

**Untersuchungen zur Biofilmbildung  
und zum Quorum-sensing in  
*Staphylococcus epidermidis***

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Christoph Friedemann Batzilla  
aus Braunschweig**

**Würzburg, Dezember 2006**

Eingereicht am: .....

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzender: .....

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Roy Gross
3. Gutachter: Frau PD. Dr. Wilma Ziebuhr

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt.

Diese Dissertation wurde bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt und ich habe bisher auch nicht versucht einen akademischen Grad zu erwerben oder bereits erworben.

Würzburg, Dezember 2006

Christoph Batzilla

## **Danksagung:**

Ich danke allen, die diese Arbeit durch Diskussionen und durch technische und freundschaftliche Unterstützung überhaupt erst möglich gemacht haben.

### **Besonderer Dank gilt...**

Frau PD. Dr. Wilma Ziebuhr für die Betreuung und Korrektur meiner Dissertation;

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker für die Möglichkeit an seinem Institut arbeiten zu dürfen und für die Übernahme des Erstgutachten;

Herrn Prof. Dr. Roy Gross für die Übernahme des Zweitgutachtens;

unseren Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Michael Hecker und Frau Dr. Susanne Engelmann an der Universität Greifswald;

unseren Kooperationspartnern an der Umeå University, Schweden, Prof. Bernt-Eric Uhlin und Prof. Mikael Elofsson;

Herrn Dr. Knut Ohlsen für wissenschaftliche Diskussionen und Unterstützung;

dem SFB630 für finanzielle Unterstützung meiner Arbeit;

meiner langjährigen Laborkollegin Steffi für die gute Zusammenarbeit, gegenseitige Unterstützung und Freundschaft;

sowie allen „Mit-Staphylokokken“ Doris, Karin, Antje, Suse, Martin, Hennes, Katja, wie auch Svetlana und Elena;

allen anderen Mitarbeitern des Institutes und Kooperationspartnern;

meinen Freunden Pär, Sebastian, Prisca, Frank, Erik, Olga, Johannes, Markus, Indranil, den Jungs von Take This, sowie Tom, Andi und ihren beiden Sandras;

meinen Eltern für ihre große Unterstützung in so vielen Situationen;

meiner Frau Julia, für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, die intensive Korrektur dieser Arbeit und für so vieles mehr.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Abstract.....	3
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	5
1.2 Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> .....	6
1.3 Regulation der Virulenz mittels Quorum-sensing und Regulationsnetzwerken .....	11
1.4 Der pleiotrope Repressor CodY.....	15
1.6 Ziel- und Aufgabenstellung der Dissertation .....	18
<b>2 Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1 Grundlagen des mikrobiologischen Arbeitens .....	19
2.1.1 Kultivierung .....	19
2.1.2 Verwendete Bakterienstämme .....	19
2.1.3 Verwendete Nährmedien .....	20
2.1.4 Kultivierungsbedingungen .....	20
2.1.4.1 Kultivierung im Schüttelkolben.....	20
2.1.4.2 Kultivierung des Biofilms .....	20
2.2.1 Zellkulturen und Infektionsversuche .....	21
2.2.1.1 Zellkultur.....	21
2.2.1.2 Invasionsassay .....	21
2.3.1 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung .....	23
2.3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	23
2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung mittels Roti® Nanoquant .....	23
2.4 RNA Analytik.....	24
2.4.1 Präparation von RNA aus <i>S. epidermidis</i> .....	24
2.4.2 Kontrolle der RNA-Integrität.....	25
2.4.3 Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA unter denaturierender Bedingungen .....	25
2.4.4 Quantitative „Real-Time“ Polymerase-Kettenreaktion.....	26
2.4.5 Globale Transkriptionsanalyse mittels Mikroarray Technik.....	27
2.5 DNA Analytik.....	31
2.5.1 Präparation von chromosomaler DNA aus <i>S. epidermidis</i> .....	31
2.5.2 PCR: Polymerase-Kettenreaktion .....	31
2.5.3 DNA-Restriktion .....	32
2.5.4 Gelelektrophorese zur DNA-Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen .....	33
2.6 Proteinanalytik.....	34
2.6.1 Präparation von Proteinen aus <i>S. epidermidis</i> .....	34
2.6.1.1 Präparation extrazellulärer Proteine .....	34

2.6.1.2	Präparation von zytoplasmatischen Proteinen.....	34
2.6.2	Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	35
2.6.2.1	Färbung der Proteingele mittels „Silver“ Coomassie .....	35
2.6.2.2	DIGE Fluoreszenzfärbung.....	36
2.6.2.3	Bilderfassung von 2-D Gele .....	36
2.6.2.4	Analyse von 2-D Gelen mittels Delta-2D Software .....	37
2.6.3	Identifizierung von Proteinen aus dem 2-D Gel mittels Massenspektroskopie .....	37
2.7	Konfokale Lasermikroskopie.....	38
3	Materialien.....	39
3.1	Chemikalien.....	39
3.2	Enzyme .....	40
3.3	Reaktionskits .....	40
3.4	Geräte und Hilfsmittel.....	40
3.5	Kulturmedien und Agarplatten.....	42
3.6	Allgemeine Puffer und Lösungen.....	43
3.7	Software .....	43
3.8	Oligonukleotide (Primer).....	44
3.9	DNA-Größenmarker.....	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Untersuchungen zum Quorum-sensing System : „accessory gene regulatory system“ (Agr) in <i>S. epidermidis</i> .....	45
4.1.1	Der Einfluss des Agr Quorum-sensing Systems auf das Wachstum von <i>S. epidermidis</i> .....	45
4.1.2	Der Einfluss des Agr Quorum-sensing Systems auf das Langzeitüberleben und Wachstum von <i>S. epidermidis</i> .....	46
4.1.3	Kompetitives Wachstum von <i>S. epidermidis agr</i> -Wildtyp und Mutante .....	47
4.1.4	Beeinflussung der Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> durch das Agr- System.....	49
4.1.5	Einfluss des Agr-Systems auf die Invasivität von..... <i>S. epidermidis</i> .....	50
4.1.6	Zusammenfassung 4.1.1 bis 4.1.5.....	52
4.1.7	Untersuchungen zum Effekt des Agr Quorum-sensing Systems auf das extrazelluläre Proteom von <i>S. epidermidis</i> * .....	53
4.1.8	Zytoplasmatische Proteom Analyse von <i>S. epidermidis</i> 567 und seiner isogenen <i>agr</i> -Mutante <i>S. epidermidis</i> 567-1.....	56
4.1.9	Mikroarray-basierte vergleichende Transkriptom-Analyse von <i>S. epidermidis</i> 567 und seiner isogenen <i>agr</i> -Mutante <i>S. epidermidis</i> 567-1 .....	59
4.1.10	Einfluss des <i>S. epidermidis</i> Agr Quorum-sensing Systems auf Wachstum in dextrosefreiem Medium .....	62
4.1.11	Messung der L- und D-Lactat Bildung in <i>S. epidermidis</i> 567 und der <i>agr</i> -Mutante <i>S. epidermidis</i> 567-1 .....	63
4.1.12	Untersuchung zum Einfluss des Agr-Systems auf die $\beta$ - Lactamresistenz von <i>S. epidermidis</i> .....	64

4.1.13 Einfluß von Leucin und Isoleucin auf die <i>codY</i> Expression in der <i>agr</i> -Mutante <i>S. epidermidis</i> 567-1.....	65
4.1.14 Der Austausch der Kulturüberstände von <i>S. epidermidis</i> 567 und <i>S. epidermidis</i> 567-1 hat einen unmittelbaren Einfluss auf die <i>codY</i> Genexpression.....	66
4.1.15 Zusammenfassung 4.1.7 bis 4.1.14.....	67
4.2 Untersuchungen zur Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> .....	68
4.2.1 Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> : ein dynamischer, zeit- und umgebungsabhängiger Prozess.....	68
4.2.2 Mikroskopische Aufzeichnung des zeitlichen Verlaufs der Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> 678.....	74
4.2.3 Der Biofilm von Staphylokokken: Wachstum und Sterben.....	75
4.2.4 Der Einfluss von NaCl auf die Sekundärstrukturbildung im Biofilm von <i>S. epidermidis</i> .....	77
4.2.5 Zusammenfassung 4.2.1 bis 4.2.4.....	80
4.3 Untersuchungen zur Regulation der Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> mittels Proteom- und Transkriptom-Analysen.....	81
4.3.1 Das extrazelluläre Proteom von <i>S. epidermidis</i> 678 in einer Biofilmkultur.....	82
4.3.2 Regulation der Genexpression von <i>S. epidermidis</i> 678 in einer Biofilmkultur und dessen Überstand.....	84
4.3.3 Zusammenfassung 4.3.1 bis 4.3.2.....	88
4.4 Screening nach Biofilm-inhibitorischen Substanzen in <i>S. epidermidis</i> .....	89
4.4.1 Zusammenfassung 4.4.....	92
5 Diskussion.....	93
5.1 Einfluss des Quorum-sensing Systems Agr auf Wachstum und Überleben von <i>S. epidermidis</i> .....	93
5.2 Das Agr-System ist ein negativer Regulator der Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> .....	94
5.3 Das Agr-System von <i>S. epidermidis</i> ist wichtig für die Invasion in 293T Nierenepithelzellen.....	95
5.4 Der Einfluss des Agr-Systems auf das extrazelluläre Proteom von <i>S. epidermidis</i> .....	96
5.5 Das Agr-System beeinflusst wesentlich die Genexpression und Proteinregulation in <i>S. epidermidis</i> .....	98
5.5.1 Das Agr-System beeinflusst das SaeRS-System und weitere Pathogenitätsgene in <i>S. epidermidis</i> .....	98
5.5.2 Der pleiotrope Repressor CodY und das Agr-System: Teile eines Netzwerks zur Regulation von Pathogenität und Überleben von <i>S. epidermidis</i> .....	100
5.5.3 Der Einfluss des Agr-Systems auf den Zentralmetabolismus.....	103
5.5.3 Bedeutung der <i>agr</i> -Mutation für <i>S. epidermidis</i> .....	107

<b>5.6 Untersuchungen zur Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i></b> .....	108
<b>5.6.1 Vergleich der <i>S. epidermidis</i> 678 Biofilmbildung unter verschiedenen Bedingungen mittels der BA-Ratio</b> .....	109
<b>5.6.2 Zeitlicher Verlauf der Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i>: Wachstum und Sterben im Biofilm</b> .....	111
<b>5.6.3 NaCl führt zu einer verstärkten Sekundärstrukturbildung im Biofilm von <i>S. epidermidis</i> 678</b> .....	112
<b>5.6.4 So nah und doch so fern: Biofilm und Überstand von <i>S. epidermidis</i></b> .....	112
<b>5.7 Die Suche nach neuen Substanzen mit Wirksamkeit gegen die Biofilmbildung von Staphylokokken</b> .....	116
<b>6 Referenzen</b> .....	118
<b>7 Anhang</b> .....	124
<b>8 Lebenslauf – Curriculum Vitae</b> .....	162
<b>9 Publikationsliste</b> .....	163
<b>10 Veröffentlichungen</b> .....	165



## Zusammenfassung

Das Gram-positive, Koagulase-negative Bakterium *Staphylococcus epidermidis* war viele Jahrzehnte als harmloser Kommensale der menschlichen Haut und der Schleimhäute bekannt. Jedoch hat sich *S. epidermidis* in den letzten zwanzig Jahren zu einem Haupterreger von Nosokomialinfektionen entwickelt. Dabei unterscheidet sich *S. epidermidis* im Vergleich zu anderen Erregern durch ein sehr begrenztes Spektrum an Pathogenitätsfaktoren, aber auch durch seine Fähigkeit, Biofilme auf künstlichen Oberflächen wie Kathetern und Implantaten formen zu können.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Hauptaspekten, die in der Pathogenität von *S. epidermidis* eine wichtige Rolle spielen: (i) dem Quorum-sensing System Agr (accessory gene regulator) und (ii) dem zeitlichen Prozess des Aufbaus, sowie der Regulation der Biofilmbildung von *S. epidermidis*.

Das Quorum-sensing System Agr ist Teil eines komplexen regulatorischen Netzwerks. In der vorliegenden Arbeit wird durch Proteom- und Transkriptomanalysen gezeigt, dass das Agr-System in *S. epidermidis* den Hauptregulator für die Sekretion von extrazellulären Proteinen darstellt und darüber hinaus einen großen Einfluss auf die Regulation des Zentralmetabolismus und der Biosynthese von Aminosäuren hat. Mittels Mikroarray-Analyse konnte eine wichtige Verknüpfung des Agr-Systems mit dem pleiotrophen Repressor CodY identifiziert werden, der viele stationäre-Phase Gene im *S. epidermidis* Wildtyp reprimiert, jedoch nicht in der getesteten *agr* Mutante. Dieses führt zu einem stark veränderten Phänotyp der *S. epidermidis agr* Mutante, in Hinblick auf Wachstumskapazität, der Biofilmbildung, der Invasivität und dem Langzeitüberleben. Interessanterweise ergaben wissenschaftliche Studien, dass ca. 17 % der klinischen Isolate natürlich vorkommende *agr* Mutanten sind. Dieses könnte ein Hinweis darauf sein, dass *S. epidermidis agr* Mutanten aufgrund ihres stark veränderten Phänotyps und ihrer veränderten biochemischen Bedürfnisse und Kapazität in der Lage sind, andere ökologische Nischen im menschlichen Wirt zu besiedeln.

Der zweite Teil dieser Arbeit hat die Biofilmbildung von *S. epidermidis* zum Thema. Durch die Etablierung eines standardisierten Modells der Biofilmbildung, war es möglich, über die Einführung einer Biofilm-Adhäsion-Ratio die Biofilmbildung als zeitlichen dynamischen Prozess darzustellen und verschiedenste Bedingungen und Stämme miteinander zu vergleichen. Dabei zeigte sich, dass die Biofilmbildung in *S. epidermidis* ein klar zeitlich strukturierter Prozess ist, der von Umweltfaktoren und der Nährstoffsituation abhängig ist, und dass verschiedene Stämme sehr unterschiedlich auf Veränderungen in ihrer Umwelt reagieren. Die zeitliche Analyse der Biofilmbildung mittels konfokaler Lasermikroskopie ergab, dass viele der

Bakterien im Biofilm sterben. Dieses macht den Biofilm wesentlich anfälliger für Strömungsscherkräfte, die dann ganze Bakterienverbände ablösen und zu neuen Infektionsherden schwimmen könnten. Somit ermöglicht der Tod einer einzelnen Zelle unter Umständen ein besseres klonales Überleben. Die Mikroarray-Analysen der Genexpression im Biofilm zeigten, dass dieser einen physiologisch klar definierten Prozess durchläuft, der zu einer sehr stark verminderten metabolischen Aktivität und einer erhöhten Antibiotika-Resistenz führt. Darüber hinaus zeigen Bakterien im Biofilm einen weniger aggressiven Charakter, wie die Expression von Proteasen oder anderer Pathogenitätsfaktoren, welches *S. epidermidis* dabei hilft, dem Immunsystem des Wirts zu entgehen.

Diese neuen Ergebnisse zur Regulation der Genexpression im Biofilm und zur Rolle des Quorum-sensing Systems Agr in *S. epidermidis* tragen wesentlich zum Verständnis der Pathogenität und der Physiologie dieses wichtigen nosokomialen Erregers bei. Sie bilden eine wichtige theoretische Grundlage für weiterführende Studien, mit dem Ziel in Zukunft neue Therapie- und Präventionsansätze gegen *S. epidermidis*-Infektionen zu entwickeln.

## Abstract

The gram-positive, coagulase-negative bacterium *Staphylococcus epidermidis* was regarded as a harmless commensal of the human skin and mucosa. However, in the last two decades *S. epidermidis* has emerged as one of the major causes of nosocomial infections. In contrast to other infectious bacteria, *S. epidermidis* possesses only a limited number of pathogenicity factors, but forms a thick biofilm on artificial devices such as catheters and implants.

This thesis deals with two main aspects of the pathogenicity of *S. epidermidis*: (i) the Quorum-sensing system Agr (accessory gene regulator) and (ii) the aspects of time dependency of biofilm formation and its regulatory mechanism.

The Quorum-sensing system Agr is part of a complex network in Staphylococci. This work demonstrates that the Agr-System is the main regulator for the extracellular proteome. Moreover, it affects directly and indirectly the central metabolism and the biosynthesis of amino acids in *S. epidermidis*. By employing microarray and proteome analyses the pleiotropic repressor CodY was identified as an important player which interacts with the Agr-system and influences staphylococcal metabolism. CodY is responsible for the repression of late stationary phase genes. Proteome and transcriptome analyses along the growth curve revealed that this effect occurs only in the *S. epidermidis agr* wild type, while the *S. epidermidis agr* mutant expresses late stationary phase genes right from the beginning of the exponential growth stage. This leads to a strongly altered phenotype of the *S. epidermidis agr* mutant concerning growth capacities, biofilm formation, invasion into host cells and long term survival. Interestingly, another study has shown recently that about 17 % of all clinical isolates are naturally occurring *S. epidermidis agr* mutants. This supports the hypothesis that *S. epidermidis agr* mutants are capable of colonizing alternative ecological niches by their strong altered biochemical and physiological properties.

The main focus in the second part of this thesis aims at biofilm formation of *S. epidermidis*. In order to compare different conditions and strains for their biofilm capacity, a standardized protocol was established and a simple mathematical model was introduced. These investigations underlined that biofilm formation in *S. epidermidis* is a chronologically synchronized, but dynamic process which depends on environmental conditions and nutrition supply. In addition, different strains display variations in responding to altered environmental conditions. Interestingly, *S. epidermidis* is not able to detach from a biofilm in form of single cells. As shown by confocal laser microscopy over a time course of 48 hours, bacteria rather die off in the inner zones of the biofilm. By this means, the structure gets instable and more susceptible to shearing forces resulting in detachment and drifting of bacterial

---

clusters which are then transported to novel colonization sites. Therefore, death of a single cell might be an advantage for the clonal survival. This is in accordance with the data of gene expression analyses by microarrays. Moreover, these analyses show that biofilm formation in *S. epidermidis* is a strongly regulated process under very special physiological conditions. Obviously, biofilm formation leads to a diminished metabolic activity, a higher antibiotic resistant and to a diminished secretion of extracellular proteins and other immunogenic substances which supports the evasion of *S. epidermidis* from the host immune response.

The results on regulation of biofilm formation and the function of the Agr system give interesting new insights into the pathogenicity and physiology of this important pathogen and its survival in the human host. The data provide an excellent theoretical basis for future experimental work aiming at the development of new therapeutic strategies against *S. epidermidis* infections.

# 1 Einleitung

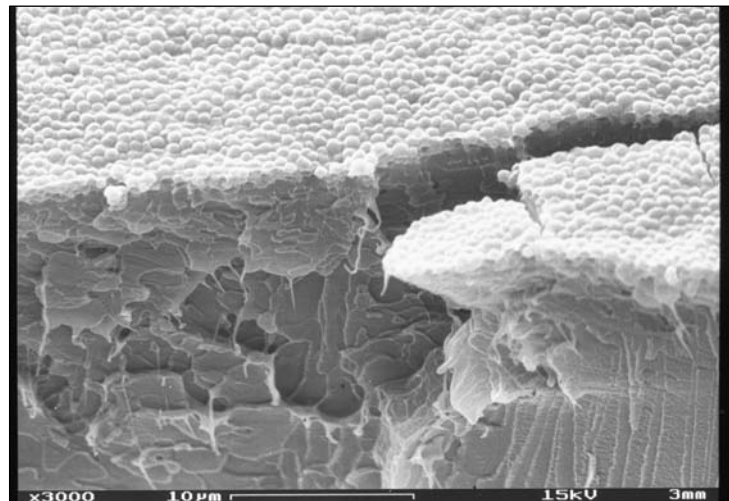
## 1.1 *Staphylococcus epidermidis*

Der Name *Staphylococcus* kommt aus dem lateinischen/griechischen und bedeutet wörtlich etwa „die Traubenkugeln“ und wurde aufgrund der runden Kokkenform dieser Bakterien gewählt (1884 von Rosenbach entdeckt). Staphylokokken sind nicht beweglich, bilden keine Sporen, besitzen einen niedrigen GC-Gehalt und sind in der Gram Färbung positiv. Im Allgemeinen werden Staphylokokken nach ihrer Fähigkeit eine Verklumpung (Agglutination) bei Mischung mit physiologischer Kochsalz-Lösung und Citratplasma hervorzurufen unterschieden. Stämme die dieses können werden als Koagulase-positiv (z.B. *Staphylococcus aureus*) und umgekehrt Spezies die dieses nicht können als Koagulase-Negativ (z.B. *Staphylococcus epidermidis*) bezeichnet.

Staphylokokken gelten als Haupterreger von Nosokomialinfektionen. Dieses beruht vor allem Fähigkeit sich Antibiotikaresistenzen (MRSA / VRSA Stämme) und anderes genetisches Material anzueignen und macht die Behandlung von Staphylokokkeninfektionen immer schwieriger und in manchen Fällen unmöglich. So weisen heute bereits 21 % der klinischen *S. aureus* Isolate eine Methicillin Resistenz auf (Kresken and Hafner, 2001).

Die Koagulase-negativen Stämme wurden über viele Jahre hinweg als ungefährlich angesehen, da sie zur gesunden Hautflora des Menschen zählen (Huebner and Goldmann, 1999). Heute spielen KNS jedoch eine bedeutende Rolle bei Nosokomialinfektionen (Jarvis and Martone, 1992; Kloos and Bannerman, 1994). *S. epidermidis* besitzt weniger extrazelluläre Pathogenitätsfaktoren und Toxine als zum Beispiel *S. aureus*. Aber vor allem die Fähigkeit von *S. epidermidis* einen vielschichtigen Biofilm auf künstlichen Oberflächen zu bilden, beispielsweise auf Hüftgelenken oder Kathetern, stellt ein massives Problem dar, da diese oft zum Ausgangsherd von schwerwiegenden systemischen Infektionen werden (Gotz, 2002; Rupp and Archer, 1994). Wegen des generellen Mangels an gewebeschädigenden Toxinen ist der Verlauf von *S. epidermidis* Infektionen daher auch eher subakuter oder chronischer Natur (Vuong and Otto, 2002). Insgesamt werden eine Vielzahl von Infektionen von *S. epidermidis* ausgelöst, dazu zählen neben Katheter- und Implantat-assoziierten Infektionen, Infektionen des zentralen Nervensystems, Endokarditis, Infektionen der Harnwege, Wundinfektionen sowie auch Infektionen am Auge durch Operationen oder Kontaktlinsen (Huebner and Goldmann, 1999).

Abbildung 1:  
Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Biofilms von *S. epidermidis* auf einer Polyesterenoberfläche. Bild mit freundlicher Genehmigung von Martin Eckart.



## 1.2 Biofilmbildung in *S. epidermidis*

Unter Biofilmbildung versteht man die Fähigkeit von Bakterien an eine Oberfläche zu binden und dort zu einer vielschichtigen Struktur zu akkumulieren. In vielen natürlichen Habitaten, die Grenzflächen zwischen einer festen und einer flüssigen Phase aufweisen, stellt der Biofilm die dominierende mikrobielle Lebensform dar. Diese Form der Bindung an eine Oberfläche ermöglicht es dem Bakterium oder der mikrobiellen heterogenen Gemeinschaft die vorliegenden Bedingungen effizient zu nutzen. Man kann daher die planktonische Phase auch als Mechanismus ansehen den Ort zu wechseln, wenn sich die Lebensbedingungen verschlechtern (Dunne, 2002; Watnick and Kolter, 2000). *S. epidermidis* wurde viele Jahre lang als harmloser Kommensale der menschlichen Haut betrachtet. Die Fähigkeit von *S. epidermidis* auf polymeren Oberflächen starke Biofilme zu bilden (Abbildung 1) hat diese Spezies jedoch heute zu einem wichtigen opportunistischen Pathogen werden lassen. Beschrieben wurde die Biofilmbildung bei Staphylokokken erstmals Anfang der 80iger Jahre, wobei auffiel, dass, im Unterschied zu Multispezies-Biofilmen in der Umwelt, diese klinischen Biofilme hauptsächlich von Bakterien einer Art und eines einzigen Stammes gebildet wurden (Christensen *et al.*, 1982; Peters *et al.*, 1981). Dieses Phänomen konnte dann Ende der 90iger Jahre mit der Aufklärung der genetischen und molekularen Grundlagen der Biofilmbildung erklärt werden (von Eiff *et al.*, 1999). Biofilme können sich auf fast allen bekannten Kathetern und den meisten anderen medizinischen Geräten und Implantaten bilden (Gotz, 2002).

Mikroskopische Studien der Biofilmbildung legen eine Bildung des Biofilms in 2 Schritten nahe: (i) Die Bindung der bakteriellen Zelle oder des Zellclusters an die polymere Oberfläche und (ii) das Wachstum und die Akkumulation zu einem vielschichtigen Zellcluster der von einer „schleimigen“ Matrix umgeben wird (Abbildung 2).

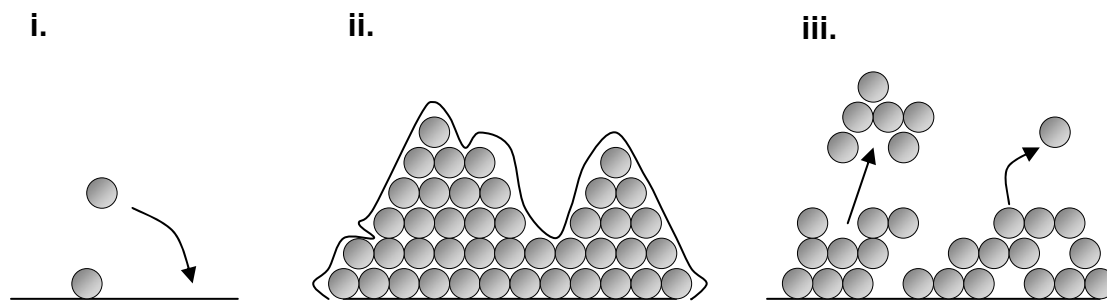


Abbildung 2: Die 2 (3) Phasen der Biofilmbildung. (i) Primäre Adhäsion (ii) Akkumulation des Zellklusters mit Biofilmmatrix (PIA / EC TC) (iii) Biofilmauflösung: mittels Degradation der Matrix lösen sich einzelne Zellen und Zellcluster und breiten sich so auch im Wirt aus.

In der ersten Phase spielen zum einem ionische Wechselwirkungen sowie die Adhäsion durch Oberflächenproteine des Bakteriums eine wichtige Rolle. Aber auch andere Umweltfaktoren oder Wirtsfaktoren, bzw. Wirtsproteine sind bei der Anlagerung von großer Wichtigkeit. Besonders wichtig auf Seiten der Proteine des Bakteriums sind in der primären Phase der Adhäsion das *autolysin E* AtlE, sowie das Protein SSP1 und sein Degradationsprodukt SSP2, zu denen allerdings das korrespondierende Gen noch nicht identifiziert werden konnte (Gotz, 2002; Heilmann *et al.*, 1997). SPP1 und SSP2 scheinen bei der Adhäsion eine Art von Fimbrien ähnliches Polymer zu bilden (Veenstra *et al.*, 1996). Eine AtlE-Mutante bildet in planktonischer Kultur sehr wohl große Aggregate, ist allerdings nicht mehr in der Lage an Oberfläche zu binden, was auf die veränderte Hydrophobizität zurückgeführt wird. Zusätzlich konnte eine starke Bindung von AtlE an Vitronectin nachgewiesen werden. Des Weiteren gibt es Hinweise auf die Bindungsfähigkeit von AtlE an Wirtszelloberflächen (Heilmann *et al.*, 1997; Takano *et al.*, 2000).

In der zweiten Phase der Biofilmbildung sind zum einen eine Reihe von Proteinen wichtig, zum anderen aber vor allem auch eine Struktur die primär als „schleimige“ Matrix beschrieben wurde.

Zu den wichtigsten bisher beschriebenen Proteinen in dieser Akkumulationsphase gehören das *accumulation associated protein* Aap und das bovine *biofilm associated protein* Bap. Aap ist ein 140 kD großes Exoprotein, welches aber nicht in allen Biofilm-positiven Stämmen vorkommt. Jedoch bilden Stämme, die Aap sekretieren deutlich mehr Biofilm (Hussain *et al.*, 1997). Das Protein Bap stellt ein neuartiges Zellwand-assoziiertes Protein dar und wurde in 5 % aller bovinen Mastitis-*S. aureus*-isolaten gefunden, jedoch nicht in humanen *S. aureus* Stämmen. Bap besteht aus 13 hochrepetitiven Sequenzen und alle *S. aureus* Stämme die Bap exprimieren sind hochgradig adhären und starke Biofilmbildner (Cucarella *et al.*, 2001). Ein

entsprechendes homologes Protein, *Bap homologue protein* Bhp und weitere sehr nah verwandte Proteine (SesD, etc.) konnten auch in *S. epidermidis*-Isolaten nachgewiesen werden (Bowden *et al.*, 2005).

Die extrazelluläre Matrix, die *S. epidermidis* umgibt, wurde bereits früh beschrieben, konnte aber erst 1996 in der Arbeitsgruppe von D. Mack eindeutig als eine Polysaccharid-Fraktion identifiziert werden (Mack *et al.*, 1996a). Dabei ließen sich zwei Polysaccharide unterscheiden. Polysaccharid I (>80%) ist ein lineares Homoglykan, welches aus mindestens 130 Untereinheiten  $\beta$ -1,6-verknüpften N-Acetylglucosamin besteht. Polysaccharid II (<20%) ist strukturell sehr nah verwandt, besteht jedoch zu einem geringen Teil aus nicht N-acylierten D-Glucosaminyl-Untereinheiten und enthält Phosphat- und Ester-verknüpfte Succinate, welche die Struktur anionisch machen. Diese Struktur ist heute einzigartig und ist hauptverantwortlich für die interzelluläre Aggregation von Staphylokokken. Aufgrund ihrer Eigenschaften wurde sie als *polysaccharide intercellular adhesin* PIA bezeichnet (Mack *et al.*, 1996a; Mack *et al.*, 1996b). Neben dieser Hauptfunktion von PIA zeigte sich, dass PIA auch eine Rolle bei der Hämagglutination von Erythrozyten spielt, was aber bis dato noch nicht genauer aufgeklärt werden konnte (Fey *et al.*, 1999; Mack *et al.*, 1999).

Neben PIA als Hauptkomponente der Biofilmmatrix konnte ein weiteres Kohlenhydratpolymer gefunden werden: extrazelluläre Teichonsäuren (*extracellular teichoic acids* EC TA). Die EC TA scheinen auch ein essentieller Bestandteil dieser Matrix zu sein, und es konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von PIA und EC TA von den Wachstumsbedingungen und der Wachstumsphase abhängig ist (Sadovskaya *et al.*, 2005). Darüber hinaus zeigte sich, dass in einigen klinischen Biofilm positiven Staphylokokken Isolaten verschiedener Spezies, die jedoch PIA-negativ waren die Biofilmmatrix vollständig aus EC TA bestand (Kogan *et al.*, 2006).

Eine weitere Form des PIA unabhängigen Biofilms konnte von Rhode *et al.* beschrieben werden. Bei dieser Form des „proteinogenen“ Biofilms wird das 220 kD große *accumulation associated protein* Aap in eine 140 kD große Form abgebaut, die dann zu starker Akkumulation der Bakterien führt. Interessanter Weise erfolgt dieser Abbau nicht nur durch bakterielle, sondern auch durch Wirtsproteasen in Dosis-abhängiger Art und Weise (Rohde *et al.*, 2005).

Für die Biosynthese von PIA ist das *intercellular adhesin ica* Operon verantwortlich (Abbildung 3). Dieses besteht aus zwei Transkriptionseinheiten, einer mit den Genen für die PIA Biosynthese (*icaADBC*), welcher vier offene Leseraster enthält und einer für einen Regulator dieses Operons: *icaR* (Gotz, 2002).



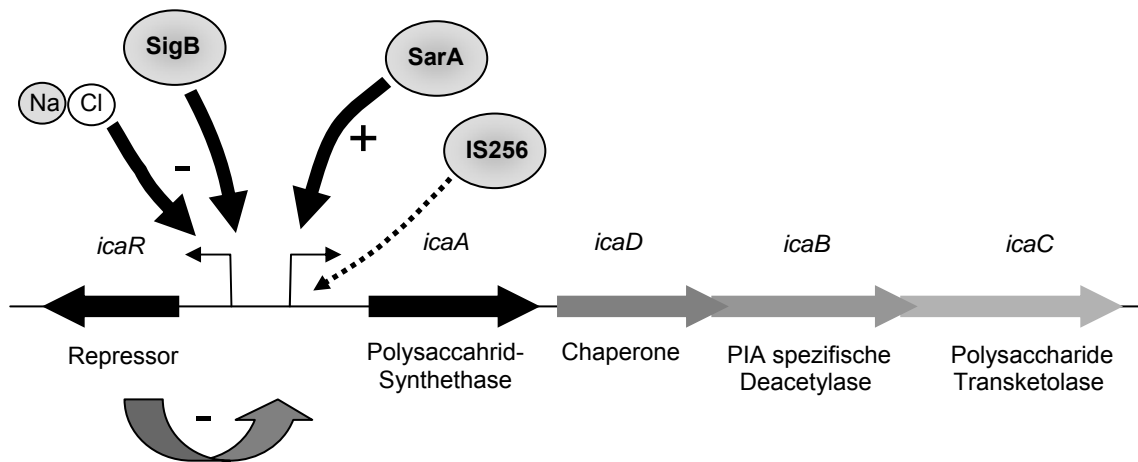


Abbildung 3: Schematischer Aufbau und Regulation des *ica* Operons.

Die korrespondierenden Proteine IcaA, C und D sind in der Membran von *S. epidermidis* lokalisiert, wohingegen IcaB hauptsächlich im Kulturüberstand vorhanden ist. IcaA scheint dabei eine Transferase-Funktion zu erfüllen und wird dabei von IcaD unterstützt, welches als eine Art Chaperon fungiert (Abbildung 4). IcaC ermöglicht es in Kombination mit IcaAD, erheblich längere Oligomerketten zu synthetisieren (Gerke *et al.*, 1998). Das extrazellulär vorliegende IcaB hingegen ist für die Deacetylierung von poly-N-Acetylglucosamin verantwortlich, und es konnte von Young *et al.* gezeigt werden, dass diese Funktion nicht nur essentiell für die Biofilmbildung sondern auch für die Kolonisierung von Wirtsgewebe sowie dem Verhindern der Phagocytose durch neutrophile Zellen ist (Vuong *et al.*, 2004a).

Die Regulation der PIA-Biosynthese unterliegt einer Reihe von Faktoren, deren Zusammenspiel und gegenseitige Beeinflussung noch nicht vollständig verstanden ist und in der Literatur diskutiert wird (Abbildung 3 zeigt einige Faktoren, die im Folgenden noch diskutiert werden). Eine zentrale Rolle spielt der im *ica* Operon kodiert Repressor IcaR. Dieser reprimiert die Biosynthese-Gene *icaADBC*. IcaR wird jedoch durch NaCl direkt inaktiviert sowie durch den alternativen Sigmafaktor SigB beeinflusst. Dabei konnte gezeigt werden das RsbU in der Regulationskaskade dieses alternativen Sigmafaktors die entscheidende Rolle zu spielen scheint. Diverse Daten weisen darauf hin, dass dieser Regulationsweg entscheidend für die Induktion der Biofilmsynthese durch Ethanol ist (Conlon *et al.*, 2002a, b; Knobloch *et al.*, 2001; Knobloch *et al.*, 2004). Darüberhinaus wurde ein weiterer Regulator, SarA als essentiell für die *icaADCB*-Genexpression gefunden. In einem Gelshiftassay konnte gezeigt werden, dass SarA eine hohe Bindungsaktivität zur Promoterregion des *ica* Operons hat und eine SarA-*S. epidermidis*-Mutante zeigte einen Biofilm-negativen Phänotyp (Tormo *et al.*, 2005). Eine weitere besondere Rolle spielen die

Umweltbedingungen für die Biofilmbildung in *S. epidermidis*. Faktoren wie Osmolarität, NaCl, Glukose, die Temperatur, Verfügbarkeit von Sauerstoff und auch diverse Antibiotika haben einen deutlichen Einfluss darauf (Conlon *et al.*, 2002b; Cramton *et al.*, 2001; Dobinsky *et al.*, 2003; Rachid *et al.*, 2000a; Rachid *et al.*, 2000b).

Eine weitere genomische Regulation des *ica* Operons erfolgt durch ein mobiles genetisches Element, das IS256. Dieses integriert in das Operon und verhindert damit die PIA Biosynthese. Diese Biofilm-Phasenvariation ist allerdings vollständig reversibel und spielt vor allem bei Nosokomialinfektionen eine besondere Rolle (Kozitskaya *et al.*, 2004; Ziebuhr *et al.*, 1999). Interessanter Weise wurden auch in den Genen der essentiellen Regulatoren *rsbU* und *sarA* Hotspots für das IS256 gefunden, was die besondere Rolle dieses genetischen Elements in der Regulation der Biofilmbildung von *S. epidermidis* unterstreicht (Conlon *et al.*, 2004).

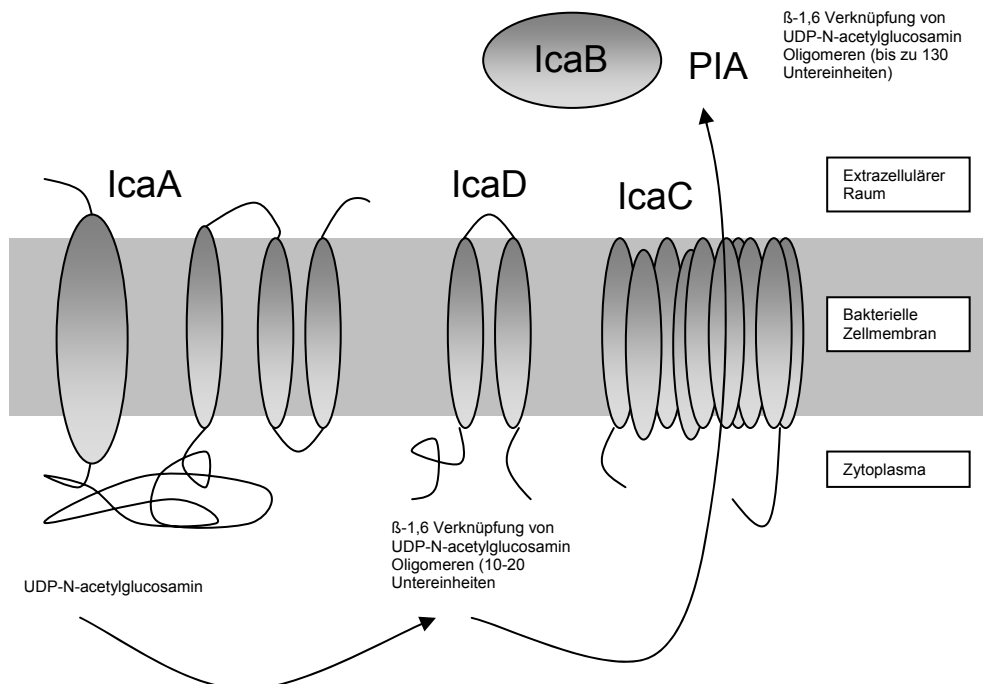


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Polysaccharide intercellular adhesin PIA-Synthese mittels der Ica Proteine.

### 1.3 Regulation der Virulenz mittels Quorum-sensing und Regulationsnetzwerken

Die Regulation von Genen die für Virulenzfaktoren und die Pathogenität verantwortlich sind unterliegt in Staphylokokken einem komplexen regulatorischem Netzwerk. Dazu gehören eine Reihe von Zwei- und Mehr-Komponenten Systemen, von denen eines das Quorum-sensing System Agr darstellt, der alternative Sigmafaktor SigB und eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren (Novick, 2003). Die meisten dieser Systeme sind in *S. aureus* untersucht worden und ihre Funktionen bestätigen sich zum Teil auch für *S. epidermidis*. Das Fehlen einiger dieser Regulatoren und der größte Teil der Virulenzfaktoren in *S. epidermidis* verändert jedoch dieses Netzwerk an einigen entscheidenden Punkten. Hinzu kommen oft noch stammspezifische Unterschiede die die Aufklärung dieser Netzwerke zusätzlich erschweren. Daher ist man gegenwärtig noch weit davon entfernt die genauen Zusammenhänge zwischen Virulenz, Umweltbedingungen und Wirtsinteraktion genau zu verstehen und im Detail beschreiben zu können (Novick, 2003).

#### Agr

Eine Vielzahl der Virulenzgene wird direkt oder indirekt vom *accessory gene regulator* Agr System reguliert. Das *agr* Operon hat etwa eine Länge von 3 kB mit zwei Transkriptionseinheiten (Abbildung 5). Diese lesen von einer mittig liegenden Promoterregion von Promotor P2 und P3 nach außen. Das P2 Operon (RNAII) kodiert für ein Zweikomponentensystem und einen autoinduzierenden Peptid-Liganden (Novick *et al.*, 1995). Die primäre Funktion dieses Operons ist die Auto-Aktivierung der beiden Promotoren. Das P3 Transkript, genannt RNAIII ist der wahre intrazelluläre Effektor der Genregulation (Janzon and Arvidson, 1990; Novick *et al.*, 1993). Da das Agr System somit auf einen selbstproduzierten extrazellulären Liganden reagiert, stellt es einen Sensor für die Dichte der eigenen Population dar (Novick *et al.*, 1995).

Das Transkript RNAII kodiert für vier Gene: *agrB*, *agrD*, *agrC* und *agrA* (Novick *et al.*, 1995). *agrB* und *agrD* sind verantwortlich für die Produktion der Autoinduktors AI (Ji *et al.*, 1995). Der AI besteht aus einem Peptid von durchschnittlich 8 Aminosäuren, die im Gen *agrD* kodiert werden und einer Thiolactonringstruktur. Die Thiolacton-Ringstruktur des AI-Peptides wird posttranslational durch die enzymatische Wirkung von AgrB in das Peptid eingeführt (Otto *et al.*, 1999; Saenz *et al.*, 2000).

Die AIs verschiedener Staphylokokken-Stämmen haben unterschiedliche Aminosäuresequenzen, jedoch alle eine konservierte Ringstruktur. Es konnte gezeigt werden, dass diese Unterschiede auf Variationen im Genbereich *agr B-D-C* zurückzuführen sind. Dabei wurden bis dato 4 verschiedene Gruppen in *S. aureus* gefunden. Diese verschiedenen AIs zeigten dabei interessanter Weise kreuzinhibierende Wirkung und die einzelnen Gruppen ließen sich auch Stämmen mit

bestimmter Virulenzen zuordnen (Ji *et al.*, 1997; Mayville *et al.*, 1999). Das *S. epidermidis* Pheromon stellt einen sehr potenten Inhibitor der *S. aureus*-Subgruppen 1 bis 3 dar, jedoch nicht von Subgruppe 4.

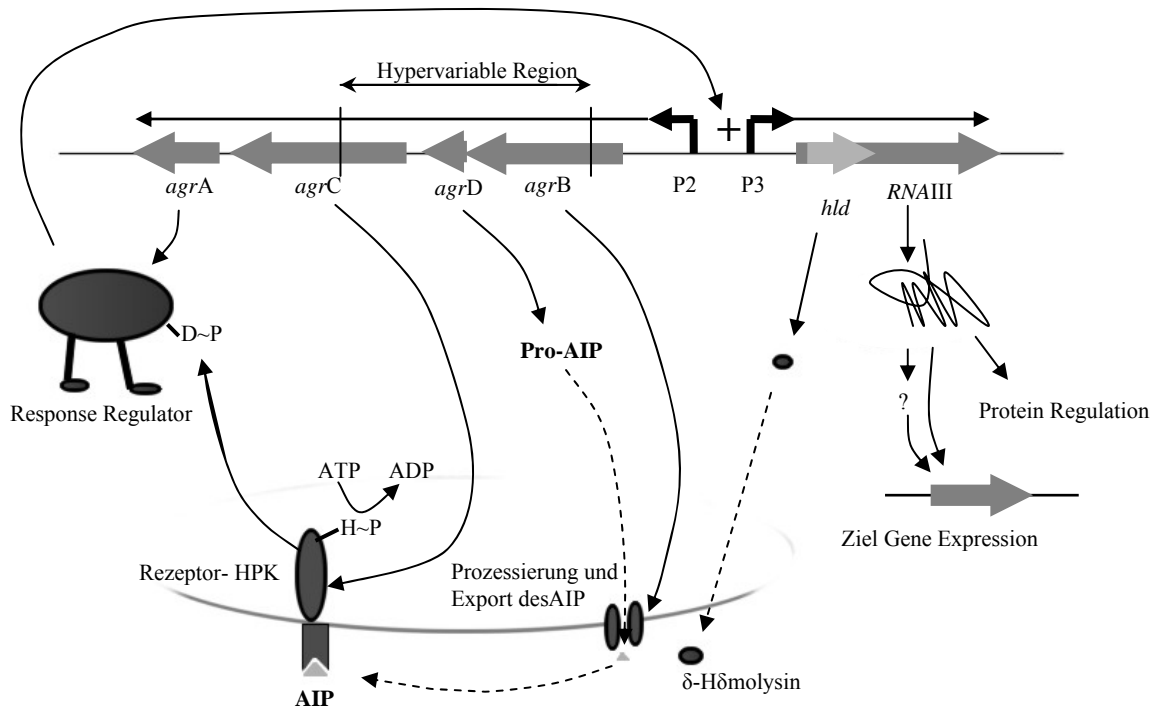


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Struktur des *agr* Operons von Staphylokokken, sowie der Autoaktivierung des Agr-Systems.

Das AI bindet zur Autoinduktion an das Transmembranprotein AgrC, welches als Sensorkinase eines Zweikomponentensystems agiert (Ji *et al.*, 1995). Durch die Bindung des AI wird AgrC phosphoryliert und aktiviert anschließend, ebenfalls über eine Phosphorylierung, den Response Regulator AgrA. AgrA ist ein DNA bindendes Protein, welches *direct repeats* mit der Konsensussequenz 5'-ACAGTTAAG-3' erkennt, die durch 12 Basenpaare voneinander getrennt sind (Koenig *et al.*, 2004). Durch Bindung an diesen Bereich induziert AgrA dann die Transkription von RNAII und RNAIII (Ji *et al.*, 1995). Der funktionelle Ablauf der Agr Autoaktivierung wird in Abbildung 5 dargestellt.

