sich zusätzlich auch untereinander. Allerdings nicht grundsätzlich in der gleichen Richtung, in der der Einfluss auch auf die Proteasen genommen wird, was zu einer zusätzlichen Komplexität des Netzwerkes führt.

Die Proteaseaktivität spielt nicht nur eine Rolle beim Abbau von Wirtsgewebe und dem Entgehen der Immunabwehr des Wirtes, sondern wurde auch in Verbindung mit der Biofilmbildung der Bakterien gebracht. In *S. aureus* wurde beschrieben, dass die erhöhten Proteasespiegel in der *sigB*-Mutante einen negativen Effekt auf die Biofilmbildung ausüben (Boles and Horswill, 2008). Das Einbringen einer zusätzlichen *agr*-Mutation führte in *S. aureus* wieder zur Etablierung eines Biofilms (Lauderdale *et al.*, 2009). Dies ist in *S. epidermidis* nicht der Fall. Demnach scheint die Bedeutung der Proteasen für die Ausbildung eines Biofilms in *S. epidermidis* nicht von entsprechendem Ausmaß zu sein.

### 7.5.2 Weitere Proteine

Vierzehn verschiedene extrazelluläre Proteine von *S. epidermidis* 567 wurden von Batzilla *et al.* in einer 2D-Gel-Analyse beschrieben (Batzilla *et al.*, 2006). Sie traten gehäuft in multiplen Spots auf, was durchaus naheliegend ist aufgrund der Tatsache, dass bspw. Proteasen und Lipasen erst extrazellulär prozessiert und damit aktiviert werden (Rosenstein and Götz, 2000; Shaw *et al.*, 2004). Unter den positiv durch *agr* regulierten Proteinen fanden sich PSM1 und PSM2 sowie die Metallo- und die Serinprotease. Die Cysteinprotease wurde nicht detektiert. Negativ durch das *agr*-System wurden unter anderem die Lipasen GehC und GehD, AtlE, das immunodominant antigen A IsaA und das secretory antigen protein SsaA reguliert (Batzilla *et al.*, 2006).

Aufgrund des großen Einflusses der in dieser Arbeit untersuchten Regulatoren auf das intrazelluläre Proteom und die Proteaseexpression, war anzunehmen, dass die Mutanten auch weitere Änderungen der extrazellulären Proteinexpression aufwiesen. Daher wurde diese in 1D-SDS-PAGEs näher untersucht (Abbildung 6-24). Im Größenbereich von ca. 100 kDa wurden in *S. epidermidis* 1457*barAB* zwei zusätzliche Banden und eine verstärkte Bande im Vergleich zum Expressionsmuster des Wildtyps gezeigt. In diesem Bereich liegen die Proenzyme der Lipasen. Möglicherweise kommt es hier zu einer verminderten Prozessierung aufgrund der reduzierten Proteaseaktivität des Stammes, die sowohl auf Caseinagarplatten als auch in der Transkriptionsanalyse nachgewiesen werden konnte. In 1457*sigB* konnten die entsprechenden Banden nicht nachgewiesen werden. In dieser Mutante waren in den zellfreien Überständen nach 5,5 h Wachstum nur wenige Banden zu erkennen. Dies resultiert evtl. aus der hohen Proteaseaktivität dieses Stammes, der zum starken Abbau der Proteine führen könnte.

Das Aap-Protein ist ebenfalls ein extrazelluläres Protein in *S. epidermidis*, welches proteolytisch prozessiert wird und in verschiedenen Größenbanden in eindimensionalen Gelen nachgewiesen werden konnte (Rohde *et al.*, 2005). Diese Banden sollten eine Größe von ca. 220 kDa, 180 kDa und 140 kDa in *S. epidermidis* 1457 aufweisen. In diesem Bereich zeigten die *S. epidermidis* Stämme 1457*barB*, 1457*barAB*, 1457*sigB*, 1457*agr* und 1457*sigBagr* zumindest nach 5,5 h unterschiedliche Expressionsmuster. Auffällig war eine stark induzierte Bande in 1457*barAB*, die in keiner weiteren Mutante beobachtet werden konnte. Möglicherweise wurde in dieser Mutante das Protein nicht prozessiert und akkumulierte im Überstand der Zellen. Ob es sich bei den gezeigten Proteinbanden tatsächlich um Aap-Fragmente handelt, muss eine Identifikation durch eine MS-Analyse oder Western Blot Experimente mit einem spezifischen Aap-Antiserum zeigen. Es wurde vermutet, dass Aap durch Interaktion mit PIA an der Biofilmbildung beteiligt ist (Hussain *et al.*, 1997; Mack, 1999). Darüber hinaus kann es einen PIA-unabhängigen, über Proteine vermittelten, Weg der Biofilmbildung ermöglichen (Rohde *et al.*, 2005). Da der Biofilm von *S. epidermidis* 1457 hauptsächlich durch PIA gebildet wird, ist unklar, ob eine fehlende Prozessierung von Aap Einfluss auf die Ausbildung eines intakten Biofilms hätte. Untersuchungen der Mutante 1457*barAB*, könnten diese Frage möglicherweise aufklären.

1457*barB* und 1457*barAB* wiesen am oberen Ende der SDS-PAGE eine bzw. zwei Banden von enormer Größe auf, die sonst nicht erkennbar waren. In *S. epidermidis* wurde nur ein Protein (Embp) beschrieben, das eine solche Größe besitzt. Embp weist einen Leserahmen von 30,5 kb auf, es ist jedoch nicht klar, ob dieser als ein Transkript abgelesen wird (Williams *et al.*, 2002). Dem Protein wurde eine Bindung an Fibronektin nachgewiesen. Ein Zusammenhang einer negativen Regulation durch BarB kann bislang nicht gezogen werden. Da die Identifikation des Proteins nicht vorliegt, kann jedoch auch spekuliert werden, dass es sich hierbei um einen Faktor handelt, der bislang nicht beschrieben wurde.

Um die Veränderungen des extrazellulären Proteoms in den untersuchten Mutanten genauer zu klären, bedarf es einer Identifikation der Proteine. Dies wäre denkbar durch spezifische Antiseren gegen Aap und Embp oder durch eine Identifikation mittels Massenspektroskopie.

## 7.6 Schlussbetrachtungen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *barAB*-Lokus in *S. epidermidis* 1457  $\sigma^B$ -abhängig reguliert wird. BarB ist ein essenzieller Regulator der Biofilmbildung in diesem Stamm und wirkt positiv auf die *icaADBC*-Transkription. Diese Regulation findet unabhängig von IcaR, dem spezifischen Negativregulator von *icaADBC*, statt. Darüber hinaus führt der Verlust beider Gene zu einer erheblichen Veränderung sowohl des intra- als auch des extrazellulären Proteoms. BarA und BarB regulieren die Enzyme der Glykolyse und des Citratzyklus negativ und könnten auf diese Weise zu einer Verschiebung des Glykolyseintermediates Fruktose-6-phosphat in Richtung der Generierung von UDP-N-Acetylglukosamin, dem Vorläufermolekül zur PIA-Synthese führen. Um diese Hypothese weiter zu kräftigen, sollten die regulierten Enzyme zusätzlich auf Transkriptionsebene untersucht werden. Außerdem könnte die Messung von Stoffwechselintermediaten wie Laktat und Acetat im Medium weitere Hinweise auf den veränderten Metabolismus geben. Hinsichtlich des extrazellulären Proteoms konnte eindeutig gezeigt werden, dass BarA zusammen mit BarB die Expression der Proteasen positiv reguliert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch andere Proteine beeinflusst werden, deren Identifizierung einen weiteren Aufschluss über das Regulon von BarA und BarB bringen könnte.

In *S. aureus* wurde der homologe *yabJspoVG*-Lokus auch schon in Zusammenhang mit der Virulenz dieser Spezies assoziiert. Es wurde gezeigt, dass die Genprodukte zur Methicillin- und Glykopeptidresistenz sowie zur Kapselbildung und zur Proteaseexpression beitragen (Meier *et al.*, 2007; Schulthess *et al.*, 2009). Trotz der hohen Konservierung der Proteine (Anhang V Proteinalignment) in *S. epidermidis* und *S. aureus*, wobei BarB deutlich höher konserviert ist, scheint es doch auch regulatorische Unterschiede zu geben. Meier *et al.* gelang es nicht eine Einzeldelektion von *spoVG* zu etablieren, dies war in *S. epidermidis* jedoch möglich. Des Weiteren bildet *S. epidermidis* keine Kapsel, daher werden in diesem Organismus vermutlich andere Prozesse reguliert.

Regulatorische Faktoren der Biofilmbildung und die Expression von weiteren Pathogenitätsfaktoren sind für die Virulenz von *S. epidermidis* von entscheidender Bedeutung sowohl für die Invasivität als auch das Überleben der Bakterien und das Entgehen der Immunantwort im Wirt. Die Erkenntnisse dieser Arbeit tragen zu einem besseren Verständnis der regulatorischen Mechanismen von *S. epidermidis* bei. Dies ist eine Voraussetzung für die Entwicklung neuer Präventionsansätze und Therapiestrategien gegen Infektionen mit *S. epidermidis*. Dafür stellen BarA und BarB Targets dar.

## Literaturverzeichnis

**Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.

**Anderl, J.N., Franklin, M.J., and Stewart, P.S.** (2000) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin  
2. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 1818-1824.

**Arber, N., Pras, E., Copperman, Y., Schapiro, J.M., Meiner, V., Lossos, I.S. et al.** (1994) Pacemaker endocarditis. Report of 44 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **73**: 299-305.

**Badurina, D.S., Zolli-Juran, M., and Brown, E.D.** (2003) CTP:glycerol 3-phosphate cytidyltransferase (TarD) from *Staphylococcus aureus* catalyzes the cytidyl transfer via an ordered Bi-Bi reaction mechanism with micromolar K(m) values. *Biochim Biophys Acta* **1646**: 196-206.

**Banner, M.A., Cunniffe, J.G., Macintosh, R.L., Foster, T.J., Rohde, H., Mack, D. et al.** (2007) Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J Bacteriol* **189**: 2793-2804.

**Bartscht, K.** Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* an Oberflächen: Charakterisierung einer biofilmnegativen Mutante. 2001. Fachbereich Biologie, Universität Hamburg.

**Bateman, A., Holden, M.T., and Yeats, C.** (2004) The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics*.

**Batzilla, C.F., Rachid, S., Engelmann, S., Hecker, M., Hacker, J., and Ziebuhr, W.** (2006) Impact of the accessory gene regulatory system (Agr) on extracellular proteins, *codY* expression and amino acid metabolism in *Staphylococcus epidermidis*. *Proteomics* **6**: 3602-3613.

**Beenken, K.E., Dunman, P.M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S.J. et al.** (2004) Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* **186**: 4665-4684.

**Bigger, J.W.** (1944) Treatment of staphylococcal infections with penicillin. *Lancet* **11**: 497-500.

**Bischoff, M., Entenza, J.M., and Giachino, P.** (2001) Influence of a functional *sigB* operon on the global regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**: 5171-5179.

- Bischoff, M., Dunman, P., Kormanec, J., Macapagal, D., Murphy, E., Mounts, W. et al.** (2004) Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus*  $\sigma^B$  regulon. *J Bacteriol* **186**: 4085-4099.
- Bjoorklind, A., and Jornvall, H.** (1974) Substrate specificity of three different extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. *Biochim Biophys Acta* **370**: 524-529.
- Boles, B.R., and Horswill, A.R.** (2008) Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* **4**: e1000052.
- Bowden, M.G., Visai, L., Longshaw, C.M., Holland, K.T., Speziale, P., and Hook, M.** (2002) Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen-binding adhesin? *J Biol Chem*.
- Bowden, M.G., Chen, W., Singvall, J., Xu, Y., Peacock, S.J., Valtulina, V. et al.** (2005) Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **151**: 1453-1464.
- Brekasis, D., and Paget, M.S.** (2003) A novel sensor of NADH/NAD<sup>+</sup> redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J* **22**: 4856-4865.
- Brückner, R.** (1997) Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiol Lett* **151**: 1-8.
- Caputo, G.M., Archer, G.L., Calderwood, S.B., DiNubile, M.J., and Karchmer, A.W.** (1987) Native valve endocarditis due to coagulase-negative staphylococci. Clinical and microbiologic features. *Am J Med* **83**: 619-625.
- Chan, P.F., and Foster, S.J.** (1998) Role of SarA in virulence determinant production and environmental signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **180**: 6232-6241.
- Cheung, A.L., and Projan, S.J.** (1994) Cloning and sequencing of *sarA* of *Staphylococcus aureus*, a gene required for the expression of *agr*. *J Bacteriol* **176**: 4168-4172.
- Cheung, A.L., Eberhardt, K., and Heinrichs, J.H.** (1997) Regulation of protein A synthesis by the *sar* and *agr* loci of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **65**: 2243-2249.
- Cheung, A.L., Bayer, M.G., and Heinrichs, J.H.** (1997) *sar* Genetic determinants necessary for transcription of RNAII and RNAPIII in the *agr* locus of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **179**: 3963-3971.
- Choong, S., and Whitfield, H.** (2000) Biofilms and their role in infections in urology. *BJU Int* **86**: 935-941.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., and Beachey, E.H.** (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* **22**: 996-1006.

**Collins, F.M., and Lascelles, J.** (1962) The effect of growth conditions on oxidative and dehydrogenase activity in *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* **29**: 531-535.

**Conlon, K.M., Humphreys, H., and O'Gara, J.P.** (2002) *icaR* Encodes a Transcriptional Repressor Involved in Environmental Regulation of *ica* Operon Expression and Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **184**: 4400-4408.

**Conlon, K.M., Humphreys, H., and O'Gara, J.P.** (2004) Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **186**: 6208-6219.

**Costerton, J.W.** (1999a) In response to: In vivo efficacy of silver-coated (Sil-zone) infection-resistant polyester fabric against a biofilm-producing bacteria, *Staphylococcus epidermidis*. *J Heart Valve Disease*; 1998;7:524-530. *J Heart Valve Dis* **8**: 346-348.

**Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P.** (1999b) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.

**Cramton, S.E., Ulrich, M., Götz, F., and Döring, G.** (2001) Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **69**: 4079-4085.

**Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Peris, C. et al.** (2004) Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **72**: 2177-2185.

**Darouiche, R.O.** (2004) Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* **350**: 1422-1429.

**de Araujo, G.L., Coelho, L.R., de Carvalho, C.B., Maciel, R.M., Coronado, A.Z., Rozenbaum, R. et al.** (2006) Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. *J Antimicrob Chemother* **57**: 855-864.

**Deighton, M., and Borland, R.** (1993) Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun* **61**: 4473-4479.

**Deutscher, J., and Saier, Jr., M.H.** (1983) ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 6790-6794

**Dobinsky, S., Kiel, K., Rohde, H., Bartscht, K., Knobloch, J.K.M, Horstkotte, M.A., and Mack, D.** (2003) Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J Bacteriol* **185**: 2879-2886.

- Drapeau, G.R.** (1978) Role of metalloprotease in activation of the precursor of staphylococcal protease. *J Bacteriol* **136**: 607-613.
- Dubin, G., Chmiel, D., Mak, P., Rakwalska, M., Rzychon, M., and Dubin, A.** (2001) Molecular cloning and biochemical characterisation of proteases from *Staphylococcus epidermidis*. *Biol Chem* **382**: 1575-1582.
- Dubin, G.** (2002) Extracellular proteases of *Staphylococcus spp.* *Biol Chem* **383**: 1075-1086.
- Duggirala, A., Kenchappa, P., Sharma, S., Peeters, J.K., Ahmed, N., Garg, P. et al.** (2007) High-resolution genome profiling differentiated *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients with ocular infections and normal individuals. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**: 3239-3245.
- Dunne, W.M., Jr.** (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* **15**: 155-166.
- Ehrlich, G.D., Hu, F.Z., Lin, Q., Costerton, W., and Post, J.C.** (2004) Intelligent implants to battle biofilms. *ASM News* **70**: 127-133.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H., Smyth, E., Kennedy, C.A., and O'Gara, J.P.** (2002) Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect* **52**: 212-218.
- Fluckiger, U., Wolz, C., and Cheung, A.L.** (1998) Characterization of a *sar* homolog of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **66** : 2871-2878.
- Fluckiger, U., Ulrich, M., Steinhuber, A., Doring, G., Mack, D., Landmann, R. et al.** (2005) Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect Immun* **73**: 1811-1819.
- Fujita, Y.** (2009) Carbon catabolite control of the metabolic network of *Bacillus subtilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **73**:245-259
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., and Bairoch, A.** (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**: 3784-3788.
- Gaudu, P., Lamberet, G., Poncet, S., and Gruss, A.** (2003) CcpA regulation of aerobic and respiration growth in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* **50**: 183-192.
- Geissler, S., Götz, F., and Kupke, T.** (1996) Serine protease EpiP from *Staphylococcus epidermidis* catalyzes the processing of the epidermin precursor peptide. *J Bacteriol* **178**: 284-288.
- Gerke, C., Kraft, A., Süßmuth, R., Schweitzer, O., and Götz, F.** (1998) Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* **273**: 18586-18593.

**Gilbert, P., Das, J., and Foley, I.** (1997) Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* **11**: 160-167.

**Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., Deboy, R.T., Ravel, J. et al.** (2005) 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. *J Bacteriol* **187**: 2426-2438.

**Götz, F., and Peters, G.** (2000) Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In Infections associated with indwelling medical devices. Waldvogel, F.A., and Bisno, A.L. (eds). Washington DC: ASM Press, pp. 55-88.

**Götz, F.** (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* **43**: 1367-1378.

**Grundy, F.J., Waters, D.A., Allen, S.H., and Henkin, T.M.** (1993) Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. *J Bacteriol* **175**: 7348-7355

**Habash, M., and Reid, G.** (1999) Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. *J Clin Pharmacol* **39**: 887-898.

**Hanahan, D.** (1985) DNA Cloning: A Practical Approach New York Oxford University Press/IRL Press, pp. 109-135.

**Handke, L.D., Conlon, K.M., Slater, S.R., Elbaruni, S., Fitzpatrick, F., Humphreys, H. et al.** (2004) Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* isolates. *J Med Microbiol* **53**: 367-374.

**Harrison, J.J., Ceri, H., Stremick, C., and Turner, R.J.** (2004) Differences in biofilm and planktonic cell mediated reduction of metalloid oxyanions. *FEMS Microbiol Lett* **235**: 357-362.

**Hartley, J.L., Temple, G.F., and Brasch, M.A.** (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**: 1788-1795.

**Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., and Götz, F.** (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* **20**: 1083-1091.

**Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G., and Götz, F.** (1997) Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* **24**: 1013-1024.

**Heilmann, C., and Peters, G.** (2001) Biology and pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis*. In Gram positive pathogens. American Society for Microbiology. Fischetti, V.A., Norvick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A., and Rood, J.J. (eds). Washington D.C.: pp. 442-449.

**Heilmann, C., Thumm, G., Chhatwal, G.S., Hartleib, J., Uekotter, A., and Peters, G.** (2003) Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **149**: 2769-2778.

**Helmann, J.D., and Chamberlin, M.J.** (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* **57**: 839-872.

**Hennig, S., Nyunt, W.S., and Ziebuhr, W.** (2007) Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate. *Int J Med Microbiol*.

**Homerova, D., Bischoff, M., Dumolin, A., and Kormanec, J.** (2004) Optimization of a two-plasmid system for the identification of promoters recognized by RNA polymerase containing *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor sigmaB. *FEMS Microbiol Lett* **232**: 173-179.

**Hoyle, B.D., Jass, J., and Costerton, J.W.** (1990) The biofilm glycocalyx as a resistance factor  
1. *J Antimicrob Chemother* **26**: 1-5.

**Hussain, M., Herrmann, M., von Eiff, C., Perdreau-Remington, F., and Peters, G.** (1997) A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* **65**: 519-524.

**Hussain, M., Heilmann, C., Peters, G., and Herrmann, M.** (2001) Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb Pathog* **31**: 261-270.

**Ishida, H., Ishida, Y., Kurosaka, Y., Otani, T., Sato, K., and Kobayashi, H.** (1998) In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*  
1. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1641-1645.

**Jäger, S.** Generierung definierter Deletionsmutanten des  $\sigma^B$  Operons in *S. epidermidis* zur Untersuchung von Regulationsmechanismen der Biofilmbildung im Rahmen von Fremdkörper-assoziierten Infektionen. 2006. Fachbereich Medizin, Universität Hamburg.

**Jefferson, K.K., Cramton, S.E., Götz, F., and Pier, G.B.** (2003) Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Mol Microbiol* **48**: 889-899.

**Ji, G., Beavis, R., and Novick, R.P.** (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**: 2027-2030.

**Kaito, C., Morishita, D., Matsumoto, Y., Kurokawa, K., and Sekimizu, K.** (2006) Novel DNA binding protein SarZ contributes to virulence in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **62**: 1601-1617.

**Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., and Lewis, K.** (2004) Persister cells and tolerance to antimicrobials  
12. *FEMS Microbiol Lett* **230**: 13-18.

- Kilstrup, M., and Martinussen, J.** (1998) A transcriptional activator, homologous to the *Bacillus subtilis* PurR repressor, is required for expression of purine biosynthetic genes in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **180**: 3907-3916.
- Kloos, W.E., and Bannerman, T.L.** (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **7**: 117-140.
- Kneschke, J.-C.** Vergleich von extrazellulären Proteinen biofilmpositiver *Staphylococcus epidermidis* Stämme mit ihren isogenetischen *sigB* Mutanten im Phänotyp, auf Aktivitäts- und transkriptioneller Ebene. 2007. Fachbereich Medizin, Universität Hamburg.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Knobloch, J.K.M., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.H., and Mack, D.** (2001) Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J Bacteriol* **183**: 2624-2633.
- Knobloch, J.K.M., von Osten, H., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Mack, D.** (2002a) Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative *Staphylococcus epidermidis* 1. *Med Microbiol Immunol* **191**: 107-114.
- Knobloch, J.K.M., Horstkotte, M.A., Rohde, H., Kaulfers, P.M., and Mack, D.** (2002b) Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* **49**: 683-687.
- Knobloch, J.K.M., Nedelmann, M., Kiel, K., Bartscht, K., Horstkotte, M.A., Dobinsky, S. et al.** (2003) Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5812-5818.
- Knobloch, J.K.M., Jäger, S., Rohde, H., and Mack, D.** (2004a) 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*. *Infect Immun* **72**: 3838-3848.
- Knobloch, J.K.M., Bartscht, K., Jäger, S., Rohde, D., Horstkotte, M.A., and Mack, D.** (2004b) Characterization of a new regulatory gene locus of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: the biofilm accumulation regulators A and B (*barAB*). *Int.J.Med.Microbiol.* 294 Suppl. 39, 190. 2004.
- Knobloch, J.K.M.** Expression von Virulenzfaktoren in *Staphylococcus epidermidis*: Regulationsmechanismen der Biofilmbildung und Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen. 2005. Fachbereich Medizin, Universität Hamburg.
- Knobloch, J.K.M., von Osten, H., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Mack, D.** (2008) Biofilm formation is not necessary for development of quinolone-resistant "persister" cells in an attached *Staphylococcus epidermidis* population 1. *Int J Artif Organs* **31**: 752-760.

**Kocianova, S., Vuong, C., Yao, Y., Voyich, J.M., Fischer, E.R., DeLeo, F.R., and Otto, M.** (2005) Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Invest* **115**: 688-694.

**Kok, M., Bron, G., Erni, B., and Mukhija, S.** (2003) Effect of enzyme I of the bacterial phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system (PTS) on virulence in a murine model. *Microbiology* **149**: 2645-2652.

**Kong, K.F., Vuong, C., and Otto, M.** (2006) *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* **296**: 133-139.

**Kornmann, H., Duboc, P., Niederberger, P., Marison, I., and von Stockar, U.** (2003) Influence of residual ethanol concentration on the growth of *Gluconacetobacter xylinus* I 2281. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**: 168-173.

**Kreiswirth, B.N., Lofdahl, S., Betley, M.J., O'Reilly, M., Schlievert, P.M., Bergdoll, M.S., and Novick, R.P.** (1983) The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* **305**: 709-712.

**Kullik, I., and Giachino, P.** (1997) The alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus*: regulation of the *sigB* operon in response to growth phase and heat shock. *Arch Microbiol* **167**: 151-159.

**Kullik, I., Giachino, P., and Fuchs, T.** (1998) Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J Bacteriol* **180**: 4814-4820.

**Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

**Lamb, H.K., Leslie, K., Dodds, A.L., Nutley, M., Cooper, A., Johnson, C. et al.** (2003) The negative transcriptional regulator NmrA discriminates between oxidized and reduced dinucleotides. *J Biol Chem* **278**: 32107-32114.

**Landy, A.** (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* **58**: 913-949.

**Lauderdale, K.J., Boles, B.R., Cheung, A.L., and Horswill, A.R.** (2009) Interconnections between Sigma B, *agr*, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect Immun* **77**: 1623-1635.

**Lewis, K.** (2001) Riddle of biofilm resistance  
15. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 999-1007.

**Lewis, K.** (2005) Persister cells and the riddle of biofilm survival  
9. *Biochemistry (Mosc)* **70**: 267-274.

**Lewis, K.** (2008) Multidrug tolerance of biofilms and persister cells  
2. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**: 107-131.

**Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C.A.** (1992) The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* **174**: 3843-3849.

**Mack, D., Siemssen, N., and Laufs, R.** (1992) Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun* **60**: 2048-2057.

**Mack, D., Nedelmann, M., Krokotsch, A., Schwarzkopf, A., Heesemann, J., and Laufs, R.** (1994) Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* **62**: 3244-3253.

**Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., and Laufs, R.** (1996a) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* **178**: 175-183.

**Mack, D., Haeder, M., Siemssen, N., and Laufs, R.** (1996b) Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J Infect Dis* **174**: 881-884.

**Mack, D.** (1999) Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J Hosp Infect* **43 Suppl**: S113-S125.

**Mack, D., Rohde, H., Dobinsky, S., Riedewald, J., Nedelmann, M., Knobloch, J.K.M. et al.** (2000) Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun* **68**: 3799-3807.

**Mack, D., Rohde, H., Harris, L.G., Davies, A.P., Horstkotte, M.A., and Knobloch, J.K.M.** (2006) Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* **29**: 343-359.

**Mack, D., Davies, A.P., Harris, L.G., Rohde, H., Horstkotte, M.A., and Knobloch, J.K.M.** (2007) Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Anal Bioanal Chem* **387**: 399-408.

**Maira-Litran, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark, G., III, Goldman, D.A., and Pier, G.B.** (2002) Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun* **70**: 4433-4440.

**Marraffini, L.A., Dedent, A.C., and Schneewind, O.** (2006) Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 192-221.

**Marrie, T.J., Nelligan, J., and Costerton, J.W.** (1982) A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead 1. *Circulation* **66**: 1339-1341.

**McCann, M.T., Gilmore, B.F., and Gorman, S.P.** (2008) *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J Pharm Pharmacol* **60**: 1551-1571.

**McCrea, K.W., Hartford, O., Davis, S., Eidhin, D.N., Lina, G., Speziale, P. et al.** (2000) The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **146** ( Pt 7): 1535-1546.

**McKevitt, A.I., Bjornson, G.L., Mauracher, C.A., and Scheifele, D.W.** (1990) Amino acid sequence of a deltalike toxin from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **58**: 1473-1475.

**Mehlin, C., Headley, C.M., and Klebanoff, S.J.** (1999) An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *J Exp Med* **189**: 907-918.

**Meier, S., Goerke, C., Wolz, C., Seidl, K., Homerova, D., Schulthess, B. et al.** (2007)  $\sigma^B$  and the  $\sigma^B$ -dependent *arlRS* and *yabJ-spoVG* loci affect capsule formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **75**: 4562-4571.

**Monk, A.B., and Archer, G.L.** (2007) Use of outer surface protein repeat regions for improved genotyping of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* **45**: 730-735.

**Morfeldt, E., Tegmark, K., and Arvidson, S.** (1996) Transcriptional control of the *agr*-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **21**: 1227-1237.

**Nickerson, N.N., Prasad, L., Jacob, L., Delbaere, L.T., and McGavin, M.J.** (2007) Activation of the SspA serine protease zymogen of *Staphylococcus aureus* proceeds through unique variations of a trypsinogen-like mechanism and is dependent on both autocatalytic and metalloprotease-specific processing. *J Biol Chem* **282**: 34129-34138.

**Nilsson, M., Frykberg, L., Flock, J.I., Pei, L., Lindberg, M., and Guss, B.** (1998) A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **66** : 2666-2673.

**Ninin, E., Caroff, N., Espaze, E., Marailac, J., Lepelletier, D., Milpied, N., and Richet, H.** (2006) Assessment of *ica* operon carriage and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing bacteraemia in bone marrow transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* **12**: 446-452.

**Novick, R.P.** (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48**: 1429-1449.

**O'Gara, J.P., and Humphreys, H.** (2001) *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol* **50**: 582-587.

**O'Gara, J.P.** (2007) *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **270**: 179-188.

**Olson, M.E., Garvin, K.L., Fey, P.D., and Rupp, M.E.** (2006) Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to biomaterials is augmented by PIA  
3. *Clin Orthop Relat Res* **451**: 21-24.

**Otto, M.** (2008) Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**: 207-228.

**Pané-Farré, J., Jonas, B., Forstner, K., Engelmann, S., and Hecker, M.** (2006) The  $\sigma^B$  regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *Int J Med Microbiol* **296**: 237-258.

**Pané-Farré, J., Jonas, B., Hardwick, S.W., Gronau, K., Lewis, R.J., Hecker, M., and Engelmann, S.** (2009) Role of RsbU in controlling SigB activity in *Staphylococcus aureus* following alkaline stress. *J Bacteriol* **191**: 2561-2573.

**Patel, J.D., Ebert, M., Ward, R., and Anderson, J.M.** (2007) *S. epidermidis* biofilm formation: effects of biomaterial surface chemistry and serum proteins. *J Biomed Mater Res A* **80**: 742-751.

**Patti, J.M., and Hook, M.** (1994a) Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol* **6**: 752-758.

**Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., and Hook, M.** (1994b) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* **48**: 585-617.

**Pedersen, K., Christensen, S.K., and Gerdes, K.** (2002) Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins  
1. *Mol Microbiol* **45**: 501-510.

**Peng, H.L., Novick, R.P., Kreiswirth, B., Kornblum, J., and Schlievert, P.** (1988) Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **170**: 4365-4372.

**Perehinec, T.M., Qazi, S.N., Gaddipati, S.R., Salisbury, V., Rees, C.E., and Hill, P.J.** (2007) Construction and evaluation of multisite recombinatorial (Gateway) cloning vectors for Gram-positive bacteria  
3. *BMC Mol Biol* **8**: 80.

**Peters, G., Locci, R., and Pulverer, G.** (1981) Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters  
4. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B* **173**: 293-299.

**Petersohn, A., Bernhardt, J., Gerth, U., Hoper, D., Koburger, T., Völker, U., and Hecker, M.** (1999a) Identification of  $\sigma^B$ -dependent genes in *Bacillus subtilis* using a promoter consensus-directed search and oligonucleotide hybridization. *J Bacteriol* **181**: 5718-5724.

**Petersohn, A., Antelmann, H., Gerth, U., and Hecker, M.** (1999b) Identification and transcriptional analysis of new members of the  $\sigma^B$  regulon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **145** ( Pt 4): 869-880.

**Projan, S.J., and Novick, R.P.** (1997) The Molecular Basis of Pathogenicity. In *The Staphylococci in Human Disease*. Crossley, K.B., and Archer, G.L. (eds). New York: Churchill Livingstone, pp. 55-81.

**Qin, Z., Yang, X., Yang, L., Jiang, J., Ou, Y., Molin, S., and Qu, D.** (2007) Formation and properties of in vitro biofilms of *ica*-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J Med Microbiol* **56**: 83-93.

**Raad, I., Alrahan, A., and Rolston, K.** (1998) *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin Infect Dis* **26**: 1182-1187.

**Rachid, S., Cho, S., Ohlsen, K., Hacker, J., and Ziebuhr, W.** (2000a) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: the possible involvement of the alternative transcription factor sigB. *Adv Exp Med Biol* **485**: 159-166.

**Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M., and Ziebuhr, W.** (2000b) Alternative transcription factor  $\sigma^B$  is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J Bacteriol* **182**: 6824-6826.

**Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., and Ziebuhr, W.** (2000c) Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 3357-3363.

**Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K.W., and Sonenshein, A.L.** (2001) *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev* **15**: 1093-1103.

**Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., and Götz, F.** (2005) Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2663-2676.

**Resch, A., Leicht, S., Saric, M., Pasztor, L., Jakob, A., Götz, F., and Nordheim, A.** (2006) Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics* **6**: 1867-1877.

**Rice, K., Peralta, R., Bast, D., de Azavedo, J., and McGavin, M.J.** (2001) Description of staphylococcus serine protease (*ssp*) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of *sspA*-encoded serine protease. *Infect Immun* **69**: 159-169.

**Rogers, K.L., Fey, P.D., and Rupp, M.E.** (2009) Coagulase-negative staphylococcal infections  
1. *Infect Dis Clin North Am* **23**: 73-98.

**Rohde, H., Knobloch, J.K.M., Horstkotte, M.A., and Mack, D.** (2001) Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **190**: 105-112.

**Rohde, H., Kalitzky, M., Kröger, N., Scherpe, S., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.M. et al.** (2004) Detection of virulence-associated genes does not discriminate between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* **42**: 5614-5619.

**Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M.A. et al.** (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* **55**: 1883-1895.

**Rosenstein, R., and Götz, F.** (2000) Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie* **82**: 1005-1014.

**Rupp, M.E., and Archer, G.L.** (1994) Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* **19**: 231-243.

**Rupp, M.E., Ulphani, J.S., Fey, P.D., and Mack, D.** (1999a) Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun* **67**: 2656-2659.

**Rupp, M.E., Ulphani, J.S., Fey, P.D., Bartscht, K., and Mack, D.** (1999b) 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 9. *Infect Immun* **67**: 2627-2632.

**Rupp, M.E., Fey, P.D., Heilmann, C., and Götz, F.** (2001) Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J Infect Dis* **183**: 1038-1042.

**Saginur, R., Stdenis, M., Ferris, W., Aaron, S.D., Chan, F., Lee, C., and Ramotar, K.** (2006) Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 55-61.

**Said-Salim, B., Dunman, P.M., McAleese, F.M., Macapagal, D., Murphy, E., McNamara, P.J. et al.** (2003) Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol* **185**: 610-619.

**Schewe, S.** 2009 Dissertation, Fachbereich Medizin, Universität Lübeck

**Schulthess, B., Meier, S., Homerova, D., Goerke, C., Wolz, C., Kormanec, J. et al.** (2009) Functional characterization of the  $\sigma^B$ -dependent *yabJ-spoVG* operon in *Staphylococcus aureus*: role in methicillin and glycopeptide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 1832-1839.

**Seidl, K., Stucki, M., Ruegg, M., Goerke, C., Wolz, C., Harris, L. et al.** (2006) *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1183-1194.

**Seidl, K., Bischoff, M., and Berger-Bächli, B.** (2008a) CcpA mediates the catabolite repression of *tst* in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **76**: 5093-5099.

**Seidl, K., Goerke, C., Wolz, C., Mack, D., Berger-Bächli, B., and Bischoff, M.** (2008b) *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect Immun* **76**: 2044-2050.

**Shaw, L., Golonka, E., Potempa, J., and Foster, S.J.** (2004) The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **150**: 217-228.

**Shigeta, M., Tanaka, G., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suginaka, H., and Usui, T.** (1997) Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method  
1. *Chemotherapy* **43**: 340-345.

**Sloot, N., Thomas, M., Marre, R., and Gatermann, S.** (1992) Purification and characterisation of elastase from *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* **37**: 201-205.

**Somerville, G., Mikoryak, C.A., and Reitzer, L.** (1999) Physiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* during exotoxin A synthesis: glutamate, iron limitation, and aconitase activity. *J Bacteriol* **181**: 1072-1078.

**Somerville, G.A., Cockayne, A., Durr, M., Peschel, A., Otto, M., and Musser, J.M.** (2003) Synthesis and deformylation of *Staphylococcus aureus* delta-toxin are linked to tricarboxylic acid cycle activity. *J Bacteriol* **185**: 6686-6694.

**Sonenshein, A.L.** (2007) Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* **5**:917-927

**Sperber, W.H., and Tatini, S.R.** (1975) Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol* **29**: 502-505.

**Stewart, P.S., and Costerton, J.W.** (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**: 135-138.

**Sun, D., Accavitti, M.A., and Bryers, J.D.** (2005) Inhibition of Biofilm Formation by Monoclonal Antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A Accumulation-Associated Protein. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**: 93-100.

**Surette, M.G., Miller, M.B., and Bassler, B.L.** (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1639-1644.

**Tenover, F.C., and Gaynes, R.** (2000) The epidemiology of *Staphylococcus* infections. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., and Rood J.I. Gram-Positive Pathogens. ASM Press (ed). Washington D.C.: pp. 414-421.

**Teufel, P., and Götz, F.** (1993) Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **175**: 4218-4224.

**Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.

**Throup, J.P., Zappacosta, F., Lunsford, R.D., Annan, R.S., Carr, S.A., Lonsdale, J.T. et al.** (2001) The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*:

genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function. *Biochemistry* **40**: 10392-10401.

**Tobisch, S., Zühlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J., Hecker, M.** (1999) Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**:6996-7004

**Tomlins, R.I., Pierson, M.D., and Ordal, Z.J.** (1971) Effect of thermal injury on the TCA cycle enzymes of *Staphylococcus aureus* MF 31 and *Salmonella typhimurium* 7136. *Can J Microbiol* **17**: 759-765.

**Tormo, M.A., Knecht, E., Götz, F., Lasa, I., and Penades, J.R.** (2005a) Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* **151**: 2465-2475.

**Tormo, M.A., Marti, M., Valle, J., Manna, A.C., Cheung, A.L., Lasa, I., and Penades, J.R.** (2005b) SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J Bacteriol* **187**: 2348-2356.

**Vadyvaloo, V., and Otto, M.** (2005) Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. *Int J Artif Organs* **28**: 1069-1078.

**van Belkum, A.** (2006) Staphylococcal colonization and infection: homeostasis versus disbalance of human (innate) immunity and bacterial virulence. *Curr Opin Infect Dis* **19**: 339-344.

**Varghese, S., Tang, Y., and Imlay, J.A.** (2003) Contrasting sensitivities of *Escherichia coli* aconitases A and B to oxidation and iron depletion. *J Bacteriol* **185**: 221-230.

**Vaudaux, P.E., Zulian, G., Huggler, E., and Waldvogel, F.A.** (1985) Attachment of *Staphylococcus aureus* to polymethylmethacrylate increases its resistance to phagocytosis in foreign body infection  
1. *Infect Immun* **50**: 472-477.

**Veenstra, G.J., Cremers, F.F., van Dijk, H., and Fleer, A.** (1996) Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **178**: 537-541.

**von Eiff, C., Heilmann, C., and Peters, G.** (1999) New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci  
1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**: 843-846.

**von Eiff, C., Peters, G., and Heilmann, C.** (2002) Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* **2**: 677-685.

**Vrany, J.D., Stewart, P.S., and Suci, P.A.** (1997) Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid-transport characteristics  
1. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 1352-1358.

**Vuong, C., Götz, F., and Otto, M.** (2000) Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **68**: 1048-1053.

**Vuong, C., and Otto, M.** (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect* **4**: 481-489.

**Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G.A., Fischer, E.R., and Otto, M.** (2003) Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **188**: 706-718.

**Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J.M., Yao, Y., Fischer, E.R., DeLeo, F.R., and Otto, M.** (2004a) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* **279**: 54881-54886.

**Vuong, C., Kocianova, S., Yao, Y., Carmody, A.B., and Otto, M.** (2004b) Increased Colonization of Indwelling Medical Devices by Quorum-Sensing Mutants of *Staphylococcus epidermidis* *In Vivo*. *J Infect Dis* **190**: 1498-1505.

**Vuong, C., Voyich, J.M., Fischer, E.R., Braughton, K.R., Whitney, A.R., DeLeo, F.R., and Otto, M.** (2004c) Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol* **6**: 269-275.

**Vuong, C., Kidder, J.B., Jacobson, E.R., Otto, M., Proctor, R.A., and Somerville, G.A.** (2005) *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin production significantly increases during tricarboxylic acid cycle stress. *J Bacteriol* **187**: 2967-2973.

**Wang, L., Li, M., Dong, D., Bach, T.H., Sturdevant, D.E., Vuong, C. et al.** (2008) SarZ is a key regulator of biofilm formation and virulence in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **197**: 1254-1262.

**Weng, M., Nagy, P.L., and Zalkin, H.** (1995) Identification of the *Bacillus subtilis* pur operon repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7455-7459.

**Weng, M., and Zalkin, H.** (2000) Mutations in the *Bacillus subtilis* purine repressor that perturb PRPP effector function in vitro and in vivo. *Curr Microbiol* **41**: 56-59.

**Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van, L.W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L.** (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* **5**: 751-762.

**Williams, R.J., Henderson, B., Sharp, L.J., and Nair, S.P.** (2002) Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **70**: 6805-6810.

**Winans, S.C.** (2002) Bacterial esperanto. *Nat Struct Biol* **9**: 83-84.

**Xu, L., Li, H., Vuong, C., Vadyvaloo, V., Wang, J., Yao, Y. et al.** (2006) Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **74**: 488-496.

**Yao, Y., Sturdevant, D.E., and Otto, M.** (2005) Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis* **191**: 289-298.

**Yao, Y., Vuong, C., Kocianova, S., Villaruz, A.E., Lai, Y., Sturdevant, D.E., and Otto, M.** (2006) Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* accessory-gene regulator response: quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defense. *J Infect Dis* **193**: 841-848.

**Yarwood, J.M., Bartels, D.J., Volper, E.M., and Greenberg, E.P.** (2004) Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* **186**: 1838-1850.

**Zhang, Y.Q., Ren, S.X., Li, H.L., Wang, Y.X., Fu, G., Yang, J. et al.** (2003) Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol* **49**: 1577-1593.

**Ziebandt, A.K., Weber, H., Rudolph, J., Schmid, R., Hoper, D., Engelmann, S., and Hecker, M.** (2001) Extracellular proteins of *Staphylococcus aureus* and the role of SarA and  $\sigma^B$ . *Proteomics* **1**: 480-493.

**Ziebuhr, W.** (2001) *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. *Contrib Microbiol* **8**: 102-107.

**Ziebuhr, W., Hennig, S., Eckart, M., Kranzler, H., Batzilla, C., and Kozitskaya, S.** (2006) Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents* **28 Suppl 1**: S14-S20.

**Zienkiewicz, A.** unpubliziert Dissertation, Fachbereich Medizin, Universität Lübeck

**Zimmerli, W., Lew, P.D., and Waldvogel, F.A.** (1984) Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect  
5. *J Clin Invest* **73**: 1191-1200.

**Zimmerli, W., Trampuz, A., and Ochsner, P.E.** (2004) Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* **351**: 1645-1654.

# Anhang

## I Plasmidkarten

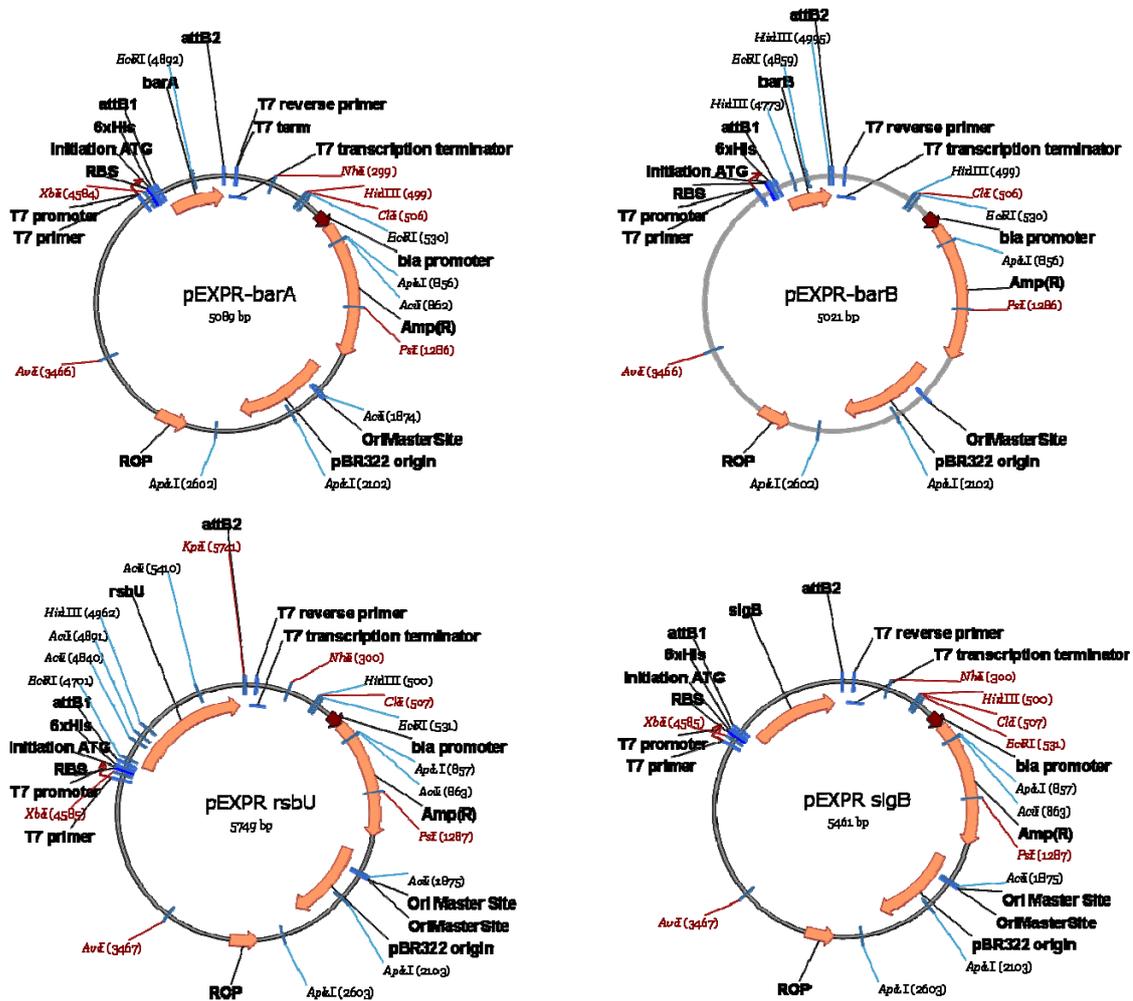


Abb. 8-1 Plasmidkarten der Expressionsplasmide

Alle Plasmide wurden nach dem Protein benannt für dessen Überexpression sie genutzt werden konnten. Dargestellt sind Größe, Resistenzkassetten, relevante Charakteristika wie Promotoren, OriSite oder Primer, und eine Auswahl an Restriktionsschnittstellen.

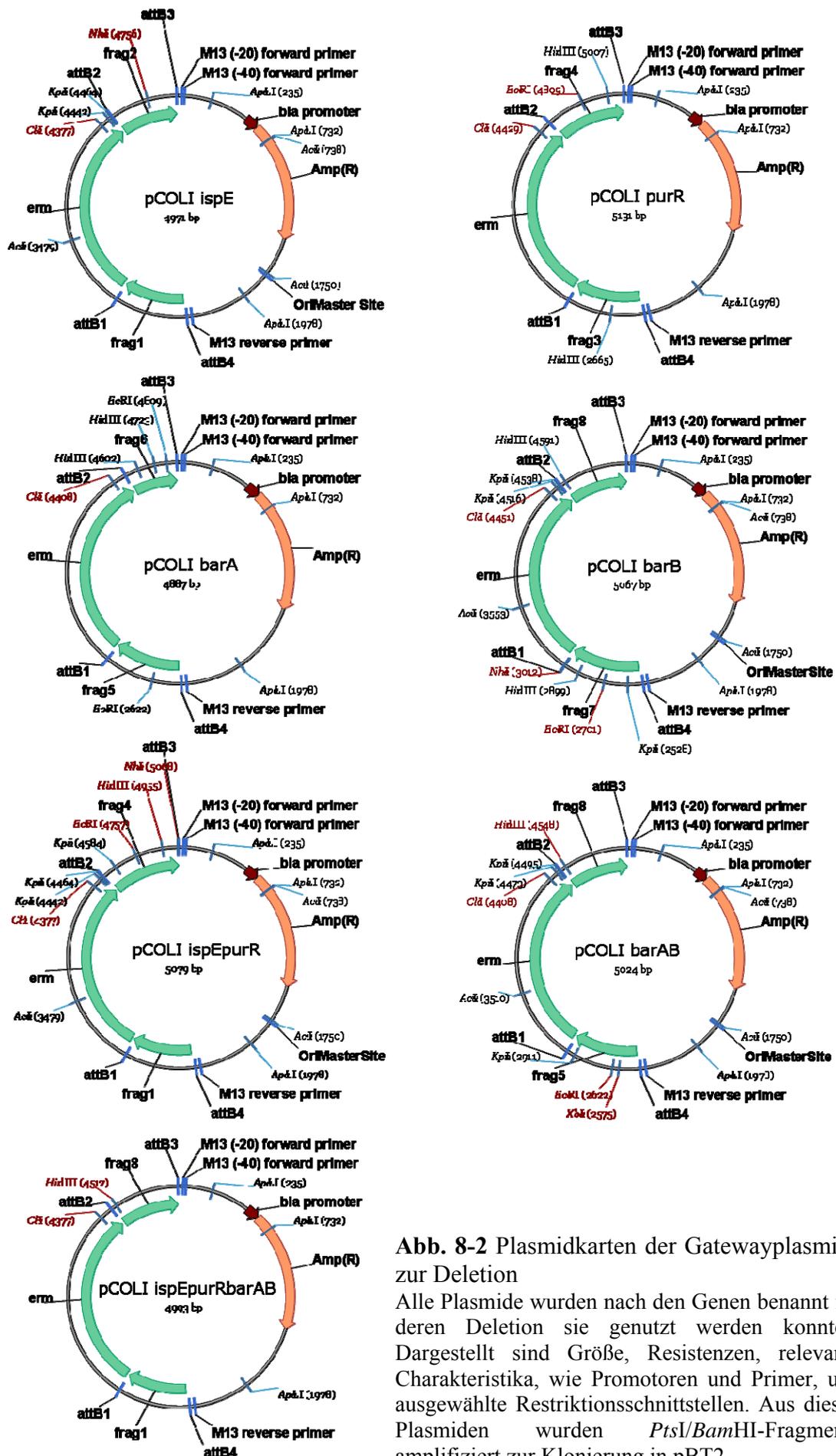


Abb. 8-2 Plasmidkarten der Gatewayplasmide zur Deletion

Alle Plasmide wurden nach den Genen benannt für deren Deletion sie genutzt werden konnten. Dargestellt sind Größe, Resistenzen, relevante Charakteristika, wie Promotoren und Primer, und ausgewählte Restriktionsschnittstellen. Aus diesen Plasmiden wurden *PtsI/BamHI*-Fragmente amplifiziert zur Klonierung in pBT2.