Generell wird angenommen das RNAIII den eigentlichen Effektor des Agr Systems darstellt (Novick *et al.*, 1995). RNAIII hat eine Länge von 504 Nukleotiden und agiert dabei sowohl als regulatorische RNA, als auch als mRNA für das  $\delta$ -Toxin, dem einzigen Toxin, das in *S. epidermidis* kodiert vorliegt (Novick *et al.*, 1995). RNAIII selber faltet sich in eine „14stem-loop“ Struktur mit zwei langen Helices (Benito *et al.*, 2000). Für *S. aureus* konnte gezeigt werden, dass das 5'-Ende der RNAIII die Translation des Alpha-Toxins reguliert und die 3' Domäne für die Repression von

Protein A verantwortlich ist (Huntzinger *et al.*, 2005; Novick *et al.*, 1993). Die genaue Regulation der anderen bekanntermaßen regulierten Virulenzfaktoren ist aber noch völlig unklar (Kong *et al.*, 2006).

### Weitere regulatorische Systeme in Staphylokokken

Neben der Zelldichte sind vor allem andere externe Stimuli, die über die Umweltbedingungen, wie zum Beispiel die Nährstoffsituation Auskunft geben extrem wichtig für die Genregulation. Diese beiden Signale müssen daher miteinander verknüpft und koordiniert werden. In *S. aureus* wurden eine Reihe von weiteren Regulatoren beschrieben, die mit dem Agr-System in Wechselwirkung stehen: SaeRS, SrlRS, ArIRS, der alternative Sigmafaktor SigB und Transkriptionsfaktoren der SarA Familie.

#### SarA

Das SarA Operon besteht aus fünf offenen Leserahmen, die von drei unabhängigen Promotoren transkribiert werden und für 3 unterschiedliche SarA Proteine kodieren (Arvidson and Tegmark, 2001; Manna *et al.*, 1998). Von diesen ist mindestens eine Promotor SigB abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass die drei Promotoren zu unterschiedlichen Zeit während des Wachstum aktiv sind (Blevins *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SarA an AT-Reiche Sequenzen bindet. Dieses wurde auch an diverse intergenische Bindungsstellen zwischen dem *agr* Promotoren P2 und P3 nachgewiesen wodurch SarA positiv auf die Transkription dieser beiden Promotoren wirkt (Rechtin *et al.*, 1999).

#### ArIRS

Das ArIRS System wurde als Antagonist zum dem Agr System in *S. aureus* beschrieben. Eine *agr* Mutante in *S. aureus* zeigte keine *arIRS* Expression, jedoch war in einer *arIS* Mutante eine Überexpression des Agr Systems festzustellen. Insgesamt scheint einen mittel- und unmittelbaren Effekt auf das extrazelluläre Proteom von *S. aureus* zu haben (Fournier *et al.*, 2001). In *S. epidermidis* ist dies bis dato jedoch nicht bestätigt worden.

#### SaeRS

Eine besondere Rolle im Hinblick auf die Verknüpfung von extrazellulären Umweltbedingungen mit der optischen Zelldichte scheint dem Mehrkomponentensystem SaeRS zuzukommen. Es besteht aus fünf Leserahmen, die mindestens vier Proteine kodieren. SaeR und SaeS bilden dabei ein klassisches Zweikomponentensystem. Die Rolle der zusätzlichen Proteine SaeP und SaeQ ist noch nicht verstanden. Die Synthese dieser beiden Leserahmen wird von RNAIII in der exponentiellen Wachstumsphase induziert, wird jedoch durch eine Reihe von Umweltsignalen blockiert. Neben RNAIII wird auch SaeR für die Expression von *saePQ* benötigt. Experimentelle Ergebnisse von Novick und Jiang weisen darauf hin,

dass dieses System die Effekte von RNAIII in Hinsicht auf Umweltbedingungen in *S. aureus* justiert (Novick and Jiang, 2003). Auch hier ist die Rolle in *S. epidermidis* noch nicht weitergehend untersucht worden.

## **Sigmafaktor B**

Staphylokokken besitzen, soweit heute bekannt nur 3 Sigma Faktoren, von denen nur SigA und SigB eine weiterreichende Rolle zukommt. SigB stellt dabei den alternativen Sigmafaktor dar. Die Signalkaskade des Sigma Faktors B wurde in *Bacillus subtilis* als ein stressinduzierbares System beschrieben (Hecker *et al.*, 1996; Kruger *et al.*, 1996). Obwohl das SigB-System in Staphylokokken bis auf einige fehlende Regulatoren in der Kaskade stark konserviert ist (Mittenhuber, 2002), scheint die Rolle von SigB doch eine andere zu sein, was nicht zuletzt wegen der geringen Anzahl der Sigmafaktoren in Staphylokokken auch Sinn macht. So wird SigB in Staphylokokken zwar durch Hitze,  $MnCl_2$  oder NaCl und alkalischen Schock induziert, jedoch nicht wie in *B. subtilis* durch einen fallenden ATP-Spiegel oder etwa Ethanolstress. Insgesamt zeigt eine Studie von Pané-Farré *et al.* das SigB in *S. aureus* eine basalere Rolle im Rahmen der zellulären Prozesse zukommt (Pané-Farre *et al.*, 2006). Die Regulation des Sigmafaktors B in Staphylokokken unterliegt den Proteinen RsbW (Miyazaki *et al.*, 1999), der als Anti-Sigma Faktor fungiert und den positiven Sigma B Regulatoren RsbU und RsbV (Palma and Cheung, 2001). Dabei bindet der Anti-Sigma RsbW an SigB und inaktiviert diesen. RsbW ist eine Anti-Anti-Sigma Faktor Kinase und phosphoryliert RsbV. RsbV wird durch RsbU dephosphoryliert und bindet ohne Phosphat RsbW, welches dann SigB frei lässt und aktiviert. Das heißt, dass die Aktivität von SigB über den Phosphorylierungsstatus des Anti-Anti-Sigma Faktors B reguliert wird (Pané-Farre *et al.*, 2006). In *S. aureus* konnte gezeigt werden, dass SigB auch zahlreiche Virulenzfaktoren reguliert, wie etwa das Fibronektin-bindende Protein A und die Koagluase in positiver Weise (Nair *et al.*, 2003), sowie alpha- und beta-Hämolysin, Enterotoxin B, eine Serinprotease SplA, die Cysteinprotease SplB, Staphopain und Leukotoxin D in einer negativen Weise (Pané-Farre *et al.*, 2006; Ziebandt *et al.*, 2001). Knobloch *et al.* untersuchten die Funktion von Sigma B in *S. epidermidis* mit einer Reihe von Deletionsmutanten im Sigma B Operon. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Sigma B einen unmittelbaren reprimierenden Effekt auf IcaR, denn Repressor des *ica*-Operons ausübt. Der Biofilm in diesen *S. epidermidis sigB* Mutanten konnte jedoch durch die Zugabe von Ethanol induziert werden, was auch die These unterstützt, dass Ethanol die Biofilmbildung in einer SigB unabhängigen Art und Weise induziert (Knobloch *et al.*, 2004).

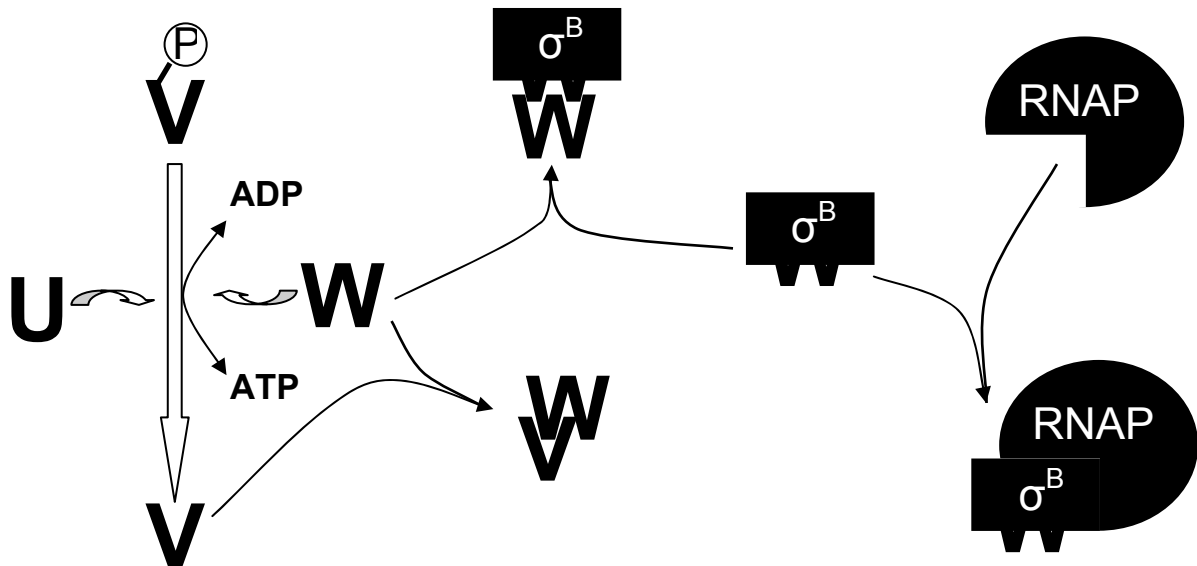


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der Regulationskaskade des alternativen Sigmafaktors SigB in Staphylokokken nach Knobloch *et al.* .

#### 1.4 Der pleiotrope Repressor CodY

Eine Vielzahl von Gram-positiven Bakterien kodieren für ein Homolog des CodY Proteins von *B. subtilis*. CodY ist ein Protein, welches mehr als hundert Gene kontrolliert die normalerweise während des schnellen Wachstums unterdrückt werden und erst dann aktiviert werden, wenn die Zellen in unmittelbare Nährstoffarmut geraten. Diese metabolische Regulation mittels Transport und der Metabolisierung von Nährstoff stellt in gewisser Weise das Rückgrat der Pathogenität eines Organismus dar (Sonenshein, 2005).

Die so genannte “stringent response” auf Aminosäure Limitation war eine der ersten globalen Regulationssysteme, die in Bakterien beschrieben wurden (Sarubbi *et al.*, 1988). Wenn der Mangel an Aminosäure kritisch wird, schalten die Zellen die Synthese von rRNA und ribosomalen Proteinen ab, führen jedoch die Synthese von bestimmten mRNA fort. Das Signal für diese Antwort ist das Binden ungeladener tRNAs an das Ribosomen und die dadurch erfolgende Aktivierung von RelA, ein an das Ribosomen gebundenes Enzym, welches die Interkonversion von GTP zu dem Alarmon pppGpp durchführt (Sonenshein, 2005). Das Abfallen des GTP Levels führt zu einer *de novo* Synthese von GTP durch die Inhibition der Inosine Monophosphat Dehydrogenase (Abbildung 7).

In *B. subtilis* stellt CodY ein GTP bindendes Protein dar, welches zunächst als Repressor des Dipeptidtransporters (*dppABCDE*) identifiziert wurde (Slack *et al.*,

1995). Weitere Untersuchungen zeigten aber bald, dass CodY darüber hinaus die Expression von viele stationäre Phase Genen reguliert (Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001). Als kritischer Faktor für die Regulation von CodY wurde zunächst das GTP Level in der Zelle erkannt. Die Affinität von CodY zu GTP ist ausreichend gering, so das CodY den Konzentrationsunterschied zwischen 2 mM GTP im exponentialen Wachstum und 0,3 mM GTP in der stationären Phase unterscheiden kann (Sonenshein, 2005).

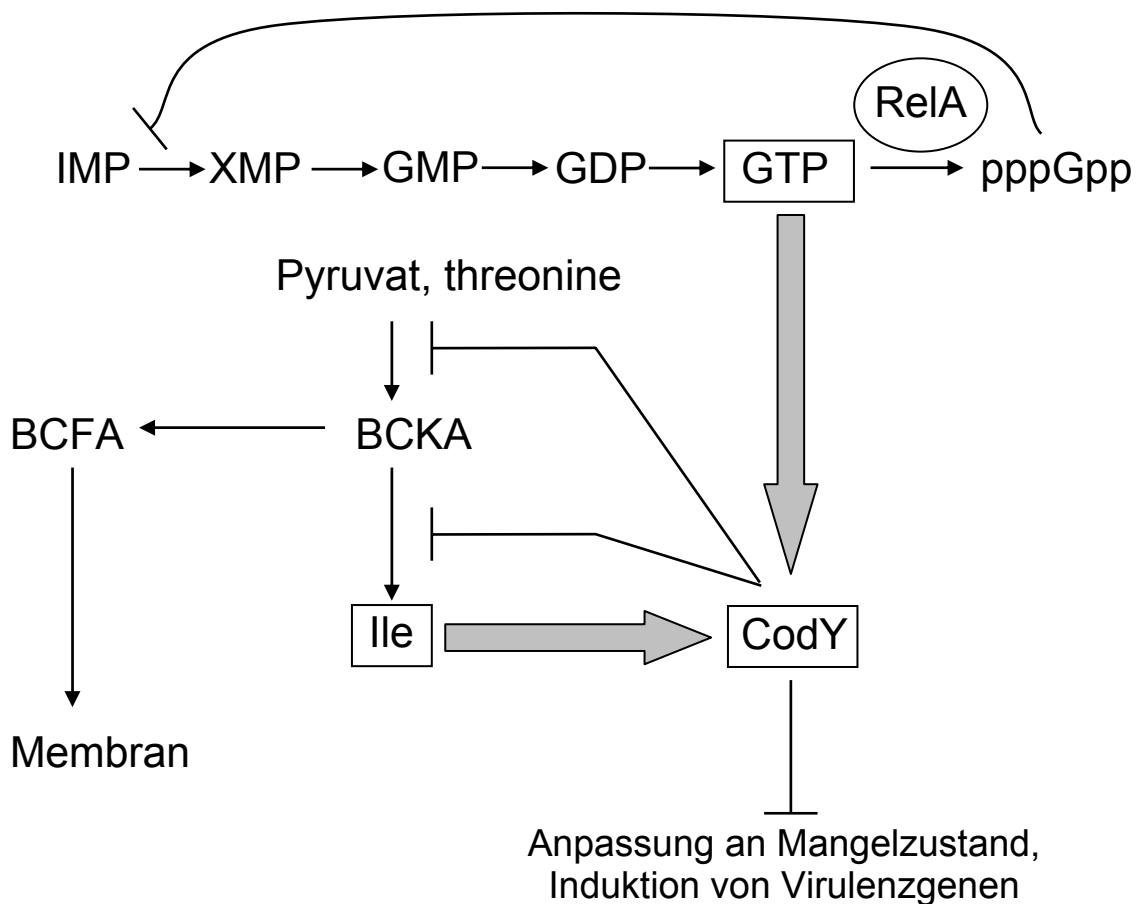


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Regulation von CodY in *B. subtilis* nach Sonenshein *et al.*. Die dicken Pfeile zeigen einen positiven Effekt an, die dünnen Pfeile einen Synthesewegverlauf und die Block-Linien eine negative Regulation. BCFA steht für branched chain fatty acid; BCKA, branched chain keto acids; Ile, Isoleucin; IMP, Inosin Monophosphat; XMP Xanthosin Monophosphat.



## 1.5 Zelluläre Invasion von Staphylokokken

Die Fähigkeit eines Bakteriums in die Wirtszellen einzudringen stellt sicherlich eine der effektivsten Wege dar, sich dem Immunsystem des Wirts zu entziehen. Die zelluläre Invasion von *S. aureus* wird seit einigen Jahren intensiv untersucht und soll als Grundlage dieses Teils der Einleitung dienen.

Die Vorteile der Invasion eines Bakteriums in eine Zelle lassen sich wie folgt zusammenfassen: (i) Schutz vor professionell phagozytierenden Zellen, (ii) Erschließung einer nährstoffreichen Quelle, (iii) Schutz vor Antikörpern und komplementvermittelter Lyse (Sinha *et al.*, 1999).

Staphylokokken haben eine Vielzahl von Adhäsinen, die spezifische Proteine auf Wirtszellen binden. Sinha *et al.* konnten z.B. zeigen, dass das Fibronektin bindende Protein FnBPs mittels Fibronektin an den Integrinrezeptor  $\alpha_5\beta_1$  Wirtszellrezeptor bindet und so eine Invasion von *S. aureus* in 293T Nierenepithelzellen vermittelt (Sinha *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 2000). Dafür war es nicht notwendig, dass die Staphylokokken lebendig waren, jedoch waren FnBPs negative Staphylokokken nicht invasiv. Dies weist auf einen konservierten Mechanismus hin, der als Ansatzpunkt für die Entwicklung von Therapeutika interessant erscheint (Sinha *et al.*, 1999). Interessanter Weise zeigte eine SaeRS negative *S. aureus* einen invasionsnegativen Phänotyp, welches auf den positiven regulatorischen Einfluss auf die Produktion von Adhäsionsproteinen zurückgeführt wurde (Liang *et al.*, 2006). Das genaue Zusammenspiel der verschiedenen Regulationssysteme ist allerdings so gut wie noch nicht untersucht.

Bis dato wird *S. epidermidis* als nicht-invasiver Erreger angesehen (Sinha *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit präsentierten Daten und erste Hinweise in Veröffentlichungen (Kong *et al.*, 2006; Vuong *et al.*, 2004b), bzw. mündliche Mitteilung von Arbeitsgruppen aus Schweden und England deuten allerdings in eine andere Richtung.

## 1.6 Ziel- und Aufgabenstellung der Dissertation

*Staphylococcus epidermidis* stellt heutzutage den Haupterreger von Nosokomialinfektionen dar. Aufgrund der stark zunehmenden Resistenzen gegen Antibiotika und den damit verbundenen Schwierigkeiten in der Behandlung dieser Infektionen sind neue Strategien zur erfolgreichen Therapie notwendig. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist jedoch ein tiefgehendes Verständnis der Regulation der Pathogenität und Biofilmbildung von *S. epidermidis*. Daher bilden folgenden Schwerpunkten die Grundlage der vorliegenden Dissertation:

- **Phänotypische Charakterisierung der *S. epidermidis agr*-Mutante 567-1 im Vergleich zum isogenen Wildtyp, *S. epidermidis* 567**
- **Untersuchung des Einflusses des Agr-Systems auf die globale Regulation in *S. epidermidis* mittels vergleichender Proteom- und Mikroarray-Analyse**
- **Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Biofilmbildung von *S. epidermidis* mittels konfokaler Lasermikroskopie und live/dead-Färbung**
- **Aufklärung von genregulatorischen Prozessen in der frühen und späten Phase der Biofilmbildung von *S. epidermidis* mittels Mikroarray-Analyse**
- **Untersuchung und Validierung von Wirksubstanzen auf biofilminhibitorische Effekte in *S. epidermidis***

## 2 Methoden

### 2.1 Grundlagen des mikrobiologischen Arbeitens

#### 2.1.1 Kultivierung

Für Standard Wachstumsexperimente wurden die entsprechenden Stämme aerob in einer Schüttelkultur kultiviert. Der verwendete Stamm wurde dazu aus einer Übernachtskultur im Schüttelkolben bei einer optischen Dichte von  $OD_{600}$  0,05 angeimpft und bei 37°C und 220 rpm. angezogen.

Die Untersuchungen zur Biofilmbildung verschiedener *S. epidermidis*-Stämme wurden in 175 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen durchgeführt. Die Biofilmbildung wurde generell bei  $OD_{600}$  0,05 angeimpft und für verschieden lange Inkubationszeiten bei 37°C im Brutschrank stehend inkubiert, wobei der Deckel einen Sauerstoffaustausch zuließ.

#### 2.1.2 Verwendete Bakterienstämme

**Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme, Besonderheiten, Quellen**

Stamm	Eigenschaften	Quelle
<i>S. epidermidis</i> 567	Harnwegsisolat; <i>ica</i> -positiv; <i>IS256</i> positiv; eher schwacher Biofilmbildner	(Batzilla <i>et al.</i> , 2006)
<i>S. epidermidis</i> 567-1	Isogene <i>agr</i> - Mutante des Harnwegsisolates <i>S. epidermidis</i> 567; eher schwacher Biofilmbildner	(Batzilla <i>et al.</i> , 2006)
<i>S. epidermidis</i> 678	Blutkulturisolat; <i>ica</i> -positiv; <i>IS256</i> positiv; starker Biofilmbildner	Ziebuhr W., Würzburg unveröffentlicht
<i>S. aureus</i> Cowan		
<i>S. aureus</i>		

### 2.1.3 Verwendete Nährmedien

In den Experimenten wurden diverse Kulturmedien eingesetzt und Wachstums- bzw. Biofilmuntersuchungen durchgeführt. Für die Untersuchung des Quorum-sensing Systems *agr* war es notwendig, dass eine hohe optische Dichte erreicht wurde. Dabei war für *S. epidermidis* 567 ein besonders reichhaltiges Medium (TSB) erforderlich. Die vergleichende Untersuchung des Biofilms verschiedener *S. epidermidis*-Stämme wurde auf Basis verschiedener Medien, wie etwa TSB, TSB(-) Dextrose, LB- oder B-Medium durchgeführt.

### 2.1.4 Kultivierungsbedingungen

#### 2.1.4.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Zur Präparation von zytoplasmatischen Proteinen oder von RNA wurden 100 ml Kolben mit 20 ml Medium bei einer optischen Dichte von  $OD_{600}$  0,05 aus einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 220 rpm. aerob kultiviert.

#### 2.1.4.2 Kultivierung des Biofilms

Es wurde ein 96-Loch Mikrotiterplatten-Test für die Analyse von Biofilmbildung verwendet. Dabei lassen sich unterschiedliche optische Dichten, Medien, Zeitpunkte und auch Stämme direkt nebeneinander vergleichen. Da aus einem Animpfen direkt aus der Übernachtskultur zu starke Schwankungen in der Biofilmentwicklung entstehen, wurde der entsprechende Stamm im Schüttelkolben bis  $OD_{600}$  0,5 vorkultiviert (siehe oben). Anschließend wurde jede Vertiefung mit 150 µl Kultur ( $OD_{600}$  0,05) beimpft und die Mikrotiterplatte stehend bei erwünschter Temperatur inkubiert. Dabei waren die zu testenden Medien, jeweils bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert, um eine möglichst hohe Wiederholbarkeit zu erreichen. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde der Biofilm dreimal vorsichtig mit 1 x PBS gewaschen (Mehrkanalpipette) und getrocknet. Zur Färbung wurde der Biofilm nun für etwa 2 Minuten mit 20 %-igem Kristallviolett (gesättigte, gefilterte Lösung) gefärbt. Der Biofilm wurde nun 3-5 mal mit 1 x PBS gewaschen, um ungebundenes Kristallviolett zu entfernen und dann bei 60°C getrocknet. Die gefärbte Platte wurde abschließend bei 495 nm in einem ELISA Reader eingescannt.

Zur Isolation von zytoplasmatischen Proteinen oder von RNA war es notwendig, ein System zu etablieren, in dem genug Zellmaterial geerntet werden konnte und dennoch eine Vergleichbarkeit zu dem bestehenden Assay herrscht. Daher wurden 175 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflaschen mit Lüftungsdeckel verwendet, die nach analoger Vorkultur (siehe oben) mit vortemperierten 130 ml TSB bei einer  $OD_{600}$  0,05 beimpft wurden. Die Flaschen wurden ebenfalls stehend kultiviert. Um die Zellen des Biofilms zu ernten, wurde der Überstand zunächst abgegossen und der Biofilm dreimal mit

eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde der Biofilm mit einem Zellschaber in 50 ml eiskaltem 1 x PBS oder bei einer RNA-Präparation mit RNA-Protect : 1 x PBS im Verhältnis 2:1 abgelöst, in ein Falconröhrchen überführt und abzentrifugiert (6328 x g, 4°C, 10 Minuten). Das Sediment wurde nun entweder unmittelbar aufgeschlossen oder max. für wenige Tage bei -20°C gelagert.

## **2.2.1 Zellkulturen und Infektionsversuche**

### **2.2.1.1 Zellkultur**

Für die Zellkultur wurden nur 293T Nierenepithelzellen verwandt. Diese wurden in DMEM Medium mit 3 % Glucose und 10 % FCS (Fetal Bovine Serum) in Petrischalen kultiviert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage zur Erhaltung der Zelllinie gesplittet. Dafür wurde das alte Medium (10 ml) komplett abgezogen, die Zellen anschließend mit 10 ml sterilem 1 x PBS pH 7,5 gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin durch vorsichtiges Klopfen von der Oberfläche gelöst. Die Zellen wurden dann in 9 ml vorgewärmtem frischen Medium resuspendiert und dann in einer 1:20 Verdünnung in eine neue Petrischale überführt.

### **2.2.1.2 Invasionsassay**

Die Invasionsassays wurden in 24-Loch Mikrotiterplatten (Greiner) durchgeführt. Zur besseren Haftung der Zellen an der Oberfläche der 24-Loch Mikrotiterplatten wurde jede Vertiefung zunächst mit 500 µl einer 10 µg/ml konzentrierten Polylysin Lösung (verdünnt in sterilem 1 x PBS) für 24 h bei 4 °C inkubiert. Dabei wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet um jegliche Kontamination zu vermeiden. Anschließend wurde die Lösung abgezogen und wie folgt mit den 293T Nierenepithelzellen beschichtet:

Die 3-4 Tage inkubierten Zellen (s.o.) wurden wie beschrieben gesplittet, jedoch in einer 1:2 Verdünnung und für 1 Tag inkubiert. Diese Zellen wurden dann mit 10 ml sterilem 1 x PBS gewaschen, mit Trypsin gelöst und wiederum in 9 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und anschließend bei Raumtemperatur und 600 rpm. für 3 min. pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet je nach Größe in 2-6 ml Medium gut resuspendiert. 10 µl der Suspension wurden dann mit 20 µl Trypanblau vermischt, um tote Zellen erkennen zu können, und 10 µl der Lösung davon, zur Zellzahlbestimmung in einer Neubau-Kammer verwandt. Zur Zellzahlbestimmung wurden alle Zellen in den 4 großen Quadranten gezählt und addiert. Dieser Wert wurde mit drei multipliziert (aufgrund der vorhergehenden Verdünnung mit Trypanblau) und mit dem Kammerfaktor 2500 multipliziert. (Anzahl x 3 x 2500 = Zellen/ml). Entsprechend wurden die resuspendierten Zellen verdünnt,

um eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml einzustellen. Von dieser Verdünnung wurden dann 1 ml pro Vertiefung in die vorbereiteten 24-Loch Platten pipettiert und diese dann über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

Für die zelluläre Infektion wurden verschiedene bakterielle Stämme verwandt: Als Positiv-Kontrolle *S. aureus* Cowan, sowie die zu testenden Stämme *S. epidermidis* 567, *S. epidermidis* 567-1 ( $\Delta agr$ ). Die verschiedenen Bakterienstämme wurden für den Infektionsversuch über Nacht in TSB bei  $37^\circ\text{C}$  und 220 rpm. kultiviert und morgens bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,05 in 20 ml neu überimpft und bei den selben Bedingungen bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von ca. 1 vorkultiviert. Zweimal 2 ml der entsprechenden Bakterienkultur wurden dann bei  $6328 \times g$  und Raumtemperatur für 5 min. zentrifugiert und das Pellet in sterilem  $1 \times \text{PBS}$  gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml sterilem PBS aufgenommen und ihre optische Dichte (1:10 Verdünnung) bestimmt. Die entsprechende Bakterienzahl wurde anhand einer Eichgerade bestimmt und die Bakterienzahl für eine MOI (Multiplicity of infection) von 10 oder 20 eingestellt:

$((2 \times 10^5 \times \text{MOI}) / (\text{Bakterienzahl nach Eichkurve})) = \text{Einzusetzende ml der Bakteriensuspension.}$

Zur Infektion wurde darauf folgend die errechnete Menge der Bakteriensuspension in jeder entsprechenden Vertiefung der 24-Loch Mikrotiterplatte gegeben und diese dann für 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Um Bakterien, die in dieser Zeit nicht invasiv waren zu entfernen wurde anschließend das Medium abgenommen und neues, vorgewärmtes Medium mit  $30 \mu\text{g/ml}$  Lysostaphin und  $50 \mu\text{g/ml}$  Gentamycin auf die infizierten Zellen gegeben. Diese wurden dann entsprechend für 1-48 h inkubiert. Zur Beendigung der Infektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen mittels 1 %-iger Saponinlösung (in sterilem  $1 \times \text{PBS}$ ) für 18 min. (max. 20 min.) lysiert und anschließend entsprechende Verdünnungen (in  $1 \times \text{PBS}$ ) der Suspension auf TSB-Agar Platten ausplattiert. Diese wurden für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Abschließend wurde die Anzahl der Bakterien unter Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnung bestimmt. Alle Werte wurden über mindestens 3 parallele Experimente gemittelt.

## 2.3.1 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung

### 2.3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von RNA und DNA wurde durch die Messung der Absorption bei 260 und 280 nm (Quarzglasküvetten), in einem Photometer bestimmt. Die RNA-Konzentration wurde durch die Multiplikation des Wertes  $A_{260}$  mit dem für RNA spezifischen Faktor  $40 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$  errechnet. Die DNA-Konzentration wurde analog errechnet; der spezifische Wert für DNA beträgt  $50 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren ergab sich aus dem Quotienten  $A_{260}/A_{280}$ , wobei ein Wert zwischen 1,8 und 2 als rein erachtet wurde.

### 2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung mittels Roti<sup>®</sup> Nanoquant

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in wässriger Lösung wurde Roti<sup>®</sup> Nanoquant verwendet. Roti<sup>®</sup> Nanoquant ist eine Modifikation des Bradford Assays (Bradford, 1976). Dabei wird die Absorption einer Färbelösung bei 450 nm und 590 nm bestimmt. Der Assay hat eine Nachweisgrenze von 200 ng. Zur Proteinbestimmung wurden 800  $\mu\text{l}$  Roti<sup>®</sup> Nanoquant Arbeitslösung (1:5 verdünnte Stocklösung) mit 200  $\mu\text{l}$  verdünnter Proteinlösung gegen Aqua dest. im Photometer gemessen. Der gemessene Quotient  $A_{590}/A_{450}$  wurde mit Hilfe einer Eichgeradenfunktion und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in die Proteinkonzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] umgerechnet. Die Eichgeradenfunktion wurde mit Hilfe von Proteinstandards vorher erstellt. Die Verdünnung der Proteinprobe wurde so gewählt, dass der Quotient  $A_{590}/A_{450}$  ca. 0,8 betrug, um die möglichst beste Vergleichbarkeit der Proteinkonzentrationen verschiedener Proben zu gewährleisten. Jede Proteinmessung wurde zur Erhöhung der Genauigkeit zweifach durchgeführt und die Endkonzentrationen arithmetisch aus den Teilmessungen ermittelt.

Formel:

$$\text{Proteinmenge } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{Verdünnungsfaktor} \times ((A_{590}/A_{450}) - 0,4475) / 0,1132$$

Der Verdünnungsfaktor ist der Quotient der reziproken Verdünnung und des eingesetzten Volumens [ $\mu\text{l}$ ] der Verdünnung.

## 2.4 RNA Analytik

### 2.4.1 Präparation von RNA aus *S. epidermidis*

Zur Präparation von mRNA aus *S. epidermidis* wurde das „RNeasy Mini-Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Dabei wurde das Herstellerprotokoll für Fast-Prep Aufschluss verwendet. Für eine bessere RNA-Konzentration wurde die geerntete Bakterienmenge jedoch teilweise erhöht: Abhängig von der optischen Dichte der Bakterienkultur wurden unterschiedliche Probenmengen geerntet. Bei einer OD<sub>600</sub> von 1,5 wurden 10 ml der Bakterienkultur geerntet, bei einer OD<sub>600</sub> von 5 bis 6 nur 1 bis 2 ml. Zum Abstoppen des Wachstums und zum Schutz der mRNA wurde die Kultur mit „RNAprotect Bacteria Reagent“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) im Verhältnis 1:2 vermischt und unter leichtem Schütteln für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 6328 x g, 4 °C für 10 min. pelletiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet konnte dann bei -20°C für einige Tage gelagert werden.

Die Präparation der RNA erfolgte mittels Fast-Prep Aufschluss. Dabei wurde das Bakterienpellet in 1,5 ml RLT Puffer (mit jeweils 10 µl/ml Mercaptoethanol) resuspendiert und in „Lysing Matrix E“ Gefäße (Q-BIOgene, Heidelberg, Deutschland) überführt. Anschließend wurden die Zellen in der Fast-Prep Maschine Savant BIO101 (Q-BIOgene, Heidelberg, Deutschland) auf der Stufe 6,5 für zweimal 30 sec. aufgeschlossen. Die Röhrchen wurden nun für 30 sec. bei 13.000 x g abzentrifugiert, um restliche Zellbestandteile aus dem Überstand zu entfernen. Der Überstand wurde dann in ein neues Reagenzgefäß überführt und im Verhältnis 1:1 mit 100 %-igem Ethanol vermischt. Danach wurde das Gemisch auf eine RNeasy Säule gegeben. Diese enthält eine Matrix, die selektiv RNA bindet. Zur Bindung der RNA wurde die Säule dann für 15 sec. bei ca. 10.000 x g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis das gesamte Gemisch über die Säule gefiltert wurde. Anschließend wurde die RNeasy Säule mit 700 µl RW-1 Puffer gewaschen um Proteine zu entfernen. Darauf folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Puffer. Um den restlichen Ethanol (aus dem RPE Puffer) aus der Matrix zu entfernen wurde die Säule für 1 min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die auf der Matrix gefällte RNA wurde dann in 85 µl (40 + 45 µl) RNase freiem Wasser in zwei Schritten von der Membran gelöst. Dabei wurde das Wasser jeweils in die Mitte der Membran (Matrix) gegeben und nach 1-2 min. Inkubation bei Raumtemperatur durch Zentrifugation (1 min., 13.000 x g, RT) die RNA eluiert.

Bei Verwendung der RNA für Real-Time PCR oder für Mikroarrays ist es notwendig, dass keinerlei DNA in der RNA Probe verbleibt, da es ansonsten zu Verfälschungen in der Auswertung kommen kann. Daher wurden die RNA Proben noch weiter mit einer „RNase free DNase“ (Merck, Darmstadt, Deutschland) behandelt. Zu den 85 µl



RNA Probe wurden 10 µl „One-Phor-All Buffer Plus“ (GE-healthcare, Freiburg, Deutschland) und 5 µl DNase gegeben und diese für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde wiederum 1 µl DNase dazu gegeben und für eine weitere Stunde der Verdau fortgesetzt. Um den Puffer und die DNase aus der Probe zu entfernen wurde diese wiederum mit dem „RNeasy Mini-Kit“ aufgereinigt, wobei jedoch auf das Waschen mit RW-1 Puffer verzichtet wurde.

### **2.4.2 Kontrolle der RNA-Integrität**

Für die Verwendung von RNA in Real-Time oder Mikroarray Analysen ist es extrem wichtig, dass die RNA Proben nicht degradiert sind. Daher wurden alle Proben mittels „RNA 6000 Pico LabChip® Kit“ elektrophoretisch analysiert. Die Durchführung und Bedingung der entsprechenden Software kann dem Herstellerhandbuch entnommen werden.

Vor Beschaffung dieses Analyse-Systems wurde die RNA-Integrität mittels Agarose-gelelektrophoretischer Auftrennung mit anschließender SYBR-Green Färbung (Sigma, Hamburg, Deutschland) überprüft.

### **2.4.3 Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA unter denaturierender Bedingungen**

Zur Transkriptionsanalyse wurde die RNA zunächst mit Hilfe der denaturierenden formaldehydhaltigen Agarose-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das 1,2 %-ige Agarosegel (4,2 g Agarose in 304,5 ml DEPC-Wasser) wurde in einer Mikrowelle durch Aufkochen gelöst. Die Agarose wurde nun in einem Wasserbad auf 60°C temperiert. Nach Zugabe von 35 ml 10x MOPS-Puffer und 10,5 ml 37 % Formaldehyds wurde die Agarose in den Gelstand gegossen. Nach dem Erkalten des Gels (ca. 45 Minuten) erfolgte die Äquilibrierung für ca. 30 Minuten im Laufpuffer (1 x MOPS). Die 10-15 µg RNA-Proben wurden mit RNase freiem Wasser auf 30 µl aufgefüllt und mit 6 µl 5 x Lade-Puffer versetzt. Zur Denaturierung der RNA wurde der Ansatz dann für 5 Minuten bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach dem Beladen des Gels wurden die Proben für ca. 3 h bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Um die Vergleichbarkeit der RNA Proben zu kontrollieren, wurde das Gel zunächst 30 min in DEPC- Wasser gewässert und dann für 20 min in einem SYBR-Green Bad gefärbt. Abschließend wurde das Gel mit einem Phosphoimager (Typhoon 8600, GE healthcare, Freiburg, Deutschland) gescannt.

**Tabelle 2: Lösungen für RNA-Gelelektrophorese**

Lösung	Zusammensetzung	Endkonzentration	Bemerkung
<b>10 x MOPS</b>	MOPS	120 mM (41,8 g/l); pH 7,0	Nach dem Autoklavieren wird die Lösung dunkel gelagert.
	3 M NaOAC (pH 4,5) 0,5 M EDTA pH 8,0 DEPC-Wasser	49,8 mM (16,6 ml); pH 4,5 10 mM (20 ml); pH 8,0 ad 1000 ml	
<b>DEPC-Wasser</b>	Diethyl Pyrocarbonat Aqua bidest.	0,1 % ad 2500 ml	Inkubation bei 37°C über Nacht; 30 min Autoklavierung
<b>5 x Loading Puffer</b>	Bromphenolblau	25 mg/10 ml	1 Monat haltbar
	EDTA	500 mM	
	37 % Formaldehyd	720µl	
	Glycerin (86 %-ig)	2 ml	
	Deionisiertes Formamid	3,084 ml	
	10 x MOPS	4 ml	
	DEPC-Wasser	ad 10 ml	

#### 2.4.4 Quantitative „Real-Time“ Polymerase-Kettenreaktion

Zur Analyse der Transkriptmengen bestimmter Gene wurde die quantitative „Real time“ PCR (Polymerase chain reaction) verwandt. Bei dieser Methode wird die Gesamt-RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese wiederum dient als Ausgangstemplate für eine PCR Reaktion, bei der mittels Einbau von SYBR-Green markierter Nukleotide die Transkriptmenge photometrisch bestimmt wird. Der gemessene Wert wird dann anhand eines zellulären Standards („house keeping gene“) normalisiert und mit den Expressionsmengen unter anderen Bedingungen oder in einem anderen Stamm verglichen. Als „house keeping gene“ wurde immer die Gyrase von *S. epidermidis* verwendet.

Zur Synthese der cDNA wurden 2 µg gereinigter, DNA-freier RNA und 1 µl (500 ng) Random Primer (Invitrogen, Berlin, Deutschland) auf 10 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und die RNA für 10 min. bei 70°C denaturiert. Zur Stabilisierung der RNA wurde diese für 5 min. auf Eis abgekühlt und anschließend 10 µl Reaktionsstocklösung hinzugefügt. Die Synthese der cDNA wurde nun für 60 min. bei 49 °C in einem Heizblock durchgeführt. Zur Inaktivierung der Reaktion wurde die cDNA abschließend bei 70 °C für 15 min. inkubiert.

**Tabelle 3: Reaktionsstocklösung:**

Zusammensetzung	Mengen	Bemerkung
dNTP	1 $\mu$ l	je Base 20 mM frisch angesetzt
Superscript III <sup>aa</sup>	1 $\mu$ l	Reverse Transkriptase (Invitrogen)
5 x First-Strand Buffer	4 $\mu$ l	(Invitrogen)
DTT (0,1 M)	2 $\mu$ l	(Invitrogen)
RNase OUT <sup>TM</sup>	1 $\mu$ l	Optional (Invitrogen)
RNase freies Wasser	1 $\mu$ l	

Für die „Real-Time“ PCR Analyse wurde das „MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System“ (BIO-RAD, München, Deutschland) verwendet. Dabei wurden 0,5  $\mu$ l der cDNA und je 500 ng der jeweiligen Primer zusammen mit dem „iQ<sup>TM</sup> SYBR-Green Supermix“ (BIO-RAD, München, Deutschland) in einem 25  $\mu$ l Ansatz eingesetzt. Die Auswertung und Analyse der Daten wurde nach dem mathematischen Modell von Pfaffl (Pfaffl, 2001) durchgeführt.

#### 2.4.5 Globale Transkriptionsanalyse mittels Mikroarray Technik

Zum erfassen der globalen Transkriptionsanalyse wurden *S. epidermidis* spezifische DNA basierte Mikroarrays (Scienion, Berlin, Deutschland) verwendet. Dieser Mikroarray repräsentiert ca. 90 % des Genoms von *S. epidermidis* RP62A. Bei diesem Mikroarray werden zwei zu vergleichende RNA Proben separat unter Verwendung unterschiedlicher DIGE (Fluoreszenz-Farbstoff) markierter dTTPs (Cy3 und Cy5) in markierte cDNA umgeschrieben und auf die Glas-slides hybridisiert. Das Protokoll basiert auf den Herstellerangaben und alle Vorgänge wurden so gut wie möglich mit größtem Schutz vor Licht durchgeführt.

##### a.) Markierungsreaktion:

Zur cDNA Synthese wurden je Probe 10  $\mu$ g DNA-freier, gereinigter RNA zusammen mit 3  $\mu$ g Random Primer auf 15  $\mu$ l Volumen mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und anschließend für 10 min. bei 70°C denaturiert.

Die Probe wurde anschließend für 5 min. auf Raumtemperatur abgekühlt und dann 19  $\mu$ l Mastermix (Tabelle 4) hinzupipettiert. Nach Zugabe von 4  $\mu$ l des jeweiligen DIGE Farbstoffes (Cy3 oder Cy5 markierte dTTP) wurde der Ansatz resuspendiert und dann für 25 min. bei 50°C (PCR-Block) inkubiert. Nach Zugabe von 1  $\mu$ l Superscript III wurde der Ansatz weitere 35 min. bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion für 15 min. bei 70°C abgestoppt. Durch die Zugabe von 10  $\mu$ l 1 molarer NaOH und einer Inkubation für 15 min. bei 65°C wurde die RNA nun hydrolysiert und der Ansatz danach mit 25  $\mu$ l Tris-HCl (1 M, pH 7,5) neutralisiert.

**b.) Aufreinigung der cDNA**

Zur Aufreinigung der cDNA wurde das „QIAquick PCR Purification Kit®“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Der Ansatz wurde dafür mit 400 µl PB Puffer vermischt und auf die mitgelieferte Säule gegeben. Durch zentrifugieren bei ca. 10.000 x g wurde die cDNA an die Matrix der Säule gebunden. Das Eluat wurde verworfen. Nun wurde die Matrix 3 mal mit PE Puffer (je 500 µl) gewaschen und anschließend durch zentrifugieren (1 min. max. RT) getrocknet. Durch die Zugabe von 30 µl HPLC Wasser wurde die markierte cDNA gelöst und in einem neuen Reaktionsröhrchen gesammelt.

**c.) Kontrolle der cDNA Qualität**

Um die Effizienz der cDNA Synthese zu prüfen wurde 1 µl der cDNA mit 3 µl 87 %-igem Glycerol und 6 µl Wasser vermischt und auf einem 2 %-igem Agarosegel im Dunkeln elektrophoretisch aufgetrennt. Wichtig ist dabei, dass kein „normaler“ Laufpuffer verwendet wird, da dieser fluoreszierende Eigenschaften hat und somit beim Scannen stören würde. Um jedoch den Lauf der Elektrophorese beurteilen zu können wurde mit einigen „Taschen“ Abstand Laufpuffer aufgetragen. Zur Analyse der cDNA Qualität wurde das Gel abschließend mit einem Phosphoimager (Typhon 8600, GE healthcare, Freiburg, Deutschland) bei den entsprechenden Wellenlängen eingescannt und mit der Software Image Quant (GE healthcare, Freiburg, Deutschland) die Qualität und Intensität der cDNA Proben verglichen.

**d.) Vorbereitung der Hybridisierungskammer**

Die Hybridisierungskammern wurden vor jeder Verwendung gründlich gereinigt und dann mit Druckluft von etwaigen Staubresten befreit. In die entsprechenden Löcher (4 Stück) wurde jeweils 15 µl HPLC Wasser vorgegeben. Dieses dient dazu, die Luftfeuchtigkeit stabil zu halten und ein Austrocknen der Proben zu verhindern. Anschließend wurde der Mikroarray in die entsprechende Vertiefung gelegt.

**e.) Hybridisierung der cDNA**

Bei guter Qualität der cDNA wurde diese mittels einer „Speed Vac“ auf ein Volumen von 3 µl einrotiert. Anschließend wurden die beiden cDNAs (eine Probe Cy3, die andere Cy5) gemeinsam in 35 µl auf 60°C vortemperiertem sciHYP Puffer (Scienion, Berlin, Deutschland) aufgenommen und für weitere 2 min. bei 95°C denaturiert. Der Ansatz wurde dann in einem Heizblock bei 60°C für 1 min. abgekühlt und auf die vorbereiteten Mikroarrays in den Hybridisierungskammern gegeben. Nun wurde vorsichtig ein Deckgläschen entsprechender Größe auf den Mikroarray gelegt, damit sich der Ansatz gleichmäßig über den Array verteilen konnte und nicht austrocknete. Die Kammer wurde abschließend verschlossen und dann für 2 bis 3 Tage bei 49 °C in einem Wasserbad inkubiert.

#### **f.) Waschen des Mikroarrays**

Um ungebundene oder unspezifische cDNA zu entfernen wurde der Mikroarray mit drei Waschpuffern (siehe Tabelle 5) gewaschen. Dabei wurden die Mikroarrays nach Entfernen des Deckgläschens für jeweils 5 min. in Puffer 1 und 2 in den entsprechenden, gereinigten Waschbehältern auf einem Schüttler gewaschen. Die Mikroarrays wurden dann 4- bis 5-mal in den auf 45°C vorgewärmten Puffer 3 untergetaucht und dann unmittelbar in ein Falconröhrchen mit 100 %-igem reinem Ethanol getaucht. Direkt danach wurde der Ethanol durch gefilterte Druckluft vom Mikroarray getrocknet und dieser dann in ein neues, aluminiumummanteltes Falconröhrchen überführt und weiter vor Licht geschützt.