## II Sequenzierungen

```

Sequenzierung pEXPR $\bar{b}arA$  -----TGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCGTA
CTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAA
AGGGAGACCACAACGGTTCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCGTA
CTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAA
*****
His-tag
Sequenzierung pEXPR $\bar{b}arA$  AGCAGGCTTCATGAAAATAATCAACTCAGATAAGGTACCCGAAGCACTAGGCCATATTCGCATGCAACTGTTATAAACGGTTTGTCTTTACATCAGGTCAAATTC
CACTCACACTTGA
AGCAGGCTTCATGAAAATAATCAACTCAGATAAGGTACCCGAAGCACTAGGCCATATTCGCATGCAACTGTTATAAACGGTTTGTCTTTACATCAGGTCAAATTC
CACTCACACTTGA
*****
codierende Sequenz von barA
Sequenzierung pEXPR $\bar{b}arA$  TGGACAATTTGTTAGCGATGATGTTCAAGAACAACCTAAGCAAGTTT
TAGAAAATTTAACTGTGGTATTTAAAGAAGCAGATTCTGATTTGAATTCGTTGTTAAAGCGACAATCTATAT
TGGACAATTTGTTAGCGATGATGTTCAAGAACAACCTAAGCAAGTTT
TAGAAAATTTAACTGTGGTATTTAAAGAAGCAGATTCTGATTTGAATTCGTTGTTAAAGCGACAATCTATAT
*****
Transition
Sequenzierung pEXPR $\bar{b}arA$  TTCTGATATGAATGATTTTCAACAAATTAATCAAATCTATGGAAACTATTT
CGTCGAACACCAACCAGCTCGTAGTTGTGTTGAAGTGTACAGGTTGCCTAAAGACGTAAGGTAGAAAAT
TTCTGATATGAATGATTTTCAACAAATTAATCAAATCTATGGAAACTATTT
CGTCGAACACCAACCAGCTCGTAGTTGTGTTGAAGTGTACAGGTTGCCTAAAGACGTAAGGTAGAAAAT
*****
Sequenzierung pEXPR $\bar{b}arA$  TGAATTGATAGGTAAAGTGAAGTTATAATTTTCTACCCAGCTTCTTGTACAAAGT
TGAATTGATAGGTAAAGTGAAGTTATAATTTTCTACCCAGCTTTC-----
*****

Sequenzierung pEXPR $\bar{b}arB$  -----TGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCGTA
CTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAA
AGGGAGACCACAACGGTTCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCGTA
CTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAA
*****
His-tag
Sequenzierung pEXPR $\bar{b}arB$  AGCAGGCTACATGAAAGTGACAGATGTAAGACTTAGAAAAATACAAACAGACGGCAGAAATGAAAGCACTCGTTCCATTACGCTAGATGAAGCTTT
CGTAATTCATGATTTACGTGTAAT
AGCAGGCTACATGAAAGTGACAGATGTAAGACTTAGAAAAATACAAACAGACGGCAGAAATGAAAGCACTCGTTCCATTACGCTAGATGAAGCTTT
CGTAATTCATGATTTACGTGTAAT
*****
codierende Sequenz von barB Transition
Sequenzierung pEXPR $\bar{b}arB$  TGAAGGAAACTCAGGCTTTTCGTCGCAATGCCAAGTAAACGTACACCAGATGGTGAATCCG
TGACATCGGCATCCTATCAATTCGATATGAGACAAGAAATCCAAGATGCAGTGAT
TGAAGGAAACTCAGGCTTTTCGTCGCAATGCCAAGTAAACGTACACCAGATGGTGAATCCG
TGACATCGGCATCCTATCAATTCGATATGAGACAAGAAATCCAAGATGCAGTGAT
*****
Sequenzierung pEXPR $\bar{b}arB$  GAAAGTATATGATGAAACTGATGAAGTTATTCAGACAAAAATGCTACTTCAGATAACGAAGAATCAGACGAAGCTTAAT
TAAAAATGTACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTTGA
GAAAGTATATGATGAAACTGATGAAGTTATTCAGACAAAAATGCTACTTCAGATAACGAAGAATCAGACGAAGCTTAAT
TAAA-----
*****

```

```

Sequenzierung -----TACCATCACCATCACCATCAGCTCGAATCAACAAGTTTACAAAAAGCAGGCTATTCGTGGAAGAATTACAAAAAGTTATAAAGCCCTTGTTAAAGAAAGTTT
pEXPRrsbU TACATATGTCGTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTACAAAAAGCAGGCTATTCGTGGAAGAATTACAAAAAGTTATAAAGCCCTTGTTAAAGAAAGTTT
          *****
          His-tag                               codierende Sequenz von rsbU
Sequenzierung AATAACTAACATAAAACATTATTAATTAAGAAATGTGAAGCATTACAAATGAAGTTATAAAGAAAGATGTTTTACCTGAAGATATAGTTGAGATACATAAAGATTATATTAATACATT
pEXPRrsbU AATAACTAACATAAAACATTATTAATTAAGAAATGTGAAGCATTACAAATGAAGTTATAAAGAAAGATGTTTTACCTGAAGATATAGTTGAGATACATAAAGATTATATTAATACATT
          *****
Sequenzierung AGATTTAACTGAAGAAGATATTTAGAAACGCTCGATGTGTACAAGAAGTCGTTAAAGGATTTGGATATAGTTACCGAGATTACCAAAGACTTGTTAATAAGCTTCAAGTCCACGATAA
pEXPRrsbU AGATTTAACTGAAGAAGATATTTAGAAACGCTCGATGTGTACAAGAAGTCGTTAAAGGATTTGGATATAGTTACCGAGATTACCAAAGACTTGTTAATAAGCTTCAAGTCCACGATAA
          *****
Sequenzierung AGAAATGGATTAGCCTCAAGACTTCAACAAACTATGCTGAAAGCTGATATCCACAATTTGATAGCATTCAAATAGGAGTGATATCTGTTGCTGCACAAAAAGTAAGTGGTGATTATTT
pEXPRrsbU AGAAATGGATTAGCCTCAAGACTTCAACAAACTATGCTGAAAGCTGATATCCACAATTTGATAGCATTCAAATAGGAGTGATATCTGTTGCTGCACAAAAAGTAAGTGGTGATTATTT
          *****
Sequenzierung TAATCTTATTGATCATAAAGATGGCACAATGAGTTTGTGTGGCAGACGTTATAGGTTCAAGGTATCCAGCAGCTTTAGCTATGAGTATGATAAAATTTGGCATGGATGCTTATGGACA
pEXPRrsbU TAATCTTATTGATCATAAAGATGGCACAATGAGTTTGTGTGGCAGACGTTATAGGTTCAAGGTATCCAGCAGCTTTAGCTATGAGTATGATAAAATTTGGCATGGATGCTTATGGACA
          *****
Sequenzierung TTCACAACCTACCTAGTGATGGTTGAAGCGTTGAACCGTGTGAAAAGAACGTTAACCAAAATATGTTTGTGTCACAATGTTTATGGACTGTATGAAGAGATGAATCATCTTCTTTACTG
pEXPRrsbU TTCACAACCTACCTAGTGATGGTTGAAGCGTTGAACCGTGTGAAAAGAACGTTAACCAAAATATGTTTGTGTCACAATGTTTATGGACTGTATGAAGAGATGAATCATCTTCTTTACTG
          *****
Sequenzierung TAGCTCAGCTGGGCATGAACCTGGCTATATATATCGCGCAGAAACTGAAGCGTTTGAAGGAAATGGTGTGCGAGGAAAGAGTTCAGGTGTGAGTCCCAAAACACGTTATAGCCAACAGGA
pEXPRrsbU TAGCTCAGCTGGGCATGAACCTGGCTATATATATCGCGCAGAAACTGAAGCGTTTGAAGGAAATGGTGTGCGAGGAAAGAGTTCAGGTGTGAGTCCCAAAACACGTTATAGCCAACAGGA
          *****
Sequenzierung AATCCCTATTTACCTTGATGATTTAATCATAATTTTACTGATGGTGTACAGAGGCACGAGATGTAGAGGGTAATTTTATTGATAAAGATAAGTTGTTAGACTTAATTCAAAAATATAA
pEXPRrsbU AATCCCTATTTACCTTGATGATTTAATCATAATTTTACTGATGGTGTACAGAGGCACGAGATGTAGAGGGTAATTTTATTGATAAAGATAAGTTGTTAGACTTAATTCAAAAATATAA
          *****
Sequenzierung GCATATGCATCCACAGGATATAGTTCAAATTAATTTACGAAGCGATTTTAAATTAACAAAATCCTGCGAGAAAAGATGATATGACTATTTTAATTATAAAAAGAGTAAACTAATTTATAAA
pEXPRrsbU GCATATGCATCCACAGGATATAGTTCAAATTAATTTACGAAGCGATTTTAAATTAACAAAATCCTGCGAGAAAAGATGATATGACTATTTTAATTATAAAAAGAGTAAACTAATTTATAAA
          *****
Sequenzierung ATATAGATTAAGTTAAATTCATGTAGGGTATAGGTACCCAGCTTTTCTT
pEXPRrsbU ATATAGATTAAGTTAAATTCATGTAGGGTATAGGTACCCAGCTTTTCTT
          *****
    
```

```

Sequenzierung --ACCTATGTCGTA TACCATCACCATCACCATCACTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCAGGTGCGAAATAATGGCGAAAGAGTCGAAATCAGCTAGTGAAGTATCA
pEXPRsigB      -TACCTATGTCGTA TACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCAGGTGCGAAATAATGGCGAAAGAGTCGAAATCAGCTAGTGAAGTATCA
                *****
                His-tag
Sequenzierung CCTGAACAAATTAACCAATGGATTAACAACATCAAGAAAACGAAGATAGCCAAGCTCAAGATAAATTAGTAAAACATTATCGTAAGCTGATTGAATCTTTAGCTTATAGGTACTCTAAG
pEXPRsigB      CCTGAACAAATTAACCAATGGATTAACAACATCAAGAAAACGAAGATAGCCAAGCTCAAGATAAATTAGTAAAACATTATCGTAAGCTGATTGAATCTTTAGCTTATAGGTACTCTAAG
                *****

Sequenzierung GGACAATCACATCATGAAGATTTAGTTC AAGTTGGTATGGTTGGTCTAATAGGTGCTATTAATAGATTTGATTTATCATTGATCGTAAGTTGAAGCCTTCTTAGTACCAACAGTTATT
pEXPRsigB      GGACAATCACATCATGAAGATTTAGTTC AAGTTGGTATGGTTGGTCTAATAGGTGCTATTAATAGATTTGATTTATCATTGATCGTAAGTTGAAGCCTTCTTAGTACCAACAGTTATT
                *****

Sequenzierung GGTGAGATTA AAAAGATATTTACGAGATAAAAACATGGAGTGTTCATGTACCTAGACGTATTA AAGAAATGGTCCAAGAATCAAAAAGTTAGTGATGAATTAACAAATGAACTTGAACGT
pEXPRsigB      GGTGAGATTA AAAAGATATTTACGAGATAAAAACATGGAGTGTTCATGTACCTAGACGTATTA AAGAAATGGTCCAAGAATCAAAAAGTTAGTGATGAATTAACAAATGAACTTGAACGT
                *****

Sequenzierung TCACCATCTATTAGTGA AATCGCACACGCTTAGAAGTTTCAGATGAAGAAGTTTGG AAGCGATGGAGATGGGGCAGAGTTACAATGCCCTGAGTGTGGATCACTCTATAGAAGCAGAT
pEXPRsigB      TCACCATCTATTAGTGA AATCGCACACGCTTAGAAGTTTCAGATGAAGAAGTTTGG AAGCGATGGAGATGGGGCAGAGTTACAATGCCCTGAGTGTGGATCACTCTATAGAAGCAGAT
                *****

Sequenzierung AAAGATGGTTCGACAGTTACATTATTAGATATTATGGGACAACAAGATGATAATTATGATTTAACGGAAAAACGATGATATTAGAA TGTATTTACCTATTTTGTGAGAGAGAGAAAGA
pEXPRsigB      AAAGATGGTTCGACAGTTACATTATTAGATATTATGGGACAACAAGATGATAATTATGATTTAACGGAAAAACGATGATATTAGAA C GTATTTACCTATTTTGTGAGAGAGAGAAAGA
                *****
                Transition
Sequenzierung CAAATCATA CATTGTACTTTTATTGAAGGCTTAGCCAAAAAGAGACTGGTGAAAGAATTGGTCTTAGTCAAATGCATGTTTCACGTTTGCAACGTACCGCAATAAAAAACCCAGCTTTC
pEXPRsigB      CAAATCATA CATTGTACTTTTATTGAAGGCTTAGCCAAAAAGAGACTGGTGAAAGAATTGGTCTTAGTCAAATGCATGTTTCACGTTTGCAACGTACCGCAATAAAAAACCCAGCTTTC
                *****
                Transversion
Sequenzierung TTGTACAAAGTGGTTGATTGAGGCTGCTAA CAAA
pEXPRsigB      TTGTACAAAGTGGTTGATTGAGGCTGCTAA CAAAAG
                *****
    
```

```

erm.rv      -----AAGCAGTTGCACACTAACAAAAACATAATTTATGAGCGTCGTCGATAACTCTAAATTTAATATTTTTATTTAAGGTGAGTCTGGACATTGAATATATGTTTCAGACTCTTTGT
1457ispE    CATCAAGAAGCAGTTGCACACTAACAAAAACATAATTTATGAGCGTCGTCGATAACTCTAAATTTAATATTTTTATTTAAGGTGAGTCTGGACATTGAATATATGTTTCAGACTCTTTGT
                *****
                manipulierte 5'Region

erm.rv      TATTGTAGTCTTTATTTATTCCATTTTCATGAGATTATGCAACTTACGTTTATTATTAATACACAATTCATTTAAATTAACGAATAACCAATTTGAATAAGTCCAATTTTTGTAATATC
1457ispE    TATTGTAGTCTTTATTTATTCCATTTTCATGAGATTATGCAACTTACGTTTATTATTAATACACAATTCATTTAAATTAACGAATAACCAATTTGAATAAGTCCAATTTTTGTAATATC
                *****

erm.rv      CAAAAGTGATTGCGCTTTAGTTGTTAAATATATTTTTAAATATGAAAATGCGTATGTTGAGTGTAAAAAATTACTCTTCATTAAGATTTTACGAGAAATGCACATAGTCTATCAAATA
1457ispE    CAAAAGTGATTGCGCTTTAGTTGTTAAATATATTTTTAAATATGAAAATGCGTATGTTGAGTGTAAAAAATTACTCTTCATTAAGATTTTACGAGAAATGCACATAGTCTATCAAATA
                *****

erm.rv      TTTAAAGGCTTTTATGTTAAATCATTTTAATAACAATTCAAAGCGAGGGCGGAAAAATGATATATGAAACTGCGCCAGCTAAGATAAATTTTACGCTCGACACCCCTTTTTAAAGAGATG
1457ispE    TTTAAAGGCTTTTATGTTAAATCATTTTAATAACAATTCAAAGCGAGGGCGGAAAAATGATATATGAAACTGCGCCAGCTAAGATAAATTTTACGCTCGACACCCCTTTTTAAAGAGATG
                *****

erm.rv      ATGGTTATCATGAAATTGAAATGGTGTGACAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGACGGTGACATCTCTCTATTGTGAGTTATTAGTGGTACAGTTTTCAACCGTTTTAATTATAAA
1457ispE    ATGGTTATCATGAAATTGAAATGGTGTGACAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGACGGTGACATCTCTCTATTGTGAGTTATTAGTGGTACAGTTTTCAACCGTTTTAATTATAAA
                *****
                att-site                                Anteil der erm-Resistenzkassette

erm.fw      -----CTGTTATTTTGTACAATAAGGATAAATTTGAATGGTACCATAAACGACCGTTTATGGTACCTTTTCACCCAGCTTTCTTGTACAAAGT
1457ispE    TGTATCGATAAGGAATAGATTTAAAAATTTGCTGTTATTTTGTACAATAAGGATAAATTTGAATGGTACCATAAACGACCGTTTATGGTACCTTTTCACCCAGCTTTCTTGTACAAAGT
                *****
                Anteil der erm-Resistenzkassette                                att-site

erm.fw      GGTAATGCAGTGAATGGTTGTTGTAATGAAGTTTACTTAGTAAGATTATTAGGATAGAAGGGTTTGAAGAAGATGAGATATAAAGAAGCGAACGTATTGTATTTATGACACAATACCTCA
1457ispE    GGTAATGCAGTGAATGGTTGTTGTAATGAAGTTTACTTAGTAAGATTATTAGGATAGAAGGGTTTGAAGAAGATGAGATATAAAGAAGCGAACGTATTGTATTTATGACACAATACCTCA
                *****
                manipulierte 3'Region

erm.fw      TGAACCAACCAATAAGTTGATACCCCTCACTTATTTTGTAAAGAAATTTAAACAAGCAAAATCGTCAATTAGTGAAGACGTTCAAATCATTAATAAATACGTTTCAAATGAAAAATTAG
1457ispE    TGAACCAACCAATAAGTTGATACCCCTCACTTATTTTGTAAAGAAATTTAAACAAGCAAAATCGTCAATTAGTGAAGACGTTCAAATCATTAATAAATACGTTTCAAATGAAAAATTAG
                *****

erm.fw      GAACTATTATTACTACAGCAGGTGCTAGCGGTGGAGTAACTATAAGCCTATGATGAGTAAATCAGAGGCCACAGAGGTTGTTGATGAGGTGATAGAGCAATTACAAGAGAAAGACCGTT
1457ispE    GAACTATTATTACTACAGCAGGTGCTAGCGGTGGAGTAACTATAAGCCTATGATGAGTAAATCAGAGGCCACAGAGGTTGTTGATGAGGTGATAGAGCAATTACAAGAGAAAGACCGTT
                *****

erm.fw      TGCTACCTGGAGGATATTTATTTTATCCGATTTAGTTGGTAATCCTTCTCTATTAATAAAGTAGGTAAGTTAATTGCTAGTATATATATGAACGAAGAAGCTTGATGCTGTTGTTACC
1457ispE    TGCTACCTGGAGGATATTTATTTTATCCGATTTAGTTGGTAATCCTTCTCTATTAATAAAGTAGGTAAGTTAATTGCTAGTATATATATGAACGAAGAAGCTTGATGCTGTTGTTACC
                *****
    
```



```

erm.rv      -----TGTTACCATAGCGACTAAAGGGATATCACTTGCGAATGCAGTCGCAAACGTATTAAAT
1457barA   ATTAATAAAGTAGGTAAGTTAATTGCTAGTATATATGAACGAAGAACCTGATGCTGTTGTTACCATAGCGACTAAAGGGATATCACTTGCGAATGCAGTCGCAAACGTATTAAAT
                                     *****
                                     manipulierte 5'Region
erm.rv      TTACCTGTAGTGGTTATAAGAAAGGACAATAAAGTTACAGAAGGTTCTACGGTTTCAATCAATTATGTTTCAGGATCATCTAGAAAAATAGAAACAATGGTGTATCGAAACGAACTTTA
1457barA   TTACCTGTAGTGGTTATAAGAAAGGACAATAAAGTTACAGAAGGTTCTACGGTTTCAATCAATTATGTTTCAGGATCATCTAGAAAAATAGAAACAATGGTGTATCGAAACGAACTTTA
                                     *****
erm.rv      GCTGAGAATTCTAATGTCCTCGTAGTAGACGATTTTATGAGGGCTGGTGGCTCAATTAATGGAGTAATGAATTTAATGAATGAGTTTAAAGCCCATGTAAAAGGGGTATCAGTACTTGTA
1457barA   GCTGAGAATTCTAATGTCCTCGTAGTAGACGATTTTATGAGGGCTGGTGGCTCAATTAATGGAGTAATGAATTTAATGAATGAGTTTAAAGCCCATGTAAAAGGGGTATCAGTACTTGTA
                                     *****
erm.rv      GAATCAAAAAGAGTAAAACAAAGATTAATTGAAGATTATACTTCCTTAGTCAGATTGTCAGATGTCGACGAGTACAACCAAGAATTTAAAGTGAACCAGGCAACAGTTTGTCTAAATTT
1457barA   GAATCAAAAAGAGTAAAACAAAGATTAATTGAAGATTATACTTCCTTAGTCAGATTGTCAGATGTCGACGAGTACAACCAAGAATTTAAAGTGAACCAGGCAACAGTTTGTCTAAATTT
                                     *****
erm.rv      TCTTAAAAAAGGAGTGTCAAATTCATCATGAAAATAATCAACTCAGATAAGGTACCCGAAGCACTAGGCCCATATTCGCATGCAACTGTTATAAACGGTTTTGTCTTTACATCAGGTCAA
1457barA   TCTTAAAAAAGGAGTGTCAAATTCATCATGAAAATAATCAACTCAGATAAGGTACCCGAAGCACTAGGCCCATATTCGCATGCAACTGTTATAAACGGTTTTGTCTTTACATCAGGTCAA
                                     *****
erm.rv      GTTTGTACAAAAAGCAGGCTGACGGTGACATCTCTCTATTGTGAGTTATTAGTGGTACAGTTTCAACCGTTTTAATTATAAAAAAGTGGTGCATTTTAAATTGGCACAAACAGGTAA
1457barA   GTTTGTACAAAAAGCAGGCTGACGGTGACATCTCTCTATTGTGAGTTATTAGTGGTACAGTTTCAACCGTTTTAATTATAAAAAAGTGGTGCATTTTAAATTGGCACAAACAGGTAA
                                     *****
att-site   Anteil der erm-Resistenzkassette
erm.fw      -----ACGACCGTTTATGGTACCTTTTCAACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGGTTGCCTAAAGA
1457barA   TAGATTTAAAAATTCGCTGTTATTTTGTACAATAAGGATAAATTTGAATGGTACCATAAACGACCGTTTATGGTACCTTTTCAACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGGTTGCCTAAAGA
                                     *****
                                     Anteil der erm-Resistenzkassette att-site
erm.fw      CGTAAAGGTAGAAATTGAATTGATAGGTAAAGTGAAGGAATTATAATTTTCTTAAAAGTTGTCAAGCTTCTAATAACATAAAGATATACTAGGGGGGCTCACTACATGAAAGTGACAGAT
1457barA   CGTAAAGGTAGAAATTGAATTGATAGGTAAAGTGAAGGAATTATAATTTTCTTAAAAGTTGTCAAGCTTCTAATAACATAAAGATATACTAGGGGGGCTCACTACATGAAAGTGACAGAT
                                     *****
manipulierte 3'Region
erm.fw      GTAAGACTTAGAAAAATACAAACAGACGGCAGAATGAAAGCACTCGTTCCATTACGCTAGATGAAGCTTTTGTAAATTCATGATTTACGTGTAATTGAAGGAAACTCAGGCTTTTCGTC
1457barA   GTAAGACTTAGAAAAATACAAACAGACGGCAGAATGAAAGCACTCGTTCCATTACGCTAGATGAAGCTTTTGTAAATTCATGATTTACGTGTAATTGAAGGAAACTCAGGCTTTTCGTC
                                     *****
erm.fw      GCAATGCCAAGTAAACGTACACCAGATGGTGAATCCCGTGACATCGCGCATCTATCAATTTCTGATATGAGACAAGAAATCCAAGATGCAGTGATGAAAGTA
1457barA   GCAATGCCAAGTAAACGTACACCAGATGGTGAATCCCGTGACATCGCGCATCTATCAATTTCTGATATGAGACAAGAAATCCAAGATGCAGTGATGAAAGTATATGATGAAACTGATGAA
                                     *****

```

*erm.rv* -----ATTTAAAGTGAACCAAGGCAACAGTTTGTCTAAATTTCTTAAAAAGGAGTGTCAAATTCATCATGAAAATAATCAACTCAGATAAGGTACCCGAAGC  
 1457barB TGTCGACGAGTACAACCAAGAATTTAAAGTGAACCAAGGCAACAGTTTGTCTAAATTTCTTAAAAAGGAGTGTCAAATTCATCATGAAAATAATCAACTCAGATAAGGTACCCGAAGC  
 \*\*\*\*\*

**manipulierte 5'Region**

*erm.rv* ACTAGGCCATATTCGCATGCAACTGTTATAAACGGTTTTGTCTTTACATCAGGTCAAATTCACACTCACACTTGATGGAACAATTGTTAGCGATGATGTTCAAGAACAAACTAAGCAAGT  
 1457barB ACTAGGCCATATTCGCATGCAACTGTTATAAACGGTTTTGTCTTTACATCAGGTCAAATTCACACTCACACTTGATGGAACAATTGTTAGCGATGATGTTCAAGAACAAACTAAGCAAGT  
 \*\*\*\*\*

*erm.rv* TTTAGAAAATTTAACTGTGGTATTTAAAAGAAGCAGATTTCTGATTTGAATTTCTGTTGTTAAAGCGACAATCTATATTTCTGATATGAATGATTTTCAACAAATTAATCAAATCTATGGAAA  
 1457barB TTTAGAAAATTTAACTGTGGTATTTAAAAGAAGCAGATTTCTGATTTGAATTTCTGTTGTTAAAGCGACAATCTATATTTCTGATATGAATGATTTTCAACAAATTAATCAAATCTATGGAAA  
 \*\*\*\*\*

*erm.rv* CTATTTTCGTCGAACACCAACCAGCTCGTAGTTGTGTTGAAGTGTACGGTTGCCATAAGACGTAAAGGTAGAAAATGAATTGATAGGTAAAGTGAAGGAATTATAATTTTCTTAAAAGTT  
 1457barB CTATTTTCGTCGAACACCAACCAGCTCGTAGTTGTGTTGAAGTGTACGGTTGCCATAAGACGTAAAGGTAGAAAATGAATTGATAGGTAAAGTGAAGGAATTATAATTTTCTTAAAAGTT  
 \*\*\*\*\*

*erm.rv* GTCAAGCTTCTAATAACATAAAGATATACTAGGGGGGCTCACTACATGAAAGTGACAGATGTAAGACTTAGAAAAATACAAACAGACGGCAGAATGAAAGCACTCGTTCCATTACGCTA  
 1457barB GTCAAGCTTCTAATAACATAAAGATATACTAGGGGGGCTCACTACATGAAAGTGACAGATGTAAGACTTAGAAAAATACAAACAGACGGCAGAATGAAAGCACTCGTTCCATTACGCTA  
 \*\*\*\*\*

*erm.rv* GCAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGACGGTGACATCTCTCTATTGTGAGTTATTAGTGGTACAGTTTCAACCGTTTAAATTATAAAAAAGTGGTGCATTTTAAATTGGCACAAACA  
 1457barB GCAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGACGGTGACATCTCTCTATTGTGAGTTATTAGTGGTACAGTTTCAACCGTTTAAATTATAAAAAAGTGGTGCATTTTAAATTGGCACAAACA  
 \*\*\*\*\*

**att-site**

**Anteil der erm-Resistenzkassette**

*erm.fw* -----TGTTATTTGTACAATAAGGATAAAATTTGAATGGTACCATAAACGACCGTTTATGGTACCTTTTCA**CC**CAGCTTCTTG**T**TACA**AA**AGTGGT**C**AGAT  
 1457barB TAAGGAATAGATTTAAAAATTTTCGCTGTTATTTGTACAATAAGGATAAAATTTGAATGGTACCATAAACGACCGTTTATGGTACCTTTTCA**CC**CAGCTTCTTG**T**TACA**AA**AGTGGT**C**AGAT  
 \*\*\*\*\*

**Anteil der erm-Resistenzkassette**

**att-site**

*erm.fw* AACGAAGAATCAGACGAAGCTTAATTAAGAAATGTATTCAATTTATAAAAATAGCCCTGGGACATTGATGATATATTGCTCAGGCATTTTAAATGATTTGTTAGTCAATGGCAAAATTAGT  
 1457barB AACGAAGAATCAGACGAAGCTTAATTAAGAAATGTATTCAATTTATAAAAATAGCCCTGGGACATTGATGATATATTGCTCAGGCATTTTAAATGATTTGTTAGTCAATGGCAAAATTAGT  
 \*\*\*\*\*

**manipulierte 3'Region**

*erm.fw* AATGATTGTGTAATGGATTACTTGAAATTTATACCATATTGTTFCGGGAGGGACTGCGACTTCTTATTGAAGTTGTAGTCCCTCCGTTATTTTAAATGACTTTGTATTTCCATAAACGAA  
 1457barB AATGATTGTGTAATGGATTACTTGAAATTTATACCATATTGTTFCGGGAGGGACTGCGACTTCTTATTGAAGTTGTAGTCCCTCCGTTATTTTAAATGACTTTGTATTTCCATAAACGAA  
 \*\*\*\*\*

*erm.fw* AACGAAATAAACATTTAACGATAAATAAGAATTATAGAAGTAAAATACTGATATGTTTCTCTGACAACAATTCATCTATAAAAATTTACTTATGATAGACGTAATTAATATGTCTGTATG  
 1457barB AACGAAATAAACATTTAACGATAAATAAGAATTATAGAAGTAAAATACTGATATGTTTCTCTGACAACAATTCATCTATAAAAATTTACTTATGATAGACGTAATTAATATGTCTGTATG  
 \*\*\*\*\*

*erm.fw* ATTATAACTTTATCGTCATAAATTATGATTGATAAATATGATGATTTAGACACTGAAATAAAAATACCAATGATTAATAAAGAGGTTGAATATGTAATGTAACGTGTTGGGTTTGTATGACCTC  
 1457barB ATTATAACTTTATCGTCATAAATTATGATTGATAAATATGATGATTTAGACACTGAAATAAAAATACCAATGATTAATAAAGAGGTTGAATATGTAATGTAACGTGTTGGGTTTGTATGACCTC  
 \*\*\*\*\*