#### **g.) Scannen des Mikroarrays**

Für die Analyse der Mikroarray Daten des *S. epidermidis* 567 und 567-1 wurde die Software Version 4.0 von Genpix Pro verwendet. Zur Analyse der *S. epidermidis* 678 Biofilm Experimente stand bereits die Version 6.0 zu Verfügung. In beiden Fällen wurde der Mikroarray bei einer Ratio von ca. 1 (635nm /532 nm) eingescannt.

#### **h.) Auswertung der Mikroarray Ergebnisse**

Die Daten des *S. epidermidis* 567 und 567-1 Experiments wurden mit einer von mir in VBA programmierten Excel-Datei ausgewertet, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Software zur Auswertung zur Verfügung stand. Die lineare Normalisierung des Datensatzes wurde unter Genpix Pro 4.0 vorgenommen und die entsprechenden parallelen Experimente in dem Programm für eine Auswertung verwendet. Es wurden nur signifikante Daten verwendet, die in wiederholbaren Fällen ein gleiches Expressionmuster aufwiesen. Als zentraler Wert wurde der „Ratio of Median“ verwendet, wobei die Spotintensität mindestens 2-fach über dem Hintergrund liegen musste. Ein Gen wurde dann als anders reguliert im Vergleich zur mit hybridisierten Probe betrachtet, wenn sein „Ratio of Median“ über 2 oder unter 0,5 lag.

Bei der Analyse der Biofilmexperimente mit *S. epidermidis* 678 wurde Axon Acuity 4.0 als Datenbank und Auswertungssoftware verwendet und wie folgt verfahren: Nach dem Scannen wurde ein von mir modifiziertes Gitter (englisch Grid) auf das gescannte Bild angewendet, welches mittels der Analysefunktion der Software den annotierten Genen Expressionswerte zuordnet. Diese Daten wurden dann in die Datenbanksoftware Axon Acuity 4.0 übertragen. Dort wurden mindestens 3 parallele Experimente zur Erstellung eines Datensatzes verwendet. Hier die Prozedur in der Kurzbeschreibung (Details sind dem Handbuch zu entnehmen): Zunächst wurden alle Datensätze angeglichen, d.h. Mikroarrays wurden via „Dyeswap“ in die Selbe Datenstruktur konvertiert (635nm/532nm → 532nm/635nm). Die sich daraus ergebenden analogen Repliken der Versuche wurden dann gemeinsam linearer und nach Lowess- Normalisiert, um Artefakte,

die aus der Technik resultieren, zu minimieren. Die nun normalisierten Daten der Repliken wurden per „Query Wizard“ in einen Datensatz transferiert. Dabei wurden mittels Logarithmus Datenpunkte, bei denen der Wert nicht mindestens 2 mal über dem Hintergrund waren, bzw. die als „bad“ oder „absent“ markiert waren, entfernt. Die Datensätze der sich daraus ergebenden Datenbank wurden einem einseitigen t-Test mit einem p-Wert von 0,05 unterzogen, um signifikante von unspezifischen Daten zu trennen. Anschließend wurde der Datensatz per Algorithmus nach Werten deren Ratio des Medians über 2, bzw. unterhalb 0,5 lag, sortiert, um die signifikant regulierten Gene zu erhalten. Der sich daraus ergebene Datensatz wurde dann in einer Excel-Datei abgespeichert und unter molekularbiologischen, regulatorischen Gesichtspunkten ausgewertet.

**Tabelle 4: Mastermix Mikroarray**

Zusammensetzung	Mengen	Bemerkung
dNTP-Mikroarray	4 µl	5 mM dATP, dCTP, dGTP, 2 mM dTTP
Superscript III <sup>aa</sup>	2 µl	Reverse Transkriptase (Invitrogen)
5 x First-Strand Buffer	8 µl	(Invitrogen)
DTT (0,1M)	4 µl	(Invitrogen)
RNase OUT™	1 µl	Optional (Invitrogen)

**Tabelle 5: Waschpuffer Mikroarray**

Waschpuffer	Bestandteile	Menge auf 250 ml
Wash solution 1	1 x SSC (HPLC) 0,03 % SDS	12,5 ml (20 x SSC (HPLC)) 0,75 ml (10 % SDS)
Wash solution 2	0,2 x SSC (HPLC)	2,5 ml (20 x SSC (HPLC))
Wash solution 3	0,05 x SSC (HPLC)	625 µl (20 x SSC (HPLC)) Alle Puffer add. 250 ml mit HPLC Wasser

## 2.5 DNA Analytik

### 2.5.1 Präparation von chromosomaler DNA aus *S. epidermidis*

Zur Präparation von chromosomaler DNA wurden 2 ml einer Übernachtskultur bei 13.792 x g für 2 min. zentrifugiert und das Sediment in 1 ml TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Puffer I aufgenommen und gut mit 15 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) sowie 20 µl Lysostaphin (2 mg/ml) vermischt und resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde der Ansatz bei 37°C inkubiert und durchmischt. Nach ungefähr 10 min. wurde der Ansatz viskös und klar und die Lyse beendet. Zum Verdau der Proteine wurden 375 µl TE-Puffer, 225 µl 10 %-iges SDS und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) zum Ansatz gegeben und bei 55°C für 30 min. inkubiert. Nach der Zugabe von 150 µl 5 M Natriumperchlorat wurde der Ansatz kurz geschwenkt und ½ Volumen (ca. 450 µl) Chloroform-Isoamylalkohol dazugegeben. Der Ansatz wurde für eineinhalb Stunden kräftig geschüttelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei ca. 13.000 x g für 10 Minuten. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und auf zwei neue Eppendorfgefäße verteilt. Nun wurde die DNA mit dem doppelten Volumenanteil an 96%-igem Ethanol bei -80°C für 20 Minuten gefällt. Die DNA wurde anschließend für 10 min. bei 13.792 x g herunter zentrifugiert und dann einmal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde an der Luft getrocknet und in 50 µl EB-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst.

**Tabelle 6: Lösungen zur Isolation von chromosomaler DNA aus *S. epidermidis***

Lösungen	Zusammensetzung	Konzentration
Puffer I	Tris-HCl pH 7,5	10 mM
	Sucrose	25 % (v/v)
TE Puffer	Tris-HCl pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
Chloroform-Isoamylalkohol	Chloroform	96 % (v/v)
	Isoamylalkohol	4 % (v/v)
EB- Puffer	Tris-HCl pH 8,5	10 mM

### 2.5.2 PCR: Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dafür wurde eine hitzestabile Polymerase (je nach Anwendung Taq (ohne Profreading)/Dap/Goldstar) verwendet. Als Matrize wurde die chromosomale DNA von *S. epidermidis* verwendet. Die entsprechenden Primer des zu amplifizierenden Fragmentes wurden so ausgewählt, dass ein hoher GC-Gehalt, keine „Loops“ und eine Länge von 20

Basenpaaren erreicht wurde. Der PCR-Ansatz (siehe Tabelle 7) wurde in einem Thermocycler amplifiziert. Zur Amplifikation wurde ein Programm eingesetzt, das aus Wiederholungen von Denaturierungs-, Annealings- und Elongations-Schritten bestand. Die Denaturierung der DNA erfolgte standardmäßig bei 95°C für 1 Minute. Anschließend wurde die Temperatur für das Annealing der Primer an die chromosomalen DNA gesenkt. Die berechnete Schmelztemperatur  $T_m$  wurde als Grundlage für eine Annealing-Temperatur herangezogen. Die Elongation wurde bei 72°C durchgeführt. Der Zyklus wurde je nach Primer und gewünschter Menge wiederholt (Standard 30 Zyklen). Die Qualität und Fragmentgröße der amplifizierten DNA wurde in einem 1%-igen Agarosegel überprüft. Zur Verwendung des PCR-Produktes als Sonde wurde das Produkt mittels „QIAquick-PCR-Purification-Kit“<sup>®</sup> nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

$$T_m = (69,3 + 0,41 \times ([G\%] + [C\%]) - 650/n) - 5^\circ\text{C}$$

n = Summe der Länge des Oligo-Primer/2

**Tabelle 7: Zusammensetzung PCR-Ansatz: Bsp. Taq-Polymerase**

Komponente	Menge
10 x Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> [100 mM]	1,5 µl
dNTPs [20 mM je Nukleotid]	0,5 µl
Primer forward [10 mM]	1 µl
Primer reward [10 mM]	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
Template	je nach Konzentration
Aqua bidest.	Ad 50 µl

### 2.5.3 DNA-Restriktion

Um DNA an definierten Stellen zu spalten wurden Restriktionsenzyme eingesetzt. Eine Unit [U] dieses Enzyms spaltet 1 µg DNA innerhalb einer Stunde. Der Restriktionsansatz (Tabelle 8) wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte eine Auftrennung mittels der Gelelektrophorese. Bei einem Doppelverdau wurde der 10 x One-Phor-All Buffer PLUS von (GE healthcare, Freiburg, Deutschland) verwendet.



**Tabelle 8: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
DNA	0,5 bis 2 µg
10 x Puffer (Typ je nach Enzym)	1 µl
Enzym	1 µl
Aqua bidest.	Ad 10 µl

### 2.5.4 Gelelektrophorese zur DNA-Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen

Bei der Agarose-Gelelektrophorese erfolgt die Auftrennung von DNA ihrem Molekulargewicht nach im elektrischen Feld. Es wurde zur Auftrennung der DNA ein 1 %-iges Agarose verwendet, welches im Bereich von 1 bis 10 kb eine gute Auftrennung ermöglicht. Die Agarose wurde in (150 ml) Laufpuffer angesetzt (siehe Tabelle 9) und aufgekocht. Nach dem Erkalten der Agarose auf ca. 50°C wurde das Gel gegossen. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die DNA wurde mit 5 x Probenpuffer vermischt (10 µl DNA + 2-3 µl Probenpuffer) und in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde ein DNA- Marker aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 110 V für ca. 60 Minuten. Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter der Geldokumentationseinheit wurde dann mit UV- Licht die angefärbte DNA sichtbar gemacht und das Ergebnis dokumentiert.

**Tabelle 9: Zusammensetzung von DNA-Probenpuffer und TAE-Laufpuffer**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Konzentration</b>
DNA-Probenpuffer	Bromphenolblau	0,25 %
	Xylenyanol	0,25 %
	Glycerin	50 %
	SDS	1 %
	TAE	1 x
	EDTA	100 mM
	50 x TAE	Tris
	Essigsäure	57,1 ml
	EDTA-Stocklösung [0,5 M; pH 8,0]	100 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

## 2.6 Proteinanalytik

### 2.6.1 Präparation von Proteinen aus *S. epidermidis*

#### 2.6.1.1 Präparation extrazellulärer Proteine

Die Präparation extrazellulärer Proteine erfolgte wie von mir in meiner Diplomarbeit beschrieben.

#### 2.6.1.2 Präparation von zytoplasmatischen Proteinen

Zur Präparation zytoplasmatischer Proteine aus *S. epidermidis* wurde eine mechanische Aufschlussmethode mittels Fast-Prep durchgeführt. Die Bakterien wurden in TSB kultiviert und in verschiedenen Wachstumsphasen geerntet. Das Volumen der genommenen Probe war abhängig von der optischen Dichte (10 ml  $\sim$ OD<sub>600</sub> 1,5; 1 ml  $\sim$ OD<sub>600</sub> 6). Zunächst wurde die Proteinbiosynthese in den Bakterien durch die Zugabe von 20 µg/ml Chloramphenicol Endkonzentration gestoppt (3 min. bei RT unter schütteln inkubiert). Anschließend wurden die Zellen für 10 min. bei 6328 x g und 4°C pelletiert und dann 3-mal mit je 5 ml 1 x PBS mit 20 µg/ml Chloramphenicol gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in 1 µl Tris-HCl (10 mM, pH 7,5) resuspendiert und zusammen mit 100 µl „EDTA-free“ Protease-Inhibitormix (HoffmanLaRoche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) in „Lysing Matrix E“ Gefäße (Q-BIOgene, Heidelberg, Deutschland) überführt. Nun wurde die Zellsuspension in der Fast-Prep Maschine Savant BIO101 (Q-BIOgene, Heidelberg, Deutschland) bis zu 6 mal auf der Stufe 6.5 für je 30 sec. homogenisiert, wobei die Probe zwischen den Schritten jeweils für mindestens eine Minute auf Eis gekühlt wurde. Danach wurde das Homogenat für 15 min. bei Raumtemperatur mit DNase/RNase verdaut, wobei die Lösung regelmäßig gevortext wurde, bis der Überstand klarer wurde. Die Probe wurde nun für 10 min. bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um Zellreste und andere unlösliche Bestandteile zu sedimentieren und der Überstand dann in neue Reaktionsgefäße überführt. In diesem war bereits 5 M Harnstoff (bei 1 ml 350 mg) vorgelegt worden. Anschließend wurde dieser für ca. 30 min. bei Raumtemperatur und unter regelmäßigem vortexen gelöst. Es folgte dann eine TCA (trichloroacetic acid) Fällung mit einer Endkonzentration von 20 % (300 µl) für 1 h auf Eis. Das Protein wurde dann für 20 min. bei 4°C und 13.792 x g pelletiert. Um das TCA zu entfernen folgten dann 4 Waschschrte mit jeweils 1 ml Aceton, wobei das Pellet jedes Mal weitestgehend in

Lösung gebracht wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Aceton gänzlich abgenommen und die Probe für einige Minuten bei 37°C vollständig getrocknet. Das Proteinpellet wurde dann in Lysepuffer resuspendiert (Tabelle 10) und bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 10: Zusammensetzung Lysepuffer**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
Chaps	19,8 mM

## **2.6.2 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die Auftrennung von Proteinen in der zweidimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde erstmals 1975 durchgeführt (Klose J., 1975; O'Farrell P.H., 1975). Sie beruht auf der Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt in der ersten Dimension und nach ihrer Masse in der zweiten Dimension. Durch die Verwendung der immobilisierten pH Gradienten Streifen (Görg A., 1995) wurde in der ersten Dimension eine hohe Auflösung und Reproduzierbarkeit erreicht (Blomberg A., 1995).

Die Rehydratisierung, Isoelektrische Fokussierung, Äquilibrierung und die Elektrophorese der zweiten Dimension wurden exakt nach dem von GE Healthcare/ Amersham Biosciences herausgegebene Handbuch „2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients - Principles and Methods“ durchgeführt.

### **2.6.2.1 Färbung der Proteingele mittels „Silver“ Coomassie**

Die Gele wurden für eine Stunde fixiert (Lösungen Tabelle 11). Es folgten zwei Waschschriffe mit Aqua dest. für jeweils 10 Minuten und ein weiteres Waschen in Fixierer-Lösung. Zur Färbung wurden die Gele mindestens 2 Tage mit der kolloidalen Färbelösung auf einem Vertikalschüttler inkubiert. Um das nicht an Proteine gebundene Coomassie aus den Gelen zu entfernen, wurden die Gele mehrfach mit Aqua dest. gewaschen. Zur Aufbewahrung wurden die Gele in Klarsichtfolien eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

**Tabelle 11: Lösungen für die „Silver“ Coomassiefärbung**

<b>Lösung</b>	<b>Komponente</b>	<b>Menge/ Konzentration</b>
Fixierer	Ethanol 96 %	40 % (v/v)
	Essigsäure 100 %	10 % (v/v)
	Aqua bidest.	ad 1000 ml
Kolloidales Coomassie	Ammonium Sulfat	756,8 mM
		100 g/l
	Phosphorsäure 85 %	100 ml/l
	dH <sub>2</sub> O	Add. 250 ml
	0,12 % Coomassie B1131	1,2 g/l
Nach einer Stunde Lösen weiter hinzugeben:	96 %-iger Ethanol	200 ml/l
	dH <sub>2</sub> O	Add. 1 l (ca. 500 ml)

### 2.6.2.2 DIGE Fluoreszenzfärbung

Zur Analyse der Proteinexpression in *S. epidermidis* wurde die „CyDYe DIGE Fluors (minimal dyes) for ETTAN DIGE“ (GE healthcare, Freiburg, Deutschland) verwendet. Bei dieser äußerst sensitiven Methode werden zwei zu vergleichende Proteinproben zunächst separat von einander mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen (Cy3 und Cy5) markiert, dann gemischt und gemeinsam per 2-Dimensionaler SDS-Page Gelelektrophorese aufgetrennt und das resultierende 2-D Gel mittels Phosphoimager (Typhoon 8600, GE healthcare, Freiburg, Deutschland) eingescannt. Die beiden bei 635 nm, bzw. 532 nm gescannten Bilder lassen sich dann unmittelbar ohne „warp“ Prozess miteinander vergleichen und die die Proteinmenge in Relation zueinander setzen. Die Markierungsreaktion wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.6.2.3 Bilderfassung von 2-D Gele

Die mit „Silver“ Coomassie gefärbten Gele wurden auf einem HP Scanjet 4300 eingescannt. Die Grafikdateien wurden im unkomprimierten TIF Format gespeichert und zur besseren Verarbeitung mit der Decodon Delta 2D Software die Bilddatei auf 1000 x 800 Pixel reduziert.

### 2.6.2.4 Analyse von 2-D Gelen mittels Delta-2D Software

Die vergleichende Analyse der Proteingele wurde mit der Software Delta 2D<sup>®</sup> (Decodon, Greifswald, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden gleiche Proteinspots in 2 verschiedenen Gel-Bildern per „warping“ zur Deckung gebracht und anschließend die Färbungsintensität der Gel-Bilder aneinander angeglichen. Interessante Spots auf kolloidal gefärbten Gelen wurden markiert und später massenspektrometrisch analysiert. Die DIGE-gefärbten Gele wurden in Projekte gegliedert. Für die Datenanalyse wurden für jedes Experiment mindestens 3 unabhängige, parallele Gele verwendet, die zu einem Fusionsgel transformiert wurden, welches dann als Grundlage für die Datenanalyse diente. Alle Gele wurden den Angaben des Herstellers der Software entsprechend ausgewertet. Nach entsprechender Normalisierung wurden Proteinspots, die mit einem „Ratio of Median“ Wert  $\geq 2$  fach oder  $\leq 0,5$  fach divergent waren, als signifikant reguliert betrachtet.

### 2.6.3 Identifizierung von Proteinen aus dem 2-D Gel mittels Massenspektroskopie

Die massenspektroskopischen Analysen wurden in Kooperation mit Herrn Prof. Hecker und Frau Dr. Engelmann in Greifswald durchgeführt. Hier wird nur kurz das Prinzip der Analyse dargestellt:

Um Größe und Form der Proteingele unter dem „Spot-picking“ Roboter zu erhalten, wurden die Proteingele zuvor für 1 Stunde gewässert. Das gewässerte Gel wurde in dem Roboter platziert und arretiert. Mit der im Roboter eingebauten Kamera wurde das Gel fotografiert. Auf diesem Bild wurden an der Computersteuerung des Roboters die auszuschneidenden Spots markiert. Der Roboter schnitt nun die markierten Spots aus und legte jeden einzelnen in eine dafür vorgesehene Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte. Die Platte wurde bis zum Verdau im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Der Verdau erfolgte automatisch in der Ettan Spot Handling Workstation (GE healthcare, Freiburg, Deutschland). Dabei fand ein „In-Gel-Verdau“ statt. Als verdauendes Enzym wurde Trypsin verwendet, das spezifisch die Peptidbindungen am C- Terminus von Lysin (K) und Arginin (R) spaltet. Dabei entsteht ein für das jeweilige Protein spezifisches Fragmentmuster. Jedes einzelne Fragment hat eine spezifische Masse und kann später im MALDI-TOF-MS nachgewiesen werden. Die Gesamtheit aller Massen der Fragmente des Proteins ergibt letztlich den „Peptidmass-Fingerprint“. Durch den Vergleich des Massendatensatzes eines Proteins mit einer Datenbank kann das Protein identifiziert werden. Je mehr einzelne Fragmentmassen zwischen Protein und Datenbank übereinstimmen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Ergebnis der Identifikation stimmt.

Im Verdauroboter wurde zunächst das Coomassie aus dem Gel gewaschen. Nach dem Trypsinverdau wurde das Gel durch Waschen mit Acetonitril entfernt. Das verdaute Protein wurde vom Roboter direkt auf die Messplatte getropft. Die beladene Platte wurde mit einem MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometer- Time Of Flight) analysiert. Im MALDI-TOF-MS werden die in einer kristallinen Matrix befindlichen Fragmente mittels eines Laserbeschusses gasförmig ionisiert. Diese Ionen werden in einem im Vakuum befindlichen elektrischen Feld beschleunigt. Ihrer Masse wird dadurch bestimmt, dass alle Ionen nach der Beschleunigungsstrecke die gleiche kinetische Energie haben, aber aufgrund ihrer Masse eine unterschiedliche Flugzeit auf der nachfolgenden Driftstrecke benötigen. Die gemessenen Massenspektren wurden bereits vorgeeicht, so dass eine unmittelbare Auswertung der Daten mit GPMW™ (Lighthouse, San Diego, USA) möglich war. Als Standard wurden eine maximale Massenabweichung von 50 ppm und als Proteinmodifikation Carbamidomethylierungen bei Cystein, sowie Methionin-Sulfoxidierungen eingestellt. Als Datenbank wurde eine von Scienion annotierte Version des *S. epidermidis* RP62A verwandt.

## 2.7 Konfokale Lasermikroskopie

Zur Analyse der Biofilmbildung unter zeitlichen und lebend/tot Fragestellungen wurde unter anderem die konfokale Lasermikroskopie eingesetzt. Dafür wurden die entsprechenden *S. epidermidis* Stämme analog zu den Biofilm-Experimenten in Mikrotiterplatten oder Zellkulturflaschen in einer Schüttelkultur von einer OD<sub>600</sub> 0,05 zu OD<sub>600</sub> 0,5 vorkultiviert und dann in einer 1:10 Verdünnung in 900 µl vorgewärmtes Medium in „Chamber slide®“ Systeme (Lab-Tek, Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) pipettiert. Diese Kammern ermöglichen es, den Biofilm von unten durch einen durchsichtigen Objektträger bei verschiedenen Wellenlängen zu mikroskopieren. Zum einen konnte unter Zuhilfenahme einer 37°C Temperaturkammer der zeitliche Verlauf der Biofilmbildung durch Intervall-Fotografie aufgezeichnet werden. Zum anderen war es möglich, unter Verwendung des „BacLight®“ live/dead Kits (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) den Anteil von lebenden und toten Zellen innerhalb eines Biofilms unter verschiedenen Bedingungen nach verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen. Die Versuche wurden alle nach den Handbüchern des Kits, bzw. des Zeiss Axiovert 100M Mikroskops durchgeführt und die Bilder entsprechend aufgezeichnet.

### 3 Materialien

#### 3.1 Chemikalien

**Tabelle 12: Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Ammoniumsulfat	ROTH, Karlsruhe
Acrylamid	ROTH, Karlsruhe
Bisacrylamid	ROTH, Karlsruhe
CHAPS	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Serva G Blue	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliantblau G-250	AppliChem, Darmstadt
DTT	ROTH, Karlsruhe/AppliChem, Darmstadt
Dry strip cover fluid	Amersham Biosciences, Freiburg
Glycin	ROTH, Karlsruhe
Iodacetamid	Sigma, Mannheim
Pharmalyte™ 3-10	GE healthcare, Freiburg
Protease Inhibitor Complete Mini EDTA free	Roche, Mannheim
SDS	AppliChem, Darmstadt
Silber-Nitrat	Sigma, Mannheim
TEMED	ROTH, Karlsruhe
Tris	AppliChem, Darmstadt
Urea	AppliChem, Darmstadt

Alle weiteren benötigten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

ROTH, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Roche, Mannheim; Sigma, Mannheim; AppliChem; Merck, Darmstadt; Gibco, Eggenstein; GE healthcare (Amersham Biosciences), Freiburg; Difco, Augsburg.

## 3.2 Enzyme

**Tabelle 13: Verwendete Enzyme**

Enzym	Hersteller
DNase	Invitrogen, Karlsruhe
Lysozym	Sigma, Mannheim
Lysostaphin	Sigma, Mannheim
Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Trypsin (porcine)	Promega

Die Enzyme wurden gemäß der Empfehlungen der Hersteller gelagert und verwendet.

## 3.3 Reaktionskits

**Tabelle 14: Verwendete Kits**

Kits	Hersteller
„API-Staph“	Bio Merieux, Lyon, Frankreich
„BacLight live/dead“	Invitrogen, Karlsruhe
„Destreak Solution“	GE healthcare, Freiburg
„DIGE minimal labelling“	GE healthcare, Freiburg
„RNeasy™ Mini-Kit“	Qiagen, Hilden
„QIAquick PCR Purification Kit“	Qiagen, Hilden

Alle Kits wurden gemäß den Anleitungen der Hersteller verwendet.

## 3.4 Geräte und Hilfsmittel

**Tabelle 15: Verwendete Geräte und Hilfsmittel**

Geräte/Hilfsmittel	Hersteller
37°C Schüttler	Innova 4300, Innova
Bioanalyzer 2100	Agilent Techn., Palo Alto, CA
Computer	PCG-NV309 VAIO Laptop, SONY Athlon XP 2100+ Workstation
DNA- Elektrophorese Gelkammer	DNA Sub Cell™, Biorad
Feinwaage	Balance, Ohyo
Filme	Hyperfilm ECL™, Amersham Biosciences
Filmentwicklungsgerät	Curix 60, Agfa
Fluoreszenzdetektor	Typhoon 8600, Amersham Biosciences
Glaskugelzellaufschlusseinheit	Fast Prep™ FP120 BIO101, Savant



<b>Geräte/Hilfsmittel</b>	<b>Hersteller</b>
Geldokumentationsanlage	Gel Doc 2000, Bio-Rad
Heizblock	Liebisch
Horizontale Elektrophorese Gelkammer	Ettan DALT six, Amersham Biosciences
Hybridisierungsöfen	Mini 10, Hybaid
Immobilisierte pH Gradienten Streifen	IPG-Strips, Amersham Biosciences pH 3-10; pH 4-7; jeweils 18 bzw. 24 cm
Inkubator	Heraeus
Kryostaten (für 1 & 2 Dimension)	MultiTempIII, Amersham Biosciences
Kühlschrank/-20°C Eisfach	Privileg
Kühlzentrifugen	J2-HC Zentrifuge, Festwinkelrotor JA10/20, Beckman Megafuge 1.0R, Heraeus Biofuge 13R, Heraeus
Magnetrührer	M21, GLW
MALDI-TOF-MS	Proteome- Analyzer 4700, Applied Biosystems
Mikropipetten	0,5 µl - 10µl, Eppendorf 1 µl - 20 µl, Gilson 20 µl – 200 µl, Eppendorf 200 µl – 1 ml, Gilson
Mikroskop	PMLS, Leica
Mikrowellengerät	Micromat, AEG
Netzteile (Power supplies)	
DNA-Gele	Power PAC 300, Bio-Rad
RNA-Gele	E455, Consort
Zweite Dimension Protein Gele	E835, Consort
IEF	EPS 3500XL, Amersham Biosciences
Photometer	Ultrospec3000, Amersham Biosciences
pH-Meter	WTW ph523, Metrokur Herisan
Polymerasekettenreaktionseinheit	T3 Thermocycler, Biometra
Rehydratisierungs-Schale	18/24 cm Tray, Amersham Biosciences
RNA-Elektrophorese Gelkammer	Gelkammer, ROTH
Scanner	HP ScanJet Ilcx
Sterilarbeitsbank	NaAirII Typ A/B3, NaAir
„Speed Vac“	Speed Vac <sup>R</sup> SC110, Savant
Tischzentrifuge	Zentrifuge 5415c, Eppendorf
UV- Nukleinsäuren „cross-linker“	GS Gene Linker <sup>TM</sup> UV Chamber, Bio-Rad
Verdauroboter	Ettan Spot Handling Workstation, Amersham Biosciences

<b>Geräte/Hilfsmittel</b>	<b>Hersteller</b>
Vertikalschüttler	H5501 digital, Kika Labortechnik
Videoprinter	P90, Mitsubishi
Vortexer	L46, GLW
Wagen	470, Kern
	Navigator™, Ohaus
Wasserbad	1083, GFL
Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup>	REF 353M2 Vented cap BD Falcon™
Zellkulturplatten (96-Loch)	CELLSTAR No 655166 Flat Botton, Greiner Bio-one
Spotpicking-Workstation	Bio-Rad

### 3.5 Kulturmedien und Agarplatten

Alle Nährmedien wurden bei 110°C für 10 Minuten autoklaviert. Zusätze wurden gegebenenfalls nach dem Abkühlen der Lösung auf 40 bis 50°C hinzugegeben.

**Tabelle 16: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien und Fertigmedien**

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>B- Medium</b>	
Bacto Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/l
Aqua bidest.	ad 1 l
<b>LB (Luria- Bertani)- Medium</b>	
Trypton- Caseinpepton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
Aqua bidest.	ad 1 l
<b>TSB (Trypticase-Soy-Broth)</b>	
Bei diesem Medium wurden 30 g/l des Fertigpräperates der Firma BD verwendet. Die Zusammensetzung des Produktes ist für 30 g laut Herstellerangaben wie folgend:	
Caseinpepton	17 g
Pepton aus Sojamehl	3 g
Glukose	2,5 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g

Zur Herstellung der Agarplatten wurden jeweils 14 g/l Agarose zugesetzt und die Platten nach Erkalten des Mediums auf 40 bis 50°C in Petrischalen gegossen.

**Tabelle 17: Medienzusätze**

<b>Medienzusatz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Konzentration der Stocklösung; Lagerungsbedingungen</b>
Erythromycin	0,01 mg/ml	100 mg/ml in Ethanol [100%]; -20°C 10 mg/ml in Ethanol [100%]; -20°C

### 3.6 Allgemeine Puffer und Lösungen

**Tabelle 18: Angaben zur Zusammensetzung allgemeiner Puffer und Lösungen**

<b>Pufferbezeichnung</b>	<b>Bestandteile/Stockkonzentration</b>	<b>Endkonzentration; eingestellter pH</b>
<b>EB- Puffer</b>	Tris/HCl	10 mM; pH 8,5
<b>50x TAE</b>	Tris Essigsäure EDTA Aqua dest.	242 g/l 57,1 ml/l 50 mM; pH 8,0 ad 1 l
<b>10x PBS</b>	NaCl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Aqua dest.	64 g/ 0,8 l 10g / 0,8 l 1,6g/ 0,8 l 1,6g/ 0,8 l ad 0,8 l; pH 7,5

### 3.7 Software

**Tabelle 19: Verwendete Computersoftware**

<b>Software; Versionsbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Delta 2D	Decodon, Greifswald, Deutschland
GPMW 4.1	Lighthouse Data, Odense M. Dänemark
Office 2003	Microsoft, Remond, USA
Photoshop 5.0 Limited Edition	Adobe System Inc., San Jose, CA, USA
Windows XP	Microsoft, Remond, USA

### 3.8 Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotide wurden bei der Firma Sigma-ARK in Darmstadt bestellt und synthetisiert. Es wurden jeweils eine 100 mM und eine 10 mM Stocklösung mit Aqua bidest. aliquotiert. Die Primer wurden bei -20°C gelagert.

**Tabelle 20: Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Oligonukleotid-Primer**

Name	Sequenz (5' → 3')
agr1	GAGGATCCGAGTGACAAGTAGGATACT
agr2	GAGGAATCCTCGTGCCAATGTTACGT
gyr1	TTATGGTGCTGGACAGATACA
gyr2	CACCGTGAAGACCGCCAGATA
icaA1	AACAAGTTGAAGGCATCTCC
icaA2	GATGCTTGTTTGATTCCCT
RNAIII1	ACGTAACACTGAGTCCAAGGA
RNAIII2	TGAAAAATTTGCTTAATCTAGT
SE0478-1	CACATAAAACAAGAAAATCGTACAC
SE0478-2	CGAACCACCAGTCTTAGTATTTTCG
SE0479-1	GATATGCAACTTGATATACCTTTC
SE0479-2	CTTTAATGCGCATAGGTATCTC
sspA1	CATTCCTCACTTGGCACAGA
sspA2	TGACCCACAAATTTGCCA
CodY1	TGCAGCCACTGTAATTGGAA
CodY2	TGATCGTGTAATGCCCACTC

### 3.9 DNA-Größenmarker

**Tabelle 21: Fragmentgrößen des Gene-Ruler™ 1 kb DNA Leiter (MBI-Fermentas)**

Fragmentnummer	Fragmentgröße [bp]
1	10000
2	8000
3	6000
4	5000
5	4000
6	3500
7	3000
8	2500
9	2000
10	1500
11	1000
12	750
13	500
14	250



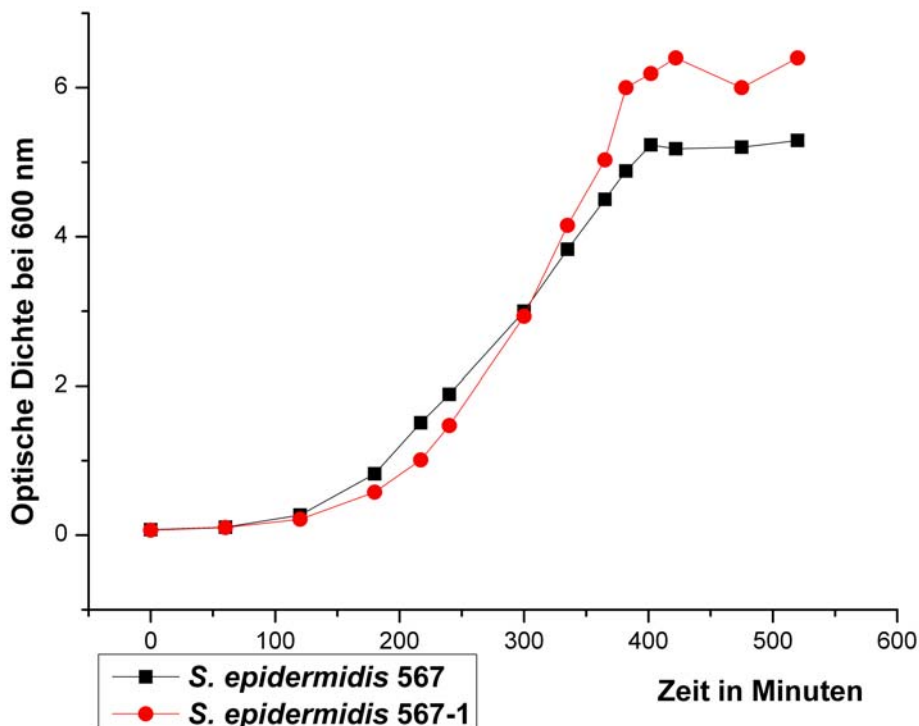
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zum Quorum-sensing System : „accessory gene regulatory system“ (Agr) in *S. epidermidis*

#### 4.1.1 Der Einfluss des Agr Quorum-sensing Systems auf das Wachstum von *S. epidermidis*

Da ein Quorum-sensing System im unmittelbaren Zusammenhang mit dem Wachstum eines Bakteriums steht, waren Wachstumsexperimente zentraler Ausgangspunkt zur Untersuchung des Einflusses einer  $\Delta agr$  Mutation in *S. epidermidis*. Zur Untersuchung verwendet wurden das klinische Harnwegsisolat *S. epidermidis* 567 und die von S. Rachid konstruierte isogene  $\Delta agr$  Mutante *S. epidermidis* 567-1 (Batzilla *et al.*, 2006). Da ein eindeutiger Einfluss erst bei einer hohen optischen Dichte erwartet wurde, konnte nur ein sehr reichhaltiges Medium wie TSB eingesetzt werden, in dem *S. epidermidis* entsprechend gut bis zu einer Dichte von über  $OD_{600}$  5 wächst. Abbildung 1 zeigt deutlich die Wachstumsunterschiede der beiden Stämme in TSB Medium. Zu Beginn des Wachstums hat die Mutante eine leicht verlängerte Lag-Phase beginnt dann jedoch in der späten exponentiellen Phase den Wildtyp zu überholen und erreicht reproduzierbar eine höhere optische Dichte in der stationären Phase.

Abbildung 1: Repräsentative Wachstumskurven von *S. epidermidis* 567 und *S. epidermidis* 567-1 in einer TSB Schüttelkultur



### 4.1.2 Der Einfluss des Agr Quorum-sensing Systems auf das Langzeitüberleben und Wachstum von *S. epidermidis*

Die natürliche Umgebung im Wirt von Staphylokokken wird geprägt von Nährstofflimitation aber auch von nährstoffreichen Phasen mit daraus resultierendem starkem Wachstum. Von daher ist auch der Einfluss des Agr-Systems auf das Langzeitüberleben von Interesse. Da jedoch einige *S. epidermidis*-Stämme auch in Schüttelkultur stark verklumpen, war erwartet worden, dass sich die CFU (Colony forming units) durch Ausplattieren nur ungenau bestimmen lassen würde. Daher wurde ein Assay mit Glaskugeln (Fast-Prep System) etabliert, der diese Bakterienaggregate durch Scherkräfte mechanisch lösen sollte. Im Verlauf der Assay-Etablierung stellte sich jedoch heraus, dass *S. epidermidis* 567 und 567-1 so gut wie nicht in Schüttelkultur aggregierten, weshalb problemlos die CFU erstellt werden konnten. Abbildung 2 zeigt die Langzeitwachstumskurven von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen  $\Delta agr$ -Mutante bis zu 96 Stunden. Über den gesamten Zeitraum zeigt die  $\Delta agr$ -Mutante eine höhere optische Dichte. Vergleicht man allerdings diese Werte mit den Ergebnissen der CFU Analyse (Abbildung 3), so wird ersichtlich, dass noch vor Erreichen der stationären Phase ein großer Teil der Bakterien der  $\Delta agr$ -Mutante abstirbt und nur als Zellfragmente vorliegen. Vor allem in einem Zeitraum bis zu 65 Stunden zeigt der *agr*-Wildtyp eine erheblich bessere Überlebensrate als die isogene  $\Delta agr$ -Mutante.

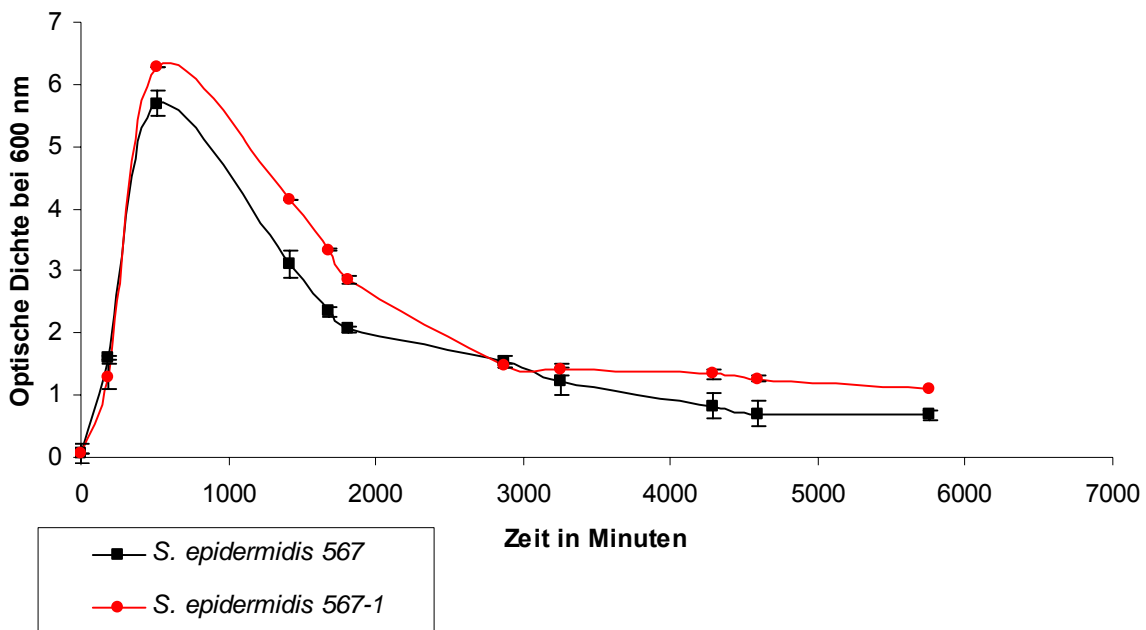


Abbildung 2: Langzeitwachstumskurven von *S. epidermidis* 567 und *S. epidermidis* 567-1 in einer TSB Schüttelkultur

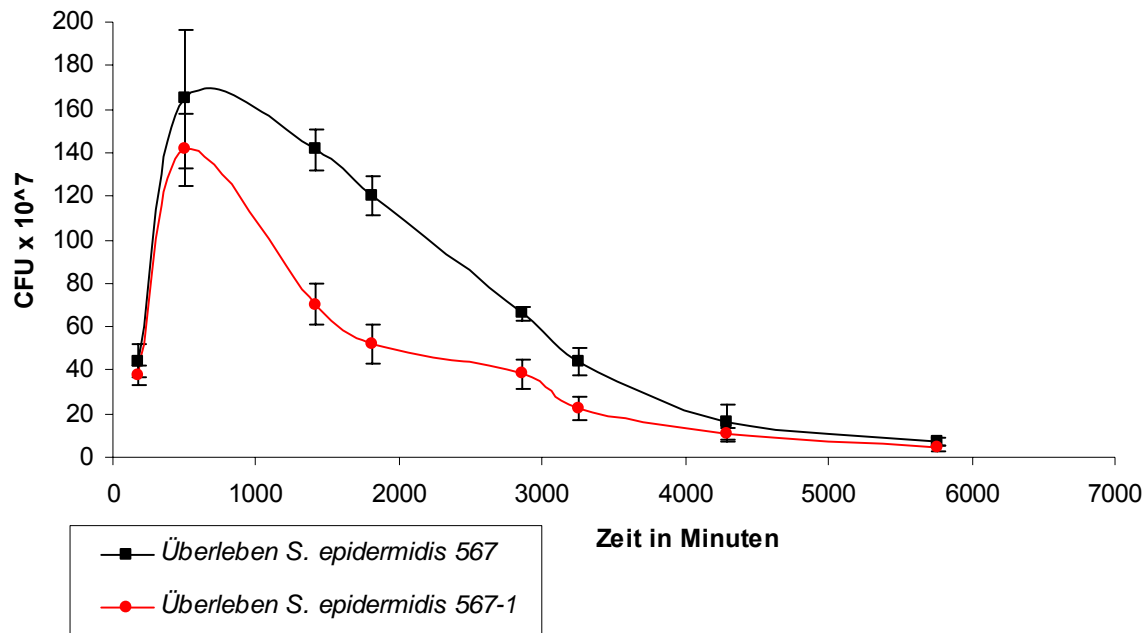


Abbildung 3: CFU des Langzeitwachstumsexperiments von *S. epidermidis* 567 und *S. epidermidis* 567-1

#### 4.1.3 Kompetitives Wachstum von *S. epidermidis* agr-Wildtyp und Mutante

Klinische Untersuchungen zum Polymorphismus des Agr-Regulons haben ergeben, dass bis zu 17 % der klinischen Isolate natürlich vorkommende *agr*-Mutanten sind (Li *et al.*, 2004). Da von einer gleichzeitigen Besiedlung der Haut sowohl mit Agr-positiven als auch mit Agr-negativen Stämmen zu rechnen ist, ergibt sich die Frage, welcher der beiden Stämme sich in Falle einer Infektion eher durchsetzen kann. Dazu wurde das kompetitive Verhalten von Wildtyp und *agr*-Mutante zunächst in einem Wachstumsexperiment verglichen. Da *S. epidermidis* 567-1 ( $\Delta$ *agr*-Mutante) mit seiner Resistenzkassette (*ErmB*) einen Marker besitzt, ließ sich diese Fragestellung *In vitro* untersuchen. Die beiden *S. epidermidis* Stämme wurden jeweils unabhängig von einander von OD<sub>600</sub> 0,05 auf OD<sub>600</sub> 0,5 vorkultiviert, anschließend die Zellzahlen genau eingestellt und dann mit einer jeweiligen OD<sub>600</sub> 0,025 die Mischkultur angeimpft. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde aus der Kultur eine Probe entnommen und diese in verschiedenen Verdünnungen auf TSB-Platten und TSB-Platten mit 10 µg/ml Erythromycin ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch das Auszählen der Koloniezahlen auf den beiden Platten ließ sich indirekt auf die CFU von *S. epidermidis* 567 schließen.

Im unmittelbaren Vergleich der optischen Dichte der Mischkultur mit den Einzelkulturen fällt auf, dass eine deutlich geringere optische Dichte erreicht wird, als wenn beide Stämme allein kultiviert werden (Abbildung 4). Untersuchungen zum

Überleben der beiden Stämme zeigen, dass sich der Agr-Wildtyp bereits in der Phase des exponentiellen Wachstums gegenüber der Mutante durchsetzt. Nach 50 Stunden Wachstum war in keinem Fall ein Überleben der *S. epidermidis*  $\Delta agr$ -Mutante nachweisbar (Abbildung 5). Im Vergleich des Überlebens des Wildtyps in Einzel- und in Mischkultur zeigt sich, dass, sobald die  $\Delta agr$ -Mutante aus der Kultur „verdrängt“ wurde, eine für Langzeitwachstum „normale“ Koloniezahl nachgewiesen werden konnte (Vergleich Abbildung 3 mit Abbildung 5).