*erm.fw* GTTTTCCTTATTAAGCATAACAACCTTATTTGAATTTCTAAA-----  
 1457barB GTTTTCCTTATTAAGCATAACAACCTTATTTGAATTTCTAAAATTTATAAACCTTTAATG  
 \*\*\*\*\*

```

erm.rv          -----TGTTACCATAGCGACTAAAGGGATATCACTTGCGAATGCAGTCGCAAACGTATTAAAT
1457barAB      ATTAATAAAGTAGGTAAGTTAATTGCTAGTATATATATGAACGAAGAAGCTTGATGCTGTTGTTACCATAGCGACTAAAGGGATATCACTTGCGAATGCAGTCGCAAACGTATTAAAT
          *****
          manipulierte 5'Region
erm.rv          TTACCTGTAGTGGTTATAAGAAAGGACAATAAAGTTACAGAAGGTTCTACGGTTTCAATCAATTATGTTTCAGGATCATCTAGAAAAATAGAAACAATGGTGTATCGAAACGAACTTTA
1457barAB      TTACCTGTAGTGGTTATAAGAAAGGACAATAAAGTTACAGAAGGTTCTACGGTTTCAATCAATTATGTTTCAGGATCATCTAGAAAAATAGAAACAATGGTGTATCGAAACGAACTTTA
          *****
erm.rv          GCTGAGAATTCTAATGTCTCTAGTAGACGATTTTATGAGGGCTGGTGGCTCAATTAATGGAGTAATGAATTTAATGAATGAGTTTAAAGCCCATGTAAAAGGGGTATCAGTACTTGTA
1457barAB      GCTGAGAATTCTAATGTCTCTAGTAGACGATTTTATGAGGGCTGGTGGCTCAATTAATGGAGTAATGAATTTAATGAATGAGTTTAAAGCCCATGTAAAAGGGGTATCAGTACTTGTA
          *****
erm.rv          GAATCAAAGAAGTAAAACAAAGATTAATTGAAGATTATACTTCCTTAGTCAGATTGTCAGATGTCGACGAGTACAACCAAGAATTTAAAGTGAACAGGCAACAGTTTGTCTAAATTT
1457barAB      GAATCAAAGAAGTAAAACAAAGATTAATTGAAGATTATACTTCCTTAGTCAGATTGTCAGATGTCGACGAGTACAACCAAGAATTTAAAGTGAACAGGCAACAGTTTGTCTAAATTT
          *****
erm.rv          TCTTAAAAAAGGAGTGTCAAATTCATCATGAAAATAAACAATCAGATAAGGTACCCGAAGCACTAGGCCATATTCGCATGCAACTGTTATAAACGGTTTTGTCTTTACATCAGGTCAA
1457barAB      TCTTAAAAAAGGAGTGTCAAATTCATCATGAAAATAAACAATCAGATAAGGTACCCGAAGCACTAGGCCATATTCGCATGCAACTGTTATAAACGGTTTTGTCTTTACATCAGGTCAA
          *****
erm.rv          GTTTGTACAAAAAGCAGGCTGACGGTGACATCTCTCTATTGTGAGTTATTAGTGGTACAGTTTCAACCGTTTTAATTATAAAAAAGTGGTGCATTTTTAAATGGCACAAACAGGTAA
1457barAB      GTTTGTACAAAAAGCAGGCTGACGGTGACATCTCTCTATTGTGAGTTATTAGTGGTACAGTTTCAACCGTTTTAATTATAAAAAAGTGGTGCATTTTTAAATGGCACAAACAGGTAA
          *****
          att-site                Anteil der erm-Resistenzkassette
erm.fw          -----TCGCTGTTATTTTGTACAATAAGGATAAATTTGAATGGTACCATAAACGACCGTTTATGGTACCTTTTCAACCAGCTTCTTGTACAAGTGGTCAGATAACGAAG
1457barAB      TAGATTTAAAAATTTTCGCTGTTATTTTGTACAATAAGGATAAATTTGAATGGTACCATAAACGACCGTTTATGGTACCTTTTCAACCAGCTTCTTGTACAAGTGGTCAGATAACGAAG
          *****
          Anteil der erm-Resistenzkassette                att-site
erm.fw          AATCAGACGAAGCTTAATTAAGAAATGTATTCAATTTATAAAATAAGCCTGGGACATTGATGATATATTGTCTCAGGCATTTAATGTATTGTTAGTCAATGGCAAATTAGTAATGATT
1457barAB      AATCAGACGAAGCTTAATTAAGAAATGTATTCAATTTATAAAATAAGCCTGGGACATTGATGATATATTGTCTCAGGCATTTAATGTATTGTTAGTCAATGGCAAATTAGTAATGATT
          *****
          manipulierte 3'Region
erm.fw          GTGTAATGGATTACTTGAAATTTATACCATATGTTTCGGGAGGGACTGCGACTTCTTATTGAAGTTGTAGTCCCTCCGTTATTTTTAATGTACTTTGTATTCCATAAACGAAAACGAAA
1457barAB      GTGTAATGGATTACTTGAAATTTATACCATATGTTTCGGGAGGGACTGCGACTTCTTATTGAAGTTGTAGTCCCTCCGTTATTTTTAATGTACTTTGTATTCCATAAACGAAAACGAAA
          *****
erm.fw          TAAACATTTAACGATAAATAAGAATTTAGAAAGTAAAATACTGATATGTTTCTGACAACAATTCATCTATAAAAAATTTACTTATGATAGACGTAATTAATATGCTGTATGATTATAA
1457barAB      TAAACATTTAACGATAAATAAGAATTTAGAAAGTAAAATACTGATATGTTTCTGACAACAATTCATCTATAAAAAATTTACTTATGATAGACGTAATTAATATGCTGTATGATTATAA
          *****
erm.fw          CTTTATCGTCATAAATTATGATTGATAATATGATGATTAGACACTGAAATAAAATACCAATGATTAATAAAGAGGTTGAATATGTAATGTAACGTGGGTTTGTGACCTCGTTTTC
1457barAB      CTTTATCGTCATAAATTATGATTGATAATATGATGATTAGACACTGAAATAAAATACCAATGATTAATAAAGAGGTTGAATATGTAATGTAACGTGGGTTTGTGACCTCGTTTTC
          *****
    
```

```

erm.rv -----GCAGTTGCACACTAACAAAAACATAATTTATGAGCGTCGTCGATAACTCTAAATTTAATATTTTTATTTAAGGTGAGTCTGGACATTGAATATATGTTTCAGACTCTTTGT
1457ispEpurRbarAB CATCAAGAAGCAGTTGCACACTAACAAAAACATAATTTATGAGCGTCGTCGATAACTCTAAATTTAATATTTTTATTTAAGGTGAGTCTGGACATTGAATATATGTTTCAGACTCTTTGT
*****
manipulierte 5'Region

erm.rv TATTGTAGTCTTTATTTATTCCATTTTCATGAGATTATGCAACTTACGTTTATTATTAATACACAATTCATTTAAATTAACGAATAACCATTTGAATAAGTCCAATTTTTGTAATATC
1457ispEpurRbarAB TATTGTAGTCTTTATTTATTCCATTTTCATGAGATTATGCAACTTACGTTTATTATTAATACACAATTCATTTAAATTAACGAATAACCATTTGAATAAGTCCAATTTTTGTAATATC
*****

erm.rv CAAAAGTGATTGCGCTTTAGTTGTTAAATATATTTTTAAATATGAAAATGCGTATGTTGAGTGTAAAAAATTACTCTTCATTAAGATTTTACGAGAAATGCACATAGTCTATCAAATA
1457ispEpurRbarAB CAAAAGTGATTGCGCTTTAGTTGTTAAATATATTTTTAAATATGAAAATGCGTATGTTGAGTGTAAAAAATTACTCTTCATTAAGATTTTACGAGAAATGCACATAGTCTATCAAATA
*****

erm.rv TTTAAAGGCTTTATGTTAAATCATTTTAATAACAATTCAAAGCGAGGGCGGAAAAATGATATATGAAACTGCGCCAGCTAAGATAAAATTTACGCTCGACACCCTTTTTAAAGAGATG
1457ispEpurRbarAB TTTAAAGGCTTTATGTTAAATCATTTTAATAACAATTCAAAGCGAGGGCGGAAAAATGATATATGAAACTGCGCCAGCTAAGATAAAATTTACGCTCGACACCCTTTTTAAAGAGATG
*****

erm.rv ATGGTTATCATGAAATTGAAATGGTGATGACAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGACGGTGACATCTCTCTATTGTGAGTTATTAGTGGTACAGTTTTCAACCGTTTTAATTATAAA
1457ispEpurRbarAB ATGGTTATCATGAAATTGAAATGGTGATGACAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGACGGTGACATCTCTCTATTGTGAGTTATTAGTGGTACAGTTTTCAACCGTTTTAATTATAAA
*****
att-site Anteil der erm-Resistenzkassette

erm.fw -----GCTGTATTTTGTACAATAAGGATAAAATTTGAATGGTACCATAAACGACCGTTTTATGGTACCTTTT
1457ispEpurRbarAB GTCCCTAGCGCTTACGGGGAATTTGTATCGATAAGGAATAGATTTAAAAATTCGCTGTATTTTGTACAATAAGGATAAAATTTGAATGGTACCATAAACGACCGTTTTATGGTACCTTTT
*****
Anteil der erm-Resistenzkassette

erm.fw CACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCAGATAACGAAGAATCAGACGAAGCTTAATTAAGAAATGTATTCTTTATAAAAATAAGCCTGGGACATTGATGATATATTGTCTCAGGCATT
1457ispEpurRbarAB CACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCAGATAACGAAGAATCAGACGAAGCTTAATTAAGAAATGTATTCTTTATAAAAATAAGCCTGGGACATTGATGATATATTGTCTCAGGCATT
*****
att-site manipulierte 3'Region

erm.fw TAATGTATTGTTAGTCAATGGCAAAATTAGTAATGATTGTGTAATGGATTACTTGAAATTTATACCATATTGTTCCGGAGGGACTGCGACTTCTTATTGAAGTTGTAGTCCCTCCGTTAT
1457ispEpurRbarAB TAATGTATTGTTAGTCAATGGCAAAATTAGTAATGATTGTGTAATGGATTACTTGAAATTTATACCATATTGTTCCGGAGGGACTGCGACTTCTTATTGAAGTTGTAGTCCCTCCGTTAT
*****

erm.fw TTTAATGTACTTTGTATTTCCATAAACGAAAACGAAATAAACATTTAACGATAAATAAGAAATATAGAAGTAAATACTGATATGTTTCTCTGACAACAATTCATCTATAAAAAATTAC
1457ispEpurRbarAB TTTAATGTACTTTGTATTTCCATAAACGAAAACGAAATAAACATTTAACGATAAATAAGAAATATAGAAGTAAATACTGATATGTTTCTCTGACAACAATTCATCTATAAAAAATTAC
*****

erm.fw TTATGATAGACGTAATTAATATGTCGTGTATGATTATAACTTTATCGTCATAAATTATGATTGATAAATATGATGATTTAGACACTGAAATAAAATACCAATGATTAATAAAGAGGTTGAAT
1457ispEpurRbarAB TTATGATAGACGTAATTAATATGTCGTGTATGATTATAACTTTATCGTCATAAATTATGATTGATAAATATGATGATTTAGACACTGAAATAAAATACCAATGATTAATAAAGAGGTTGAAT
*****

erm.fw ATGTAATGTAACTGTTGGGTTTGATGACCTCGTTTTC-----
1457ispEpurRbarAB ATGTAATGTAACTGTTGGGTTTGATGACCTCGTTTTCCCTTATTAAAGCATAACAACTTAT
*****

```

### III Signifikant veränderte Proteine des intrazellulären Proteoms

**Tab. 8-1** Signifikant veränderte Proteine in *S. epidermidis* 1457barA, 1457barB und 1457barAB im Vergleich zum Wildtyp

Genname oder GI	putative Identifikation	biologischer Prozess	Regulation in		
			1457barA	1457barB	1457barAB
Nukleotidstoffwechsel					
<i>deoB</i>	Phosphopentomutase				0,46
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese			2,13
<i>pyrC</i>	Dihydroorotase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese			2,99
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese			3,21
<i>purQ</i>	Phosphoribosylformylglycinamidinsynthese I PurQ	Purin-Ribonucleotidbiosynthese			3,62
<i>prsA</i>	Ribosephosphatpyrophosphokinase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	0,49	0,26	3,95
<i>upp</i>	Uracilphosphoribosyltransferase	Wiederverwertung von Nucleosiden und Nucleotiden			6,40
<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole- succinocarboxamidsynthese	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	0,48		
Transkription					
<i>rpoB</i>	RNA-Polymerase beta-Kette				0,34
<i>rpoC</i>	DNA-abhängige RNA-Polymerase, beta- Untereinheit				4,14
Proteinsynthese					
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation			0,10
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation			0,15
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation			0,21
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation			0,25
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation			0,35
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation			0,44
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation			4,29

<i>rpsB</i>	30S ribosomales Protein S2	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation		4,76
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		5,74
27468083	30S ribosomales Protein S1	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation		5,78
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		5,88
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		7,16
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		7,87
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation		7,96
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation	0,43	
<i>rplJ</i>	50S ribosomales Protein L10	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation		2,76
Proteinbestimmung				
<i>dnaK</i>	DnaK Protein	Proteinfaltung- und Stabilisation		0,23
<i>dnaK</i>	DnaK Protein	Proteinfaltung- und Stabilisation		0,32
<i>dnaK</i>	DnaK Protein	Proteinfaltung- und Stabilisation		2,78
27468132	Xaa-Pro dipeptidase	Degradation von Proteinen, Peptiden und Glycopeptiden		3,39
27468491	Methionylaminopeptidase	Proteinmodifikation und -reparatur		4,35
<i>tig</i>	trigger Faktor	Proteinfaltung und Stabilisation, Protein- und Peptidsekretion und <i>trafficking</i>		6,70
<i>groEL</i>	GroEL Protein	Proteinfaltung- und Stabilisation	0,45	10,14
Transport- und Bindeproteinen				
<i>ptsI</i>	Phosphoenolpyruvat-Protein-Phosphatase	Kohlenhydrate, organische Alkohole und Säuren		3,88
Biosynthese von Cofaktoren, prosthetischen Gruppen und Carriern				
27468515	Nicotinat-phosphoribosyltransferase-ähnliches Protein	Pyridine -Nukleotide		2,68
<i>hemH</i>	Ferrochelatase	Heme, Porphyrin und Cobalamin		3,26
27469293	GTP-binding protein			3,47
<i>hemL-1</i>	Glutamat-1-semialdehyd-2,1-aminomutase	Heme, Porphyrin und Cobalamin		3,73
Zellwand				
<i>tagD</i>	Teichonsäurebiosynthesis-Protein, Glycerol-3-phosphatcytidyltransferase	Biosynthese and Degradation des Mureinsacculus und Peptidoglycans		0,24

<i>femB</i>	FemB protein	Biosynthese und Degradation von Oberflächenpolysacchariden und -lipopolysacchariden, Toxinproduktion und Resistenz		0,46
Energiemetabolismus				
<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacetyltransferase			0,10
27467075	Malat:Quinon-oxidoreduktase	TCA-Zyklus		0,30
<i>ldh</i>	L-lactatdehydrogenase	Glycolyse/Glukoneogenese, anaerob		0,49
<i>tal</i>	putative Transaldolase	Pentosephosphat-Weg		2,21
27468937	Sorbitoldehydrogenase	Fermentation		2,33
<i>glpK</i>	Glycerolkinase			2,47
<i>pgk</i>	Phosphoglyceratkinase	Glycolyse/Glukoneogenese		2,53
<i>icd</i>	Isocitratdehydrogenase	TCA-Zyklus		2,62
<i>mgo-2</i>	malate:quinone oxidoreductase	TCA-Zyklus		2,84
<i>pyk</i>	Pyruvatkinase	Glycolyse/Glukoneogenese		2,95
<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacetyltransferase			2,95
<i>mgo-2</i>	malate:quinone oxidoreductase	TCA-Zyklus		2,98
<i>pgk</i>	Phosphoglyceratkinase			3,04
<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacetyltransferase			3,96
<i>fbxA</i>	Fructose-bisphosphataldolase, Klasse II	Glycolyse/Glukoneogenese		5,68
<i>ldh</i>	L-lactatdehydrogenase	Glycolyse/Glukoneogenese	0,46	6,78
<i>lacD</i>	Tagatose 1,6-diphosphataldolase	Biosynthese und Degradation von Polysacchariden		8,93
<i>ald</i>	Alanindehydrogenase	Alanin-metabolische Prozesse	0,26	

Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus			
<i>accC</i>	Acetyl-CoA-Carboxylase (Biotin-Carboxylase-Untereinheit) <i>accC</i>	Biosynthese	2,25
<i>plsX</i>	Fettsäure /Phospholipid Syntheseprotein PlsX	Fettsäurebiosynthese	2,80
Regulatorische Funktionen			
<i>ccpA</i>	catabolite control protein A	DNA-Bindung, Transkriptionsaktivator	2,35
Sonstiges			
27469309	konserviertes hypothetisches Protein		0,13
27467260	konserviertes hypothetisches Protein		0,16
27467393	plant-metabolite dehydrogenases		0,17
27468303	konserviertes hypothetisches Protein	Adaptation an atypische Bedingungen	2,15
27467466	konserviertes hypothetisches Protein		2,51
27467725	GTP-binding elongation factor		9,10
27468992	D-specific D-2-hydroxyacid dehydrogenase		9,25
27468226	konserviertes hypothetisches Protein		2,07

**Tab. 8-2** Signifikant veränderte Proteine in *S. epidermidis* 1457barAB im Vergleich zu 1457barA und 1457barB

Genname oder GI	putative Identifikation	biologischer Prozess	Regulation in 1457barAB	
			vs 1457barA	vs 1457barB
Nukleotidstoffwechsel				
<i>deoB</i>	Phosphopentomutase		0,49	0,43
<i>pyrC</i>	Dihydroorotase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	2,17	2,51
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	2,38	
27468515	Nicotinat-phosphoribosyltransferase-ähnliches Protein	Pyridine –Nukleotide	2,48	3,07
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	2,81	
<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamidsynthase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	3,43	2,97
<i>purQ</i>	Phosphoribosylformylglycinamidinsynthase I PurQ	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	3,76	
<i>upp</i>	Uracilphosphoribosyltransferase	Wiederverwertung von Nucleosiden und Nucleotiden	4,60	5,34
<i>prsA</i>	Ribosephosphatpyrophosphokinase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	7,97	15,10
27468775	Inosin-adenosin-guanosin-nucleosidhydrolase	Wiederverwertung von Nucleosiden und Nucleotiden		0,49
<i>purA</i>	Adenylosuccinatsynthase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese		2,11
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese		2,55
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese		3,31
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese		3,75
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese		4,45
Transkription				
<i>rpoC</i>	DNA-abhängige RNA-Polymerase, beta-Untereinheit		3,58	10,38
<i>nusG</i>	Antiterminationsprotein	Transkriptionsfaktors		2,11