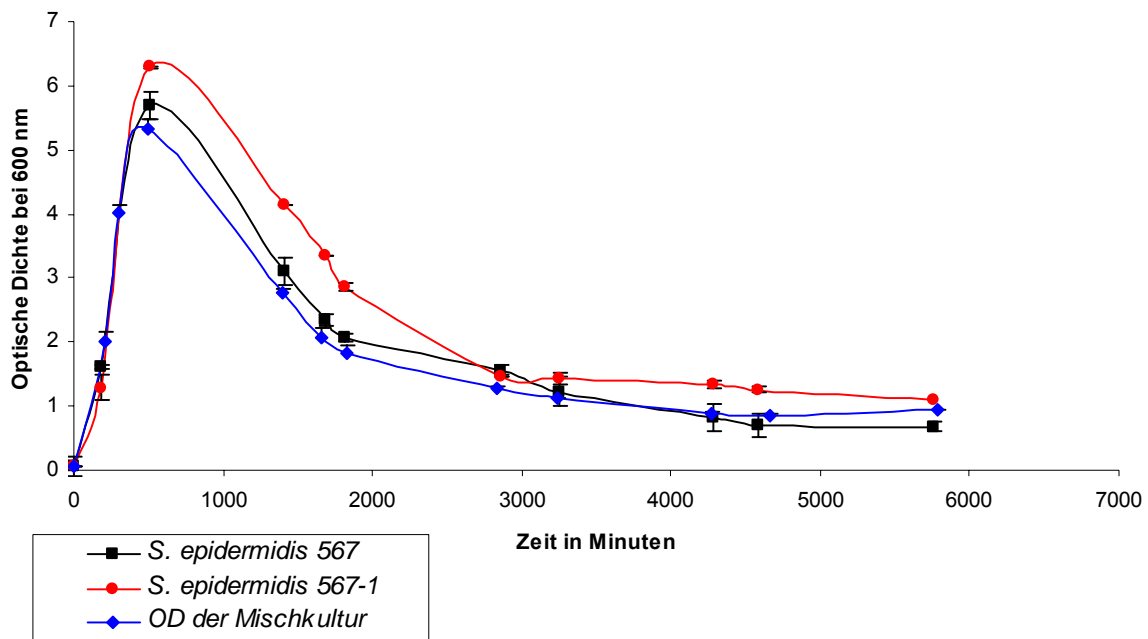


Abbildung 4: Vergleich optischer Dichten im Langzeitwachstumsversuch von *S. epidermidis* 567, *S. epidermidis* 567-1 und einer *S. epidermidis* 567 & 567-1 Mischkultur

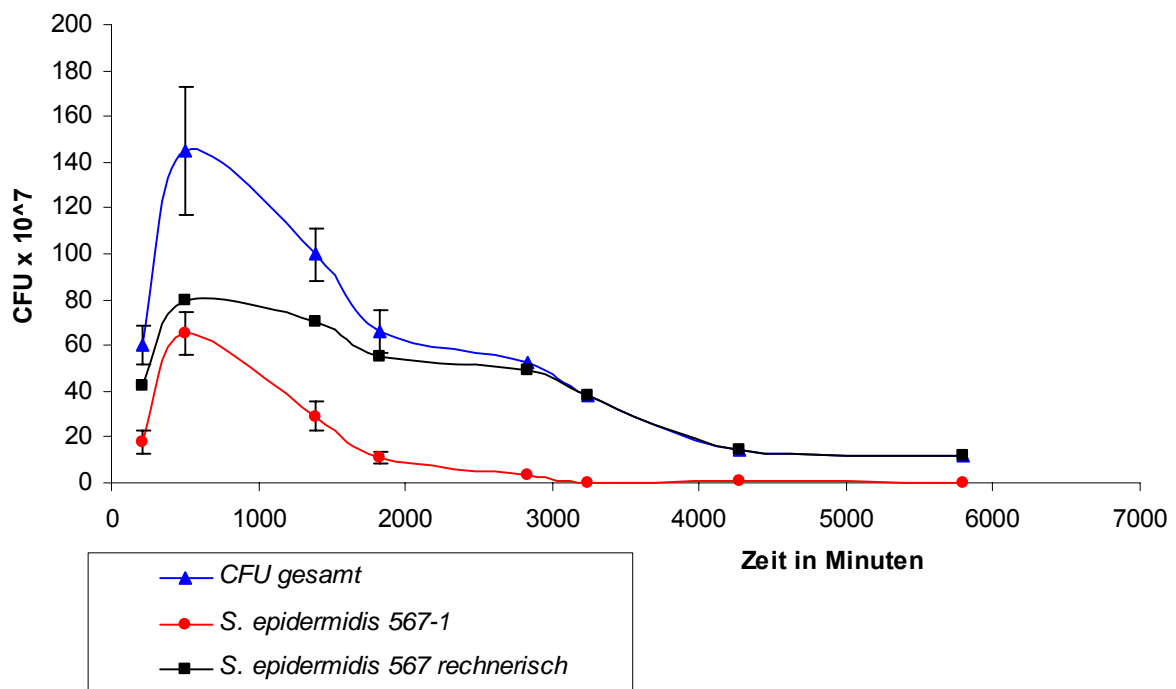


Abbildung 5: Vergleich der CFU im Langzeitwachstumsversuch in einer *S. epidermidis* 567 & 567-1 Mischkultur



#### 4.1.4 Beeinflussung der Biofilmbildung in *S. epidermidis* durch das Agr-System

Als Hauptpathogenitätsfaktor von *S. epidermidis* wird dessen Fähigkeit zur Bildung von mehrschichtigem Biofilm auf künstlichen Oberflächen, wie Hüftgelenken, Kathetern, etc. angesehen. Für einen effektiven Infektionsprozess scheint eine Regulation, auch in Hinsicht auf die Zelldichte, für den Organismus als sinnvoll. Für die Untersuchung zur Biofilmbildung von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr* Mutante *S. epidermidis* 567-1 wurde der 96-Loch Mikrotiterplatten (Flacher Boden)-Test in abgewandelter Form verwendet. Beide Stämme wurden aus ihrer jeweiligen Übernachtskultur in einer Schüttelkultur von  $OD_{600}$  0,05 bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 vorkultiviert und in vorgewärmtes Medium in einer 1:10 Verdünnung in die Mikrotiterplatten überimpft. Anschließend wurde der Biofilm für bestimmte unterschiedliche Zeiträume bei 37°C stehend inkubiert. Der Biofilm wurde abschließend gewaschen und mit Kristallviolett gefärbt und zur Auswertung die Absorption mit einem Elisa-Reader bei 595 nm eingescannt.

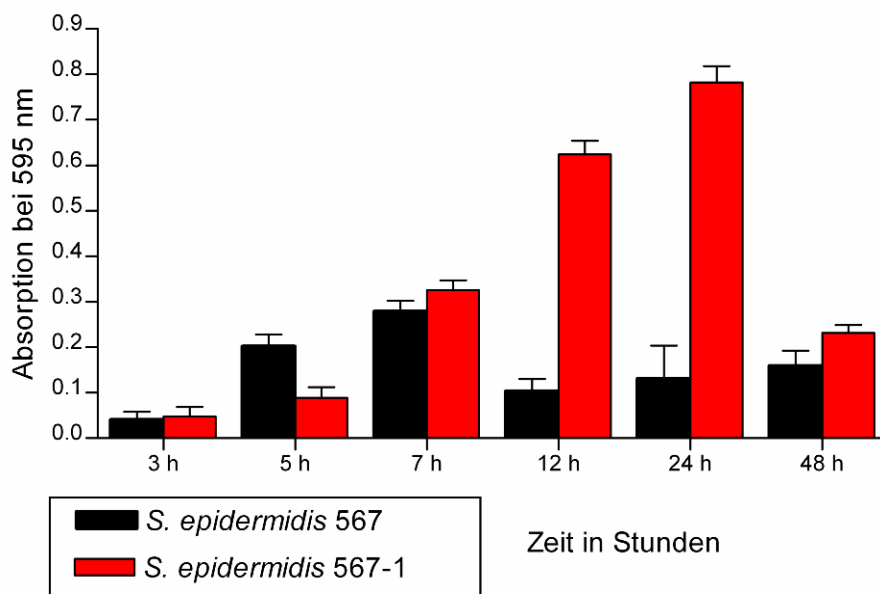


Abbildung 6: Biofilm-Mikrotiterplatten Assay über 48 Stunden mit *S. epidermidis* 567 und *S. epidermidis* 567-1

Dabei zeigte sich, dass der *S. epidermidis* Wildtyp in der primären Wachstumsphase schneller Biofilm akkumuliert. Jedoch bildet die *S. epidermidis agr*-Mutante nach sieben Stunden bereits einen stärkeren Biofilm, der nach 24 Stunden eine bis zu 8-fache Dicke des Biofilms des Wildtyps erreicht. Der Wildtyp hingegen reduziert seine Biofilmdicke bereits nach sieben Stunden deutlich, was auf einen „Detachment“-Prozess hinweist (Abbildung 6). Die Analyse anderer *S. epidermidis* Stämme (siehe Abschnitt 3.2.3) zeigte im Lebend-tot-Assay, dass nach 24 h unter den gegebenen

Bedingungen ein großer Teil der im Biofilm-befindlichen Bakterien bereits abgestorben ist. Dies lässt sich als ein Hinweis auf eine Verknüpfung des „Detachment“-Prozesses und dessen dichteabhängiger Regulation durch das Agr-System interpretieren.

#### 4.1.5 Einfluss des Agr-Systems auf die Invasivität von *S. epidermidis*

In der aktuellen Literatur wird beschrieben, dass im Infektionsprozess vieler *S. aureus* Stämme die zelluläre Invasion von bedeutender Rolle zu sein scheint. *S. epidermidis* wird hingegen als nicht invasiv beschrieben. In persönlicher Kommunikation mit einigen anderen an *S. epidermidis* forschenden Gruppen wurde berichtet, dass zumindest eine basale Invasivität von *S. epidermidis* vermutet wird. Von *S. aureus* und *S. epidermidis* ist bekannt, dass das Agr-System einen entscheidenden Effekt auf die Bildung von Oberflächenproteinen und extrazellulären Proteinen hat, die auch einen Einfluß auf die Invasivität haben könnten. Daher wurde eine Untersuchung bezüglich der zellulären Invasion von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen  $\Delta agr$ -Mutante *S. epidermidis* 567-1 durchgeführt. Beide Stämme wurden aus ihrer jeweiligen Übernachtskultur in einer Schüttelkultur von  $OD_{600}$  0,05 bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 vorkultiviert, anschließend gewaschen, die Bakteriendichte bestimmt, eingestellt und ein Standardinfektionsprotokoll mit 293T Nierenepithelzellen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde dem stark invasiven Stamm *S. aureus* Cowan mitgeführt.

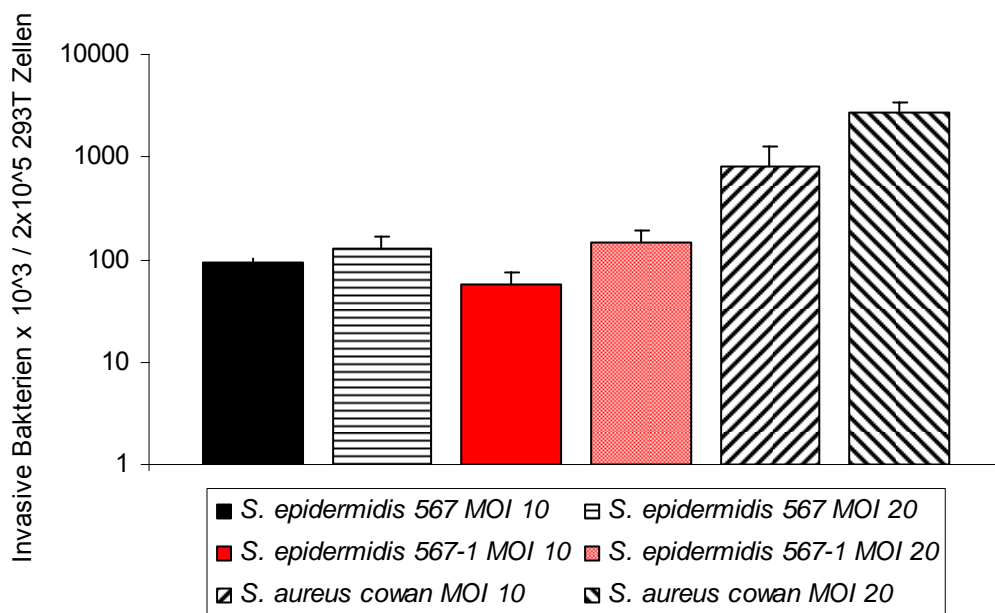


Abbildung 7: Zelluläre Invasion von *S. epidermidis* 567 und 567-1, sowie *S. aureus* Cowan in 293T Nierenepithelzellen

Obwohl die Experimente vorläufiger und grundlegender Natur waren, lassen sich jedoch einige Aussagen treffen: Wie erwartet zeigte *S. epidermidis* unter den gegebenen Bedingungen im Vergleich zu *S. aureus* Cowan nur eine geringe Invasivität (Abbildung 7). Im Vergleich zu einigen anderen *S. aureus*-Stämmen (mündlichen Korrespondenz mit S. Donat, unveröffentlichte Beobachtungen) sind die Infektionsraten von *S. epidermidis* 567 jedoch auf etwa gleichem Niveau.

Im direkten Vergleich der zellulären Invasion von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen  $\Delta agr$ -Mutante *S. epidermidis* 567-1 zeigte sich, dass die primäre Invasion durch eine *agr*-Mutation nur leicht verschlechtert wird. Viel deutlicher scheint jedoch der Effekt auf das Überleben bzw. das Wachstum innerhalb der Nierenepithelzellen zu sein (Abbildung 8). Dies könnte mit der durch die *agr*-Mutation verursachten Veränderung des Zentralmetabolismus oder der verringerten Bildung von extrazellulären Proteasen zusammenhängen (s.u.). Im Zusammenhang mit dem Infektionsprozess an künstlichen Oberflächen und dem umliegenden Gewebe ist die zelluläre Invasion von *S. epidermidis* ein Feld, das noch weiterer Untersuchungen bedarf

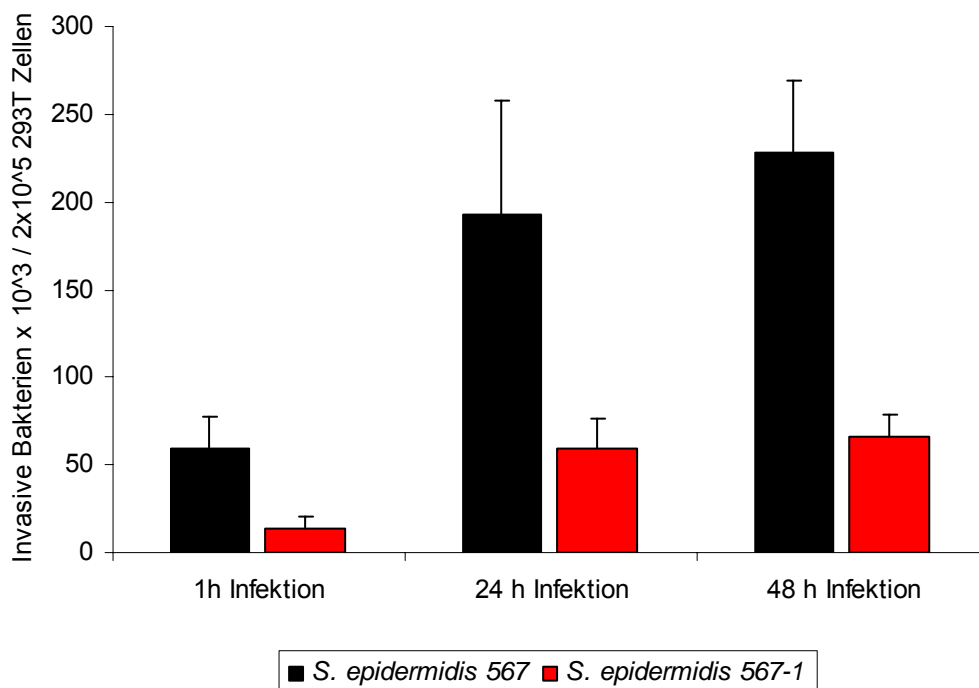


Abbildung 8: Invasion von *S. epidermidis* 567 und 567-1 nach 1h; 24h und 48 h in 293 T Nierenepithelzellen

#### **4.1.6 Zusammenfassung 4.1.1 bis 4.1.5**

Die vergleichenden phänotypischen Untersuchungen des *S. epidermidis* 567 *agr*-Wildtyps und der *S. epidermidis* 567-1 *agr*-Mutante zeigten:

- 1. Nach einer verlängerten Log-Phase erreicht die *S. epidermidis agr*-Mutante eine höhere optische Dichte, jedoch liegt die CFU deutlich unterhalb der des *S. epidermidis* Wildtyps.**
- 2. Die *S. epidermidis agr*-Mutante zeigt ein wesentlich verschlechtertes Langzeitüberleben im Vergleich zum isogenen Wildtyp.**
- 3. Im kompetitiven Wachstumsversuch wird die *agr*-Mutante vom Wildtyp verdrängt.**
- 4. Die *S. epidermidis agr*-Mutante bildet aufgrund eines verminderten „Detachments“-Prozesses wesentlich stärkeren Biofilm.**
- 5. Die *S. epidermidis agr*-Mutante ist ähnlich invasiv in 293T Nierenepithelzellen wie der isogene *S. epidermidis* Wildtyp. Jedoch zeigt die Mutante ein deutlich verringertes intrazelluläres Wachstum.**

#### 4.1.7 Untersuchungen zum Effekt des Agr Quorum-sensing Systems auf das extrazelluläre Proteom von *S. epidermidis*\*

Wie aus *S. aureus* bekannt ist, spielt das Agr-System eine zentrale Rolle für die Art und Quantität der sekretierten Proteine von Staphylokokken. Daher wurde auch in *S. epidermidis* ein solcher Effekt im Zusammenhang mit dem Anstieg der optischen Dichte postuliert. Um dies näher zu untersuchen wurde eine vergleichende Analyse des extrazellulären Proteoms von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr* Mutante *S. epidermidis* 567-1 mittels 2-dimensionaler Proteingelelektrophorese und anschließender Massenspektrometrie vorgenommen. Die Proben wurden dazu entlang der Wachstumskurve der frühen exponentiellen, in der transienten und in der stationären Wachstumsphase genommen. Dafür wurden *S. epidermidis* 567 und seine isogene  $\Delta agr$  Mutante *S. epidermidis* 567-1 aus einer Übernachtskultur in jeweils 1 l TSB Medium bei OD<sub>600</sub> 0,05 angeimpft und die Proben entsprechend der Zeitpunkte geerntet. Die Präparation der extrazellulären Proteine erfolgte mittels TCA-Fällung und die Probenmenge wurde in Abhängigkeit zur optischen Dichte der Kulturen auf 2-D Gele aufgetragen (Batzilla *et al.*, 2006).

Insgesamt konnten 14 Proteine in über 60 Proteinspots per MALDI-ToF-Analyse identifiziert werden (Tabelle 22). Diese Protein-Variationen sind auf verschiedene Fragmente mit unterschiedlichen pI Werten und molekularen Massen zurückzuführen. Ob diese allerdings aus einem Degradationsprozess oder differentieller Synthese oder von biologischen oder methodischen Modifikationen herrührt muss immer im Einzelnen genauer untersucht werden.

Die meisten der Proteine werden deutlich durch den Wachstumsstatus und das Agr System beeinflusst. *S. epidermidis* akkumuliert im Verlauf seines Wachstums 6 verschiedene Proteine mit ansteigender Konzentration: PfoR, FeoB, PSM1, PSM2, SrrA und SspA (Tabelle 22). Außer PfoR, welches keinerlei signifikante Veränderung zeigte, waren die Mengen aller anderen Proteine deutlich von einer  $\Delta agr$ -Mutation negativ beeinflusst (Abbildung 9; Tabelle 22). Den stärksten Effekt in dieser Hinsicht zeigte die Akkumulation der extrazellulären Serin-Protease SspA im Wildtyp, die in der Mutante nur in äußerst geringer Menge gebildet wurde (Abbildung 9).

\* Die methodisch-experimentellen Grundlagen zur extrazellulären Proteomanalyse von *S. epidermidis* wurden bereits in vorangegangenen Experimenten vom Autor erarbeitet (C. Batzilla, Diplomarbeit 2003). Da die dabei gewonnenen Erkenntnisse zum extrazellulären Proteom für das Gesamtverständnis der Vorgänge wichtig sind, werden Teile aus diesen Experimenten hier noch einmal aufgegriffen und dargestellt. Die Daten wurden an die neue Gen-Nomenklatur, die nach Veröffentlichung der Genomsequenz eines Biofilm-bildenden *S. epidermidis* gültig ist (Gill *et al.*, 2005), angepasst.

Im Gegensatz dazu nahm jedoch die Menge einiger anderer Proteine im Verlauf der transienten und stationären Phase im Wildtyp deutlich ab. Darunter die Lipasen GehC und GehD, das immunodominante Antigen IsaA, das Autolysin AtlE und das „staphylococcal secretory antigen protein“ SsaA. Entsprechend umgekehrt verhielt es sich dazu in der Mutante, in der diese Proteine im Verlauf der Wachstumskurve akkumulierten (Abbildung 9; Tabelle 22). Insgesamt 3 der 14 Proteine wurden im Wildtyp konstant in gleicher Menge gebildet bzw. akkumuliert. Zum einen die Zink-Metalloprotease Aureolysin SepA, eine bis dato unbeschriebene Protease, die hier als Ext2 bezeichnet wird, und ein weiteres uncharakterisiertes Protein, welches in dieser Arbeit mit Ext1 bezeichnet wurde (Abbildung 9; Tabelle 22). Im Gegensatz zu Ext1 und Ext2, die von einer *agr*-Mutation nicht beeinflusst wurden, war die Proteinmenge an SepA im extrazellulären Proteom der Mutante leicht geringer.

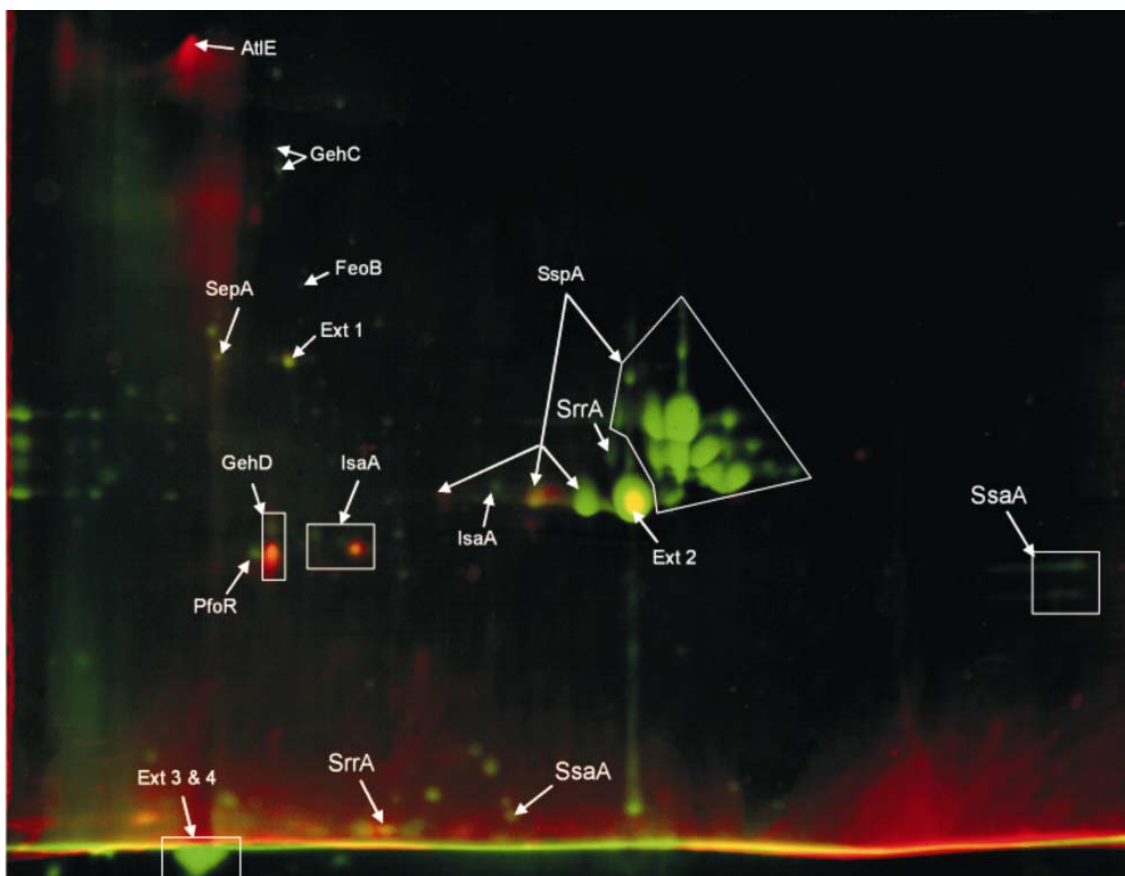


Abbildung 9: Falschfarben-Bild des extrazellulären Proteoms von *S. epidermidis* 567 (grüner Kanal) und der *agr* Mutante *S. epidermidis* 567-1 (roter Kanal) in der stationären Phase. Beide Stämme wurden in TSB Medium kultiviert, die Proteinproben per TCA-Fällung präpariert und per 2-D Gelelektrophorese analysiert. Die Proteine wurden aufgetrennt in IPG-Streifen pH 3-10 (links→rechts) und die resultierenden 2-D Gele mit CBB G-250 gefärbt. Proteine, die im Wildtyp verstärkt gebildet werden, erscheinen grün. Entsprechend umgekehrt erscheinen extrazelluläre Proteinspots mit einer größeren Menge in der Mutante in rot. Die

identifizierten Proteine sind mit Pfeilen und ihren gebräuchlichen Abkürzungen markiert und in Tabelle 22 genauer beschrieben.

Tabelle 22: Extrazelluläre Proteine identifiziert mittels 2-D Gelelektrophorese und MalidTof-Analyse in *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1. In der Tabelle werden die relativen Mengenunterschiede der Proteine zwischen den beiden Stämmen in der (i) exponentiellen, (ii) der transienten und (iii) der stationären Phase dargestellt.

Label	Locus <sup>a</sup>	Gebräuchlicher Name <sup>a</sup>	Menge von extrazellulärem Protein <i>agr</i> Wildtyp / <i>agr</i> Mutante Wachstumsphase		
			OD <sub>600</sub> 1	Transient	Stationär
PfoR	SE2129 <sup>b</sup>	pfoS/R	-/+	+ /++	++ /++
AtlE	SE0750	autolysin E	+++ /++	++ /++	+ /+++
Ext 1	SE0752	conserved hypothetical protein	++ /+	++ /++	++ /++
FeoB	SE2114 <sup>b</sup>	ferrous iron transport protein B	- /-	+ /-	+ /-
GehC	SE0281	triacylglycerol lipase precursor	++ /-	++ /-	+ /+
GehD	SE2403	glycerol ester hydrolase; lipase precursor	+++ /+	+++ /+++	+ /+++
IsaA	SE2126	immunodominant antigen A	+++ /+	+++ /++	+ /++
Ext 2	SE1296	protease ; homologue to <i>S. aureus</i> peptidase, U32 family	+++ /++ +	+++ /+++	+++ /+++
Ext 3	SE0848	phenol soluble modulins beta 1/beta 2	- /-	+++ /-	+++ /-
Ext 4	SE0849	phenol soluble modulins beta 1/beta 2	- /-	+++ /-	+++ /-
SepA	SE2219 <sup>b</sup>	zinc metalloproteinase aureolysin; extracellular elastase precursor	+ /-	++ /+	++ /+
SrrA	SE1176	staphylococcal respiratory response protein SrrA	- /-	+ /-	+ /-
SspA	SE1543 <sup>b</sup>	V8 serine protease; glutamyl endopeptidase precursor	+ /-	+++ /+	+++ /+
SsaA	SE0433	secretory antigen SsaA-like protein	++ /++	+ /++	+ /++

#### 4.1.8 Zytoplasmatische Proteom Analyse von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1

Um den Einfluss des Agr Quorum-sensing Systems auf das zytoplasmatische Proteom von *S. epidermidis* zu untersuchen, wurden Proben vom Wildtyp *S. epidermidis* 567 und der isogenen *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1 in der früh-exponentiellen Phase (bei OD<sub>600</sub> 1) und in der spät-exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> 4) präpariert. Die Proteinproben wurden dann mittels DIGE-Technik Fluoreszenzmarkiert und anschließend per 2-D Gelelektrophorese über einen pH Bereich von pH 3 bis 11 aufgetrennt. Anschließend wurden die resultierenden 2-D Gele per Phosphoimager eingescannt und mittels der Delta 2-D Software (Decodon, Greifswald, Deutschland) ausgewertet. Zur Identifizierung der interessanten Spots wurden separate 2-D Gele im gleichen pH Bereich angefertigt. Diese wurden mit jeweils 500 µg Protein/Gel beladen und mit coloidalem Coomassie gefärbt. Die Identifizierung der Proteinspots wurde in Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Prof. Hecker und Dr. Engelmann, in Greifswald durchgeführt.

Die Experimente zeigten einen erstaunlich deutlichen Unterschied auf zytoplasmatischer Proteomebene zwischen *S. epidermidis* 567 und der *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1. Insgesamt konnten etwa 750 Proteinspots im pH Bereich 3 bis 11 lokalisiert werden (Abbildung 10 und 11). Von diesen unterschieden sich 110 Proteinspots in der früh-exponentiellen Phase zwischen Wildtyp und Mutante und 190 Proteinspots in der spät-exponentiellen Phase. Von 112 dieser Proteinspots konnten bei massenspektroskopischen Analysen 51 verschiedene Proteine identifiziert werden. Von diesen tauchten 20 Proteine in mehr als einem Spot auf, vermutlich aufgrund von Variationen im *pI* oder in der Masse. Interessanterweise traten einige Proteinakkumulationen desselben Proteins in beiden Stämmen in unterschiedlichen Spots auf, was auf einen regulatorischen Hintergrund dieses Phänomens hinweist. Die gesamte Liste der identifizierten Proteine ist im Anhang, Tabelle A1, dargestellt.

Die größten Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante im zytoplasmatischen Proteom sind im Aminosäure- und Kohlenhydrat-Metabolismus zu finden. Besonders verstärkt bildet die *agr*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp Proteine von Oligopeptid-Transportern und Biosynthese-Enzyme der aromatischen, sowie der Aspartat- und Pyruvat- basierten Aminosäure Familien (Anhang, Tabelle A1). Im Wildtyp wurden im Vergleich zur Mutante vor allem verstärkt Proteine, die im Pyruvat-Metabolismus involviert sind, gefunden, wie etwa die Pyruvat-Carboxylase oder -Dehydrogenase, sowie auch die Aconitat-Hydratase aus dem Citronensäure-Zyklus. Darüber hinaus konnte in Übereinstimmung mit dem extrazellulären Proteom eine höhere Menge der Serin-Protease SspA auch im zytoplasmatischen Proteom des Wildtyps gefunden werden. Ein weiterer interessanter Unterschied konnte in der Purin-Biosynthese und



Nukleotid-Interkonversion beobachtet werden (Abbildung 10 und 11). Die IMP-Dehydrogenase GuaB, welche die Umwandlung von IMP zu GMP katalysiert, sowie die GMP-Reduktase GuaC, welche GMP zu IMP reduziert, wurden in diversen Proteinspots gefunden. Dies deutet auf eine differentielle Regulation im Vergleich von Wildtyp und Mutante während der verschiedenen Wachstumsphasen hin.

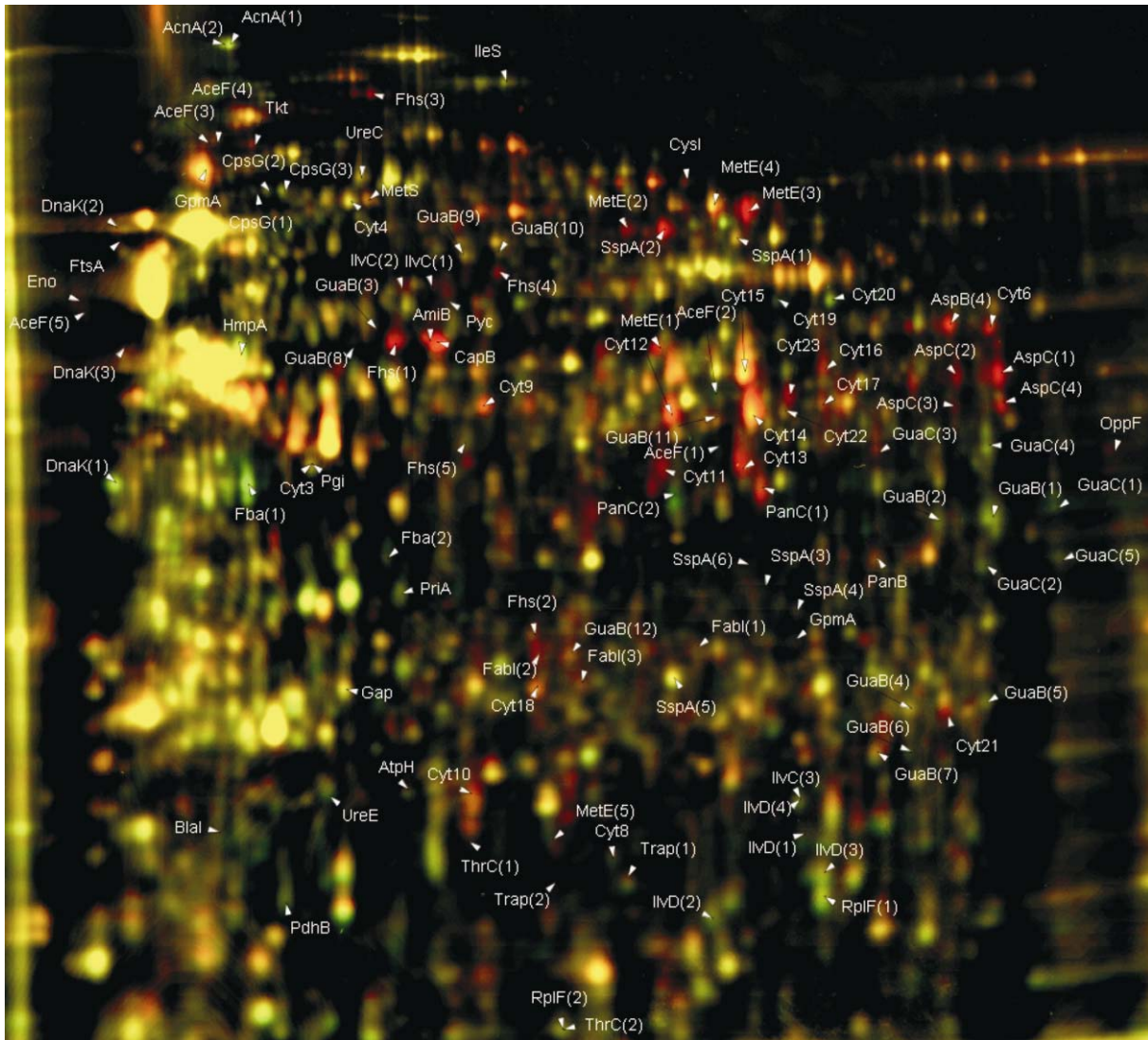


Abbildung 10: Falschfarben-Bild des zytoplasmatischen Proteoms von *S. epidermidis* 567 (grüner Kanal) und seiner isogenen *agr* Mutante *S. epidermidis* 567-1 (roter Kanal) in der früh-exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> 1). Die Proteine wurden mittels DIGE-Technik mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert und dann per 2-D Gelelektrophorese, unter Verwendung von IPG Streifen im pH-Bereich 3 bis 11 aufgetrennt. Proteine, die im *S. epidermidis* 567 Wildtyp in einer größeren Menge vorkommen, erscheinen in grün, die der Mutante entsprechend in rot. Die per Massenspektroskopie identifizierten Proteine sind durch Pfeile mit ihren gewöhnlichen Abkürzungen markiert und die korrespondierenden Daten im Anhang in Tabelle A1 aufgeführt.

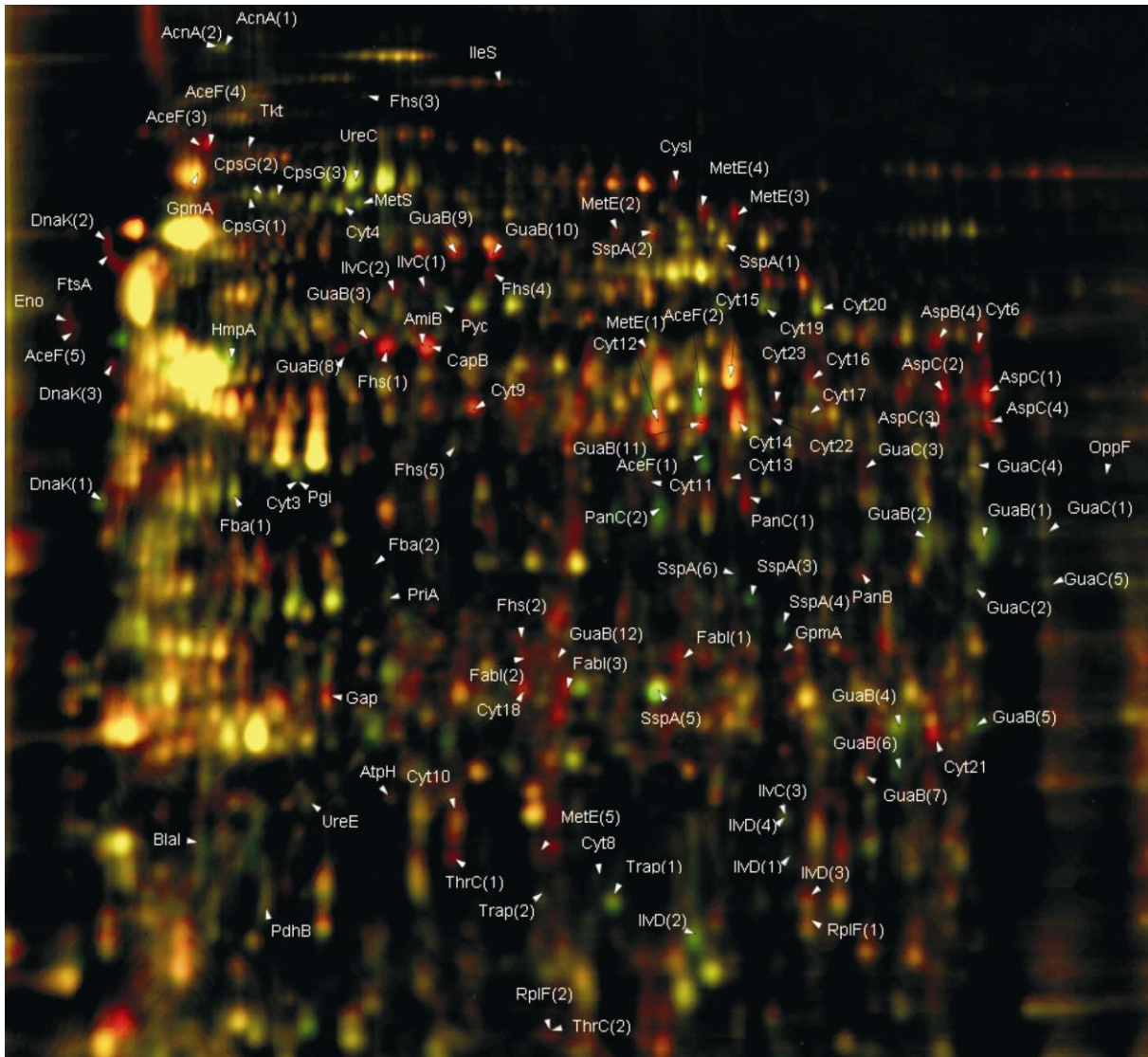


Abbildung 11: Falschfarben-Bild des zytoplasmatischen Proteoms von *S. epidermidis* 567 (grüner Kanal) und seiner isogenen *agr* Mutante *S. epidermidis* 567-1 (roter Kanal) in der spät-exponentiellen Phase ( $OD_{600}$  4). Die Proteine wurden mittels DIGE Technik mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert und dann per 2-D Gelelektrophorese, unter Verwendung von IPG Streifen im pH-Bereich 3 bis 11 aufgetrennt. Proteine, die im *S. epidermidis* 567 Wildtyp in einer größeren Menge vorkommen, erscheinen in grün, die der Mutante entsprechend in rot. Die per Massenspektroskopie identifizierten Proteine sind durch Pfeile mit ihren gewöhnlichen Abkürzungen markiert und die korrespondierenden Daten im Anhang in Tabelle A1 aufgeführt.

#### 4.1.9 Mikroarray-basierte vergleichende Transkriptom-Analyse von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1

Die vergleichende Transkriptom-Analyse per DNA Mikroarray ermöglicht es, die Regulation zweier Stämme zu einem bestimmten Zeitpunkt in ihrer Gesamtheit und in ihren Unterschieden zu erfassen. Da die beobachteten Unterschiede im Bereich des extrazellulären wie auch des zytoplasmatischen Proteoms bei weitem die erwarteten Effekte einer Mutation des Agr Quorum-sensing Systems in *S. epidermidis* übertraf, erschien eine grundlegende Analyse dieser Effekte auf Transkriptom-Ebene analog zu den angefertigten Experimenten als essentiell, um die Regulation besser interpretieren zu können. Dafür wurden RNA-Proben von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1 entlang der Wachstumsphase in entsprechenden TSB Schüttelkulturen genommen. Die Probenzeitpunkte wurden dafür analog zu den zytoplasmatischen Proteom-Analysen in der früh-exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> 1) und in der spät-exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> 4) gewählt und die RNA mittels Fastprep-Rneasy-Protokoll (Qiagen, Hilden, Deutschland) präpariert.

Im Vergleich des *S. epidermidis* Wildtyps und der *agr*-Mutante konnten insgesamt 180 Gene identifiziert werden, die differentiell reguliert werden. Diese Gene lassen sich entsprechend ihrem Regulationszeitpunkt und Verhalten bezüglich der *agr*-Mutation in Gruppen einteilen (Abbildung 12). Die vollständige Liste der differentiell regulierten Gene wird im Anhang, Tabellen A2 und A3 wiedergegeben. Tabelle A2 des Anhangs listet dabei die Gene auf, die im Vergleich zur Mutante signifikant stärker im *S. epidermidis* 567 Wildtyp exprimiert werden. In Gruppe (i) werden 23 Gene zusammengefasst, die im Wildtyp, sowohl in der früh- als auch spät-exponentiellen Phase signifikant induziert sind. Besonders interessant in dieser Gruppe ist das *saeR/S* System, welches ein Multi-Komponenten Regulationssystem darstellt, das in die Regulation der Virulenz von Staphylokokken eine entscheidende Rolle spielt. Darüber hinaus wurde *codY*, ein pleiotroper Regulator im Wildtyp stärker exprimiert gefunden als in der *S. epidermidis agr* Mutante. Das *codY* Gen kodiert für ein Protein, welches in *Bacillus subtilis* und *Lactococcus Lactis* als globaler Regulator der stationären Phase Gene bekannt ist. Des Weiteren gehören zu Gruppe (i) Gene, die für extrazelluläre Proteine kodieren, wie etwa die Glycerolester-Hydrolase (*geh*), die extrazelluläre Serin-Protease *sspA*, *sepA* and auch Staphopain.

Gruppe (ii) beinhaltet 34 Gene (Anhang, Tabelle A2), die im Wildtyp verglichen mit der *agr*-Mutante nur in der früh-exponentiellen Phase verstärkt exprimiert werden. In dieser Gruppe befinden sich vor allem Gene, die für alternative Zuckertransporter (z.B. Arbutin und Ribose), aber auch für die Metabolisierung von Pyruvat zu organischen Säuren (wie Lactat, Formiat, Acetat und Acetoin) notwendig sind. Weitere wichtige Faktoren dieser Gruppe sind Gene, die im Harnstoffzyklus und

Stickstoff-Metabolismus eine wichtige Rolle spielen (Abbildung 12). Zu Gruppe (ii) gehören zehn weitere Gene, die hauptsächlich in den Zucker- und Aminosäure-Transport involviert sind, sowie einige wenige Gene, die für Stressantwort-Proteine kodieren.

In Tabelle A3 des Anhangs sind alle Gene aufgeführt, die signifikant stärker in der *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1 exprimiert werden als im *agr*-Wildtyp *S. epidermidis* 567. Insgesamt wurden 94 Gene in der früh- und/oder spät-exponentiellen Phase verstärkt in der Mutante exprimiert (Gruppe (v)). Besonders auffällig ist, dass die *agr*-Mutante eine große Menge von Aminosäurebiosynthese-Genen im Vergleich zum Wildtyp induziert (Abbildung 12). Darunter die Gene der Valin, Isoleucin und Leucin Biosynthese, die über die gesamte exponentielle Phase stark induziert werden. Aber auch die Gene der meisten anderen Aminosäurebiosynthesewege wurden in der Mutante stärker exprimiert: Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Cystein, Methionin, Histidin, Glutamat, Glycin, Threonin, Aspartat und Alanin. Des Weiteren wurde in der *agr*-Mutante, verglichen mit dem *S. epidermidis* Wildtyp Stamm, eine Reihe alternativer Oligopeptid-Transporter bis zu 19-fach induziert. Auch Teile des Sulfat-Metabolismus wurden in der Mutante verstärkt exprimiert. Eine letzte Gruppe (vi) umfasst Gene wie ABC Transporter und Enzyme der Biosynthese von Cofaktoren, die nur in der späten exponentiellen Phase von der *agr*-Mutante verstärkt exprimiert wurden.

Abbildung 12 (nächste Seite): Zusammenfassendes Säulendiagramm der Gene und regulatorischen Gengruppen, die durch die *agr* Mutation in *S. epidermidis* in ihrer Expression verändert wurden. Die Daten wurden mittels Mikroarray-Analyse in der früh- und spät-exponentiellen Phase gewonnen. Aufgrund der großen Anzahl von Einzeldaten wurden diese nach ihren regulatorischen bzw. funktionalen Gruppen (Stoffwechsel oder Synthese) zusammengefasst und der Durchschnittswert (Mean) berechnet. Die Standardabweichungen zeigen die Variationen innerhalb einer Gruppe von diesem Wert an. Die Daten werden als Verhältnis (Ratio) von Wildtyp zu *agr*-Mutante, bzw. Mutante zu Wildtyp dargestellt. Positive Werte zeigen eine stärkere Expression im Wildtyp, negative Werte eine stärkere Expression in der Mutante an. Die hochgestellten Zahlen beziehen sich auf das Zusammenfassen nach funktionellen Eigenschaften der Gene, in Übereinstimmung mit der KEGG Datenbank für *S. epidermidis* ATCC12228. Die detaillierten Daten der einzelnen Gene sind im Anhang in Tabelle A2 und A3 aufgelistet.

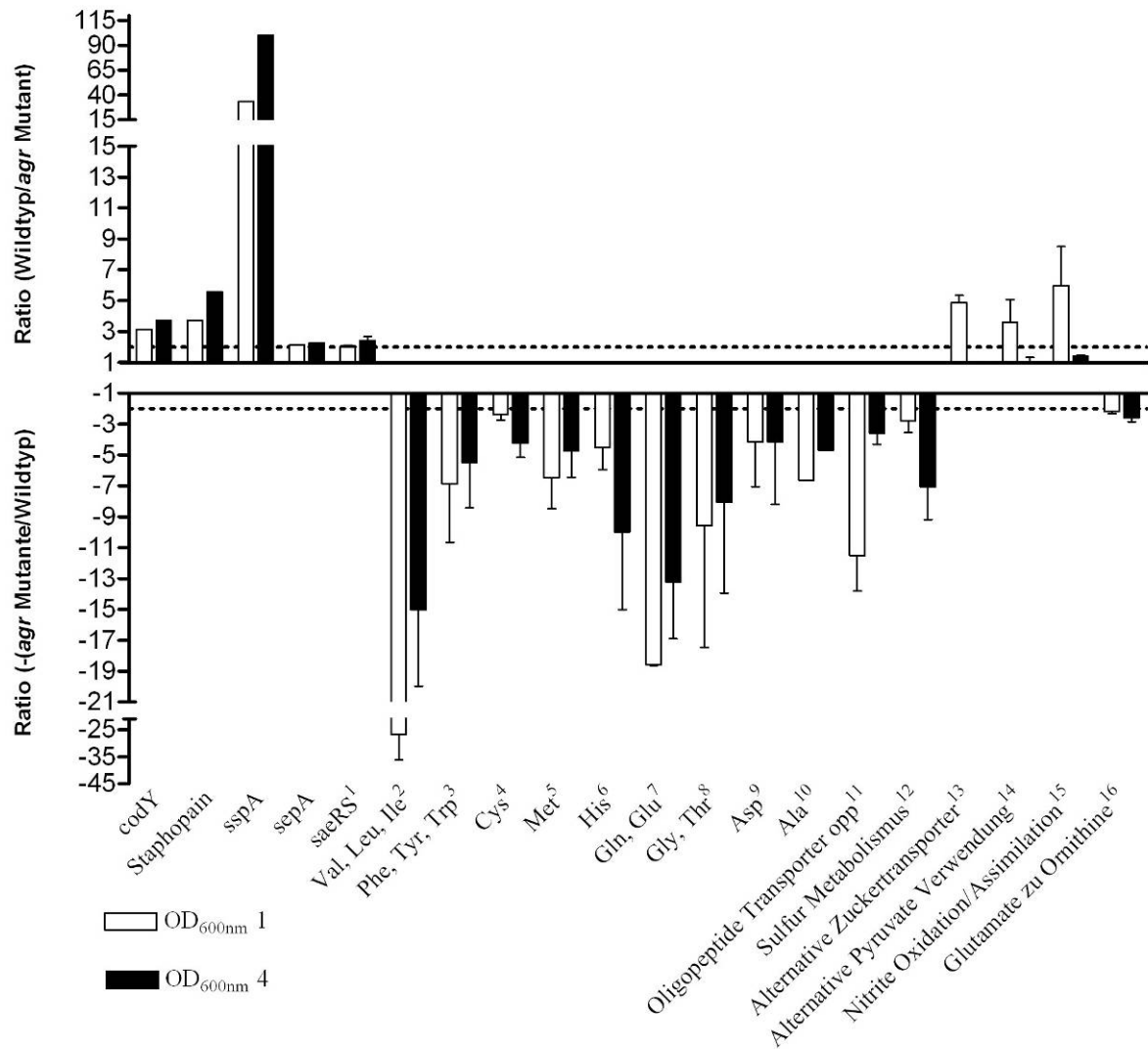


Abbildung 12: Beschreibung siehe vorherige Seite.

Die Liste der funktionell zusammengefassten Gene ist wie folgt: <sup>1</sup>SE0478, SE0479, SE0480, SE0481; <sup>2</sup>SE1654, SE1655, SE1657, SE1658, SE1659, SE1660, SE1661; <sup>3</sup>SE0505, SE1047, SE1048, SE1049, SE1050, SE1052, SE1053, SE1054, SE1055, SE1410; <sup>4</sup>SE2270, SE2324; <sup>5</sup>SE0011, SE2323, SE2379, SE2380, SE2382; <sup>6</sup>SE0271, SE0272, SE0273, SE0274, SE0275, SE0276, SE0277, SE0504; <sup>7</sup>SE2311, SE2312; <sup>8</sup>SE0995, SE1008, SE1009, SE1010, SE1011, SE1074, SE1662; <sup>9</sup>SE1008, SE1009, SE1074, SE1075, SE1076; <sup>10</sup>SE1079; <sup>11</sup>SE0681, SE0682, SE0683, SE0684; <sup>12</sup>SE2174, SE2175, SE2179, SE2180, SE2181, SE2270, SE2324; <sup>13</sup>SE1897, SE2086, SE2087; <sup>14</sup>SE0197, SE1387, SE2098, SE2143, SE2145; <sup>15</sup>SE0228, SE0229, SE1978; <sup>16</sup>SE1209, SE1210, SE1212.

#### 4.1.10 Einfluss des *S. epidermidis* Agr Quorum-sensing Systems auf Wachstum in dextrorefreiem Medium

Aufgrund des starken regulatorischen Effektes der Mutation des *agr*-Systems auf den Metabolismus von *S. epidermidis* stellte sich die Frage, in wieweit sich dieses auf ein Wachstum in TSB Medium ohne Dextrose auswirken würde. Besonders die Tatsache, dass viele alternative Zucker-Transporter und eine Art Overflow Metabolismus in *S. epidermidis* 567 verstärkt vorlagen, legte nahe, dass dieser ohne Dextrose entsprechend besser wachsen müsste. Diese Vermutung konnte jedoch nicht bestätigt werden und so verlief die Wachstumskurve nach der optischen Dichte ähnlich der Kurve in TSB Medium mit Dextrose, wenn auch zeitlich gestreckt (Abbildung 13). Tests zum Überleben der Bakterien zeigten, dass auch hier die hohe optische Dichte der *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1 nicht mit einer entsprechend hohen Lebendzellzahl einhergeht (Daten nicht gezeigt).

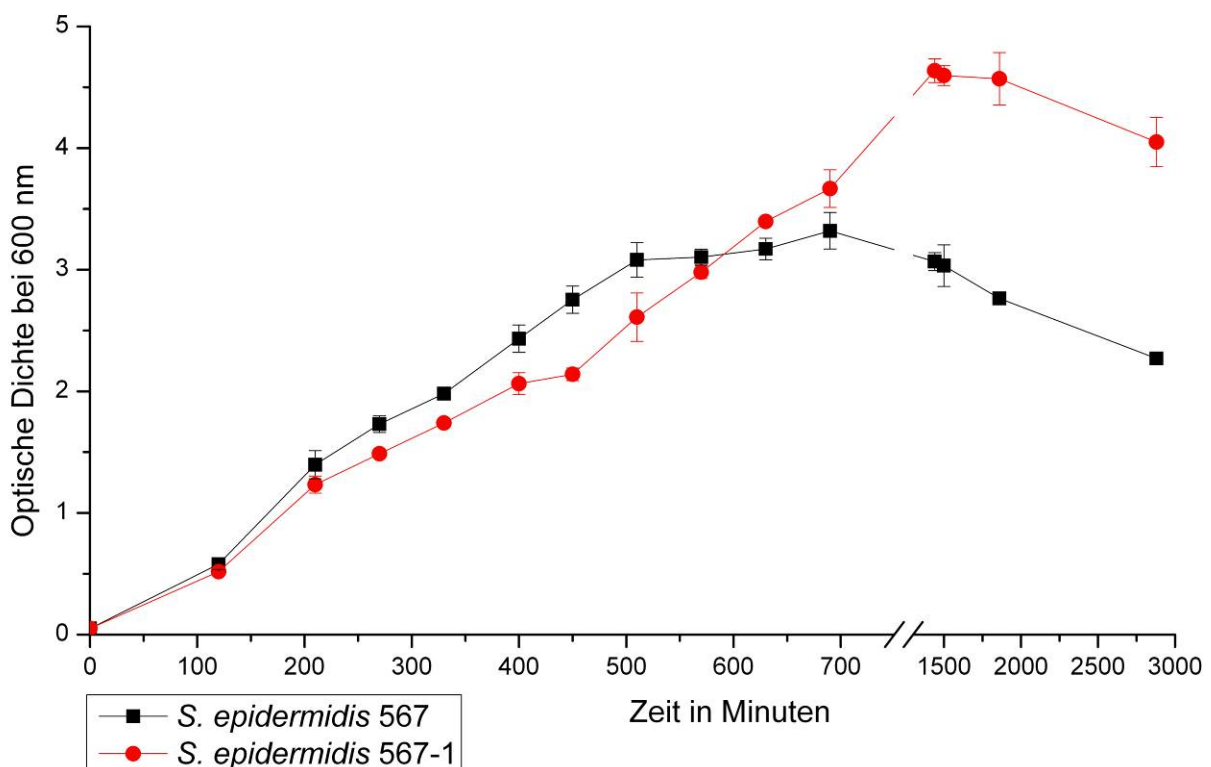


Abbildung 13: Wachstumskurve von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr* Mutante *S. epidermidis* 567-1 in TSB ohne Dextrose Medium Schüttelkultur.

#### 4.1.11 Messung der L- und D-Lactat Bildung in *S. epidermidis* 567 und der *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1

Die vergleichende Analyse des Transkriptom von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1 in der früh- und spät-exponentiellen Phase zeigte, dass *S. epidermidis* 567 eine Art Overflow Metabolismus zu Beginn des exponentiellen Wachstums betreibt. Welchen Umfang dieser Overflow-Metabolismus hat und wie sich dieser im Vergleich zur Mutante auf metabolischer Ebene unterscheidet, sollte daher am Beispiel der Lactat-Bildung geklärt werden. Das Gen *ldh* (SE2145), die L-Lactatdehydrogenase, ist in der früh-exponentiellen Phase im Wildtyp 3-fach induziert, jedoch in der späten Phase nicht mehr reguliert (Anhang, Tabelle A2). Die Proben wurden analog zu den Wachstumsexperimenten bei OD<sub>600</sub> 1 und OD<sub>600</sub> 4 genommen und mittels eines Kits die Konzentration des D- und L-Lactats photometrisch bestimmt und dann anhand einer Eichreihe in µg/ml umgerechnet.

Insgesamt zeigte sich, dass von beiden Stämmen im Verlaufe des exponentiellen Wachstums erheblich mehr L-Lactat als D-Lactat gebildet wird. Bei OD<sub>600</sub> 1 liegt jeweils die etwa gleiche Menge an beiden Lactat-Isoformen in der Wildtyp- und Mutanten-Kultur vor (Abbildung 14). In der spät-exponentiellen Phase ist wie erwartet die Konzentration an L-Lactat in der Wildtyp-Kultur erhöht (Abbildung 14). Jedoch ist der Unterschied in verschiedenen Experimenten nie so deutlich ausgefallen wie erwartet. Denkbar ist, dass es entweder zu einer Gegenregulation auf Proteinebene kommt oder die Mutante zu einem anderen Zeitpunkt oder über einen anderen Mechanismus diese Art der Fermentation für sich entsprechend in abgeschwächter Form benefalls nutzt kann.

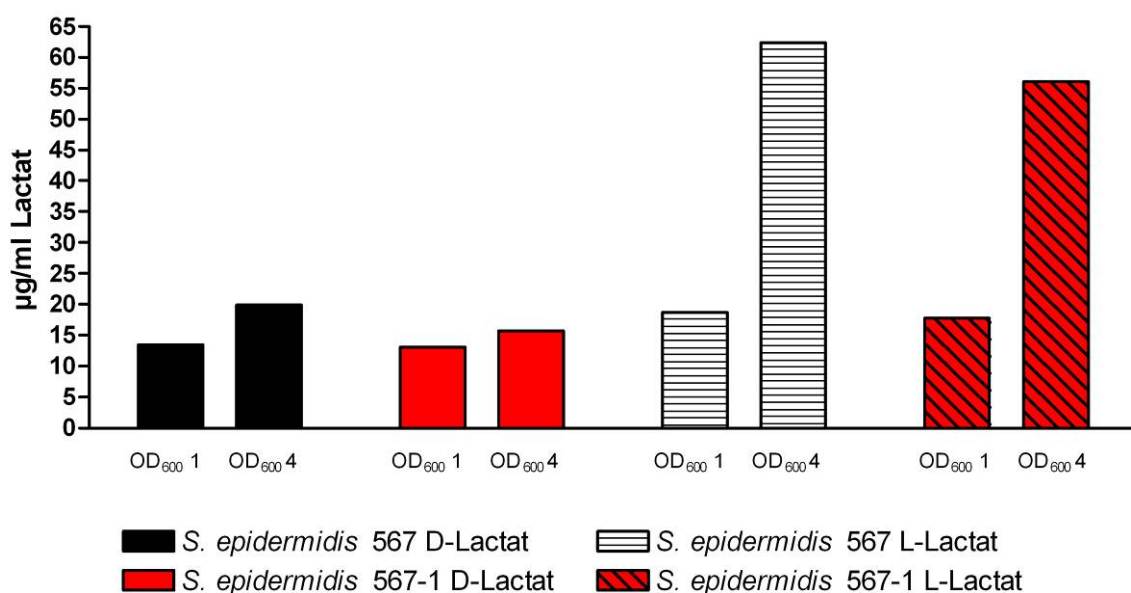


Abbildung 14: Repräsentative Auswertung eines D- und L-Lactat Nachweises entsprechender *S. epidermidis* 567 und *S. epidermidis* 567-1 TSB Schüttelkulturen.

#### 4.1.12 Untersuchung zum Einfluss des Agr-Systems auf die $\beta$ -Lactamresistenz von *S. epidermidis*

Im Verlauf der Datenauswertung der vergleichenden Transkriptom-Analyse von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1 fiel ein besonders stark in der Mutante exprimiertes Gen, eine Metallo- $\beta$ -Lactamase, auf (SE2145, Anhang, Tabelle A3). Da neben der Biofilmbildung vor allem die Verbreitung von Resistenzen im Bereich der nosokomialen Infektionen eine besondere Rolle spielt, sind Faktoren, die auf eine dichteabhängige Regulation von Resistenzen hindeuten, von besonderem Interesse. Deshalb wurden der *S. epidermidis* Wildtyp und die *agr*-Mutante analog zu den vorherigen Experimenten kultiviert und in einem einfachen photometrischen Assay die  $\beta$ -Lactamase-Aktivität des jeweiligen Überstandes und des Zellaufschlusses bei OD<sub>600</sub> 4 bestimmt.

Interessanterweise zeigte sich, dass im Gegensatz zu den Transkriptdaten im Überstand und im Zellaufschluss eine stärkere  $\beta$ -Lactamase Aktivität des *S. epidermidis* Wildtyps nachzuweisen war (Abbildung 15). Jedoch muss festgestellt werden, dass die genaue Rolle der annotierten *S. epidermidis* Metallo- $\beta$ -Lactamasen noch nicht untersucht worden ist (im Gegensatz zu  $\beta$ -Lactamasen wie *blaZ-1* oder *blaZ-2*) und somit über ihre Funktionalität und Regulation nur spekuliert werden kann.

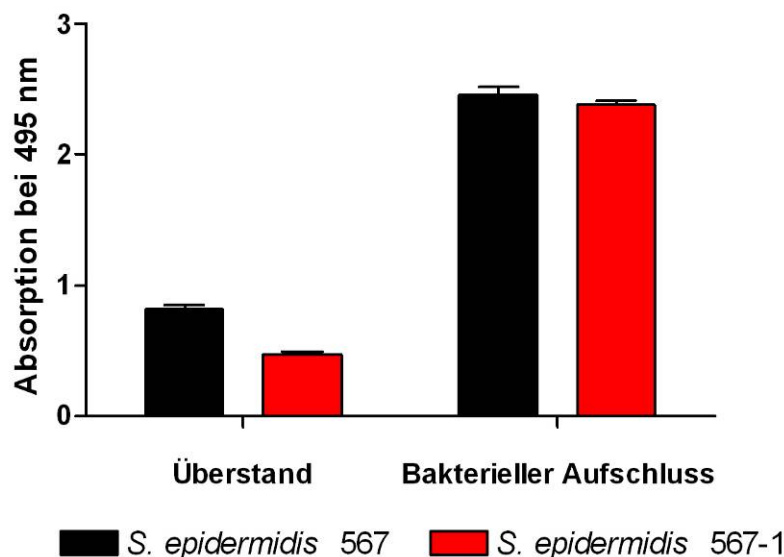


Abbildung 15: Photometrische Bestimmung der  $\beta$ -Lactamase Aktivität des Überstandes und des Zellaufschlusses von *S. epidermidis* 567 und *S. epidermidis* 567-1.



#### 4.1.13 Einfluß von Leucin und Isoleucin auf die *codY* Expression in der *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1

Die Expression von *codY* in *B. subtilis* und *L. lactis* ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Eine besondere Rolle spielen dabei vor allem „branched chain amino acids“ (Leucin, Isoleucin, Valin), wenn sie in bestimmten Oligopeptid-Strukturen vorliegen, die dann nach der Aufnahme in die Zelle als zelluläres Signal fungieren und zu einer entsprechenden CodY-vermittelten regulatorischen Antwort führen. Daher wurde ein grundlegendes Experiment mit der Fragestellung durchgeführt, ob die Zugabe von Leucin und Isoleucin, die als Signal-Aminosäuren in *B. subtilis* beschrieben werden (Guedon *et al.*, 2001; Sonenshein, 2005), die Expression von *codY* in *S. epidermidis* verändern könnte. Dafür wurde eine *S. epidermidis* 567-1 Schüttelkultur mit TSB bis OD<sub>600</sub> 1 kultiviert, dann die jeweilige Aminosäure im Überschuss (100 µg/ml in 1 x PBS pH 7,5) dazugegeben und nach 10 Minuten entsprechend aus jeder Kultur die RNA präpariert. Anschließend wurde eine quantitative RT-PCR unter Verwendung *codY*-spezifischen Primern durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der *S. epidermidis* 567 Wildtyp-Stamm mitgeführt.

Die Zugabe der einzelnen Aminosäuren reichte jedoch nicht aus, um eine signifikante Steigerung der Genexpression von *codY* in *S. epidermidis* 567-1 nachweisen zu können (Abb. 16). Hier wäre es wünschenswert, dieses Experiment auch mit Branched-chain-amino-acid-Oligopeptiden zu wiederholen, um deren möglichen Effekt auf die *codY* Expression zu prüfen. Da die Synthese dieser kurzen Peptide jedoch sehr aufwendig und kostenintensiv ist, würde sich dieser Ansatz jedoch nur in Experimenten mit einer noch herzustellenden *codY*-Mutante lohnen.

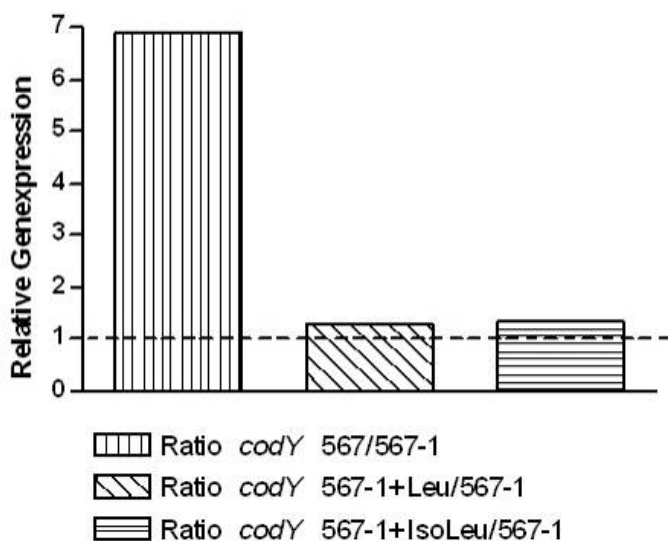


Abbildung 16: Relative Genexpression von *codY* im Vergleich von *S. epidermidis* 567 und 567-1, sowie von *S. epidermidis* 567-1 mit und ohne Zugabe von Leucin oder Isoleucin.

#### 4.1.14 Der Austausch der Kulturüberstände von *S. epidermidis* 567 und *S. epidermidis* 567-1 hat einen unmittelbaren Einfluss auf die *codY* Genexpression

Die vergleichende Transkriptom-Analyse von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr* Mutante *S. epidermidis* 567-1 in der früh- und spät-exponentiellen Phase zeigte einen Effekt des *agr* Quorum-sensing Systems auf die *codY* Expression und damit auf die gesamte Regulation der Aminosäurebiosynthese von *S. epidermidis*. Um zu klären, inwieweit dies ein interner regulatorischer Effekt oder ein indirekter Effekt z.B. über die Sekretion von extrazellulären Proteasen ist, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem die entsprechenden Kulturüberstände ausgetauscht wurden. Beide Kulturen wurden analog zu den allgemein verwendeten Bedingungen bis zu einer  $OD_{600}$  1 kultiviert. Dann wurden die Kulturen parallel bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und anschließend auf das Pellet des jeweils anderen Stammes gegeben und resuspendiert, bzw. im Falle der Kontrolle auf eine parallele Kultur des Stammes gegeben. Die resuspendierten Kulturen wurden dann für 15 bzw. 30 min. wiederum bei 37°C im Schüttelkolben kultiviert und dann entsprechend die RNA Proben für eine quantitative RT-PCR präpariert.

Das Ergebnis dieses Experiments legt nahe, dass die Expression von *codY* unmittelbar mit der Zusammensetzung des Überstandes der Kultur zusammenhängt, wie dieses auch schon für *B. subtilis* und *L. lactis* beschrieben wurde. Nach 15 Minuten Inkubation mit dem Überstand der Mutante zeigt der Wildtyp Stamm *S. epidermidis* 567 eine signifikant verringerte Expression von *codY*. Umgekehrt wird in der *agr* Mutante *S. epidermidis* 567-1 mit dem Überstand des Wildtyps deutlich mehr *codY* expremiert. Jedoch gleichen sich diese regulatorischen Effekte bereits nach 30 min fast vollständig wieder aus (Abbildung 17).

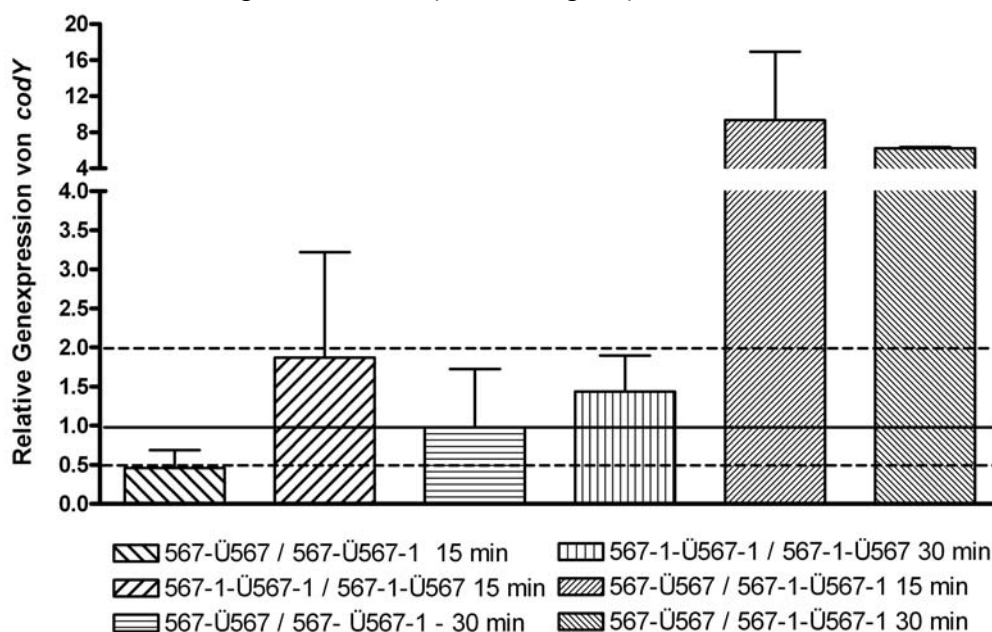


Abbildung 17: Relative Genexpression (RT PCR) von *codY* in einem Kultur/Überstand Austauschexperiment.

#### 4.1.15 Zusammenfassung 4.1.7 bis 4.1.14

Die vergleichenden Proteom- und Transkriptom-Analyse des *S. epidermidis* Wildtyps und seiner isogenen *agr*-Mutante führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Das **Agr-System beeinflusst die meisten der identifizierten extrazellulären Proteine. Akkumuliert werden besonders: PfoR, FeoB, PSM1 und PSM2, SrrA und besonders stark die Serine-Protease SspA. Im Gegensatz dazu wird die Menge an GehC, GehD, IsaA und AtlE im Verlauf der Wachstumskurve deutlich reduziert.**
2. Die vergleichende zytoplasmatische Proteom-Analyse zeigte, dass das **Agr-System einen weitreichenden Effekt auf die Physiologie von *S. epidermidis* hat. Dieses betrifft den Zentralmetabolismus, wie auch die Nukleotidinterkonversion.**
3. Die **Mikroarray-basierte Transkriptom-Analyse unterstützte die Ergebnisse der Proteom-Analysen. Darüberhinaus konnte ein Interaktionspartner des Agr-Systems, CodY, ein pleiotroper Repressor der stationären-Phase-Gene identifiziert werden. CodY ist nur im Wildtyp aktiv, was in der Mutante teilweise die Anpassung der Physiologie an die Zelldichte verhindert.**

Weitergehende physiologische Untersuchungen auf Basis dieser Ergebnisse ergaben:

4. Die **unterschiedliche Regulation der Aufnahme von Dextrose ist nicht der Grund für das veränderte Wachstumsverhalten von Wildtyp und *agr*-Mutante.**
5. Der *S. epidermidis* Wildtyp hat im Vergleich zur *agr*-Mutante eine leicht erhöhte  $\beta$ -Lactamase Aktivität im Überstand.
6. Die Zugabe der einzelnen Aminosäure Leucin oder Isoleucin induziert die *codY*-Expression in der *agr*-Mutante nicht.
7. Für die *codY*-Expression scheint ein Faktor im Überstand verantwortlich zu sein, da sich mittels eines Austauschs der Kulturüberstände von Wildtyp und isogenen *agr*-Mutante *codY* in der Mutante temporär induzieren, bzw. im Wildtyp die Expression reprimieren ließ.

## 4.2 Untersuchungen zur Biofilmbildung von *S. epidermidis*

Die Fähigkeit einen mehrschichtigen Biofilm bilden zu können wird als der Hauptvirulenzfaktor von *S. epidermidis* angesehen und steht damit im Zentrum der aktuellen *S. epidermidis*-Forschung. Trotz der großen Fortschritte auf diesem Gebiet bleiben viele zentrale Fragen der primären Adhäsion, der Ausbildung und letztlich des Auflösens des Biofilms offen.

Im nachfolgenden Kapitel wurde daher das Thema Biofilm in *S. epidermidis* von mehreren Seiten aus beleuchtet. Es wurden Standardisierungsexperimente zur Vergleichbarkeit von Biofilmmessungen durchgeführt, die Biofilmstruktur und Dynamik durch konfokale Lasermikroskopie untersucht sowie Analysen des extrazellulären Proteoms und des Gesamttranskriptoms im Biofilm vorgenommen.

### 4.2.1 Biofilmbildung in *S. epidermidis*: ein dynamischer, zeit- und umgebungsabhängiger Prozess

Für den klassischen Biofilm-Assay für Staphylokokken werden 96-Loch Mikrotiterplatten mit 200 µl Medium je Vertiefung befüllt und diese aus der entsprechenden Übernachtskultur in einer Verdünnung von 1 : 10 beimpft und die Platte dann über Nacht bei 37°C inkubiert. In der Vergangenheit haben sich jedoch bei diesem Vorgehen, insbesondere bei *S. aureus*, große Abweichungen zwischen einzelnen Experimenten ergeben. Daher wurde ein Protokoll entwickelt, das eine bessere Standardisierung und damit Vergleichbarkeit der Versuche erlaubt. (Abbildung 18).

Zunächst erschien es nötig, die bakterielle Zellzahl und die Wachstumsphase, die für den Start einer Wachstumsphase essentiell sind, bei den zu untersuchenden Stämmen besser zu synchronisieren. Dafür wurde direkt nach der Übernachtskultur eine weitere Vorkultur angesetzt (Abbildung 18, Schritt 1), in der die Zellen bis zur früh-exponentiellen Phase bei OD<sub>600</sub> 0,5 kultiviert wurden. Diese Kultur wurde dann wiederum mit vorgewärmtem Medium 1: 10 verdünnt, und je 150 µl pro Vertiefung in ausreichend lange vorgewärmte Mikrotiterplatten gefüllt. Die Platten wurden anschließend bei der gewünschten Temperatur inkubiert (Schritt 2). Biofilmmessungen wurden zu fest gewählten Zeitpunkten vorgenommen, um verschiedene Bedingungen und den Verlauf des Wachstums vergleichen zu können (Schritt 3). Außerdem wurde, vor der Biofilmmessung, das Wachstum der Bakterien im Überstand durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt, um die Biofilmmenge mit der Anzahl der Bakterien in Beziehung setzen zu können. Dies ist auch für die spätere Testung von Substanzen mit Anti-Staphylokokken- und Anti-Biofilmwirkung von hohem praktischem Nutzen.

Um mechanische Beschädigungen vor allem von schwächer ausgebildeten Biofilmen zu vermeiden, wurden die Kulturen mittels einer Mehrkanalpipette vorsichtig entfernt und mehrfach mit PBS gespült. Nach dem Trocknen wurde der anhaftende Biofilm, wie in Material und Methoden beschrieben, mit Kristallviolett angefärbt.

Die Daten des Biofilms und des Überstandes stehen in einer direkten Beziehung zueinander. Ist ein Medium besonders reich an Glukose, so wird nicht nur ein stärkerer Biofilm gebildet, sondern auch die Bakterien im Überstand werden entsprechend stärker wachsen. Als Biofilm induzierend kann folglich nur eine Bedingung gelten, wenn die Akkumulation des Biofilm die Erhöhung des Wachstums im Überstand deutlich übertrifft. Durch die Bildung des Quotienten der Absorption des Biofilms bei 495 nm und der OD<sub>600</sub> beim entsprechenden Zeitpunkt ergibt sich eine einfache Relation, die dieses unmittelbar darstellt, jedoch keine numerische Zahl im Sinne von Zellzahlverhältnissen repräsentiert.

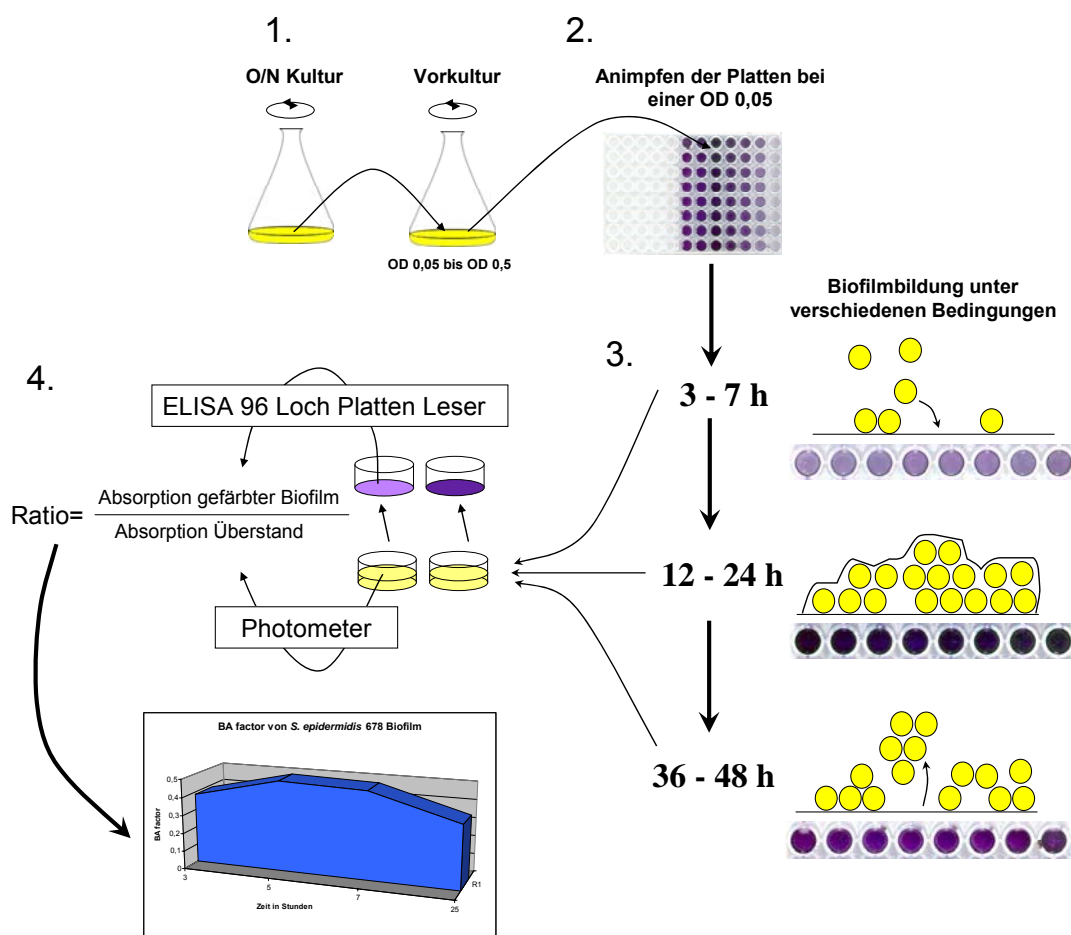


Abbildung 18: Standardisierungsprotokoll zur Biofilmbildung in Staphylokokken (Schritt 1 bis 3) und Darstellung der versuchstechnischen und mathematischen Berechnung des BA-Ratio (Bakterielle Adhäsion).

Da dieser Faktor die relative bakterielle Adhäsion darstellt, wurde dieser Quotient im Folgenden als BA-Ratio (für bakterielle Adhäsion) bezeichnet. Neben dem Vergleich verschiedener Bedingungen ermöglicht die „Normalisierung“ mittels der BA-Ratio auch den Vergleich der Biofilmbildung entlang der Zeit und den Vergleich der Kapazität der Adhäsion verschiedener Stämme, auch unter unterschiedlichen Bedingungen.

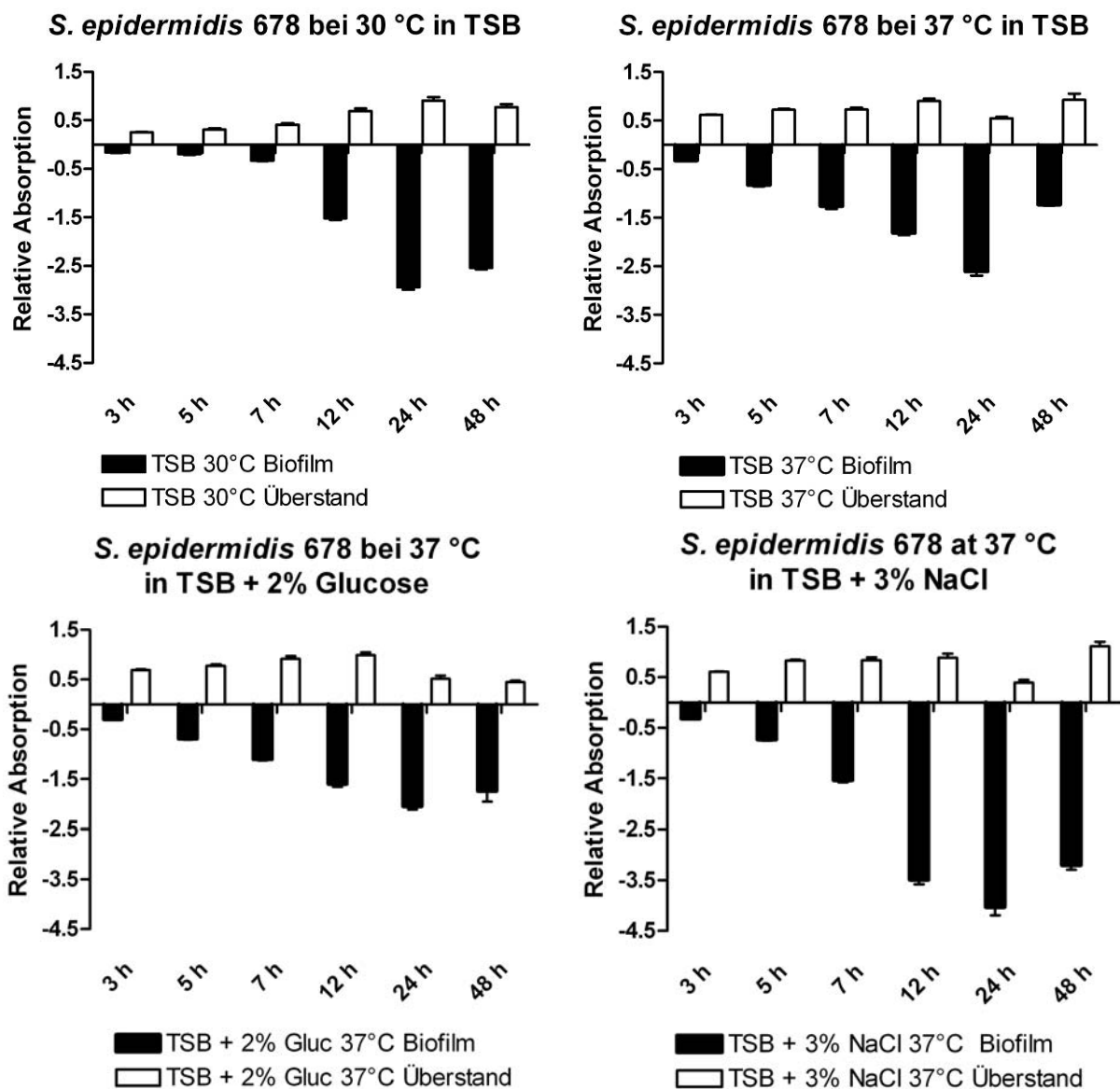


Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der Biofilmbildung und des Wachstums im Überstand von *S. epidermidis* 678 unter vier verschiedenen Bedingungen. Die weißen Balken zeigen die  $OD_{600}$  des Überstandes an, die schwarzen Balken (nach unten zeigend) die relative Stärke des Biofilms, gemessen bei 495 nm.

Durch die Verwendung des Standardisierungsprotokolls bei den Biofilmexperimenten ließen sich weitgehend konstante Ergebnisse mit allen getesteten Stämmen erzielen. Als Ausgangsbasis für weitere Experimente führte ich daher einige Biofilm-Assays mit *S. epidermidis* 687 in verschiedenen Medien, bzw. mit verschiedenen Zusätzen durch. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse einiger Experimente in TSB Medium bei 37°C, bei 30°C, mit 2 % Glucose und mit 3 % NaCl in einem Balkendiagramm dargestellt. Abbildung 20 zeigt dieselben Experimente mit der BA-Ratio im unmittelbaren Vergleich.

Deutlich zu erkennen ist, dass die Biofilmbildung unter allen Einflüssen ein dynamischer Prozess ist, der unter den verschiedenen Bedingungen jedoch unterschiedlich schnell und stark abläuft. So kommt es nach einer anfänglich langsamen Akkumulation meist ab der siebten Inkubationsstunde zu einer stärkeren Wachstumsphase. Im Kontrast dazu findet das stärkste Wachstum im Überstand eher unmittelbar nach Beginn des Experiments statt. Besonders zwischen 24 h und 48 h nimmt die Stärke des Biofilms unter allen Bedingungen ab, wohingegen die optische Dichte im Überstand zum Teil sogar noch zunimmt oder aber stabil bleibt. Dies weist auf einen aktiven Ablöse-Mechanismus („Detachment“) hin.

Abbildung 20 gibt den Verlauf der Akkumulation mittels BA-Ratio wieder. Besonders deutlich wird, um wie viel intensiver die Akkumulation des Biofilms im Verhältnis zum Wachstum in TSB-Medium unter der Zugabe von 3 % NaCl bei *S. epidermidis* 678 ist. Bei 30°C fällt auf, dass die BA-Ratio ähnlich stark zu den anderen Bedingungen ansteigt, dann aber vergleichsweise schwach nach 24 h abfällt, so dass das Verhältnis von Biofilmdicke und OD<sub>600</sub> des Überstandes relativ konstant bleibt.

Die Biofilm-Assays wurden mit diversen Stämmen und Bedingungen getestet, deren Ergebnisse weitestgehend mit den in der Literatur gezeigten Datensätzen übereinstimmen. Jedoch gab es in einem Fall eine erstaunliche Abweichung. Wie in Abbildung 20 gezeigt wird, induziert die Zugabe von 3 % NaCl in *S. epidermidis* 678 eine starke Biofilmbildung. Bei der Untersuchung des Stammes *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1 zeigte sich jedoch im Gegensatz dazu ein völlig anderes Phänomen (Abbildung 21). Die Zugabe von 3 % NaCl reduzierte die Biofilmbildung, im Vergleich zum Wachstum im Überstand deutlich. Inwieweit die Herkunft von *S. epidermidis* 567 als Harnwegsisolat eine Rolle spielt konnte jedoch nicht geklärt werden. Insgesamt muss jedoch bemerkt werden, dass es sich bei *S. epidermidis* 567 um einen im Vergleich mit anderen Stämmen eher schwachen Biofilmbildner handelt.

Wie unterschiedlich stark verschiedene Staphylokokken-Stämme unter bestimmten Bedingungen Biofilm bilden, verdeutlicht Abbildung 22. Dabei ist nicht nur das maximal Maß der Biofilmdicke stark abweichend, sondern auch wie schnell der Biofilm ausgebildet wird.

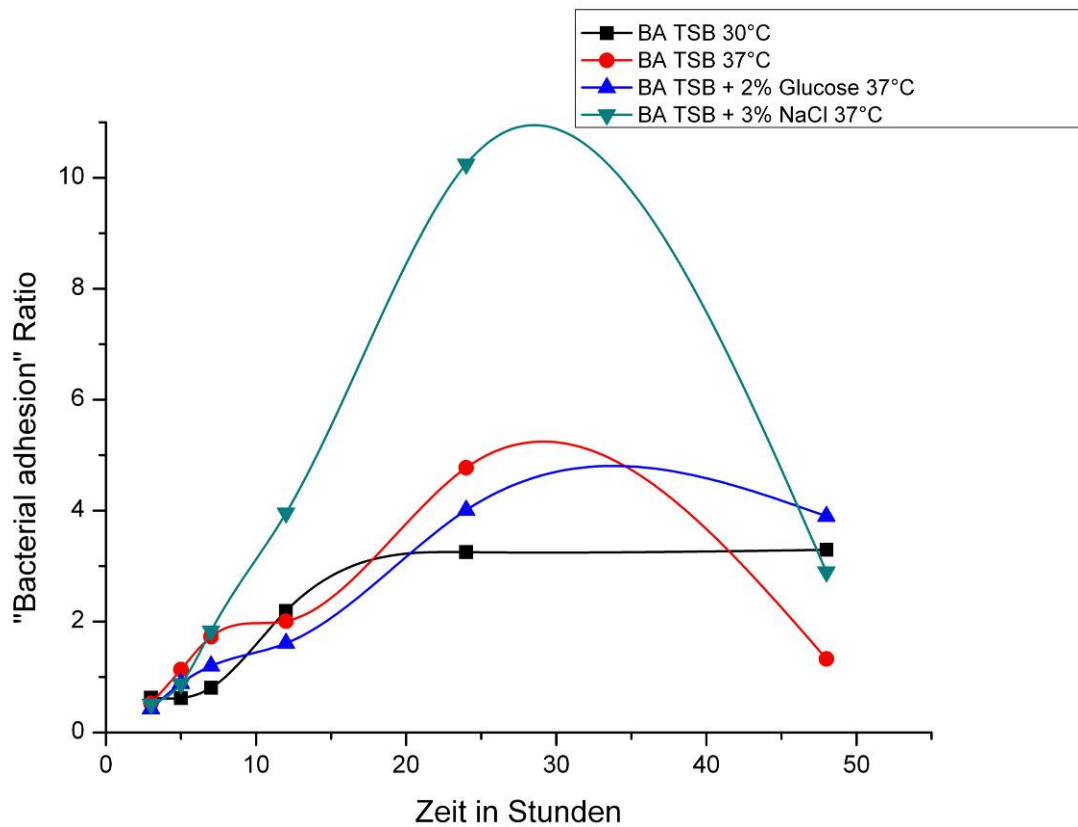


Abbildung 20: „Bacterial Adhäsion“ Ratio von *S. epidermidis* 678 unter verschiedenen physiologischen Bedingungen.

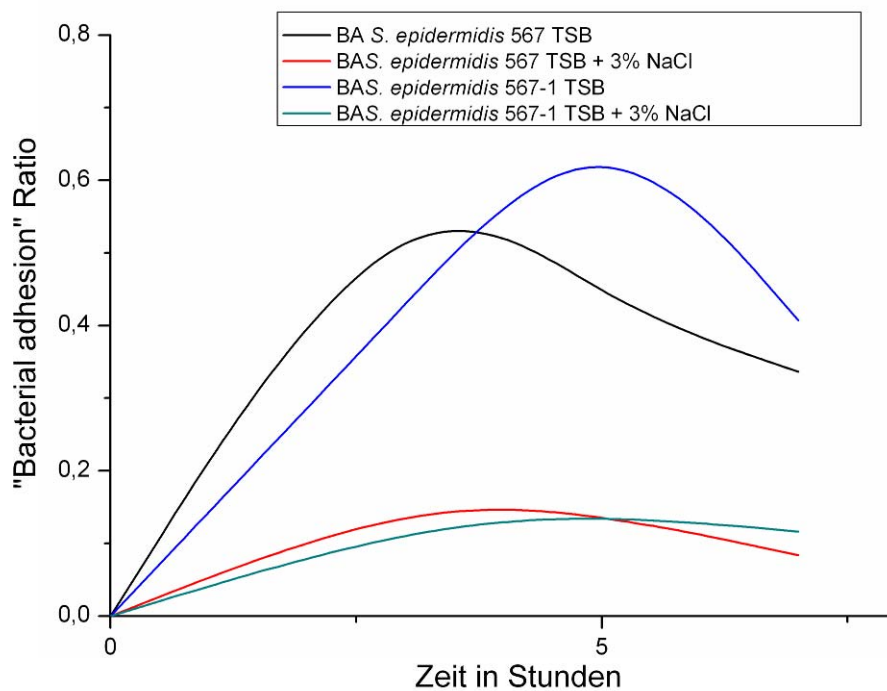


Abbildung 21: Bakterielle Adhäsion bei 37°C von *S. epidermidis* 567 und *S. epidermidis* 567-1 in TSB Medium und unter der Zugabe von 3 % NaCl.