## Aminosäurebiosynthese

27467021	Ornithincarbamoyltransferase	Glutamatfamilie		0,35943
Proteinsynthese				
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	0,09	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	0,14	
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation	0,17	
<i>rplJ</i>	50S ribosomales Protein L10	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation	0,24	0,19
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	0,26	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	0,28	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	0,29	
27469179	konserviertes hypothetisches Protein	Protein synthesis: tRNA aminoacylation	3,12	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	4,83	
<i>rpsB</i>	30S ribosomales Protein S2	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation	5,82	7,16
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation	6,15	
27468083	30S ribosomales Protein S1	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation	7,68	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	7,90	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	8,26	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	9,33	
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation	9,39	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		0,10
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		0,14
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation		0,15
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		0,21
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		0,31
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		0,32
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation		10,07
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		2,61
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		5,35
27468083	30S ribosomales Protein S1	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation		6,78
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation		6,91

<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		7,58
<i>dnaK</i>	DnaK Protein	Faltung und Stabilisation		7,60
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		7,92
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation		8,91
Proteinbestimmung				
<i>dnaK</i>	DnaK Protein	Faltung und Stabilisation	0,21	
<i>dnaK</i>	DnaK Protein	Faltung und Stabilisation	0,28	
<i>dnaK</i>	DnaK Protein	Faltung und Stabilisation		5,01
<i>tig</i>	trigger Faktor	Proteinfaltung und Stabilisation, Protein- und Peptidsekretion und <i>trafficking</i>	2,52	
<i>dnaK</i>	DnaK Protein	Faltung und Stabilisation	3,32	
27468491	Methionylaminopeptidase	Proteinmodifikation und –reparatur	4,62	4,51179
<i>groEL</i>	GroEL Protein	Proteinfaltung- und Stabilisation	22,29	19,89
<i>dnaK</i>	DnaK Protein	Faltung und Stabilisation		0,27
<i>dnaK</i>	DnaK Protein	Faltung und Stabilisation		0,44
27468132	Xaa-Pro dipeptidase	Degradation von Proteinen, Peptiden und Glycopeptiden		2,49
Transport und Bindung von Proteinen				
<i>ptsI</i>	Phosphoenolpyruvat-Protein-Phosphatase	Kohlenhydrate, organische Alkohole und Säuren	4,95	6,74
Biosynthese von Cofaktoren, prosthetischen Gruppen und Carriern				
<i>hemH</i>	Ferrochelatase	Heme, Porphyrin und Cobalamin	5,03	9,40
<i>hemL-1</i>	Glutamat-1-semialdehyd-2,1-aminomutase	Heme, Porphyrin und Cobalamin		2,92
Zellwand				
<i>tagD</i>	Teichonsäurebiosynthesis-Protein, Glycerol-3-phosphatcytidyltransferase	Biosynthese and Degradation des Mureinsacculus und Peptidoglycans	0,26	0,26
27468626	UDP-GlcNAc 2-epimerase	Cell envelope: Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides	2,07	
<i>lacD</i>	Tagatose 1,6-diphosphataldolase	Biosynthese und Degradation von Polysacchariden	3,63	

<i>femB</i>	FemB protein	Biosynthese und Degradation von Oberflächenpolysacchariden und -lipopolysacchariden, Toxinproduktion und Resistenz		0,48
Energiemetabolismus				
<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacetyltransferase			0,09
<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacetyltransferase		0,09	
27467075	Malat:Quinon-oxidoreduktase	TCA-Zyklus	0,27	0,36
<i>tal</i>	putative Transaldolase	Pentosephosphat-Weg	2,34	
<i>mgo-2</i>	malate:quinone oxidoreductase	TCA-Zyklus	2,48	
<i>pgk</i>	Phosphoglyceratkinase	Glycolyse/Glukoneogenese	2,81	
<i>glpK</i>	Glycerolkinase		2,82	2,43
<i>mgo-2</i>	Malat:Quinon Oxidoreduktase	TCA-Zyklus	2,84	
27468937	Sorbitoldehydrogenase	Fermentation	2,98	2,24
<i>icd</i>	Isocitratdehydrogenase	TCA-Zyklus	3,47	2,71
<i>lacD</i>	Tagatose 1,6-diphosphataldolase	Biosynthese und Degradation von Polysacchariden	3,63	11,21
<i>fbaA</i>	Fructose-bisphosphataldolase, Klasse II	Glycolyse/Glukoneogenese	5,89	9,36
<i>ldh</i>	L-lactatdehydrogenase	Glycolyse/Glukoneogenese	9,71	14,61
<i>gltA</i>	Citratsynthase	Energy metabolism: TCA cycle	0,40	
<i>mgo-2</i>	Malat:Quinon Oxidoreduktase	TCA-Zyklus		2,46
<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacetyltransferase			2,53
<i>mgo-2</i>	Malat:Quinon Oxidoreduktase	TCA-Zyklus		3,02
<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacetyltransferase		4,62	

<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacetyltransferase			8,38
Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus				
27469302	Acetyl-CoA C-acetyltransferase-ähnliches Protein	Biosynthese	0,44	0,35
<i>accC</i>	Acetyl-CoA-Carboxylase (Biotin- Carboxylase-Untereinheit) <i>accC</i>	Biosynthese	2,50	3,14
<i>plsX</i>	Fettsäure /Phospholipid Syntheseprotein PlsX	Fettsäurebiosynthese	4,11	5,15
Regulatorische Funktionen				
<i>ccpA</i>	<i>catabolite control protein A</i>	DNA-Bindung, Transkriptionsaktivator	2,79	2,48
Sonstiges				
27467393	Pflanzen-metabolit Dehydrogenase		0,15	
27467260	konserviertes hypothetisches Protein		0,17	0,19
27469309	konserviertes hypothetisches Protein		0,20	0,20
27467393	Pflanzen-metabolit Dehydrogenase		0,21	
27467393	Pflanzen-metabolit Dehydrogenase			0,09
27467393	Pflanzen-metabolit Dehydrogenase			0,23
27468081	GTP-Bindeprotein		2,31	
27468303	konserviertes hypothetisches Protein	Adaptation an atypische Bedingungen	2,40	
27469293	GTP-binding protein		3,23	
27467725	GTP-binding elongation factor		8,89	11,40
27468992	D-specific D-2-hydroxyacid dehydrogenase		11,19	10,32
27468226	konserviertes hypothetisches Protein			0,39
27467466	konserviertes hypothetisches Protein			2,28

**Tab. 8-3** Signifikant veränderte Proteine in *S. epidermidis* 1457*sigB* und 1457*sigBagr* im Vergleich zum Wildtyp 1457

Genname oder GI	putative Identifikation	biologischer Prozess	Regulation in	
			1457 <i>sigB</i>	1457 <i>sigBagr</i>
<b>Nukleotidstoffwechsel</b>				
<i>prsA</i>	Ribosephosphatpyrophosphokinase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	0,14	
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	0,18	
<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole- succinocarboxamidsynthase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	0,23	
<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole- succinocarboxamidsynthase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	0,39	
<i>pyrB</i>	Aspartattranscarbamoylase chain A	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	2,14	
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese		2,23
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese		2,49
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese		4,16
<i>upp</i>	Uracilphosphoribosyltransferase	Wiederverwertung von Nucleosiden und Nucleotiden		5,98
<b>Transkription</b>				
<i>rpoA</i>	DNA-abhängige RNA-Polymerase alpha-Kette		0,17	
<i>rpoC</i>	DNA-abhängige RNA-Polymerase, beta- Untereinheit		0,31	7,34
<i>rpoB</i>	RNA-Polymerase beta-Kette			6,73
<b>Proteinsynthese</b>				
<i>rplY</i>	50S ribosomales Protein L25	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation	0,14	0,27
<i>rpsB</i>	30S ribosomales Protein S2	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation	0,16	3,47
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	0,18	
<i>rplJ</i>	50S ribosomales Protein L10	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation	0,26	
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation	0,27	

<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation	0,32	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	0,47	
<i>tsf</i>	Elongationsfaktor EF-Ts	Translationselongation	2,22	
<i>rplJ</i>	50S ribosomales Protein L10	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation	2,41	
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation	0,20	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	0,24	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	0,26	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	0,28	
<i>rplJ</i>	50S ribosomales Protein L10	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation	0,28	
<i>hemL-1</i>	Glutamat-1-semialdehyd-2,1-aminomutase	Heme, Porphyrin und Cobalamin	2,38	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	3,28	
<i>rplJ</i>	50S ribosomales Protein L10	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation	3,41	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	3,89	
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation	5,29	
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	7,70	
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation	8,78	
Proteinbestimmung				
<i>dnaK</i>	DnaK Protein	Faltung und Stabilisation	0,18	
<i>clpX</i>	Protease ClpX, ATP-abhängig	Degradation von Proteinen, Peptiden und Glycopeptiden, Chaperonaktivität	0,32	0,17
<i>dnaK</i>	DnaK Protein	Faltung und Stabilisation	0,18	
<i>dnaK</i>	DnaK Protein	Faltung und Stabilisation	0,25	
<i>mrsA-2</i>	Peptidmethioninsulfoxidreduktase	Modifikation und Reparatur	2,81	
27468132	Xaa-Pro-dipeptidase	Degradation von Proteinen, Peptiden und Glycopeptiden	2,93	
<i>tig</i>	<i>trigger</i> Faktor	Proteinfaltung und Stabilisation, Protein- und Peptidsekretion und <i>trafficking</i>	5,02	

<i>tig</i>	trigger Faktor	Proteinfaltung und Stabilisation, Protein- und Peptidsekretion und <i>trafficking</i>		20,06
Biosynthese von Cofaktoren, prosthetischen Gruppen und Carriern				
<i>menB</i>	Naphthoatsynthase	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers: Menaquinone and ubiquinone	0,11	
27468515	Nicotinat-phosphoribosyltransferase-ähnliches Protein	Pyridine -Nukleotide		3,41
Energiemetabolismus				
<i>glpK</i>	Glycerolkinase		0,05	2,87
<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacyltransferase		0,09	
27467075	Malat:Quinon Oxidoreductase	Energy metabolism: TCA cycle	0,11	0,09
<i>ald</i>	Alanindehydrogenase	Alanin-metabolische Prozesse	0,29	2,30
<i>pyk</i>	Pyruvatkinase	Glycolyse/Glukoneogenese	0,36	2,66
<i>budA</i>	alpha-Acetylactatdecarboxylase	Fermentation	0,36	
<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacyltransferase			3,19
<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacyltransferase			3,33
<i>ldh</i>	L-lactatdehydrogenase	Glycolyse/Glukoneogenese, anaerob		3,66
27468138	Glycinderhydrogenase (decarboxylating) subunit 2	Aminosäuren und Amine		4,02
Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus				
27469302	acetyl-CoA C-acetyltransferase-ähnliches Protein	Biosynthese	2,04	
<i>plsX</i>	Fettsäure /Phospholipid Syntheseprotein PlsX	Fettsäurebiosynthese	8,41	
Regulatorische Funktionen				
<i>rsbU</i>	SigmaB Regulationsprotein RsbU	Proteininteraktion		2,18
Sonstiges				
27467393	Pflanzen-metabolit Dehydrogenase		0,07	

---

27467260	konserviertes hypothetisches Protein		0,22	0,17
27468656	generelles Stressprotein 20U	Adaptation an atypische Bedingungen	0,31	0,48
27468081	GTP Bindeprotein		0,36	
27469309	konserviertes hypothetisches Protein		0,37	0,23
27468297	konserviertes hypothetisches Protein			2,08
27467725	GTP-binde-elongationsfaktor			2,48

---

**Tab. 8-4** Signifikant veränderte Proteine in *S. epidermidis* 1457sigBagr im Vergleich zu 1457sigB

Genname oder GI	putative Identifikation	biologischer Prozess	Regulation in 1457sigBagr vs 1457sigB
<b>Nukleotidstoffwechsel</b>			
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	3,03
<i>upp</i>	Uracilphosphoribosyltransferase	Wiederverwertung von Nucleosiden und Nucleotiden	3,20
<i>pyrC</i>	Dihydroorotase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	4,07
<i>prsA</i>	Ribosephosphatpyrophosphokinase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	6,51
<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamidsynthase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	7,19
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	7,39
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	22,77
<i>guaB</i>	Inositol-monophosphat-dehydrogenase	Purin-Ribonucleotidbiosynthese	41,05
<b>Transkription</b>			
<i>nusG</i>	Antiterminationsprotein	Transkriptionsfaktors	2,38
<i>rpoB</i>	RNA-Polymerase beta-Kette		3,50
<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase alpha chain		7,36
<i>rpoC</i>	DNA-abhängige RNA-Polymerase, beta-Untereinheit		23,83
<b>Proteinsynthese</b>			
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	0,22
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	0,35
<i>tsf</i>	elongation factor EF-Ts	Translationselongation	0,48
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	2,16
27469179	konserviertes hypothetisches Protein, Glutaminamidtransferase Untereinheit PdxT	tRNA-Aminoacylation	2,22

<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	2,74
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	2,95
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	3,64
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	6,09
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	6,10
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation	7,94
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	8,08
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	Translationselongation	14,82
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G	Translationselongation	19,53
<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	Ribosomale Proteine: Synthese und Modifikation	22,05
Proteinbestimmung			
<i>clpC</i>	ATP-abhängige Clp Protease, ATP-Bindeuntereinheit ClpC	Degradation von Proteinen, Peptiden und Glycopeptiden, Adaptation an atypische Bedingungen	5,54
<i>tig</i>	<i>trigger</i> Faktor	Proteinfaltung und Stabilisation, Protein- und Peptidsekretion und <i>trafficking</i>	10,45
<i>tig</i>	<i>trigger</i> Faktor	Proteinfaltung und Stabilisation, Protein- und Peptidsekretion und <i>trafficking</i>	27,59
Transport- und Bindeproteinen			
<i>ptsI</i>	Phosphoenolpyruvat-Protein-Phosphatase	Kohlenhydrate, organische Alkohole und Säuren	6,27
Biosynthese von Cofaktoren, prosthetischen Gruppen und Carriern			
27468515	Nicotinat-phosphoribosyltransferase-ähnliches Protein	Pyridine –Nukleotide	5,31
Energiemetabolismus			
<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacetyltransferase		0,23
27467132	Formatacetyltransferase	Fermentation	0,43

<i>budA</i>	alpha-Acetolactatdecarboxylase	Fermentation	2,35
27468138	Glycinderhydrogenase (Decarboxylierung) Untereinheit 1	Aminosäuren und Amine	2,56
<i>pyk</i>	Pyruvatkinase	Glycolyse/Glukoneogenese	2,79
27468139	Glycinderhydrogenase (Decarboxylierung) Untereinheit 2	Aminosäuren und Amine	3,15
<i>pyk</i>	Pyruvatkinase	Glycolyse/Glukoneogenese	3,48
<i>lacD</i>	Tagatose 1,6-diphosphataldolase	Biosynthese und Degradation von Polysacchariden	4,02
<i>ldh</i>	L-lactatdehydrogenase	Glycolyse/Glukoneogenese, anaerob	4,04
<i>fbaA</i>	Fructose-bisphosphataldolase, Klasse II	Glycolyse/Glukoneogenese	5,54
<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacetyltransferase		7,21
<i>ald</i>	Alaninderhydrogenase	Alanin-metabolische Prozesse	7,95
<i>pdhC</i>	Pyruvatedehydrogenase-Komplex E2 Komponente, Dihydrolipoamidacetyltransferase		36,53
<i>glpK</i>	Glycerolkinase		60,68
Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus			
<i>plsX</i>	fatty acid/phospholipid synthesis protein PlsX	Fettsäurebiosynthese	0,16
27469028	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthase	Biosynthese	2,06
<i>accC</i>	Acetyl-CoA-Carboxylase (Biotin-Carboxylase- Untereinheit) accC	Biosynthese	2,64
Regulatorische Funktionen			
<i>rsbU</i>	SigmaB Regulationsprotein RsbU	Proteininteraktion	2,53
<i>ccpA</i>	<i>catabolite control protein A</i>	DNA-Bindung, Transkriptionsaktivator	2,66
Pathogenese			
<i>srrA</i>	<i>staphylococcal respiratory response protein SrrA</i>	Regulatorische Funktionen: DNA-Interaktionen, Proteininteraktionen; Zweikomponentensystem	2,94

## Sonstiges

---

27468303	konserviertes hypothetisches Protein	Adaptation an atypische Bedingungen	2,29
27468297	conserved hypothetical protein		2,57
27468081	GTP binding protein		3,59
27469293	GTP-binding protein		4,55