*S. aureus* 325 stellt einen Superlativ im Bereich der Biofilmbildung da. Hinzu kommt, dass er praktisch nur Biofilm bildet und so gut wie gar nicht im Überstand wächst. Erstaunlicherweise neigt er in Schüttelkultur jedoch nicht zu starker Klumpenbildung. *S. epidermidis* RP62A ist ein klassischer Laborstamm der *S. epidermidis* Forschung. Er zeigt von Beginn des Biofilm-Assays an eine starke Biofilmbildung, die aber bereits nach 7 Stunden ihr Maximum erreicht. Im Vergleich dazu zeigt *S. epidermidis* 678 unter guten Wachstumsbedingungen, also zu Beginn der Kultur, sowohl starkes Biofilmwachstum, als auch ein deutliches Wachstum im Überstand. Erst nach sieben Stunden beginnt er deutlich stärker in der Biofilmschicht zu wachsen. Abschließend bleibt jedoch die Feststellung, dass jeder Stamm seine individuellen Kultivierungsoptima im Bezug auf Biofilmbildung hat. Dieser dynamische Prozess ist ein klar zeitlich definierter Vorgang, der von Umgebungsvariablen, wie der Salzkonzentration, Glukose, Nährstoff- und Sauerstoff, der Temperatur und nicht zuletzt der Beschaffenheit der Oberfläche ganz maßgeblich beeinflusst wird. Darüber hinaus dürften Strömungsverhältnisse und andere Faktoren zu Variationen führen. Die deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen sind möglicherweise evolutionäre Anpassung und ökologische Nischenbildungen.

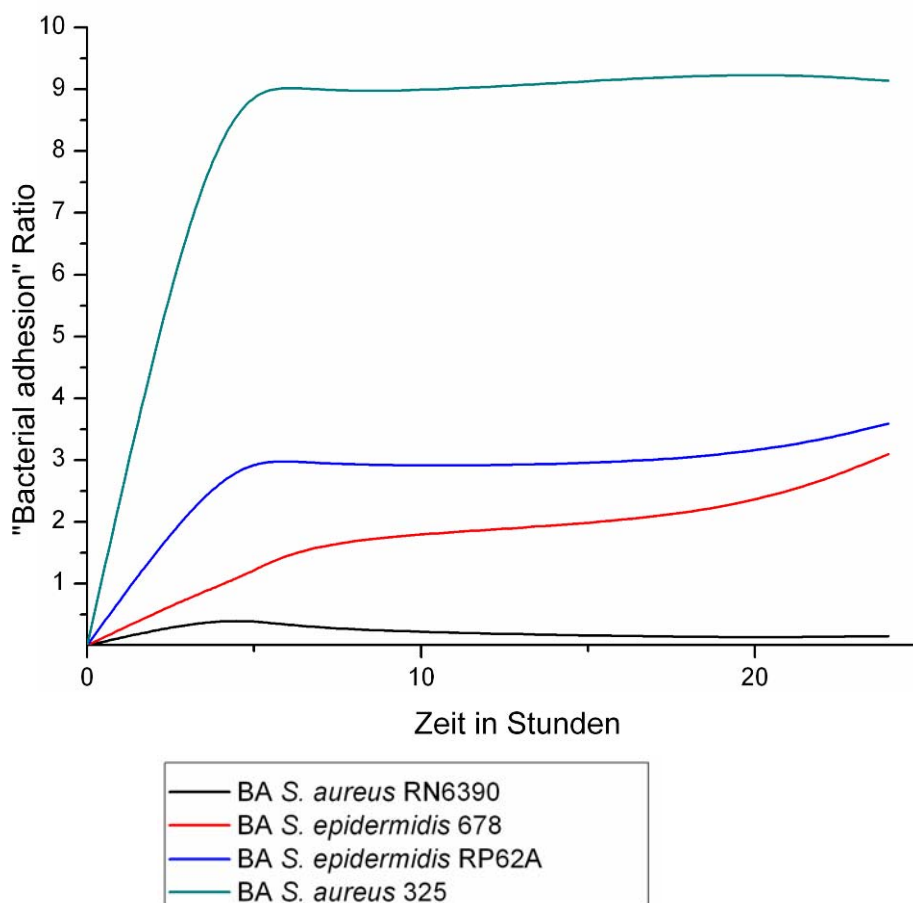
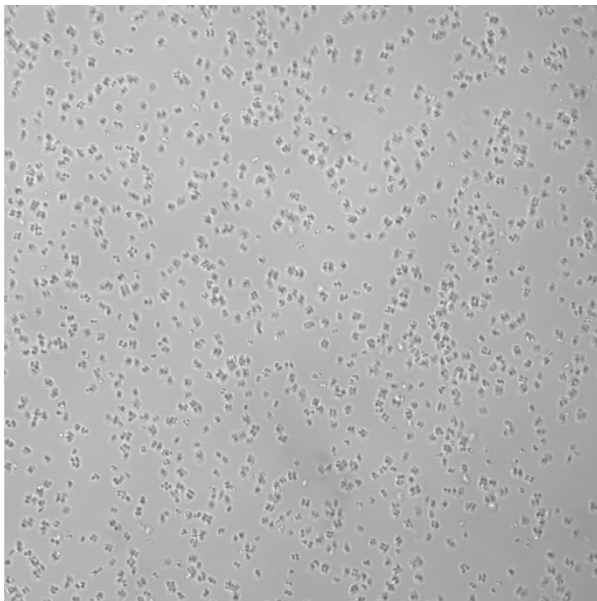


Abbildung 22: Bakterielle Adhäsion in TSB Medium, bei 37°C von vier verschiedenen Staphylokokken-Stämmen.

#### 4.2.2 Mikroskopische Aufzeichnung des zeitlichen Verlaufs der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 678

Der zeitliche Verlauf der Biofilmbildung sowie die Bestimmung lebender und toter Zellen innerhalb dieser Struktur wurde mittels konfokale Lasermikroskopie eingesetzt. Dafür wurde *S. epidermidis* 678 analog zu den Biofilm-Experimenten in einer Schüttelkultur von einer  $OD_{600}$  0,05 zu  $OD_{600}$  0,5 vorkultiviert und dann in einer 1:10 Verdünnung in 900  $\mu$ l vorgewärmtes Medium in „Chamber slide<sup>®</sup>“-Systeme (Lab-Tek, Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) pipettiert. Diese Kammern ermöglichen es, den Biofilm von unten durch einen durchsichtigen Objektträger bei verschiedenen Wellenlängen zu mikroskopieren. Somit konnte unter Zuhilfenahme einer 37°C Temperaturkammer der zeitliche Verlauf der Biofilmbildung durch Intervall-Fotografie aufgezeichnet werden. Nach 24 h wurde dann unter Verwendung des „BacLight<sup>®</sup>“ Live/Dead Kits (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) die lebenden und toten Zellen innerhalb des Biofilms mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Der detaillierte Verlauf der Biofilmbildung wird in Abbildung A1 im Anhang dargestellt. Abbildung 23 stellt die Situation zum Beginn des Experiments (0 h) und am Ende nach 24 h dar. Die anschließende Lebend-tot-Färbung zeigt (Abbildung 25), dass der überwiegende Teil der Bakterien innerhalb des Biofilms bereits nach 24 h tot ist, und dass diese abgestorbenen Bakterien in Aggregaten auftreten.

0 h



18 h 45 min

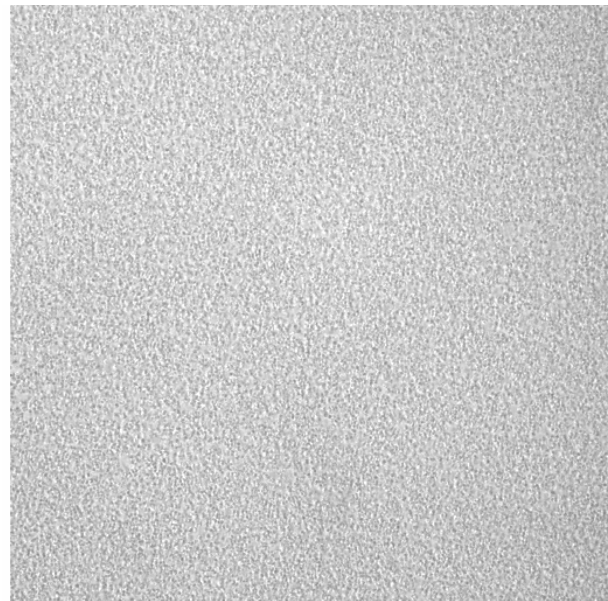


Abbildung 23: Mikroskopische Bilder (63 x) des Verlaufs der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 678 in TSB, bei 37°C. Der gesamte Verlauf wird im Anhang, Abbildung A1 dargestellt.

### 4.2.3 Der Biofilm von Staphylokokken: Wachstum und Sterben

Die Untersuchungen zum Verlauf der Biofilmbildung von *S. epidermidis* zeigten eine deutliche Dynamik. Das klassische Modell der 3 Phasen (Bindung an die Oberfläche, Akkumulation durch Wachstum und Auflösung) lässt sich anhand des verwendeten BA-Modells gut nachvollziehen. Jedoch sagen die klassischen Modelle nichts über das Überleben und das Wachstum aus. In Ergänzung zur Dokumentation des Prozesses der Biofilmbildung in 3.2.2 wurde daher an entscheidenden Punkten der Biofilmbildung (siehe Abbildung 24) konfokale Lasermikroskopaufnahmen des Biofilms von *S. epidermidis* 678 gemacht. Dabei wurden mittels eines Live/Dead-Kits sowohl die lebendigen, als auch die bereits abgestorbenen Zellen markiert. Der Verlauf ist in Abbildung 25 dargestellt. Die nach 3 h noch lose Struktur des Biofilms verdichtet sich bis zum Zeitpunkt 7 h deutlich und erreicht nach 24 h ihren Maximalwert. Jedoch sind zu diesem Zeitpunkt bereits eine große Zahl an toten Zellen in der Biofilmstruktur zu erkennen (rote Zellen). Nach 48 h ist ein großer Teil des Biofilms abgestorben. Es fällt auf, dass die toten Zellen nicht zufällig verteilt vorkommen, sondern sich als Kluster ausbreiten und im Gegensatz zu den lebendigen Zellen schnell ihre Kokkenform verlieren. Dies könnte ein Indiz für eine aktive Zersetzung innerhalb des Biofilms sein. Denkbar ist auch, dass der Biofilm durch das Absterben der einzelnen Zellen poröser und damit ein mechanisches Ablösen durch Strömung einfacher wird. Jedoch kann sich ein einzelnes Bakterium bei Verschlechterung der Nährstoffsituation nicht aus seinem Biofilmverbund lösen. Das Bakterium stirbt in der eigentlich zum Schutz aufgebauten Masse, was aber unter Umständen für das klonale Überleben sinnvoll ist.

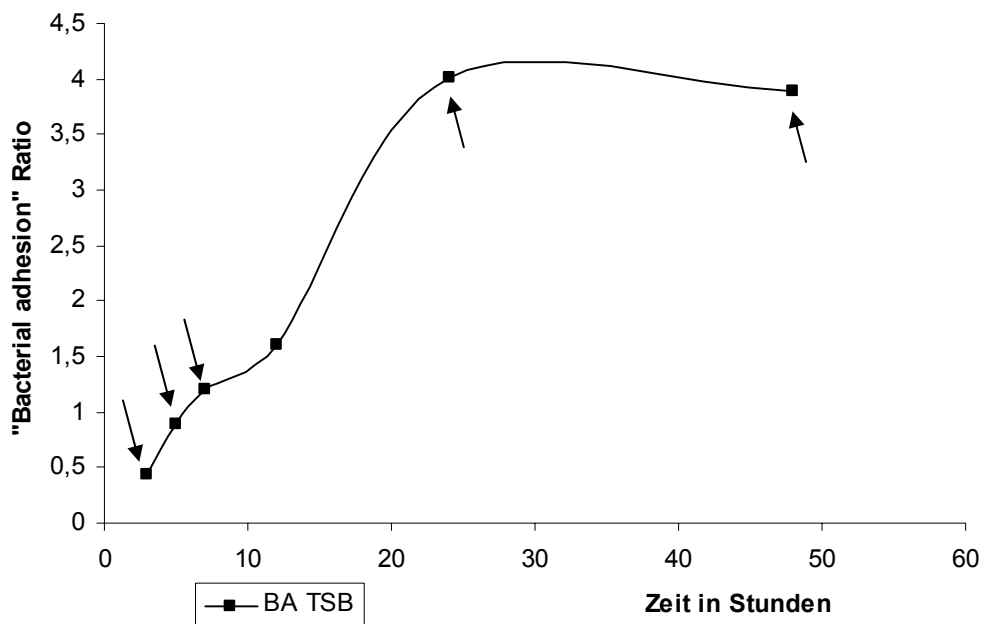


Abbildung 24: BA-Faktor Verlauf der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 678 in TSB Medium, bei 37°C. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Probennahme des korrespondierenden konfokalen Lasermikroskop Experiments.

Abbildung 25: Bilder der konfokalen Lasermikroskopie von Live/Dead gefärbten *S. epidermidis* 678 Biofilmen, nach 3, 5, 7, 24 und 48 h links nach rechts. Informationen zu den Bildern:

3 h; Bildgröße real: 206 x 206 x 12  $\mu\text{m}$ ;

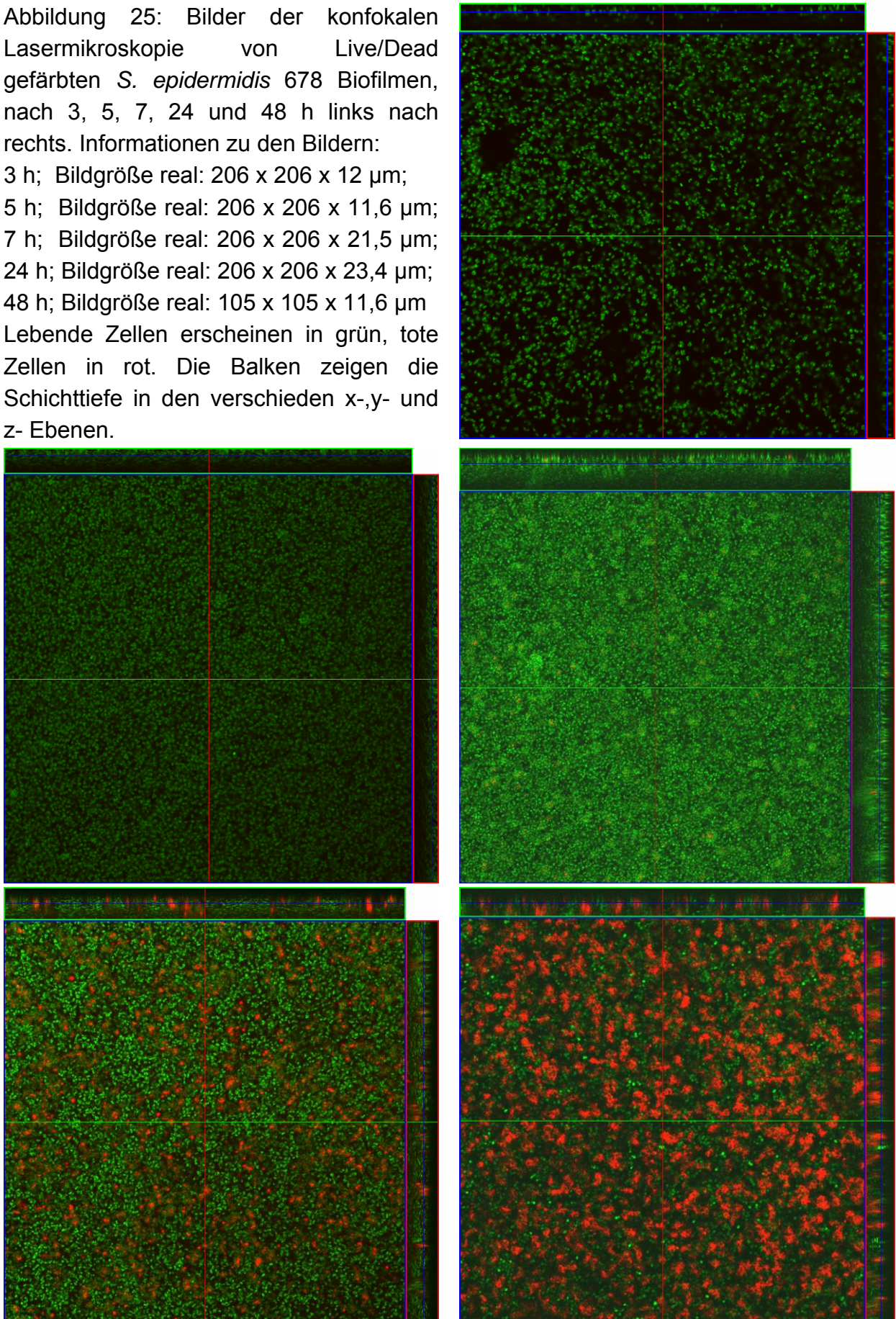
5 h; Bildgröße real: 206 x 206 x 11,6  $\mu\text{m}$ ;

7 h; Bildgröße real: 206 x 206 x 21,5  $\mu\text{m}$ ;

24 h; Bildgröße real: 206 x 206 x 23,4  $\mu\text{m}$ ;

48 h; Bildgröße real: 105 x 105 x 11,6  $\mu\text{m}$

Lebende Zellen erscheinen in grün, tote Zellen in rot. Die Balken zeigen die Schichttiefe in den verschiedenen x-,y- und z- Ebenen.



#### 4.2.4 Der Einfluss von NaCl auf die Sekundärstrukturbildung im Biofilm von *S. epidermidis*

Die Untersuchungen der Biofilmbildung in 3.2.1 zeigten einen deutlichen Einfluss von Natriumchlorid auf die Stärke des Biofilms. Dies wird in der Literatur auch bereits beschrieben. Eine genauere Analyse, in welcher Art und Weise NaCl die Biofilmbildung verändert, steht jedoch aus. Die Dicke eines Biofilms unterliegt einigen theoretischen Begrenzungen. Vor allem, wenn eine ausreichend gute Versorgung der verschiedenen Zellschichten, zumindest während der Wachstumsphase, gewährleistet sein soll. Das heißt, dass sich theoretisch die Dicke des Biofilms begrenzt. Die Zugabe von NaCl zu TSB verändert ja nicht die Energielimitation und damit das Wachstumspotential von *S. epidermidis*. Daher erschien es plausibel, dass andere Faktoren zu einer stärkeren Biofilmbildung führen müssen.

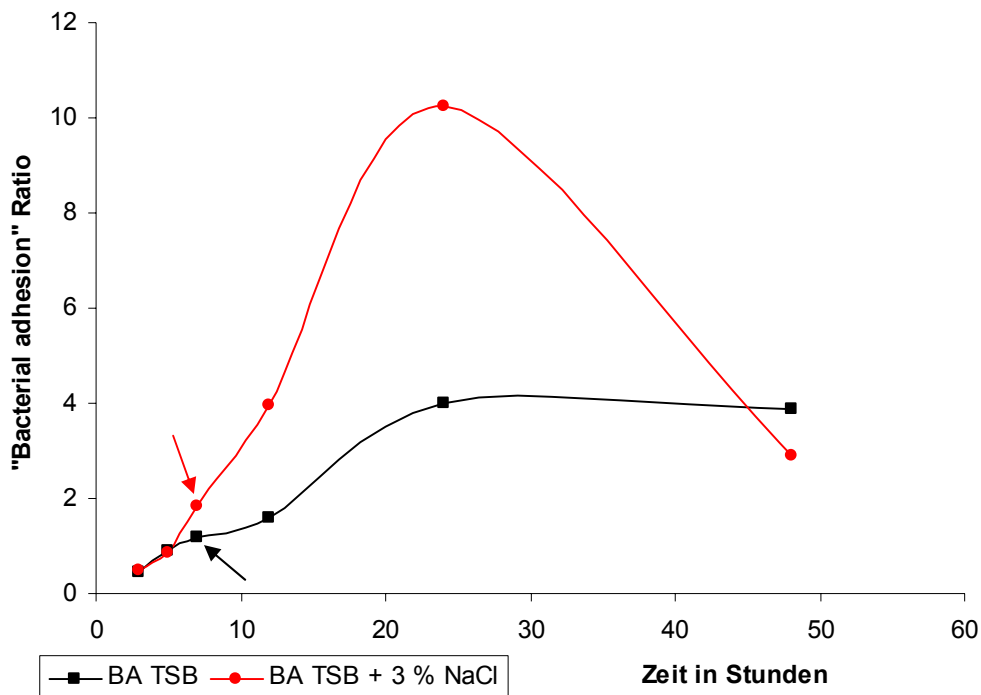
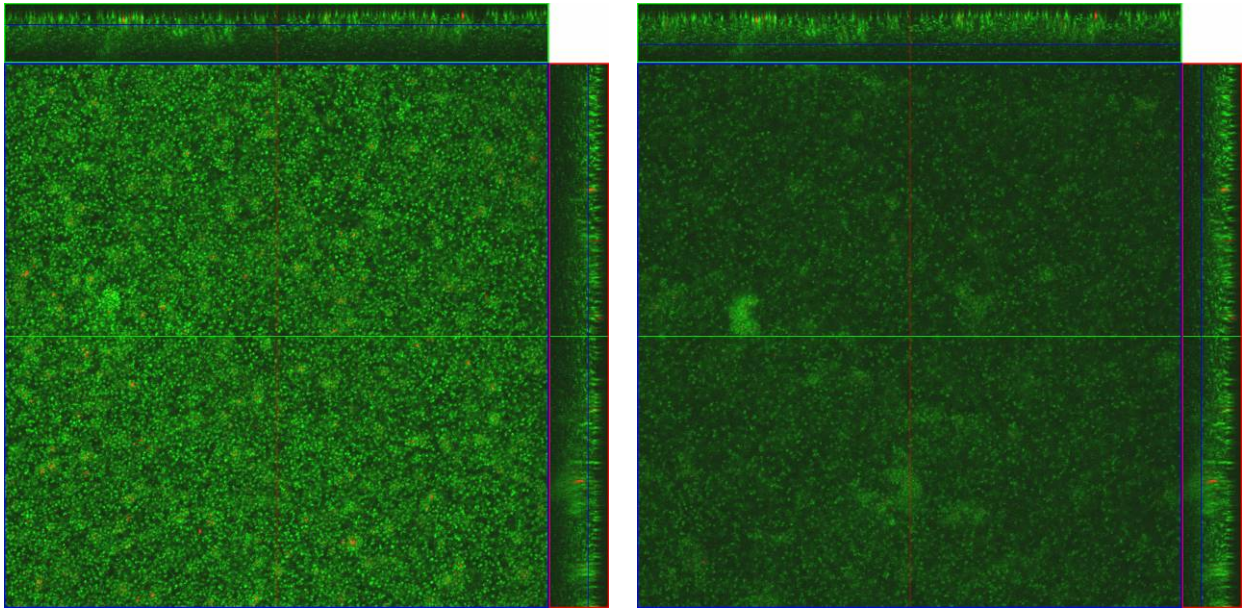


Abbildung 26: Bakterielle Adhäsion (BA)-Ratio von *S. epidermidis* 678 in TSB Medium und TSB Medium mit zusätzlich 3 % NaCl, bei jeweils 37°C. Die beiden Pfeile markieren die Messzeitpunkte des korrespondierenden konfokalen Live/Dead Experiments.

Biofilm in TSB nach 7 h; Bildgröße real: 206 x 206 x 21,5  $\mu\text{m}$



Biofilm in TSB + 3 % NaCl nach 7 h; Bildgröße real: 206 x 206 x 37,6  $\mu\text{m}$

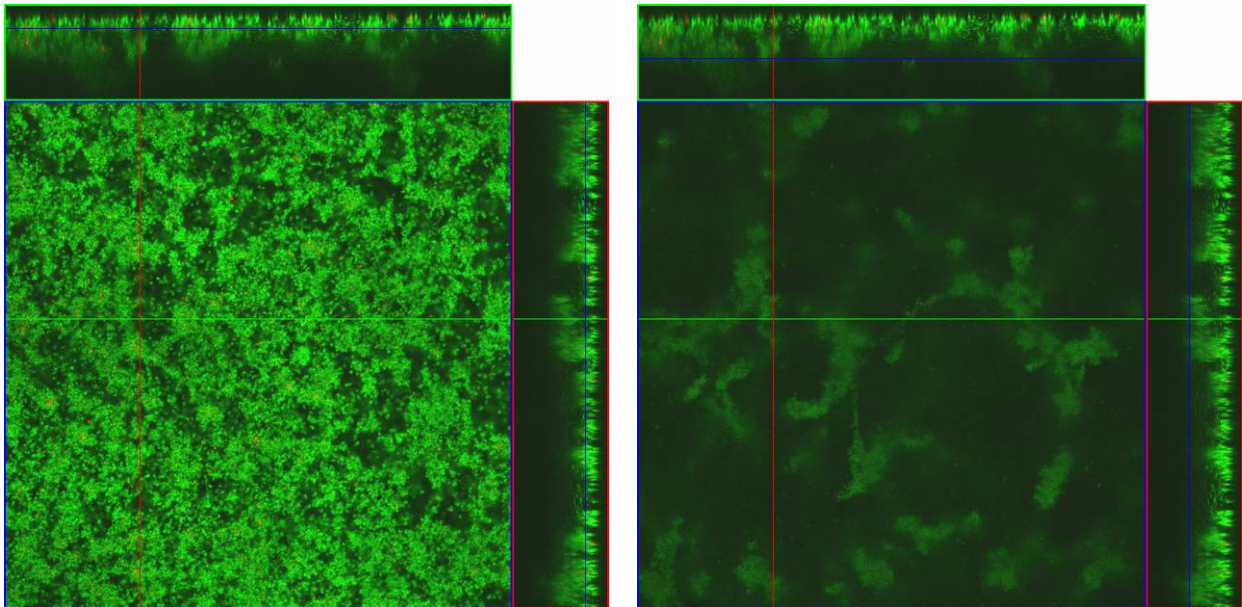


Abbildung 27: Konfokale Lasermikroskopie-Bilder (63 x) von Live/Dead gefärbten *S. epidermidis* 678 Biofilmen. Die beiden oberen Bilder stellen den Biofilm nach 7 h in TSB Medium dar, die beiden unteren den Biofilm unter Zugabe von zusätzlich 3 % NaCl. Das linke Bild ist jeweils aus einer tieferen Schicht, das rechte Bild aus einer nahe der Oberfläche gelegenen Schicht aufgenommen. Grüngefärbte Zellen sind lebendig, Zellen in rot sind abgestorben.

Zur Untersuchung von möglichen Strukturunterschieden in der Biofilmbildung wurde ein einfaches kofokales Lasermikroskopisches Experiment mit dem Biofilm von *S. epidermidis* 678 nach 7 h (Abbildung 26 zum Vergleich der BA-Kurven) mit und ohne Zugabe von 3 % NaCl im TSB Medium durchgeführt. Abbildung 27 zeigt die äußerst deutlichen Unterschiede.

Bei Biofilm in normalem TSB Medium bildet *S. epidermidis* 678 eine homogene Biofilmstruktur. Diese ist sowohl in den unteren Schichten als auch auf der Oberfläche recht ähnlich ausgeprägt. Die Oberflächenstruktur zeigt kleinere „Hügel“, aber kein ausgeprägtes Wachstum einzelner Zellkluster in die Höhe.

Im Vergleich dazu ist in der Biofilm von *S. epidermidis* 678 in TSB Medium unter Zugabe von 3 % NaCl bereits in den tieferen Schichten deutlich strukturierter. Der Biofilm erscheint wie von Kanälen durchzogen. Diese starke Ausprägung einer Sekundärstruktur zieht sich durch die gesamte Schichtdicke und führt zur Ausprägung von „Biofilmtürmen“, die eine Höhe von bis zu 40 µm innerhalb von 7 h erreichen können. Dies entspricht bei einer durchschnittlichen Größe von 1 µm einer Schichtdicke von mindestens 40 Bakterien. Es ist leicht vorstellbar, dass sich diese „Biofilmtürme“ beim Absterben der unteren Schicht durch Strömung abreißen lassen und diese Kluster dann im Wirt in den einzelnen Organen neue Infektionsherde hervorrufen können.

#### **4.2.5 Zusammenfassung 4.2.1 bis 4.2.4**

Die physiologischen Charakterisierungen des Biofilms von *S. epidermidis* und die Untersuchungen mittels konfokalem Lasermikroskops ergaben:

- 1. Die Biofilmbildung ist ein dynamischer zeitlich und umgebungsabhängiger Prozess, der sich mittels einer Ratio von Überstand und Biofilm-Absorption mathematisch beschreiben lässt.**
- 2. Verschiedene Stämme unterscheiden sich erheblich in der Qualität und in der Quantität der Biofilmbildung unter diversen getesteten Bedingungen.**
- 3. Die zeitliche Beobachtung der Biofilmbildung zeigte, dass bereits nach 24 h einige tote Bakterien im Biofilm vorliegen. Nach 48 h ist ein Großteil des Biofilms abgestorben.**
- 4. Das Absterben der Bakterien im Biofilm tritt nicht zufällig verteilt sondern in Klustern auf. Die abgestorbenen Bakterien verlieren schnell ihre Kokkenform. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass sich so eher Bakterien-Aggregate als Einzelzellen aus der Biofilmmasse ablösen.**
- 5. Die Zugabe von 3 % NaCl zum Medium führt bei *S. epidermidis* 678 zu einer erheblich verstärkten Sekundärstruktur im Biofilm, in Form von Türmen und Kanälen.**



### **4.3 Untersuchungen zur Regulation der Biofilmbildung in *S. epidermidis* mittels Proteom- und Transkriptom-Analysen**

Die klassischen Modelle, in denen Gen- und Proteinregulation der Biofilmbildung in Staphylokokken untersucht werden, basieren immer auf dem Vergleich einer Schüttelkultur mit einer Biofilmkultur. Daraus resultieren aber diverse Probleme, da zwei Zustände miteinander verglichen werden, die an sich zu verschieden sind, um Rückschlüsse auf deren Regulation ziehen zu können. Besonders im Bereich des Stoffwechsels dürften die Unterschiede in der Genregulation zum Beispiel durch das unterschiedliche Sauerstoffangebot erheblich sein.

In den Untersuchungen zur Biofilmdynamik (3.2.1) war deutlich erkennbar, dass sich der Überstand über einem Biofilm anders verhält als die Bakterien im Biofilm. Dabei liegen beide Systeme zueinander in enger räumlicher Nähe und unterliegen damit den gleichen äußeren Bedingungen und einem vergleichbaren zeitlichen Ablauf der Biofilmbildung. Besonders die stammspezifischen Unterschiede (Abbildung 22) deuten darauf hin, dass Bakterien nicht nur Biofilm bilden, weil sie zufällig an eine Oberfläche gekommen sind, sondern, dass damit immer auch eine spezifische Antwort auf physiologische Signale verbunden ist.

*S. epidermidis* 678 stellt einen sehr guten Modellorganismus dar, da er einen starken Biofilm bildet, gut induzierbar ist und darüber hinaus auch im Überstand des Biofilms gut wächst. Zur Präparation von von RNA war es notwendig, ein System zu etablieren, in dem genug Zellmaterial geerntet werden konnte und dennoch eine Vergleichbarkeit zu dem bestehenden Mikrotiterplatten-Assays herrscht. Daher wurden 175 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflaschen mit Lüftungsdeckel verwendet, die nach analoger Vorkultur (3.2.1) mit vortemperierten 130 ml TSB Medium bei einer OD<sub>600</sub> 0,05 beimpft wurden. Die Flaschen wurden ebenfalls ruhig stehend kultiviert. Um die Zellen des Biofilms zu ernten, wurde der Überstand zunächst abgegossen und der Biofilm dreimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde der Biofilm mit einem Zellschaber in 50 ml eiskaltem 1 x PBS oder bei einer RNA-Präparation mit RNA-Protect : 1 x PBS (2:1) abgelöst, in ein Falconröhrchen überführt und abzentrifugiert (6328 x g, 4°C, 10 Minuten). Das Sediment wurde nun entweder unmittelbar aufgeschossen oder für wenige Tage bei -20°C gelagert und der Überstand entsprechend behandelt.

### 4.3.1 Das extrazelluläre Proteom von *S. epidermidis* 678 in einer Biofilmkultur

Da die Biofilmbildung durch die Produktion von PIA und Adhäsionsfaktoren hauptsächlich mit der Produktion extrazellulären Faktoren verbunden ist, stellte sich die Frage, inwieweit es zu Veränderungen im extrazellulären Proteom einer Biofilmkultur kommt. Daher wurden die extrazellulären Proteine nach 7 h, 12 h, 24 h und 48 h präpariert, mittels 2-D Gelelektrophorese aufgetrennt und dann verglichen (Abbildungen 28 und 29). Der größte Unterschied im extrazellulären Proteom ist zwischen 12 h und 24 h bzw. 48 h zu beobachten. Weil aber die Art des Proteommusters nach 24 h und 48 h stark auf zytoplasmatische Proteine hinweist, die bei der Lyse sterbender Bakterien frei gesetzt werden, scheint dieses eher kein Produkt eines aktiven Sekretionsprozess darzustellen. Ob die auf diese Weise sekretierten Proteine eine aktive Rolle in der Genregulation überlebender Bakterien spielen, kann nur spekuliert werden. Es kann jedoch angenommen werden, dass diese Lyse von anderer, umliegenden Zellen möglicherweise als physiologisches Signal wahrgenommen wird und so ein entsprechender Einfluss auf die Genregulation stattfindet. Im Vergleich mit den Ergebnissen der Untersuchung zu *S. epidermidis* 567 fällt ein deutlich abweichendes Proteinbild zu dem von *S. epidermidis* 678 auf (Vergleiche Abbildung 9 und 29). Dieses ist jedoch, wenn man die aktuelle Literatur zu *S. aureus* vergleicht, nicht ungewöhnlich. Die Art und Anzahl der Spots insgesamt variiert deutlich, jedoch ist auch die Anzahl der Spot verglichen mit anderen Spezies wie *S. aureus* auch eher gering.

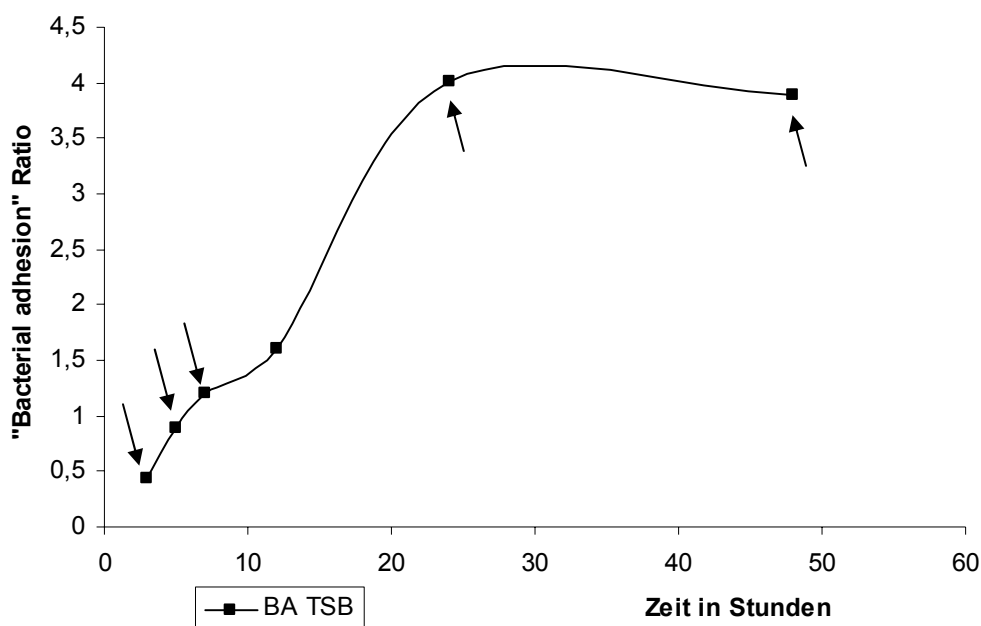
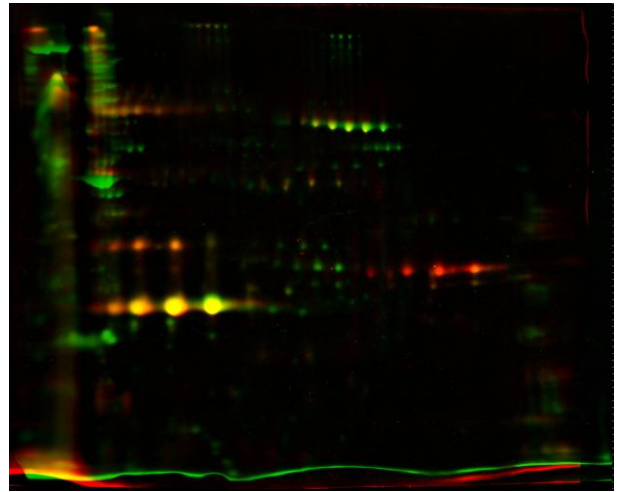


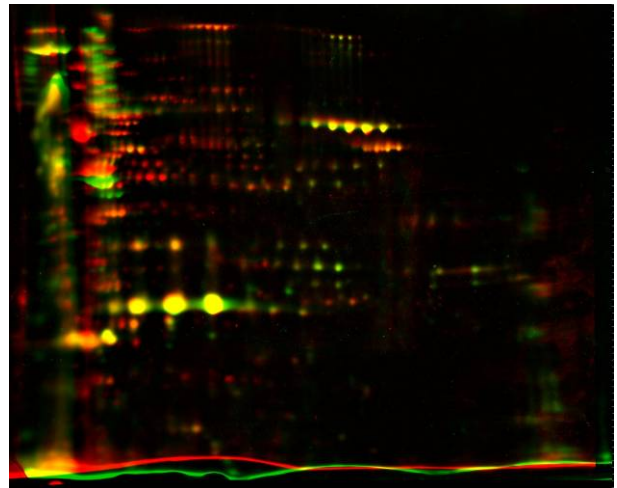
Abbildung 28: Probenzeitpunkte der Entnahme der extrazellulären Proteine aus der Biofilmkultur von *S. epidermidis* 678

Besonders auffällig ist das Fehlen der Akkumulation der extrazellulären Serin-Protease SspA. Da *S. epidermidis* 567 einen deutlich schwächeren Biofilm bildet, könnte dies auf eine Funktion der Protease in der Biofilmdegradation hinweisen.

*S. epidermidis* 678 TSB Biofilmkultur  
(roter Kanal) 7 h und (grüner Kanal) 12 h



*S. epidermidis* 678 TSB Biofilmkultur  
(grüner Kanal) 12 h und (roter Kanal) 24 h



*S. epidermidis* 678 TSB Biofilmkultur  
(roter Kanal) 48 h und (grüner Kanal) 24 h

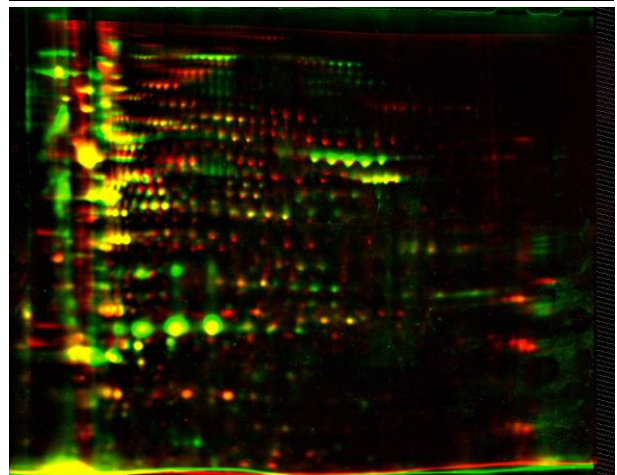


Abbildung 29: Das extrazelluläre Proteom einer *S. epidermidis* 678 Biofilmkultur: Falschfarben-Bilder von 2 D Gelen des Überstandes des Biofilms nach 7 h, 12 h, 24 h und 48 h. Alle Gele wurden mit 500 µg Protein beladen und im pH Bereich 3-11 nicht-linear aufgetrennt. Die Gele wurden mit colloidalem Coomassie gefärbt und die gescannten Gele mittels Delta 2 D Software verglichen.

### 4.3.2 Regulation der Genexpression von *S. epidermidis* 678 in einer Biofilmkultur und dessen Überstand

Zur Untersuchung der regulatorischen Vorgänge, die die Biofilmbildung oder das Wachstum im Überstand bedingen, wurden vergleichende Analysen dieser beiden Kulturzustände mittels Mikroarrays durchgeführt. Die RNA wurde wie in 3.3 beschrieben nach 7 h, also in der Phase des stärksten Wachstums und nach 24 h, also bereits in der Phase der beginnenden Biofilmauflösung, präpariert (Abbildung 28).

Zur Analyse der Genexpression wurden „Full-Genome“-DNA basierte Mikroarrays der Firma Scienion AG, Berlin, verwendet, die ca. 92 % des Genoms von *S. epidermidis* RP62A repräsentieren. Die Ergebnisse der Mikroarray-Analysen sind im Detail im Anhang, Tabellen A4-A7, dargestellt.

Nach 7 h wurden 48 Gene gefunden, die in Bakterien im Überstand und 105 Gene, die in den Bakterien des Biofilms verstärkt exprimiert wurden. Besonders interessant sind dabei 12 Gruppen von Genen, die charakteristische Unterschiede der beiden Phasen darstellen (Abbildung 30 und 31). Dabei ist zum einen das *ica*-Operon zu nennen, das im Biofilm wie erwartet stärker exprimiert wird, bzw. der Repressor *icaR*, der im Überstand in erhöhter Menge vorliegt. Darüber hinaus werden im Biofilm zwei weitere Gruppen von Genen exprimiert: eine Gruppe beinhaltet Gene die für die DNA Transformation verantwortlich sind und die andere Gruppe umfasst Gene, die eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren repräsentieren (Resistenzgene, wie eine  $\beta$ -Lactamase, Gene der *mec*-Kassetten und Proteasen). Die starken Unterschiede im Expressionsprofil bezüglich des Energiestoffwechsels (z.B. Transporter, Enzyme des Katabolismus und hier vor allem der Nitratatmung, die verstärkt im Überstand vorliegt) weisen darauf hin, dass bereits in dieser frühen Phase des Experiments eine klare Differenzierung der beiden Kulturen innerhalb der Zellkulturflasche vorliegt. Dies wird dadurch unterstützt, dass im Überstand eine Reihe von ribosomalen Proteinen verstärkt gebildet werden, was denn Schluss zulässt, dass die Entscheidung „für oder gegen“ Biofilmbildung einen völlig anderen physiologischen Weg bedeutet.

Die hohe Anzahl von konservierten hypothetischen Genen, die in dieser frühen Phase im Biofilm exprimiert werden, stellt eine besonders interessante Gruppe an Genen dar. Diese Gene sind mit großer Wahrscheinlichkeit direkt in die Biofilmbildung involviert, was vor allem in Hinsicht auf die Targetsuche zur Biofilminhibition interessant erscheint.

Im vergleichenden Experiment zeigt sich nach 24 h ein noch unterschiedlicheres Bild der Kulturen des Biofilms und des Überstandes. Nach einer langen Inkubationszeit können die physiologischen Zustände in den einzelnen Kulturen, die für die Experimente verwendet wurden, leicht variieren. Die Ergebnisse werden im Detail in

die Tabellen A6 und A7 des Anhangs dargestellt. In diese Tabellen wurden auch Werte aufgenommen, deren p-Werte im einseitigen t-Test nicht unter 0,05 lagen. Jedoch nur wenn diese in allen parallelen Experimenten gleich reguliert waren. Somit kann ein besseres Bild der Regulation wiedergegeben werden, da viele dieser Werte für den Gesamtzusammenhang unerlässlich sind. Die Werte und ihre Standardabweichung, sowie die entsprechenden p-Werte sind daher in Tabelle A4 - A7 des Anhangs jeweils separat aufgeführt.

In den Bakterien des Überstands der Kultur wurden nach 24 h 236 Gene und in den Bakterien des Biofilms 111 Gene jeweils verstärkt exprimiert. Betroffen sind davon im Prinzip alle wichtigen zellregulatorischen Prozesse. Abbildung 32 und 33 stellen die wesentlichen Gruppen von Genen dar. Deutlich wird, dass der Überstand im Gegensatz zum Biofilm noch im Wachstum ist. Gene der Transkription, Translation, 33 ribosomale Proteine, aber auch Gene der Replikation der DNA, der Zellteilung und der Biosynthese von Bestandteilen der Zellhülle/Membran werden in den Bakterien des Überstandes deutlich verstärkt exprimiert.

Insgesamt unterscheidet sich die physiologische Situation der beiden Zustände deutlich von einander. So variierte nicht nur die Arten der aktivierten Transporter, sondern vor allem auch die Gene, die im Energiestoffwechsel eine Rolle spielen. Im Biofilm scheinen anaerobe Bedingungen die Bakterien zur Laktat- und Nitratatmung zu zwingen, wohingegen die Bakterien des Überstandes die Energie über den TCA Zyklus zu gewinnen scheinen. Interessanterweise nutzen die beiden unterschiedlichen Kulturzustände unterschiedliche Transportersysteme, um Eisen aus der Umgebung zu importieren. Die hohe Anzahl von konservierten hypothetischen Genen die differenziell exprimiert werden zeigt nicht zuletzt, wie wenig untersucht diese „Stress“-Zustände von Bakterien sind, die im Infektionsprozess sicherlich eine bedeutende Rolle spielen.

In Abbildung 31b sind eine Reihe von Regulatoren und Pathogenitätsfaktoren aufgeführt, die eine besondere Rolle spielen und auf die in der Diskussion im Detail eingegangen wird.

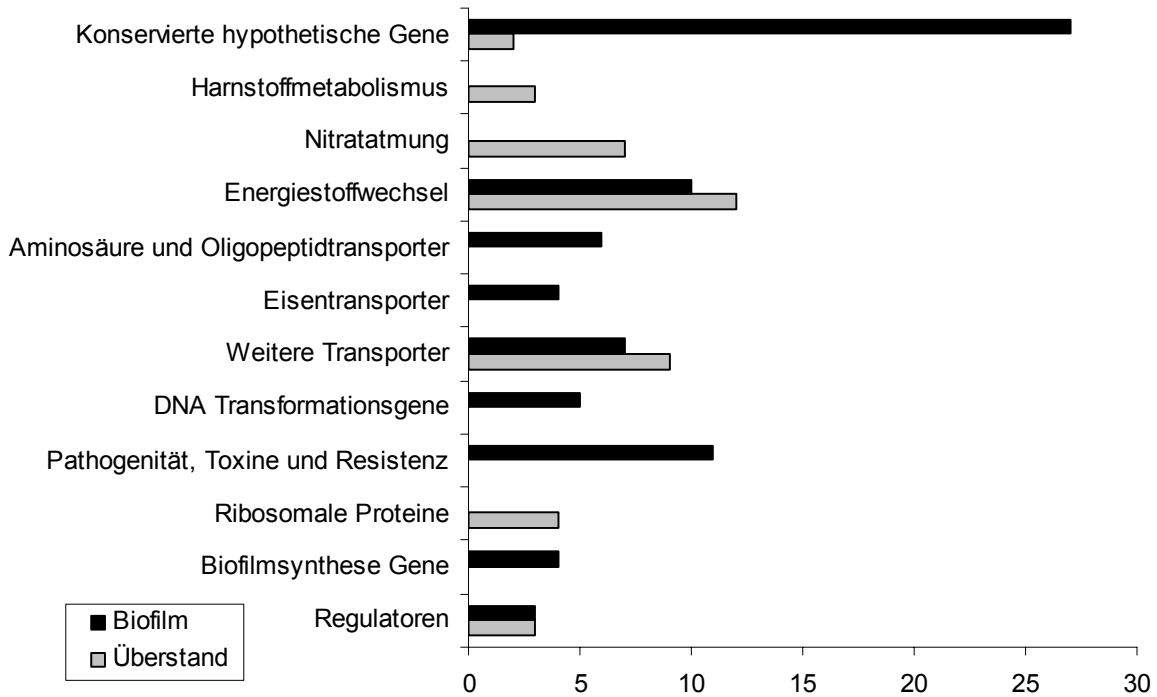


Abbildung 30: Anzahl der nach 7 h differenziell regulierten Gene zwischen Biofilm und Überstand, in 12 Gruppen. Die vollständige Liste der Gene befindet sich im Anhang, Tabellen A4 und A5.

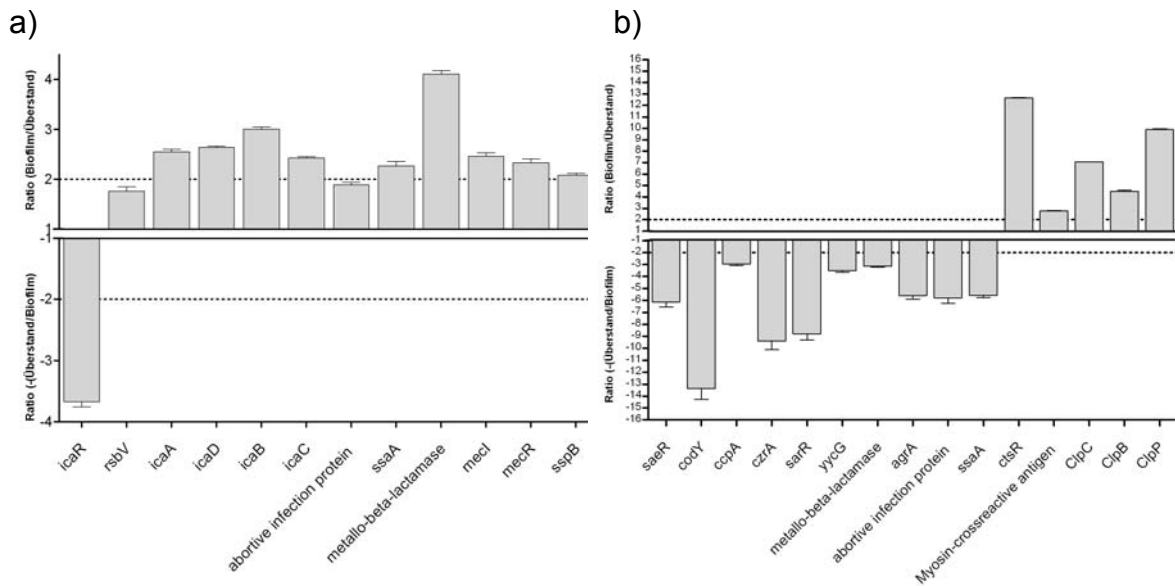


Abbildung 31: Genexpressionsprofil einer Biofilm- und Überstandskultur nach 7 h (a) und 24 (b) von ausgewählten Genen im Vergleich. Die detaillierten Daten werden in den Tabellen A4 bis A7 im Anhang dargestellt.

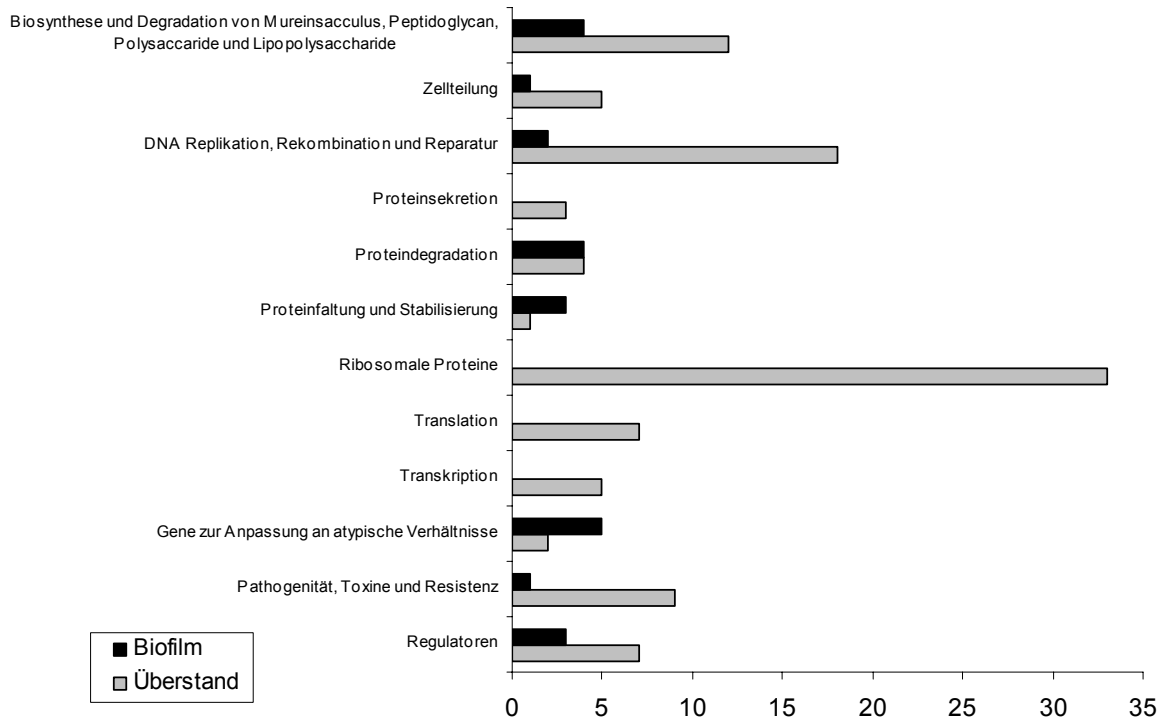


Abbildung 32: Anzahl der nach 24 h differenziell regulierten Gene zwischen Biofilm und Überstand in ausgewählten wichtigen Gruppen. Die vollständige Liste der Gene befindet sich im Anhang, Tabellen A6 und A7.

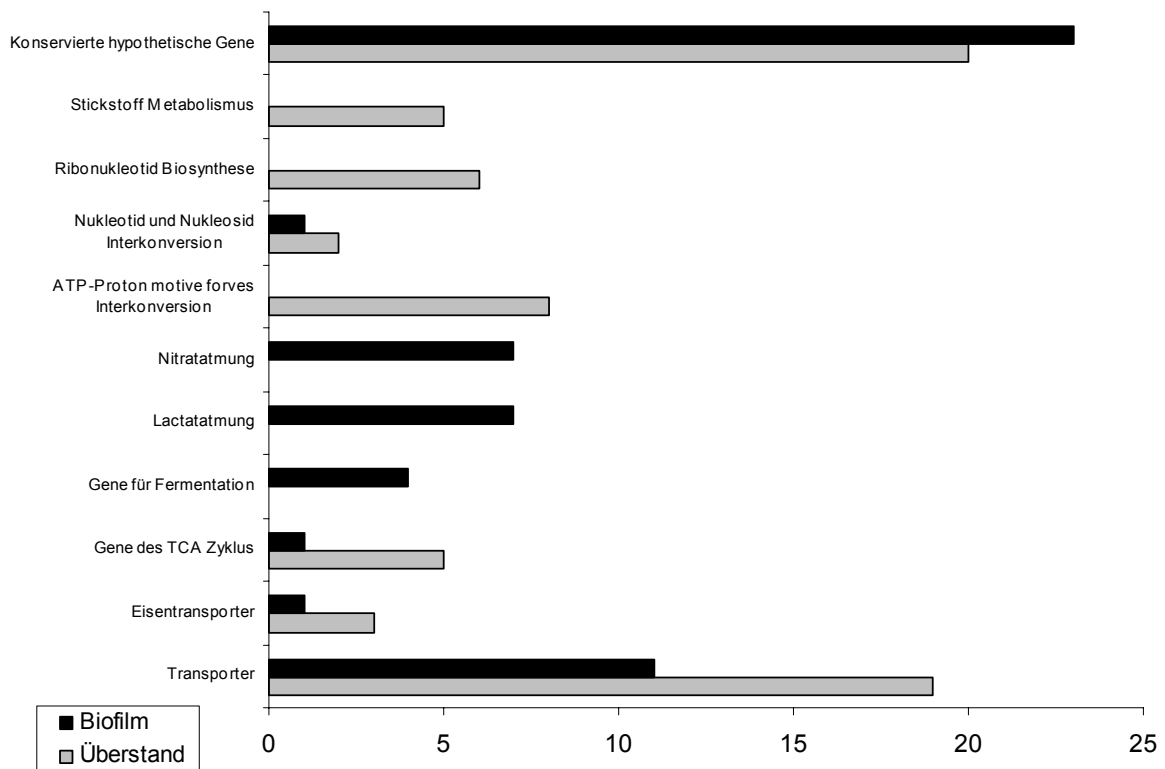


Abbildung 33: Anzahl der nach 24 h differenziell regulierten Gene zwischen Bakterien im Biofilm und im Überstand in ausgewählten wichtigen Gruppen. Die vollständige Liste der Gene befindet sich im Anhang Tabellen, A6 und A7.

### 4.3.3 Zusammenfassung 4.3.1 bis 4.3.2

Die Untersuchung des extrazellulären Proteoms, sowie die vergleichende Transkriptions-Analyse des *S. epidermidis* Biofilms mit dem korrespondierenden Überstand ergab:

1. Im extrazellulären Proteom über einem *S. epidermidis* Biofilm akkumulieren mit der Zeit viele zytoplasmatische Proteine, vermutlich aufgrund der Lyse der absterbenden Bakterien aus dem Biofilm.
2. Während der frühen Phase der Biofilmbildung exprimiert *S. epidermidis* im Biofilm neben dem *ica*-Operon verstärkt Gene, die für die DNA Transformation aber auch für die Pathogenität verantwortlich sind.
3. Bereits in der frühen Phase der Biofilmbildung unterscheidet sich der Stoffwechsel von Bakterien im Biofilm und im Überstand erheblich.
4. Nach 24 h werden alle wichtigen zellregulatorischen Prozesse im Biofilm und im Überstand differentiell reguliert.
5. Die Bakterien im Überstand scheinen nach 24 h noch zu wachsen, da sie Gene der Replikation exprimieren und ihrem Metabolismus eine aerobe Atmung zugrunde zu liegen scheint.
6. Im Gegensatz dazu exprimieren die Bakterien des Biofilms nach 24 h Gene, die im Zusammenhang mit Stress stehen (wie diverse Clp-Protease) und Gene für anaerobe Atmung.



## 4.4 Screening nach Biofilm-inhibitorischen Substanzen in *S. epidermidis*

Im Verlauf einer Infektion mit *S. epidermidis* kommt der Biofilmbildung eine besondere Rolle zu. In diesem Zusammenhang gilt die Biofilmbildung als der Haupt-Pathogenitätsmechanismus von *S. epidermidis*. Daher ist eine Suche nach Substanzen, die die Biofilmbildung verhindern oder dahingehend abändern, dass Biofilmbildung für das Bakterium von Nachteil ist, von großer Wichtigkeit. Im Rahmen des SFB 630: „Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten“ wurden diverse Substanzen mit unterschiedlichem Erfolg getestet. Durch eine Kooperation mit Prof. Mikael Elofsson an der Universität Umeå in Schweden konnten weitere 800 Substanzen mittels eines Hochdurchsatzverfahrens im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes für diese Arbeit in Schweden getestet werden. Dafür wurde wiederum ein Standardisierungsprotokoll etabliert, das weitgehend mit dem bereits erläuterten Biofilmexperiment-Design übereinstimmt. Eine *S. epidermidis* 678 Vorkultur wird aus einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  0,5 bei 37°C und 220 rpm. inkubiert. Parallel dazu werden die Mikrotiterplatten mit 180 µl TSB Medium und je 1 µl der zu testenden Substanz pro Vertiefung vorbereitet. Reihe A wurde als Positiv- und Reihe L, mit Antibiotikum, als Negativ-Kontrolle präpariert. Alle Substanzen wurden parallel in 2 Platten doppelt getestet. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten bei 37°C vorgewärmt und bei der entsprechenden  $OD_{600}$  der Vorkultur mit 20 µl angeimpft. Nach 24 h wurde die  $OD_{600}$  des Überstands bestimmt, der Biofilm gewaschen und gefärbt und anschließend bei 495 nm im Elisa Reader die Absorption bestimmt. Aus den Datensätzen lassen sich Einflüsse der Substanzen auf Wachstum und Biofilmbildung darstellen. Substanzen, die nur einen negativen Effekt auf die Biofilmbildung, nicht jedoch auf das Wachstum von *S. epidermidis* haben, sind besonders interessant, da ihre Zytotoxizität möglicherweise geringer ist.

Von den 800 getesteten Substanzen zeigten 24 einen signifikant inhibitorischen Effekt auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis*. Sechs von diesen Substanzen hatten zudem keinen Einfluss auf das Wachstum von *S. epidermidis* 678 (Tabelle 23). Diese Substanzen wurden dann in Würzburg weiter untersucht. Leider zeigte sich, dass fünf der Substanzen nur im geringen Maß wasserlöslich sind und ihre inhibitorische Funktion auf einer Oberflächenblockierung beruht. Nur Substanz ID 210775 zeigte eine Aktivität und gute Löslichkeit. Im Zytotoxizitätsassay mit Nierenepithelzellen war jedoch nach 48 h eine leichte Abrundung der Zellen zu sehen, was auf einen Einfluss der Substanz auf eukaryote Zellen hinweist. Aufgrund der Strukturformel der Substanz ist eine Einlagerung in die Zellmembran nicht unwahrscheinlich. Dieses könnte durch Modifikation der Struktur jedoch verhindert werden (Abbildung 34). Jedoch ist es nicht ausgeschlossen, dass die Aktivität der Substanz gegen die Biofilmbildung auch durch eine solche Einlagerung

in die Membran von *S. epidermidis* zustande kommt und damit eine Modifikation das biofilminhibitorische Potential aufhebt.

Tabelle 23: Substanzen mit biofilminhibitorischer Aktivität in *S. epidermidis* 678

Cambridge Nr.	Aktivität gegen Biofilm	Aktivität gegen Wachstum
224363	++	++
224361	++	+++
224466	+++	-
224468	+	+++
112980	+++	--(verstärktes Wachstum im Übertand)
105218	+++	+++
138997	+++	+++
142510	+	++
143005	++	--(verstärktes Wachstum im Übertand)
142993	++	+
142214	+	-
142992	+	++
143247	++	++
143124	++	--(verstärktes Wachstum im Übertand)
189233	++(unreglm.)	+
210809	++(unreglm.)	--(verstärktes Wachstum im Übertand)
<b>210775</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>
210269	++(unreglm.)	++
210285	++(unreglm.)	++
191709	++(unreglm.)	--(verstärktes Wachstum im Übertand)

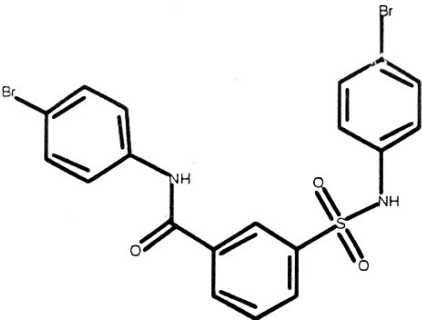
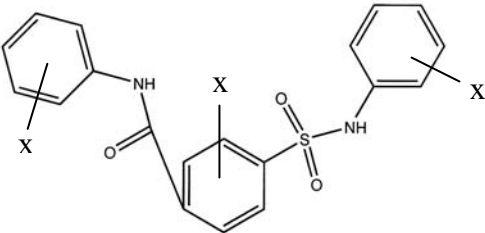
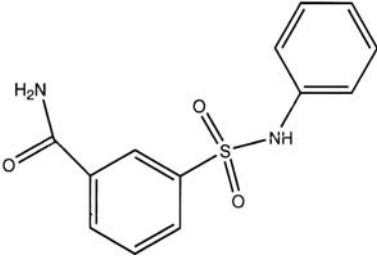
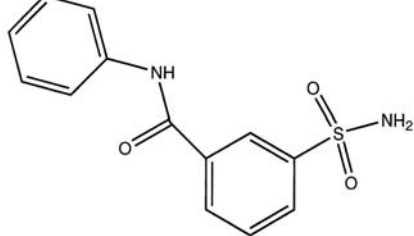
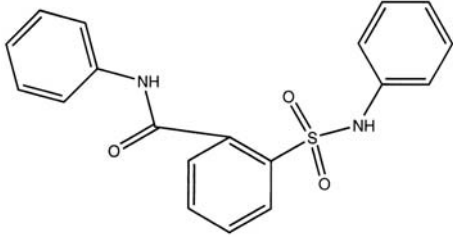
Substanz	Strukturformel:
ID 210775	
Derivat 1	
Derivat 2	
Derivat 3	
Derivat 4	

Abbildung 34: Strukturformel der Substanz ID 210775, sowie mögliche Derivatisierungen, die eine Veränderung des zytotoxischen Potentials zur Folge haben könnten. Mit X werden mögliche Substituenten markiert.

#### **4.4.1 Zusammenfassung 4.4**

- 1. Mittels eines Hochdurchsatzverfahrens konnte in Kooperation mit Prof. Mikael Elofsson, University of Umeå, Schweden 800 Substanzen auf Biofilm-inhibitorische Eigenschaften getestet werden.**
- 2. Von den zwanzig primär aktiven Kandidaten erschien eine Substanz (ID 210775) für weitergehende Untersuchungen als interessant.**
- 3. Die Substanz ID 210775 zeigt jedoch in zytotoxischen Untersuchungen eine zu starke Zellschädigung, da sie sich vermutlich aufgrund ihrer Hydrophobizität in die Membran einlagert. Durch weitere Derivatisierungen könnte diese Zytotoxizität jedoch verringert werden.**
- 4. Hochdurchsatzverfahren sind neben der gezielten Synthese ein interessanter Weg zur Identifikation von bioaktiven Substanzen.**

## 5 Diskussion

### 5.1 Einfluss des Quorum-sensing Systems Agr auf Wachstum und Überleben von *S. epidermidis*

Aus der Literatur bekannte Experimente zu diversen Quorum-sensing Systemen in anderen Organismen legten nahe, dass auch in *S. epidermidis* ein Effekt auf das Wachstumsverhalten vorliegen könnte (Bassler, 1999). Daher wurden entsprechende Experimente mit dem *agr* Wildtyp Stamm *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1 durchgeführt. Es zeigte sich (Abbildung 1) dass die *S. epidermidis* *agr*-Mutante nach einer längeren lag-Phase, zu Beginn des Wachstums, den Wildtyp ab einer  $OD_{600}$  4 überholt und reproduzierbar höhere optischen Dichte erreicht. Zunächst wurde auf eine Kontrolle der Daten per CFU (Colonie formende Einheiten)-Experimente verzichtet, da stark Biofilm-bildende *S. epidermidis*-Stämme auch in Schüttelkulturen zu starker Aggregatbildung neigen. Jedoch erschien es aufgrund der Daten der Mikroarray-Analysen und 2-D Gele als sinnvoll diesen Zustand auch im Hinblick auf das Langzeitüberleben von *S. epidermidis* Wildtyp und *agr*-Mutante genauer zu untersuchen. Zum Auftrennen möglicher Bakterien-Aggregate aus der Schüttelkultur wurde daher ein Protokoll etabliert, welches unter Verwendung von Glasskugeln eine CFU Bestimmung ermöglichen sollte. Im Verlauf der Etablierung wurde schnell klar, dass *S. epidermidis* 567 und die seine isogene *agr*-Mutante 567-1 in Schüttelkultur keine Aggregate bilden. Die CFU Bestimmung des Langzeitwachstumsexperiments zeigt interessanterweise (Abbildungen 2 und 3), dass die hohe optische Dichte der Mutante nicht mit einer entsprechend hohen Lebendzellzahl einhergeht, sondern bereits in dieser Phase des Wachstums eine große Anzahl der Bakterien abstirbt. Dies erklärt entsprechend auch die verlängerte lag-Phase der *agr*-Mutante zu Beginn des Wachstums, da aus der Übernachtskultur weniger lebende Bakterien angeimpft werden, als es die  $OD_{600}$  vermuten lässt. Besonders in Hinsicht auf das Langzeitüberleben scheint die *S. epidermidis* *agr*-Mutante gegenüber dem Wildtyp einen deutlichen Nachteil zu haben. Dies weist darauf hin, dass das Agr-System einen maßgeblichen Einfluss auf die genregulatorischen Prozesse zur Vorbereitung auf diese Nährstoffarmut hat. Da das Agr-System die Sekretion von extrazellulären Proteasen reguliert, lag der Gedanke nahe, dass insbesondere dieses Fehlen von entsprechenden Enzymen in der *S. epidermidis* *agr*-Mutante zu einem verschlechterten Aufschluss von Nährstoffen der Umgebung führt. Daher wurde eine Mischkultur mit beiden *S. epidermidis* Stämmen zu gleichen Teilen angeimpft und die Zellzahl beider Einzelstämme über den in *S. epidermidis* 567-1 befindlichen *ermB* Marker bestimmt. Die  $OD_{600}$  der Mischkultur war interessanterweise geringer als die der parallelen Einzelkultur-Kontrollen (Abbildung 4). Die CFU Auswertung der Mischkultur ergab, dass der Wildtyp erheblich besser in der Mischkultur überlebt als die Mutante (Abbildung 5). Dies deutet darauf hin, dass nicht nur der extrazelluläre

Nährstoffaufschluss für das bessere Überleben des Wildtyps verantwortlich ist, sondern anscheinend auch andere zelluläre Prozesse eine wichtige Rolle spielen.

Darüber hinaus beantwortet das Experiment die interessante Frage, welcher Stamm sich in einer klinischen Infektion durchsetzen würde, zumindest unter den in vitro gegebenen Bedingungen dahingehend, dass der Wildtyp offensichtlich eine bessere Anpassung an Stressbedingungen hat. Dies stellt natürlich einen deutlichen Selektionsvorteil dar. Allerdings ist das in vitro System einer TSB Schüttelkultur sehr artifiziell, weshalb unter Umständen die *agr*-Mutante im menschlichen Wirt durch ihre andersartige Genregulation Vorteile haben könnte.

## 5.2 Das Agr-System ist ein negativer Regulator der Biofilmbildung in *S. epidermidis*

Die Anzahl der extrazellulären Proteine und damit der enzymatischen Pathogenitätsfaktoren in *S. epidermidis* ist stark begrenzt (Novick, 2003; Vuong and Otto, 2002). In der Tat gehen die meisten *S. epidermidis*-Infektionen auf künstliche Oberflächen zurück, die als Ausgangsherd für diese Infektionen dienen (Vuong and Otto, 2002). Daher wird die Biofilmbildung als Hauptpathogenitätsmechanismus von *S. epidermidis* angesehen. Vuong *et al.* haben in ihren Untersuchungen des Agr-Systems von *S. epidermidis* in vitro, sowie in einem in vivo Kathetermodell zeigen können, dass die *agr* Mutante von *S. epidermidis* einen deutlich stärkeren Biofilm bildet (Vuong *et al.*, 2003; Vuong *et al.*, 2004b).

In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigte auch *S. epidermidis* 567 in einem 96-Loch-Mikrotiter-Assay einen wesentlich schwächeren Biofilm als seine isogene *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1 (Abbildung 6). Nach einer anfänglich stärkeren Bildung von Biofilm (nach 5 h) nimmt die Menge an Biofilm im *S. epidermidis* Wildtyp bis zum Zeitpunkt 12 h wiederum deutlich ab. Hingegen bildet die *agr*-Mutante einen wesentlich stärkeren Biofilm aus, der erst nach 24 h sein Maximum erreicht und erst danach wieder abnimmt.

Analog zu den Ergebnissen von Vuong *et al.* scheint vor allem das Ablösen des Biofilms (Detachment) in der *agr*-Mutante nicht stattzufinden bzw. im Wildtyp aktiv reguliert zu sein. Vuong *et al.* machen dafür das  $\sigma$ -Toxin verantwortlich, welches innerhalb des Transkriptes von RNAIII kodiert wird. Es wird davon ausgegangen, dass das  $\sigma$ -Toxin die PIA Struktur auflöst und damit die einzelnen Bakterien freigesetzt werden. Diese macht vor allem dann Sinn, wenn die Nährstoffsituation innerhalb des Biofilms schlechter wird und die Bakterien Gefahr laufen innerhalb der selbst erschaffenen PIA Schicht zu verhungern. Wie jedoch die Situation im Hinblick auf eine oberflächenvermittelte Infektion, wie etwa auf einem Katheter ist, lässt sich schwerlich vorhersagen. Hier muss die hohe optische Dicht nicht zwangsweise mit einer Nährstofflimitation einhergehen, weshalb es denkbar ist, dass eine natürlich

vorkommende *S. epidermidis agr*-Mutante Vorteile aus ihrem veränderten Phänotyp ziehen könnte.

### **5.3 Das Agr-System von *S. epidermidis* ist wichtig für die Invasion in 293T Nierenepithelzellen**

Die Fähigkeit in Wirtszellen einzudringen stellt sicherlich die effektivste Art da sich dem Immunsystem des Wirts zu entziehen (Isberg and Van Nhieu, 1994; Sinha *et al.*, 1999). In *S. aureus* wird dieser Mechanismus seit einigen Jahren intensiv untersucht. Bis heute gilt *S. epidermidis* in der Literatur als nicht-invasiver Erreger. Allerdings sind in einigen neueren Veröffentlichungen von Kong, Vuong und Otto *et al.* einige Hinweise darauf zu finden, dass *S. epidermidis* sehr wohl invasiv ist (Kong *et al.*, 2006; Vuong *et al.*, 2004b). Des Weiteren wurde ähnliches auch in persönlichen Gesprächen von Arbeitsgruppen in Schweden und England berichtet. Darüber hinaus deuteten Vuong *et al.* an, dass in einem In-vivo Katheter-Modell der *S. epidermidis agr*-Wildtyp stärker im dem den Katheter umgebenden Gewebe zu finden war. Im Unterschied dazu ließ sich die *S. epidermidis agr*-Mutante hauptsächlich in einem Biofilm auf dem Katheter nachweisen (Vuong *et al.*, 2004a; Vuong *et al.*, 2004b).

Zum Nachweis der Invasivität von *S. epidermidis* wurde ein Standard-Assay verwendet. Bei diesem wurden 293T Nierenepithelzellen mit *S. epidermidis* inkubiert, anschließend gewaschen, mit Antibiotika/Lysostaphin-haltigem Medium überschichtet und nach verschiedenen Inkubationszeiten die aufgenommenen Bakterien ausgezählt. Als Positivkontrolle wurde *S. aureus* Cowan mitgeführt, der als äußerst stark invasiver Stamm gilt. Es zeigte sich, dass die Invasivität von den beiden getesteten *S. epidermidis*-Stämmen wesentlich schwächer ist als die von *S. aureus* Cowan. Jedoch war eine eindeutige dosisabhängige Aufnahme von *S. epidermidis* nachweisbar (Abbildung 7). Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Bestimmung, ob ein Bakterium invasiv ist, stellt die Fähigkeit dar sich intrazellulär zu vermehren. Abbildung 8 zeigt deutlich, dass sowohl der *S. epidermidis agr*-Wildtyp als auch die Mutante dazu in der Lage sind. Jedoch wird deutlich, dass die Mutante signifikant weniger invasiv ist und intrazellulär erheblich schlechter wächst. Da vom Agr-System sowohl Oberflächenproteine als auch extrazelluläre Proteasen reguliert werden, ist vorstellbar, dass es ohne diese Faktoren für die Mutante erheblich schwieriger ist intrazellulär an Nährstoffe zu gelangen. Allerdings ist denkbar, dass dies einen „Small colony variant“ (SCV) ähnlichen Phänotyp verursacht, d.h. dass die *agr*-Mutante sich intrazellulär zwar sehr langsam vermehrt, aber somit auch zu einer „chronischen“ Infektion führt. SCV sind Subpopulationen, welche langsamer wachsen als ihr korrespondierender Wildtyp. Diese Veränderung verleiht dieser Subpopulation eine höhere Resistenz gegen Antibiotika sowie eine verringerte Lyse nach der Phagozytose durch Wirtszellen. Auf diese Weise lösen SCVs persistierende Infektionen aus, die schwer heilbar sind (von Eiff *et al.*, 2000a, b).

Die Fähigkeit von *S. epidermidis* in das umliegende Gewebe einzudringen erklärt auch diverse klinische Probleme mit wiederkehrenden Infektionen auf Implantaten. Ein neues Implantat wird sofort wieder von Bakterien aus dem umliegenden Gewebe besiedelt. Unter Umständen scheint das umliegende Gewebe sogar gesund, da es von SCVs oder natürlichen *agr*-Mutanten besiedelt ist, die das Gewebe nur im geringen Maße schädigen.

Interessanterweise zeigen Staphylokokken sowohl im Biofilm, als auch intrazellulär in den Wirtszellen eine höhere Resistenz gegen Antibiotika, was den Schluss zulässt, dass der zu niedrig dosierte Einsatz von Antibiotika (wie zum Beispiel bei der Beschichtung von Implantaten) letztlich einen Selektionsdruck erzeugt, der invasive, stark biofilmbildende Staphylokokken bevorteilt. Erste Untersuchungen mit einem anderen *S. epidermidis* Stamm (*S. epidermidis* 678) zeigten eine wesentlich höhere Invasivität. Interessanterweise war bei mikroskopischen Beobachtungen nach 24 h in einigen Bereichen zu sehen, dass *S. epidermidis* 678 unter den Wirtszellen auf der Polystyrenoberfläche der Zellkulturflaschen begonnen hatte Biofilm zu bilden. Insgesamt waren deutlich mehr Nierenepithelzellen lysiert als bei analogen *S. epidermidis* 567-Experimenten und die freien Bakterien, die unterhalb der Nierenepithelzellen vor dem Antibiotikum geschützt waren, schienen dort einen hervorragenden Ort für Biofilmbildung zu finden. Es ist vorstellbar, dass solch ein unfreiwilliger Schutz vor Antibiotika durch Wirtszellen auch in der Infektion und bei der Besiedlung von Implantaten eine wichtige Rolle spielt.

Diese ersten Daten zu Invasivität von *S. epidermidis* weisen deutlich auf die Wichtigkeit dieses Patogenitätsmechanismus bei Infektionen durch *S. epidermidis*, auch im Zusammenhang mit Biofilmbildung hin. Weiterführende Studien sind sicherlich essentiell, um die Biofilmbildung auf künstlichen Oberflächen im menschlichen Wirt zu verstehen und letztlich auch verhindern zu können.

#### **5.4 Der Einfluss des Agr-Systems auf das extrazelluläre Proteom von *S. epidermidis***

Die Experimente, die den Ergebnissen dieses Abschnittes zu Grunde liegen, wurden bereits im Rahmen der Diplomarbeit des Autors durchgeführt. Da diese aber wichtig für den Gesamtzusammenhang sind und die Veröffentlichung der *S. epidermidis* Genomsequenz eine Überarbeitung der Annotation notwendig machte, werden die Kernaussagen im Folgenden hier noch einmal zusammengefasst:

Untersuchungen des Agr-Systems in *S. aureus* zeigten, dass es eine zentrale Rolle für Qualität und Quantität der sekretierten Proteine spielt (Ziebandt *et al.*, 2004).



Daher wurde auch für *S. epidermidis* eine solch zentrale Rolle in der Regulation der Proteinsekretion entlang der Wachstumskurve erwartet.

Insgesamt zeigte sich, dass *S. epidermidis* 567 wesentlich weniger Proteine sekretiert als dies in *S. aureus* Stämme der Fall ist (Abbildung 9). Zusammenfassend wurden 14 Proteine in über 60 Proteinspots identifiziert. Es wird allgemein vermutet, dass diese Protein-Streuungen in verschiedene Spots wahrscheinlich auf Fragmentierung durch extrazelluläre Proteasen und Variation in Proteinuntertypen durch posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sind.

*S. epidermidis* verändert sein extrazelluläres Proteom im Verlauf des Wachstums deutlich in Art und Menge der sekretierten Proteine. Dabei akkumuliert *S. epidermidis* sechs verschiedene Proteine: PfoR, FeoB, PSM1, PSM2, SrrA und SspA (Tabelle 22). Außer PfoR wurden alle diese Proteine in einer *agr* Mutante gar nicht oder nur in einem sehr viel geringeren Maße sekretiert (Abbildung 9). Am deutlichsten ist dieser Effekt bei der Hauptprotease, der V8 Serine-Protease SspA zu erkennen. Diese Protease akkumuliert im extrazellulären Proteom von *S. epidermidis* extrem stark, wird jedoch von einer *agr*-Mutante nur in äußerst geringer Menge sekretiert. Im Gegensatz dazu nimmt die Menge des extrazellulären Proteins der Lipasen GehC und GehD, des immunodominanten Antigen IsaA, von SsaA und des Autolysins AtlE im Wildtyp Sekretom deutlich ab, wohingegen die *agr*-Mutante diese Proteine akkumuliert. Eine dritte Gruppe von Proteinen scheint von einer *agr*-Mutation nicht im Sekretions- und Akkumulationsverhalten beeinflusst zu sein: dazu gehören die Zink-Metalloprotease SepA und zwei bis dato noch nicht weitergehend charakterisierte Proteine: Ext2 und Ext1, von denen letzteres Domänen einer Protease enthält.

Gerade weil die Menge an extrazellulären Proteinen in *S. epidermidis* so gering ist, spielt das Agr Quorum-sensing System in *S. epidermidis* eine zentrale Rolle in diesem Teil der Pathogenität dieses Organismus. Es lässt sich vermuten, dass neben der Beeinflussung der Sekretion, der Modifikation des extrazellulären Proteoms durch Proteasen eine wichtige Rolle zukommt. Die Menge der sekretierten V8 Serin-Protease SspA ist beeindruckend und es ist gut vorstellbar, dass somit nicht nur das umliegende Wirtsgewebe aufgelöst wird, sondern auch andere Strukturen, wie etwa Proteinanteile im Biofilm. Des Weiteren könnte eine modifizierende Wirkung auf eigene, bakterielle Proteine, eine Rolle spielen, was dann letztlich zu einer veränderten biologischen Wirkung führen könnte.

Zusätzlich konnten mit PSM1 und PSM2 zwei Peptide identifiziert werden, die von Vuong *et al.* als Modulatoren der angeborenen Immunantwort des Menschen beschrieben wurden (Vuong *et al.*, 2004b). Diese Peptide stellen die direkteste Verbindung des Agr-Systems mit der Pathogenität von *S. epidermidis* dar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Agr-System das extrazelluläre Proteom von *S. epidermidis* grundlegend reguliert und ihm damit eine bedeutende Rolle in der Ausprägung der Pathogenität von *S. epidermidis* zukommt.

## **5.5 Das Agr-System beeinflusst wesentlich die Genexpression und Proteinregulation in *S. epidermidis***

Der weit reichende Effekt des Agr-Systems auf das extrazelluläre Proteom von *S. epidermidis* 567 sowie der stark abweichende Phänotyp der *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1 ließen einen Einfluss auf die globale Genexpression von *S. epidermidis* als denkbar erscheinen. Daher wurden beide isogene Stämme analog zu den vorherigen Experimenten in TSB Medium in einer Schüttelkultur bei 37°C und 220 rpm. kultiviert und bei OD<sub>600</sub> 1 und OD<sub>600</sub> 4 Proben für eine Transkriptom und Proteom-Analyse genommen. Diese kombinierte Analyse ermöglichte es grundlegende Regulationsprozesse, die direkt oder indirekt vom Agr-System beeinflusst werden zu identifizieren. Insgesamt wurden 180 Gene und 51 Proteine in 190 Spots als differentiell reguliert gefunden. Die detaillierten Daten sind im Anhang Tabellen A1, A2 und A3 aufgelistet.

### **5.5.1 Das Agr-System beeinflusst das SaeRS-System und weitere Pathogenitätsgene in *S. epidermidis***

Das SaeRS System ist Teil eines Multikomponenten-Systems, welches bisher nur in *S. aureus* grundlegend untersucht wurde (Novick and Jiang, 2003; Rogasch *et al.*, 2006). Dabei wird immer deutlicher, dass dieses System eine Art „Fein-Regulator“ des Agr-Systems darstellt, das teilweise antagonistisch aber teilweise auch protagonistisch wirkt (Rogasch *et al.*, 2006). Besonders im Hinblick auf Umweltsignale scheint es die spezifische Antwort von *S. aureus* zu modulieren (Novick, 2003). In Abbildung 12 wird dargestellt, dass das SaeRS-System in *S. epidermidis* positiv durch das Agr-System reguliert wird, d.h. in der *agr*-Mutante kein Transkript zu detektieren war. Inwieweit das SaeRS-System in *S. epidermidis* dieselbe Rolle wie in *S. aureus* übernimmt, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht ersehen. Da aber wie im Folgenden erläutert wird ein direkter Zusammenhang zwischen dem Agr-System und dem Zentralmetabolismus besteht, ist dieses gut vorstellbar.

Des Weiteren wurde bei den Transkriptionsanalysen eine Gruppe von Genen identifiziert, die in der Pathogenität von *S. epidermidis* eine direkte Rolle spielen. Dazu gehören Gene, deren Proteine bereits im extrazellulären Proteom identifiziert werden konnten: die V8 Serin-Protease SspA, der Eisentransporter FeoB, das Aureolysin und Staphopain. Zusätzlich konnte noch eine Lipase (SE0185) als induziert im Wildtyp identifiziert werden, die jedoch nicht im extrazellulären Proteom

gefunden wurde. Die *agr*-Mutante aktivierte keinerlei Pathogenitätsfaktoren stärker hoch als der isogene Wildtyp, was unterstreicht, dass das Agr-System eine Art „Master“-Regulator darstellt.

Interessanterweise zeigte sich, dass das *icaA*-Gen, welches mit für die Biofilmbildung wichtig ist, zu Beginn der Wachstumskurve im Wildtyp hoch reguliert ist (Anhang Tabelle A2). Bei einer  $OD_{600}$  4 ist dieses jedoch nicht mehr der Fall. Dieses Ergebnis ist zunächst verwunderlich, da die *agr*-Mutante im 24 Stunden Experiment einen deutlich stärkeren Biofilm bildet (Abbildung 6). Allerdings ist der Biofilm des Wildtyps zu Beginn des Experiments (bis 7h) sogar stärker. Dieses ist ein Hinweis, dass nicht nur die Degradation mittels  $\delta$ -Hämolyisin über das Agr-System reguliert wird, sondern auch ein Zusammenhang mit der *icaA*-Expression und damit der PIA Produktion besteht.

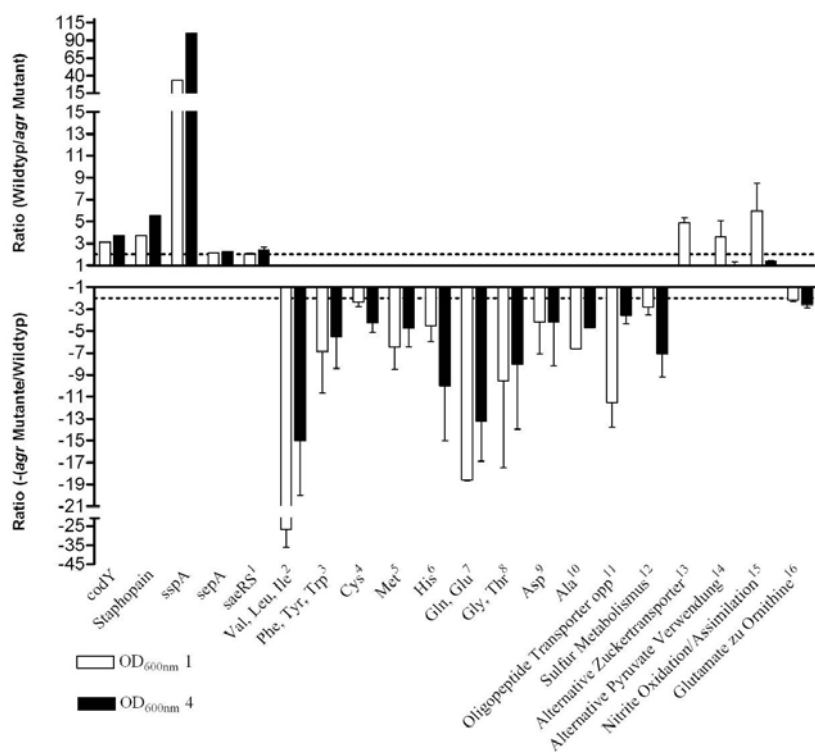


Abbildung 12: Zusammenfassendes Säulendiagramm der Gene und regulatorischen Gengruppen, die durch die *agr*-Mutation in ihrer Expression verändert wurden. Die detaillierten Angaben zur Abbildung befinden sich im Ergebnissteil bei der Kopie dieses Bildes.

Des Weiteren wurde eine Reihe von Genen gefunden, die bei der Resistenz gegen Antibiotika eine Rolle spielen könnten. Im Wildtyp waren bei  $OD_{600}$  4 ein Multidrug-Resistenzprotein sowie ein Multidrug-Transporter induziert (SE0418, SE0241; Tabelle A2) und in der Mutante eine metallo- $\beta$ -Lactamase (SE2435; Tabelle A3). Letztere war zu beiden Wachstumszeitpunkten extrem stark in der Mutante induziert, weshalb eine veränderte  $\beta$ -Lactamase-Aktivität möglich erschien. Ein einfacher

photometrischer Assay zeigte allerdings, dass eher der Wildtyp eine gering höhere  $\beta$ -Lactamase Aktivität aufweist (Abbildung 15). Jedoch muss auch beachtet werden, dass diese stark induzierte  $\beta$ -Lactamase im Gegensatz zu anderen, wie etwa BlaZ-1 und -2, noch nicht weitergehend charakterisiert wurde und somit über Funktionalität oder Regulation dieses Enzyms keine Aussagen getroffen werden können.

### **5.5.2 Der pleiotrope Repressor CodY und das Agr-System: Teile eines Netzwerks zur Regulation von Pathogenität und Überleben von *S. epidermidis***

Aus Mikroarray-Experimenten in *S. aureus* war bekannt, dass das Agr-System neben den erwarteten Genen für Proteine des Sekretoms und der Oberfläche, auch eine Reihe von Proteinen die im zentralen Metabolismus eine Rolle spielen direkt oder indirekt reguliert (Dunman *et al.*, 2001). Jedoch konnten diese Daten zu *S. aureus* nicht weitergehend interpretiert werden, um daraus auf eine entsprechende Regulationskaskade oder einen Stoffwechselfluss zu schließen.

Auch in *S. epidermidis* zeigte sich, dass der größte Teil der differentiell regulierten Gene und gebildeten Proteine mit dem zentralen Metabolismus aber auch vor allem mit der Biosynthese von Aminosäuren assoziiert war. Von besonderem Interesse war dabei, dass im *S. epidermidis agr*-Wildtyp ein Gen hochreguliert war, welches für ein homologes Protein des in *B. subtilis* und *L. lactis* beschriebenen Repressors *codY* kodiert. CodY reprimiert viele Gene der stationären Phase, wie etwa das *ilvBCD*, *leuABCD* und *oppABCF* Operon in *B. subtilis* und *L. lactis*. Neben diesen in Übereinstimmung bei diesen Organismen reprimierten Genen wurden in der Mutante, in der *codY* nicht exprimiert wurde, eine Vielzahl von Genen und Proteinen gefunden, die im direkten Zusammenhang mit der Biosynthese von Aminosäuren stehen oder für den Import von Oligopeptiden zuständig sind, die die verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Valin und Isoleucin enthalten. (sogenannte Branched-chain-amino-acids, BCAA), Diese BCAA-Oligopeptide sind offenbar für die Regulation der Aktivität von CodY von zentraler Bedeutung (Abbildung 12).

In *B. subtilis* ist beschrieben, dass die Aktivität von CodY zum einen indirekt über die Leucin/Isoleucin-Konzentration in BCAA-Oligopeptiden reguliert wird, zum anderen aber auch über den GTP Spiegel innerhalb der Zelle beeinflusst wird (Shivers and Sonenshein, 2004). Da der *S. epidermidis* Wildtyp in einem erheblich größeren Umfang Proteasen sekretiert als die Mutante, erscheint es denkbar, dass dieses initial für den Aufschluss von Proteinen aus dem Medium eine direkte Wirkung auf den BCAA-Oligopeptid-Gehalt hat und somit eine Regulation von CodY erfolgt. Auch dürfte ein solch verschobenes Spektrum an Nährstoffen, die die Mutante im Vergleich zum Wildtyp aufnehmen kann einen massiven Einfluß auf den Zentralmetabolismus haben. Eine geringere Menge an importierbaren BCAA-

Oligopeptiden führt in der Mutante folglich zu einem Mangel an intrazellulären Aminosäuren, welches eine *de novo*-Synthese dieser wichtigen Bausteine notwendig macht. Interessanterweise fanden bereits 1937 Gladstone *et al.*, dass Staphylokokken nicht *ad hoc* in der Lage sind, auf Aminosäuremangel zu reagieren (Gladstone, 1937). Passagiert man die Kultur allerdings in diversen Schritten in ein Minimalmedium ohne (die meisten) Aminosäuren, so passt sich der Stamm den Umständen langsam an. In der *S. epidermidis agr*-Mutante, scheint diese metabolische Anpassung vollständig erfolgt zu sein, da sie, im Unterschied zum Wildtyp, offensichtlich bereits zu Beginn der exponentiellen Phase zur De-novo-Aminosäuresynthese befähigt ist.