---

IV KEGG-Diagramme

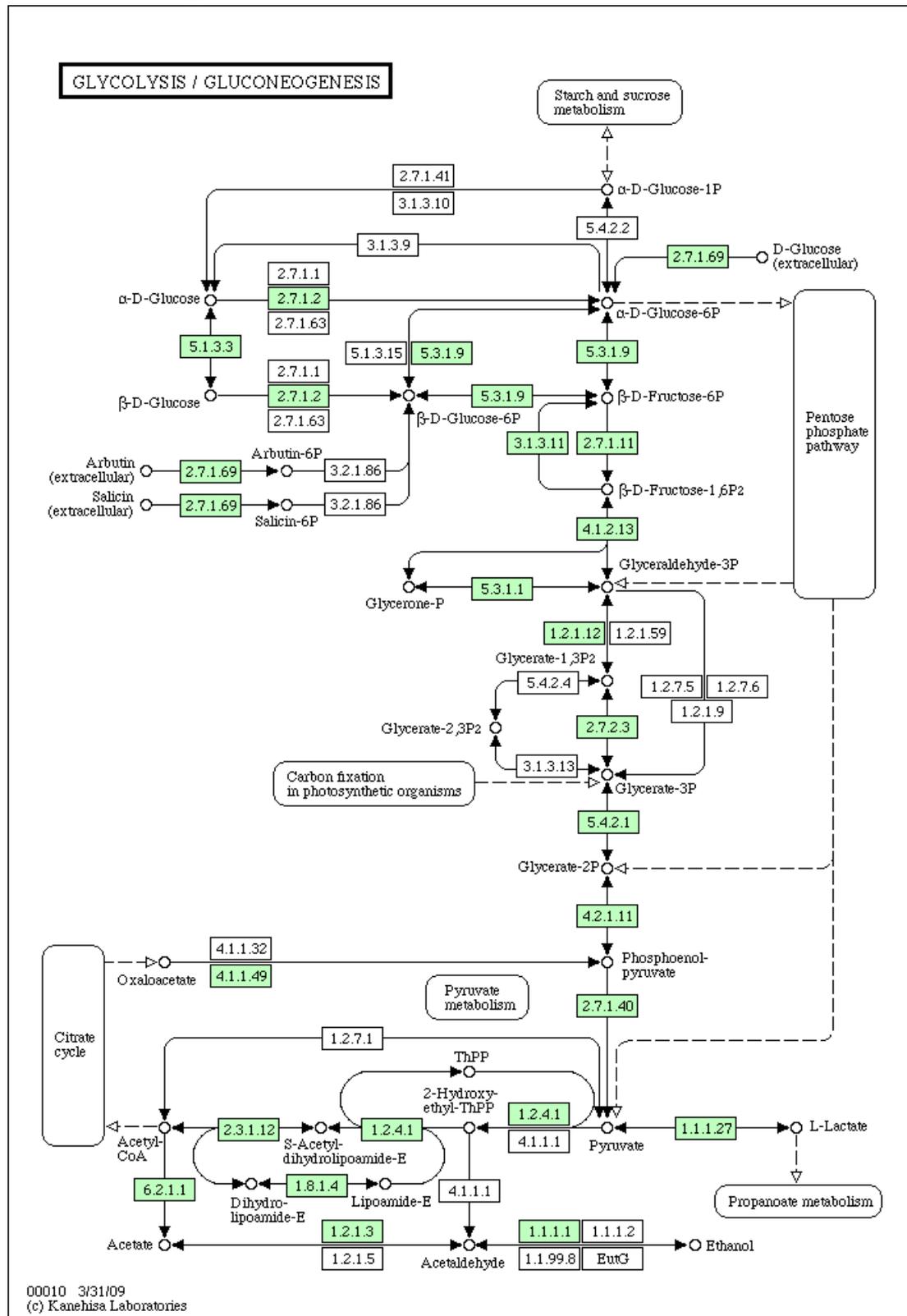


Abb. 8-3 Glykolyse / Glukoneogenese

Gezeigt sind die möglichen metabolischen Wege, die *S. epidermidis* in Glykolyse und Glukoneogenese zur Verfügung stehen. Die Enzyme sind mit ihren EC-Nummern gekennzeichnet (<http://www.genome.jp/KEGG>).

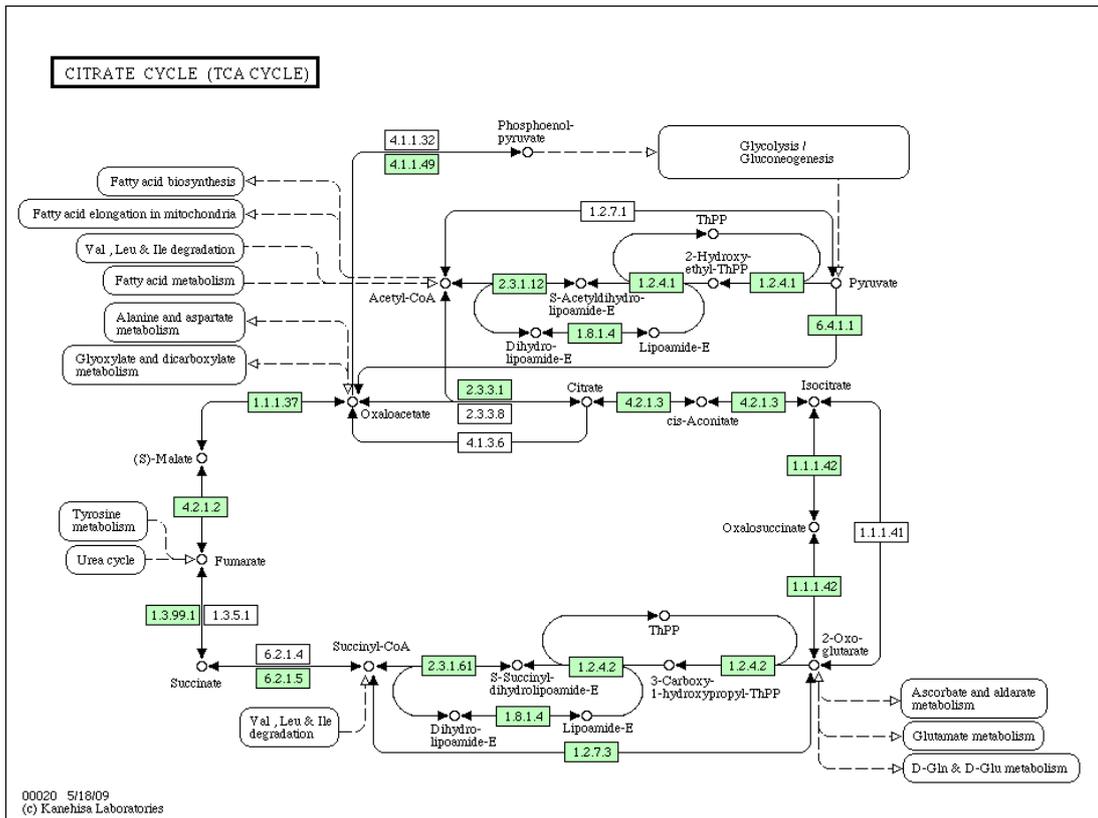


Abb. 8-4 TCA-Zyklus

Gezeigt sind die möglichen metabolischen Wege, die *S. epidermidis* im Citratzyklus zur Verfügung stehen. Die Enzyme sind mit ihren EC-Nummern gekennzeichnet (<http://www.genome.jp/KEGG>).

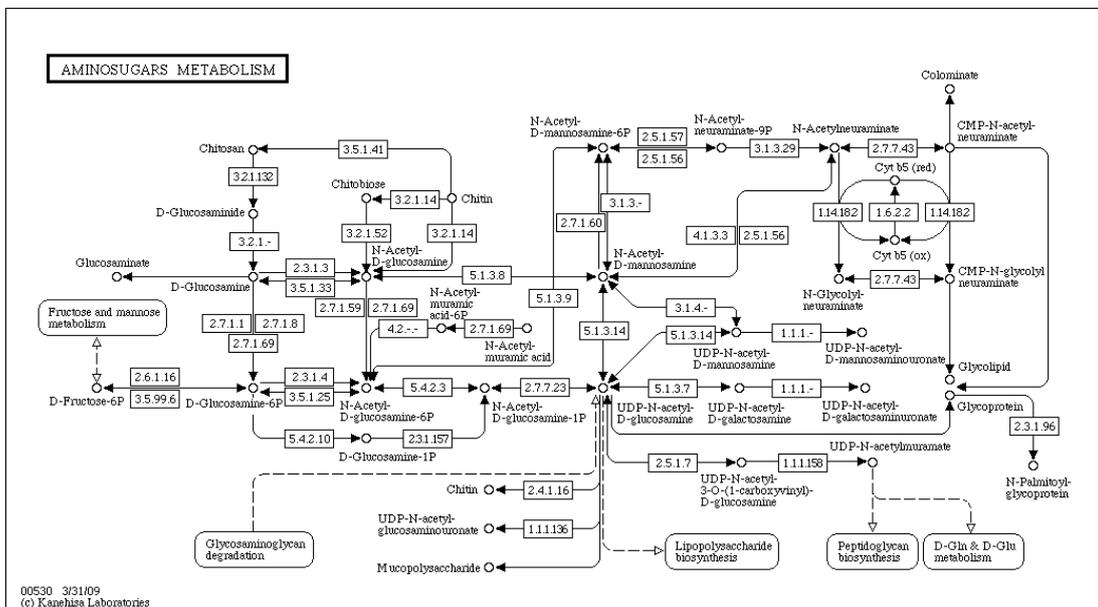


Abb. 8-4 Aminozucker-Metabolismus

Gezeigt sind die möglichen metabolischen Wege, die *S. epidermidis* beim Abbau von Aminozuckern zur Verfügung stehen. Zentrales Intermediat stellt dabei UDP-N-Acetylglucosamin dar, welches zur Synthese von PIA benötigt wird. Die Enzyme sind mit ihren EC-Nummern gekennzeichnet (<http://www.genome.jp/KEGG>).

### V Proteinalignment BarA und BarB

#### A

```
SERP0135_ S.epidermidis RP62A      MKIINSDKVPEALGPYSHATVINGFVFTSGQIPLTLDGTIVSDDVQEQTQVLENLTVVLKEAGSDLNSVV
NTL02SE2286_ S.epidermidis ATCC12228 MKIINSDKVPEALGPYSHATVINGFVFTSGQIPLTLDGTIVSDDVQEQTQVLENLTVVLKEAGSDLNSVV
NTL01SA0473_ S.aureus N315          MKIINTTRLPEALGPYSHATVVNGMVYTSQGIIPLNVDGKIVSADVQAQTKQVLENLKVVLLEEAGSDLNSVA
SACOL0540_ S.aureus COL              MKIINTTRLPEALGPYSHATVVNGMVYTSQGIIPLNIDGHIVSADVQAQTKQVLENLKVVLLEEAGSDLNSVA
*****: : :*****: **:*:***** . : ** ** * ** ***** . ***:***** .
```

```
SERP0135_ S.epidermidis RP62A      KATIYISDMNDFQQINQIYGNFYVEHQPARSCVEVSRLPKDVKVEIELIGVKVEL
NTL02SE2286_ S.epidermidis ATCC12228 KATIYISDMNDFQQINQIYGNFYVEHQPARSCVEVSRLPKDVKVEIELIGVKVEL
NTL01SA0473_ S.aureus N315          KATIFIKDMNDFQKINEVYGQYFNEHKPARSCVEVARLPKDVKVEIELVSKIKEL
SACOL0540_ S.aureus COL              KATIFIKDMNDFQKINEVYGQYFNEHKPARSCVEVARLPKDVKVEIELVSKIKEL
****:* . *****: **:*: ** * ** :*****:*****: . *:* **
```

#### B

```
SERP0136_ S.epidermidis RP62A      -----MKVTDVRLRKIQTDGRMKALVSITLDEAFVIHDLRVIEGNSGLFVAMP SKRTPDGEFRDIAHP
NTL02SE2287_ S.epidermidis ATCC12228 -----MKVTDVRLRKIQTDGRMKALVSITLDEAFVIHDLRVIEGNSGLFVAMP SKRTPDGEFRDIAHP
NTL01SA0474_ S.aureus N315          IYYRGAHYMKVTDVRLRKIQTDGRMKALVSITLDEAFVIHDLRVIEGNSGLFVAMP SKRTPDGEFRDIAHP
SACOL0541_ S.aureus COL              -----MKVTDVRLRKIQTDGRMKALVSITLDEAFVIHDLRVIEGNSGLFVAMP SKRTPDGEFRDIAHP
*****
```

```
SERP0136_ S.epidermidis RP62A      INSDMRQEIQDAVMKVYDETDEVIPDKNATSDNEESDEA
NTL02SE2287_ S.epidermidis ATCC12228 INSDMRQEIQDAVMKVYDETDEVIPDKNATSDNEESDEA
NTL01SA0474_ S.aureus N315          INSDMRQEIQDAVMKVYDETDEVVPDKNATS--EDSEEA
SACOL0541_ S.aureus COL              INSDMRQEIQDAVMKVYDETDEVVPDKNATS--EDSEEA
*****:***** *:* **
```

#### Abb. 8-6 Proteinalignment von BarA und BarB

Verglichen wurden die Proteinsequenzen von BarA (A) bzw. BarB (B) aus den *S. epidermidis* Stämmen RP62A und ATCC12228 mit den homologen Genen aus *S. aureus* N315 und COL. BarA weist mit dem homologen YabJ eine Ähnlichkeit von 90,5 % (Identität 78,6 %) auf. BarB ist höher konserviert zum homologen Protein SpoVG in *S. aureus* mit einer Ähnlichkeit von 98 % (Identität 95,1 %).

**Lebenslauf****Persönliche Angaben**

Beate Jonas

Geboren am 19. September 1981  
in Greifswald  
Ledig, keine Kinder

**Schulbildung:**

09/1988-07/2000                      Grundschule und Schlossgymnasium Gützkow  
Abschluss: Abitur (1,4)

**Studium**

10/2000-10/2005                      Studium der **Humanbiologie** an der Ernst-Moritz-  
Arndt-Universität Greifswald

11/2003-01/2004                      Praktikum an der New South Wales University,  
Sydney im Labor von Prof. Staffan Kjelleberg

Studienschwerpunkte: **Mikrobiologie und  
Molekularbiologie**, Immunologie, Medizinische  
Biochemie

10/2004-09/2005                      Diplomarbeit „Untersuchungen zur Regulation von  
SigmaB in *Staphylococcus aureus*“ am Institut für  
Mikrobiologie der Ernst Moritz Arndt Universität  
Greifswald bei Prof. Dr. Michael Hecker in der  
Arbeitsgruppe von Dr. Susanne Engelmann

10/2005                                      Abschluss mit dem akademischen Grad der Diplom-  
Humanbiologin (2,0)

**Beruflicher Werdegang:**

Seit 11/2006                              Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe  
von Prof. Dr. Johannes Knobloch

10/2005-11/2006                      im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie  
und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg  
Eppendorf

Seit 11/2006                              im Institut für Medizinische Mikrobiologie und  
Hygiene am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein,  
Campus Lübeck

**weiteres Engagement:**

als Student Mitglied im Humanbiologieverein, e. V. Greifswald, aktive  
Mitarbeit in der Arbeitsgruppe Puls (Public understanding of life sciences)

Stellv. Vorsitzende des Vereins zur Förderung des Wissens in der  
Infektiologie e.V. Lübeck

## Veröffentlichungen

### Publikationen

1. Jäger, S., **Jonas, B.**, Pfanzelt, D., Horskotte, M.A., Rohde, H., Mack, D. and Knobloch, J.K.M. 2009. Regulation of biofilm formation by  $\sigma^B$  is a common mechanism in *Staphylococcus epidermidis* and is not mediated by transcriptional regulation of *sarA*. *Int. J. Artif. Organs*, accepted
2. **Jonas, B.**, Zienkiewicz, A., Bartscht, K., Jäger, S., Rohde, H., Mack, D., Knobloch, J.K.M. 2009. *barAB* a new  $\sigma^B$  dependent regulatory gene locus of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. submitted

### Abstracts

1. **Jonas, B.**, Bartscht, K., Rohde, H., Mack, D., Knobloch, J.K.M. 2006. Regulation of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* by the  $\sigma^B$  dependent regulatory *barAB* gene locus. Minisymposium „Mikrobielle Pathogenität“
2. **Jonas, B.**, Bartscht, K., Rohde, H., Mack, D., Knobloch, J.K.M. 2006. Regulation of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* by the  $\sigma^B$  dependent regulatory *barAB* gene locus. Gordon Conference „Microbial stress responses“
3. **Jonas, B.**, Bartscht, K., Rohde, H., Mack, D., Knobloch, J.K.M. 2006. Regulation of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* by the  $\sigma^B$  dependent regulatory *barAB* gene locus. International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections
4. **Jonas, B.**, Bartscht, K., Mack, D., Knobloch, J.K.M. 2008. The regulation of biofilm formation by BarA and BarB in *Staphylococcus epidermidis*. International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections
5. **Jonas, B.**, Bartscht, K., Mack, D., Knobloch, J.K.M. 2008. BarB, a protein under control of  $\sigma^B$ , is essential for biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 298 Suppl. 2:85

### Auszeichnungen

1. Travel fellowship des International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, 2008
2. DGHM Reisestipendium der 60. Jahrestagung, 2008