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob der Effekt von CodY in der *S. epidermidis agr* Mutante umkehrbar oder beeinflussbar ist. Bei Experimenten mit der Zugabe von Isoleucin und/oder Leucin konnte keinerlei Veränderung in der Expression von CodY mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Abbildung 16; 4.1.13). Allerdings war dies in gewissem Maß auch zu erwarten gewesen, da auch in *B. subtilis* nicht die Menge an freiem Isoleucin/Leucin ausschlaggebend für die CodY-Aktivierung war, sondern diese Aminosäuren vielmehr in Form von BCAA-haltigen Oligopeptiden vorliegen mußten (Guedon *et al.*, 2001). Tauscht man allerdings den Kulturüberstand des *S. epidermidis* 567 Wildtyp gegen den der *S. epidermidis* 567-1 *agr* Mutante aus, so zeigt sich eindeutig, dass das Signal, welches die Aktivität von CodY beeinflusst, im Überstand des Wildtyps vorhanden sein muß (Abbildung 17; 3.1.13). Interessanterweise nimmt die Expression von CodY im getauschten Überstand in der Mutante nach 30 Minuten deutlich ab bzw. im Wildtyp wiederum deutlich zu. Ob jedoch eine Verbindung über eine Autoregulation oder der veränderte Pool an BCAA-Oligopeptiden zu diesem Phänomen führt ist noch zu klären. Hier wären in der Tat Experimente mit synthetisch hergestellten, definierten BCAA-Oligopeptiden sehr aufschlussreich und interessant. Leider ist die Synthese dieser Peptide recht aufwendig und teuer. Diese Versuche würden sich angesichts der Kosten nur dann lohnen, wenn man sie auch an einer *S. epidermidis codY*-Mutante bzw. *codY/agr* Doppelmutante durchführen könnte. Die Herstellung solcher Mutanten, die bei *S. epidermidis* ebenfalls sehr aufwendig ist, sollte Gegenstand künftiger Arbeiten auf diesem Gebiet sein.

In *B. subtilis* ist neben dem BCAA-Oligopeptid-Pool vor allem die intrazelluläre Menge an GTP das zweite regulatorische Signal für die Aktivität von CodY. Bei den Untersuchungen zum Proteom der beiden isogenen Stämme zeigte sich, dass die beiden Proteine GuaB und GuaC in multiplen Spots im alkalischen pH-Bereich in beiden Stämmen verteilt waren. Allerdings waren die Anzahl und Position der Spots und die jeweilige Proteinmenge in den beiden Stämmen stark unterschiedlich. Dieses deutet auf eine differentielle Regulation der Aktivität dieser Proteine in den beiden Stämmen hin, was folglich auch zu einem veränderten GTP-Level führen würde. Der

Zusammenhang von CodY und der Guanosin-Interkonversion wird in der Einleitung Abbildung 7 dargestellt. Daher erscheint es nahe liegend, dass CodY in *S. epidermidis* eine ähnliche Regulation und Funktion hat, wie in *B. subtilis*. Abbildung 34 postuliert eine mögliche Regulation von CodY im Zusammenhang mit dem Agr-System.

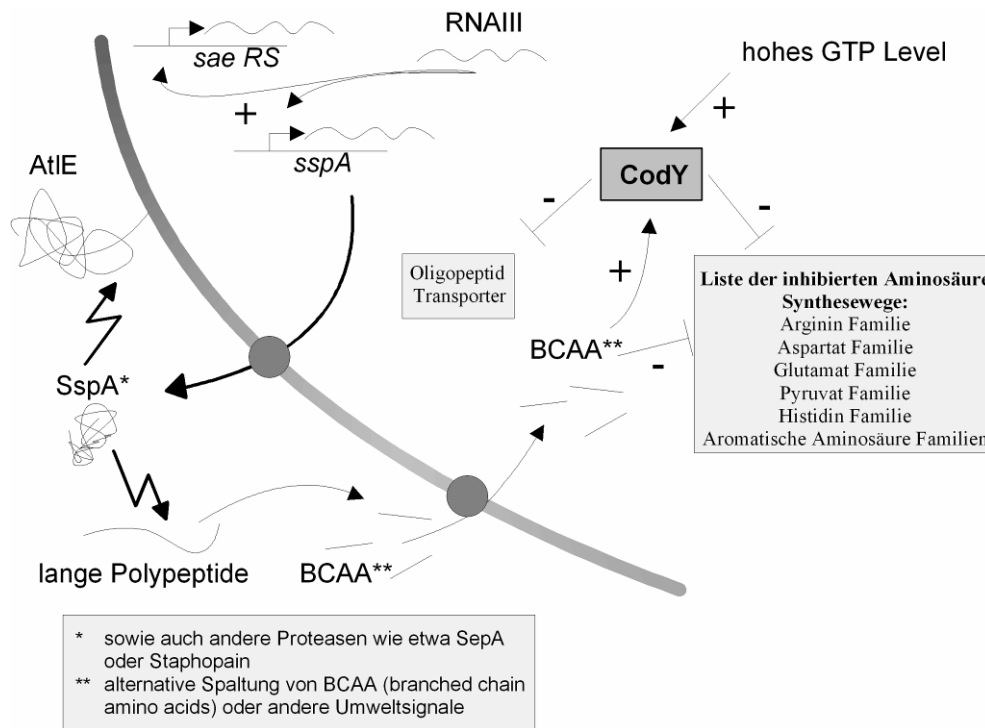


Abbildung 34: Schematische Darstellung der theoretischen Funktionsweise und Regulation von CodY in *S. epidermidis*.

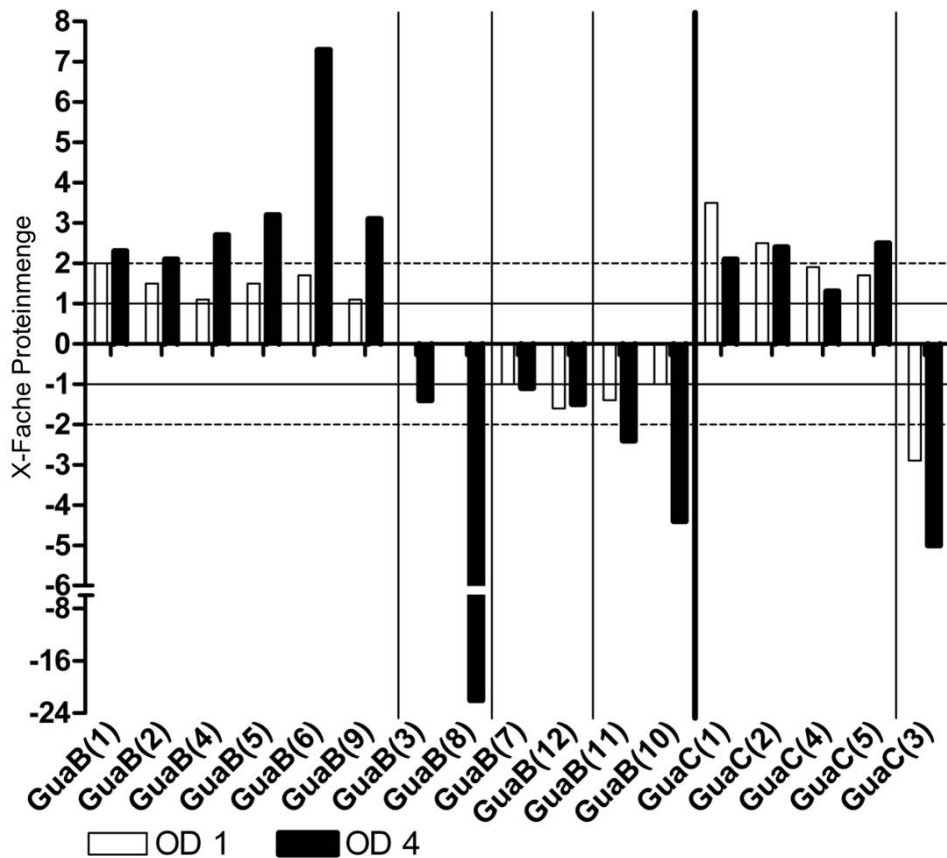


Abbildung 35: Zusammenfassendes Balkendiagramm der in unterschiedlichen Menge gebildeten Proteinspots von GuaB und GuaC in *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1. Die entsprechenden Proteinspots sind auf den 2-D Gelen in den Abbildungen 10 und 11 gekennzeichnet. Inwieweit diese Modifikationen eine Rolle in der Aktivität und damit dem intrazellulären GTP-Pool spielen ist noch zu klären.

### 5.5.3 Der Einfluss des *Agr*-Systems auf den Zentralmetabolismus

Die weit reichenden Veränderungen in der Biosynthese von Aminosäuren in der *S. epidermidis agr*-Mutante haben natürlich auch Konsequenzen für weite Teile des Zentralmetabolismus, wie für den Zucker-Katabolismus und auch den Stickstoff- und Schwefel-Metabolismus. Dies zeigen die Daten der Proteom- und Transkriptom-Analysen eindeutig (Abbildung 10, 11, 12; Tabellen A1, A2, A3). Die *de novo*-Synthese der Aminosäuren in der *agr*-Mutante verändert den Bedarf an Kohlenstoff als Ausgangssubstrat über den Citronensäure-Zyklus (TCA) grundlegend. Abbildung 36 zeigt schematisch, welchen Einfluss die analysierten Daten auf den Zentralmetabolismus haben könnten. Besonders in der früh-exponentiellen Phase leistet sich *der S. epidermidis* Wildtyp eine Art Überflussmetabolismus (Overflow metabolism), in dem er Pyruvat zu Laktat und Ethanol und Acetoin fermentiert, anstatt es über den TCA zu veratmen. Weitergehende Untersuchungen zur

Laktatkonzentration im Überstand der beiden isogenen Stämme (3.1.10) zeigten aber, dass die deutlichen regulatorischen Differenzierungen nur zu einem Unterschied von 10-15 µg/ml an Laktat zwischen den beiden Stämmen führt. Die Messpunkte waren analog bei OD<sub>600</sub> 1 und OD<sub>600</sub> 4 gewählt worden, daher ist nicht auszuschließen, dass die Mutante zwischen diesen Messzeitpunkten zu einer ähnlichen Fermentation übergeht.

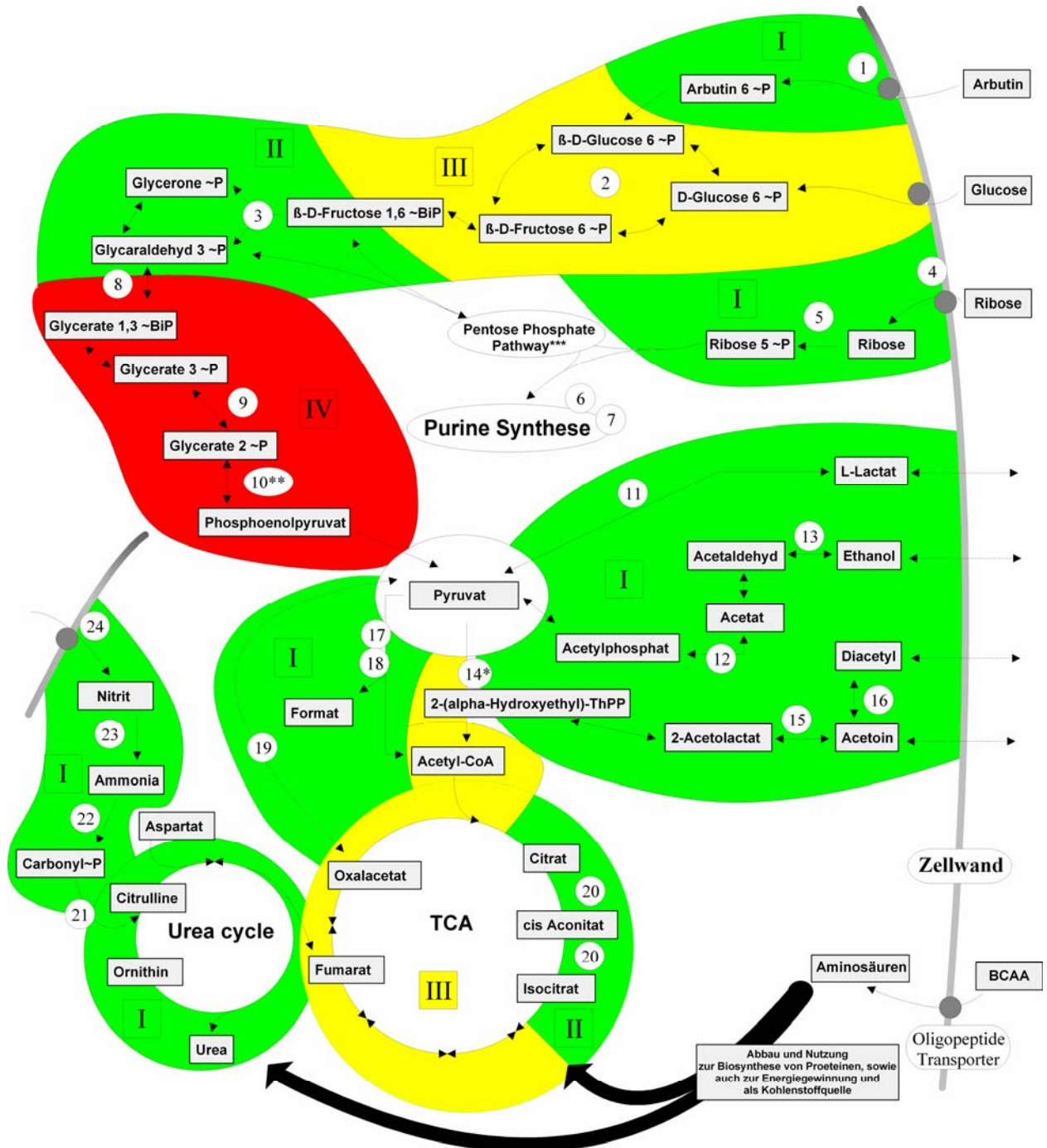
Interessanterweise importiert der Wildtyp in der früh-exponentiellen Phase neben Glukose auch alternative Zucker, worauf die Mutante in dieser Wachstumsphase verzichtet. Da das Agr-System aber sehr wohl einen Einfluss auf Oberflächen und Membran-assoziierte Proteine hat, ist denkbar, dass die Mutante diese Transporter erst verzögert exprimieren kann, obwohl ein genereller Bedarf an Zuckern besteht. Untersuchungen, ob dieses veränderte Repertoire von Zuckertransportern einen Einfluss auf das Wachstum ohne Dextrose hat, zeigten jedoch, dass das Wachstum in Wildtyp wie Mutante in gleichen Maßen verlangsamt ist und die Mutante auch hier eine höhere optische Dichte erreicht, wobei die Lebendzellzahl gleichermaßen geringer ist als im Wildtyp (3.1.9; Abbildung 13).

Nicht ganz eindeutig erscheint die Nitrit-Assimilation, die der Wildtyp verstärkt zu betreiben scheint, obwohl dieser im Vergleich zur Mutante wohl eher im geringeren Maße *de novo*-Synthese von Aminosäuren betreiben dürfte. Allerdings wird Stickstoff auch in der Nukleotid-Biosynthese gebraucht, und die Proteom-Daten zur Nukleotid-Interkonversion sowie die Veränderungen im Pentosephosphatweg unterstreichen, dass hier in der Regulation und im Stofffluss deutliche Unterschiede zwischen den beiden Stämmen vorliegen (Abbildung 35, 36; Tabellen A1, A2, A3). Außerdem verfügt die Mutante sehr wohl über diverse Aminosäurequellen, da in einem artifiziellen Medium wie TSB ein Großteil auch in Form von kurzen Peptiden oder einzelne Aminosäuren vorliegen dürften. Diese könnten von der Mutante auch zur Proteinbiosynthese oder zum Umbau in andere Aminosäuren, an denen es mangelt genutzt werden, wohingegen vor allem größere Peptide oder Proteine aufgrund des Mangels an Proteasen für die Mutante nicht verwertbar wären. Auch könnte in der Mutante das Signal zur Aktivierung von CodY aufgrund eines reduzierten BCAA-Oligopeptid-Pools fehlen.



Abbildung 36: Theoretische Projektion der Unterschiede der Regulation im zentralen Metabolismus von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr*-Mutante *S. epidermidis* 567-1 auf Basis der Proteom- und Transkriptom-Daten. Die Felder sind entsprechend der Regulation in grün (verstärkter metabolischer Fluss im Wildtyp), rot (verstärkter metabolischer Fluss in der Mutante) und gelb (kein differentiell regulierter Stofffluss) gefärbt. Die regulierten Proteine/Gene sind mittels Zahlen markiert und in der angefügten Tabelle mit Annotationsnummer und Genfunktion erklärt. Detaillierte Daten zur Expression stehen in den Anhangstabellen A1, A2 und A3.

Nummer	Annotation	Genfunktion
1	SE1897	Phosphotransferase Arbutin Transporter
2	SE0658	Glukose-6-Phosphat Isomerase
3	SE1723	Fruktose-Bisphosphat Aldolase
4	SE2086	Ribokinase
5	SE2086	Ribokinase
6	SE1911	Ribose-5-Phosphat Isomerase
7	SE1911	Ribose-5-Phosphat Isomerase
8	SE0557	Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase
9	SE0560	2 (2) 3-Diphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat-Mutase
10	SE0561	Enolase
11	SE2145	L-Lactat-Dehydrogenase
12	SE1387	Acetatkinase
13	SE2098	Sorbitol Alkoholdehydrogenase
14	SE0792	Pyruvat-Dehydrogenase
15	SE2143	Alpha-Acetylactat-Decarboxylase
16	SE0197	Acetoin (diacetyl)reduktase
17	SE0214	Format-Acetyltransferase
18	SE0215	Format-Acetyltransferase aktivierendes Enzym
19	SE0813	Pyruvat-Carboxylase
20	SE1032	Aconitathydratase
21	SE1032	Aconitathydratase
22	SE0229	Ornithin-Carbomyltransferase
23	SE0228	Carbamat-Kinase
24	SE1978	Assimilatorische Nitritreduktase



Die Felder sind entsprechend der Regulation des Stoffwechsel eingefärbt:

- stärker Stoffwechsel Fluß im Wildtyp Stamm
- kein Unterschied zwischen beiden Stämmen
- Höherer Fluß in der Mutante und geblockter Fluß im Wildtyp Stamm
- I: Hochreguliert im Wildtyp in der früh-exponentiellen-Phase
- II: Hochreguliert im Wildtyp in der spät-exponentiellen-Phase
- III: keine differenzielle Regulation
- IV: Hochreguliert in der Mutante in der früh-exponentiellen-Phase
- V: Hochreguliert in der Mutante in der spät-exponentiellen-Phase

\*SE0794 ist auch in die Reaktion eingebunden

Im Proteom scheinen hier funktionelle Modifikationen vorzuliegen.

\*\*Differenziell reguliert in einigen Spots, siehe Anhang Tabelle A2 und A3

\*\*\*OD 1 hoch reguliert im Wildtyp; OD 4 runter reguliert im Wildtyp Proteom

\*\*\*\* Die Daten bzgl. des Pentosephosphatweges sind nicht absolut eindeutig, Details siehe Anhang Tabelle A2 und A3

### 5.5.3 Bedeutung der *agr*-Mutation für *S. epidermidis*

Abschließend stellt sich die Frage, welche Bedeutung die Mutation des Quorum-sensing Systems für *S. epidermidis* hat. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Repertoire an extrazellulären Pathogenitätsfaktoren deutlich reduziert wird (Abbildung 9, Tabelle 22). Des Weiteren ist die metabolische Situation und Regulation der beiden isogenen Stämme in Hinsicht auf die Biosynthese von Aminosäuren, den Zuckerkatabolismus sowie den Stickstoff- und Sulfat-Metabolismus grundlegend verändert (Abbildungen 33-36, Tabellen A1-3). Diese fundamentalen Unterschiede haben natürlich Veränderung im phänotypischen Verhalten der *S. epidermidis agr*-Mutante zur Folge: zum einen eine stärkere Biofilmbildung bzw. ein wesentlich schlechteres Ablösen aus dem Biofilm (3.1.4, Abbildung 6), eine verschlechterte Invasivität in menschliche Nierenepithelzellen (3.1.5, Abbildungen 7 und 8) und ein verändertes Wachstumsverhalten mit einem erheblich verschlechterten Langzeitüberleben der *agr*-Mutante (3.1.2; 3.1.3; Abbildungen 1-5).

Das Agr-System in *S. epidermidis* spielt also im Netzwerk der Regulatoren eine zentrale Rolle in der Anpassung an viele Bedingungen, die in der Pathogenität von *S. epidermidis* eine essentielle Rolle spielen. Darüber hinaus zeigten die Proteom- und Transkriptom-Analysen, dass in diesem Netzwerk, in Hinsicht auf die Pathogenität von *S. epidermidis*, dem pleiotropen Repressor CodY als zentralem Regulator des Metabolismus eine wichtige Rolle zukommt (Abbildung 12).

Parallel zu Veröffentlichung dieser Daten (Batzilla *et al.*, 2006) erschien eine Arbeit von Yao *et al.*, die auch eine vergleichende Transkriptom-Analyse eines *S. epidermidis* Wildtyp und einer *agr*-Mutante zum Gegenstand hat. Der Testzeitpunkt liegt allerdings mit 24 h erheblich später, als die hier getesteten Zeitpunkte. Leider enthält die Publikation keinerlei Angaben über die CFU der beiden Stämme zu diesem Zeitpunkt und auf Basis der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Wachstumskurve lässt sich vermuten, dass die *agr*-Mutante hier bereits eine deutlich reduzierte Lebendzellzahl hat. Dies würde auch dahingehend mit den Daten von Yao *et al.* übereinstimmen, als dass eine Vielzahl der differentiell exprimierten Gene für ribosomale Proteine, von Proteinen für die Zellteilung, DNA Polymerasen und Proteinen des Zentralmetabolismus kodieren. Daher fügen sich diese Daten relativ gut als Fortführung der Ergebnisse dieser Arbeit ein. Weitere Übereinstimmungen gab es auch in Hinsicht auf Veränderungen im Nitrit-Metabolismus und der erhöhten Fermentation durch den Wildtyp (Yao *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde von Yao *et al.* ein Test zur Widerstandsfähigkeit von *S. epidermidis* gegen antibakterielle Peptide durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Wildtyp deutlich bessere Überlebenschancen hat als etwa die Mutante (Yao *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse dieser Arbeit und der Arbeiten der Arbeitsgruppe um Michael Otto deuten klar darauf hin, dass das Agr-System in *S. epidermidis* für die Pathogenität von *S. epidermidis* essentiell ist. Untersuchungen in China durch Li *et al.* zeigen, dass es eine deutliche Korrelation von Agr-Gruppen-Typen und Art und Schwere der Infektion gibt. Allerdings zeigt die Studie auch, dass ca. 17 % der klinischen *S. epidermidis* Isolate natürlich vorkommende *agr*-Mutanten sind (Li *et al.*, 2004). Das heißt, dass eine *agr*-Mutation nicht per se schlecht für das Überleben im Wirt ist. Es ist denkbar, dass durch die *agr*-Mutation eine Art „small colony variant“-Phänotyp (SCV- $\Delta$ *agr*) entsteht, der durch seine veränderten metabolischen Bedürfnisse und Fähigkeiten sowie durch seine reduzierte akute Pathogenität in anderen ökologischen Nischen im Wirt überlebt. Dort könnte diese SCV- $\Delta$ *agr*-Varianten zu einer chronische Infektion führen oder durch eine Wiederherstellung des Agr-Wildtyp Phänotyps zu einer lebensbedrohlichen akuten Infektion führen.

Weitere Untersuchungen sollten darauf fokussieren, inwieweit das Zusammenspiel mit anderen Regulatoren, wie etwa dem SaeRS-System, wichtig für die Anpassung an die Verhältnisse im Wirt ist. Besonders ein mögliches Wechselspiel von Biofilm-Phase und Invasion von *S. epidermidis* in das umliegende Gewebe ist für einen therapeutischen Ansatz und die Entwicklung von neuen Antibiotika gegen *S. epidermidis* Infektionen von großer Wichtigkeit. Eine Doppelstrategie gegen beide Mechanismen würde es ermöglichen, den Infektionsherd vollständig zu reinigen und ein Wiederkehren der Besiedlung von künstlichen Oberflächen zu verhindern. Der Schlüssel zur Entwicklung liegt sicherlich im Verständnis der regulatorischen Systeme wie dem Agr-System und dem SaeRS-System, aber vor allem auch dem direkten Zusammenhang mit dem Metabolismus des Organismus und damit auch von Systemen wie dem Repressor CodY. Letztlich ist die Pathogenität eines Bakteriums nur ein Mechanismus zur Beschaffung von Nährstoffen für den Metabolismus dieses Erregers. Somit ist der Metabolismus eines Erregers das Rückgrat und der eigentliche Regulator der Pathogenität.

## 5.6 Untersuchungen zur Biofilmbildung von *S. epidermidis*

*S. epidermidis* bildet, im Vergleich zu *S. aureus* oder anderen humanpathogenen Erregern ein sehr begrenztes Spektrum an Pathogenitätsfaktoren. Dies und nicht zuletzt auch die Tatsache, dass *S. epidermidis* Infektionen hauptsächlich in Verbindung mit künstlichen Oberflächen entstehen, führt dazu, dass die Fähigkeit, einen mehrschichtigen Biofilm zu bilden, als der Hauptpathogenitätsfaktor von *S. epidermidis* angesehen wird. Daher steht die Biofilmbildung auch im Zentrum der *S. epidermidis* Forschung. Jedoch bleiben trotz vieler Fortschritte selbst zentrale Fragen bis heute unbeantwortet, wie etwa zum Verlauf der Gen- und Proteinregulation im Biofilm.

Der zweite Teil dieser Dissertation widmete sich daher drei Aspekten der Biofilmbildung: (i) Der versuchstechnischen und mathematischen Standardisierung der Biofilmexperimente in *S. epidermidis*; (ii) dem zeitlichen Verlauf der Biofilmbildung mittels konfokaler Lasermikroskopie; und (iii) einer Untersuchung zur Genregulation in der exponentiellen Wachstumsphase und der stationären Phase im Biofilm und dem korrespondierenden Überstand.

### **5.6.1 Vergleich der *S. epidermidis* 678 Biofilmbildung unter verschiedenen Bedingungen mittels der BA-Ratio**

Der klassische Biofilm-Assay für Staphylokokken ist ein 96-Loch Mikrotiterplatten Test, bei dem Stämme aus einer Übernachtskultur in dieser Vertiefung angeimpft und über Nacht inkubiert werden. Aufgrund der großen Ungenauigkeiten, die sich aus diesem einfachen Protokoll ergeben, sind die damit zu erzielenden Ergebnisse jedoch stark variabel. Daher wurde ein Protokoll etabliert, welches möglichst wenig variable Schritte zuließ (4.2.1; Abbildung 18). Die damit erzielten Ergebnisse sind erheblich besser reproduzierbar und erlauben auch eine genaue Messung des Biofilms und des Überstandes. Dabei war festzustellen, dass sich die  $OD_{600}$  des Überstands in Abhängigkeit zur Dicke des Biofilms umgekehrt-proportional verhält. Entsprechend erlaubt die einfache mathematische Bildung einer Ratio aus dem Quotienten der Absorption des Biofilms und der  $OD_{600}$  des Überstandes die Biofilmbildung (genauer bakterielle Adhäsion) mit einem Wert zu benennen (Abbildung 18). Dieser Wert an sich ist unabhängig von der Wachstumskapazität des einzelnen Stammes oder des Stammes im entsprechenden Medium und erlaubt somit die Biofilm-Kapazität verschiedener Stämme und Bedingungen „normalisiert“ miteinander zu vergleichen. Da dieser Wert unmittelbar von der Stärke der Adhäsion abhängig ist, wurde er als Biofilm-Adhäsions-Ratio (BA-Ratio) bezeichnet. In Abbildung 19 und 20 werden vier Experimente sowohl klassisch in der Absorption als auch in Abbildung 20 mittels BA-Ratio dargestellt.

Exemplarisch werden in den beiden Abbildungen vier Bedingungen über jeweils 48 Stunden untersucht: (i) *S. epidermidis* 678 bei 30°C in TSB-Medium; (ii) *S. epidermidis* 678 bei 37°C in TSB-Medium; (iii) *S. epidermidis* 678 bei 37°C in TSB-Medium mit 2 % Glucose; (iv) *S. epidermidis* 678 bei 37°C in TSB-Medium mit 3 % NaCl. Betrachtet man den Verlauf der Biofilmbildung in Abbildung 19, so ist zu erkennen, dass der Biofilm bis zu einem Zeitraum von 24 h wächst und sich danach abbaut. Im Gegensatz hierzu findet das Wachstum im Überstand bereits zu Beginn des Experiments statt und verändert sich nach 3 h nicht mehr grundlegend, bis sich Teile des Biofilms nach 24 h ab- und auflösen und die  $OD_{600}$  im Überstand dadurch steigt. Eine Absenkung der Temperatur auf 30°C führt nur zu einer verlangsamten Biofilmbildung zu Beginn des Experiments; jedoch ist nach 24 h die Stärke des Biofilms mit der bei 37°C identisch. Vergleicht man die BA-Ratio der beiden Kurven

(30°C und 37°C) in Abbildung 20, so wird deutlich, dass bei 37°C ein größerer Teil der Bakterien adhärert. Entsprechendes gilt für die Zugabe von Glukose. Allgemein ist bekannt, dass die Zugabe von Glukose in das Medium die Biofilmbildung verstärkt. Da jedoch die Zugabe von Glukose auch das Wachstum von *S. epidermidis* verstärkt, ist der direkte Vergleich der Absorption der beiden Biofilme artifiziell. Berechnet man jedoch die BA-Ratio beider Biofilme, so wird ein Vergleich durch die Berücksichtigung der Wachstumskapazität im Überstand möglich. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, wächst *S. epidermidis* 678 unter Zugabe von Glukose im Überstand proportional stärker als im Biofilm, verglichen mit normalem TSB-Medium. Erst nach 48 h weist der Versuch mit 2 % Glukose eine höhere BA-Ratio auf. Der Biofilm nimmt also unter der Zugabe von 2 % Glukose im Vergleich zu den anderen Bedingungen nicht so stark ab, eine überproportionale Verstärkung der Biofilmbildung kann jedoch in *S. epidermidis* 678 durch die Zugabe von Glucose, zumindest in TSB-Medium, nicht erreicht werden. Die stärkste Adhäsion zeigte *S. epidermidis* unter der Zugabe von 3 % NaCl zum TSB-Medium (Abbildungen 19 und 20). Dies ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben und als allgemeiner Mechanismus mittels SigB-Regulation in *S. epidermidis* anerkannt (Knobloch *et al.*, 2001). Interessanterweise hemmt die Zugabe von 3 % NaCl sowohl in *S. epidermidis* 567 als auch in *S. epidermidis* 567-1 die Biofilmbildung deutlich (Abbildung 21). Jedoch ist das SigB Operon in diesen beiden Stämmen sehr wohl funktionell. Was diesem phänotypischen Unterschied zugrunde liegt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Deutlich ist, dass einzelne Stämme eine stark unterschiedliche Biofilm-Kapazität ausbilden und sehr unterschiedlich mit den gegebenen Bedingungen umgehen bzw. den zeitlichen Ablauf dieses Prozesses strukturieren. Abbildung 22 vergleicht die BA-Ratio von 2 *S. epidermidis* und *S. aureus* Stämmen miteinander und zeigt deutlich die Unterschiede im Adhäsionsgrad und auch dem zeitlichen Ablauf.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Biofilmbildung einen hoch dynamischen, zeitlich geregelten Prozesses darstellt, der von Umgebungsvariablen, wie etwa der Salz-, Glukose- und Sauerstoffkonzentration, der Temperatur sowie der Beschaffenheit der Oberfläche abhängt. Darüber hinaus spielen im Wirt sicherlich Strömungsverhältnisse, das Immunsystem und Antibiotika eine weitere wichtige Rolle. Diese Faktoren dürften zu der enormen Varianz im Phänotyp und somit der genetischen Regulation verschiedener Stämme geführt haben, die sich somit evolutionär unterschiedlichsten ökologischen Nischen anpassen konnten.

### 5.6.2 Zeitlicher Verlauf der Biofilmbildung in *S. epidermidis*: Wachstum und Sterben im Biofilm

Die Untersuchungen zur Biofilmbildung mittels des 96-Loch-Mikrotiterplatten-Assays zeigten deutlich die Dynamik, die diesem Prozess zugrunde liegt. Dies konnte auch durch konfokale Lasermikroskopie-Aufnahmen nachvollzogen werden (4.2.2; Abbildung 23; Abbildung A1). Das klassische Modell der Biofilmbildung unterscheidet 3 Phasen: (i) die Bindung an die Oberfläche; (ii) die Akkumulation durch Wachstum der Bakterien im Biofilm und (iii) das Auflösen des Biofilms. Die im Prinzip am geringsten untersuchte Phase dieses Modells ist die 3. Phase. Inwieweit und wie sich Bakterien aktiv aus dem Biofilm herauslösen können oder in dieser kompakten Struktur sterben ist bis heute noch nicht geklärt. Die Untersuchungen unter Verwendung der BA-Ratio zeigen, dass unter allen getesteten Bedingungen eine Reduzierung des Biofilms nach 24 h stattfand (Abbildung 20). Des Weiteren wird vermutet, dass das  $\sigma$ -Hämolysin von *S. epidermidis* zur Auflösung der PIA Struktur führt, und die stark dichteabhängige Sekretion von Proteasen legt nahe, dass diese auch eine Rolle in der Ablösung spielen könnten (Batzilla *et al.*, 2006; Vuong *et al.*, 2003). Eine Untersuchung zum Überleben und Sterben der Bakterien innerhalb eines Biofilms über einen längeren Zeitraum ist jedoch bis dato noch nicht publiziert und war damit von zentralem Interesse. Abbildung 24 zeigt die Probenzeitpunkte anhand der BA-Ratio und Abbildung 25 die lasermikroskopischen Aufnahmen, wobei bei letzteren die Bakterien zusätzlich mittels Live/Dead-Kit angefärbt wurden (Abschnitt 4.2.3).

Wie erwartet nimmt die Dicke des Biofilms zunächst bis zum Probenzeitpunkt von 24 h zu. Interessanterweise sind jedoch zu diesem Zeitpunkt bereits einige Bakterien abgestorben, wobei dieses Sterben nicht zufällig verteilt stattfindet, sondern in bestimmten Foci (Abbildung 25). Dies liegt nahe, dass das Sterben an Stellen im Biofilm beginnt, die besonders schlecht mit Nährstoffen versorgt werden. Zum Zeitpunkt 48 h ist ein großer Teil der Bakterien im Biofilm abgestorben. Besonders auffällig bei stärkerer Vergrößerung ist, dass die toten Staphylokokken ihre Kokkenform verlieren und offensichtlich lysieren. Dafür könnten eigene extrazelluläre Proteasen und Lipasen verantwortlich sein, was letztlich den umliegenden anderen Staphylokokken ein längeres Überleben ermöglichen könnte. Diese starke Deformation der toten Kokken könnte allerdings auch eine Instabilität des Biofilms zur Folge haben, der somit leichter von Strömungs- und Scherkräften abgerissen werden könnte. Dies ist für das klonale Überleben sinnvoll, da die Bakterien von diesem Ort mit seiner verschlechterten Nährstoffsituation in ein neues Habitat mit besseren Bedingungen transportiert werden können.

### **5.6.3 NaCl führt zu einer verstärkten Sekundärstrukturbildung im Biofilm von *S. epidermidis* 678**

Bei den Untersuchungen zur BA-Ratio von *S. epidermidis* 678 zeigte sich, dass dieser Stamm besonders unter der Zugabe von 3 % NaCl einen erheblich verstärkten Biofilm bildet. Theoretisch ist die Dicke eines Biofilms durch einige Faktoren, wie etwa der Versorgung mit Nährstoffen verschiedenster Arten, begrenzt. Da aber die Zugabe von NaCl nicht die Energieversorgung und damit das Wachstum direkt beeinflusst, musste diesem Phänotyp ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen. Grundlegend sollte mittels konfokaler Lasermikroskopie geklärt werden, wie hoch der Biofilm von *S. epidermidis* 678 unter der Zugabe von Salz im Vergleich zu normalem TSB-Medium ist. Interessanterweise unterschieden sich aber die Biofilme, unter den beiden Bedingungen nicht nur in der Dicke sondern vor allem in der Sekundärstruktur deutlich voneinander. Die Struktur des *S. epidermidis* 678 Biofilms mit normalem TSB-Medium ist sehr homogen aufgebaut. Auf der Oberfläche gibt es kleine „Hügel“, aber kein ausgeprägtes Wachstum einzelner Stellen in die Höhe (Abbildung 27).

Im Unterschied dazu bildet *S. epidermidis* 678 unter der Zugabe von 3 % NaCl eine starke Sekundärstruktur aus. Die unteren Schichten scheinen von Kanälen durchzogen, wobei sich diese Strukturen bis zur Oberfläche durchziehen. In den oberen Schichten des Biofilms bildet dieser „Türme“ aus, die bereits nach 7 h eine Schichtdicke von bis zu 40 µm erreichen können, was einer Schichtung von mindestens 40 Bakterien direkt übereinander entspricht. Bei einem theoretischen Durchmesser von 5 µm dieses Turms entspricht dies 1000 Staphylokokken. Es ist gut vorstellbar, dass sich diese Türme bei einer Verschlechterung der Versorgungssituation der unteren Schichten durch Strömungs- und Scherkräfte ablösen und es im humanen Wirt zu einer Dissemination der Bakterien in einzelne Organe kommt.

### **5.6.4 So nah und doch so fern: Biofilm und Überstand von *S. epidermidis***

Die bis heute veröffentlichten Analysen zur Genexpression im Biofilm von Staphylokokken beruhen meistens auf dem Vergleich eines Biofilms mit einer Schüttelkultur. Dabei ist jedoch fraglich, ob diese stark unterschiedlichen Zustände überhaupt eine adäquate Aussage über die Regulation im Biofilm zulassen. Besonders im Bereich des Stoffwechsels dürften die Modelle schwer vergleichbar sein, da sich die physiologischen Bedingungen der Kulturen zu sehr von einander unterscheiden.

In den Untersuchungen zur BA-Ratio (3.2.1) zeigte sich, dass sich der Überstand über dem *S. epidermidis* Biofilm anders verhält, als die Bakterien im Biofilm, obwohl



die beiden Systeme denkbar nahe aneinander grenzen. Dennoch schien sich ein Teil der Population gegen die Bindung an eine Oberfläche entschieden zu haben und damit in einem anderen physiologischen Zustand zu wachsen. Zur Analyse dieser differentiellen Genexpression wurde daher ein Versuchsaufbau etabliert, der unter standardisierten Bedingungen erlaubte, genügend RNA für entsprechende Mikroarray Experimente aus beiden Phasen zu präparieren (3.3).

Zusätzlich zu den Untersuchungen zur Genexpression wurde das extrazelluläre Proteom im Medium über dem Biofilm untersucht. Wie auch beim extrazellulären Proteom von *S. epidermidis* 567 wird nur eine geringe Anzahl von Proteinen sekretiert. Besonders interessant ist, dass eine ähnlich große Akkumulation der Serin-Protease SspA wie im Stamm 567 bei *S. epidermidis* 678 nicht vorliegt. Dieses könnte ein Grund sein, warum *S. epidermidis* 678 wesentlich stärkeren Biofilm bildet als *S. epidermidis* 567. Die größte Veränderung im extrazellulären Proteom im Medium über dem Biofilm findet nach 24 h bzw. nach 48 h statt. Jedoch weist das Proteinmuster deutlich auf zytoplasmatische Proteine hin, die durch Lyse der Bakterien freigesetzt werden. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Lebend-Tot-Färbung der Zellen in der konfokalen Lasermikroskopie, die auch schon nach 24 h einen deutlichen Anteil von toten Zellen im Biofilm zeigte, der entsprechend bei 48 h noch weiter erhöht war (Abbildung 25).

Die Proben zur Analyse der differentiellen Genexpression von *S. epidermidis* 678 Überstand und Biofilm wurden zum einen in der starken Biofilm-bildenden-Phase nach 7 h genommen und in der stationären-Biofilm-Phase nach 24 h (Vergleiche Abbildung 28).

In der stark Biofilm-bildenden-Phase wurden 48 Gene im Überstand und 105 Gene in den Bakterien des Biofilms verstärkt exprimiert. Besonders interessant sind dabei 12 Gruppen von Genen, die den charakteristischen Unterschied der beiden Phasen darstellen (Abbildung 30, Tabellen A4 und A5). In Übereinstimmung mit den bekannten Studien steht die deutlich verstärkte Transkription des *ica*-Operons im Biofilm, bzw. des *icaR* Repressors im Überstand (Abbildung 31 a). Interessanterweise werden im Biofilm zwei Gruppen von Genen verstärkt exprimiert, die für DNA Transformation verantwortlich sind. Im Biofilm werden zu diesem Zeitpunkt auch verstärkt Gene der Antibiotika-Resistenz und extrazelluläre Pathogenitätsfaktoren transkribiert.

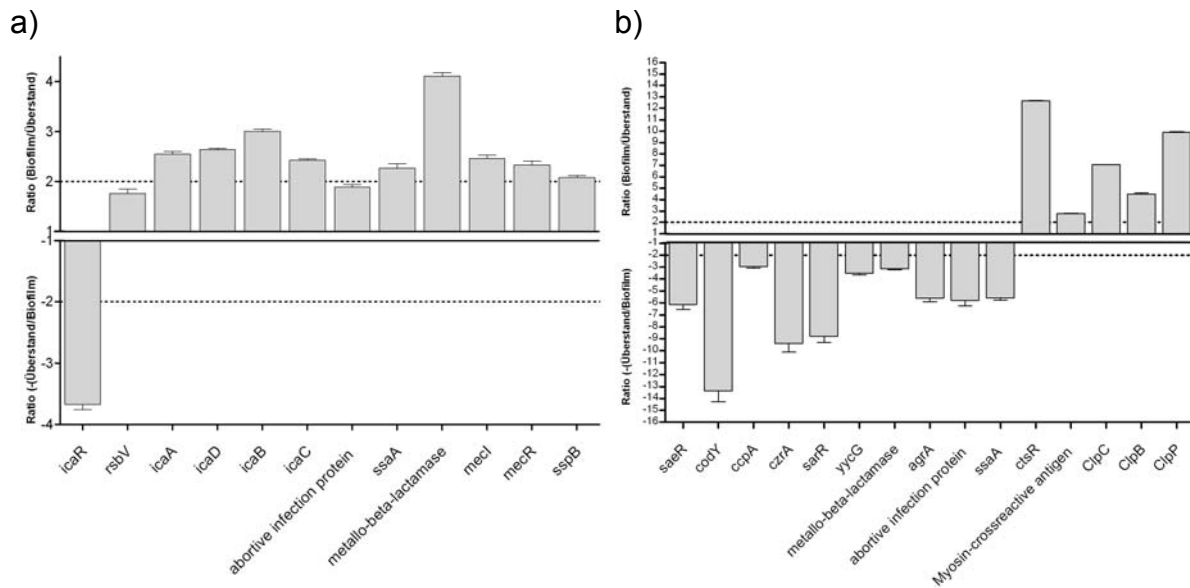


Abbildung 31: Genexpressionsprofil einer Biofilm- und Überstandskultur nach 7 h (a) und 24 h (b) von ausgewählten wichtigen Genen im Vergleich. Die detaillierten Daten werden in den Tabellen A4 bis A7 im Anhang dargestellt.

Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt ist der Stoffwechsel zwischen den Bakterien des Überstandes und denen des Biofilms deutlich unterschiedlich. So betreiben die Bakterien um Überstand Nitratatmung, was zu diesem Zeitpunkt als eine Art Überflussmetabolismus gewertet werden kann. Auch transportieren die Bakterien des Überstandes die verfügbaren Zucker mittels anderer Transportsysteme in die Zelle, als die des Biofilms. Die Bakterien des Biofilms hingegen exprimierten spezifische Eisentransporter, was auf einen Mangel an diesem wichtigen Co-Faktor hinweist. Zusammenfassend zeigt diese Analyse, dass zu diesem Zeitpunkt bereits ein deutlich anderer physiologischer Zustand in den beiden Phasen vorliegt. Erstaunlicherweise wurde keine differentielle Expression von Adhäsionsproteinen festgestellt. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die initiale Adhärenz zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen ist bzw. daran, dass einige dieser Gene nicht auf dem verfügbaren Mikroarray gespottet waren.

In der vergleichenden Analyse nach 24 h zeigte sich ein noch stärkerer Unterschied in der Genexpression zwischen den beiden Phasen. Die Bakterien im Biofilm scheinen unter anaeroben Bedingungen, die für diesen Zeitpunkt angenommen werden können, einen stark eingeschränkten Stoffwechsel durchzuführen und unter starkem Stress durch fehlgefaltete Proteine zu stehen, wie die Expression von *clpC*, *clpB* und *clpP*, sowie von *dnak*, *grpE* und *hrcA* zeigt. Hinzu kommt die Expression von diversen Stressproteinen in den Bakterien des Biofilms, was klar auf eine starke Mangelsituation hinweist. Dieses stimmt gut mit den Beobachtungen aus den Lebend-Tot-Färbungen der konfokalen Lasermikroskopie überein (Abbildung 25).

Das *ica*-Operon wird zu diesem Zeitpunkt weder in den Bakterien des Überstandes, noch des Biofilms exprimiert, was in Übereinstimmung mit den Analysen zur Biofilmdynamik steht (4.2.1).

Die Datenanalyse der differentiellen Genexpression nach 24 h zeigt, dass sich mit dem weiteren zeitlichen Verlauf die physiologischen Zustände der Stämme noch weiter von einander entfernen. Es konnten insgesamt 236 Gene gefunden werden, die in den Bakterien des Überstandes höher exprimiert wurden und 111 Gene, die in den Bakterien des Biofilms verstärkt transkribiert werden. Davon sind im Prinzip alle zentralen zellregulatorische Prozesse betroffen (Abbildungen 32 und 33; Tabellen A6 und A7). Dabei wird deutlich, dass die Bakterien im Überstand der Kultur sich noch im Wachstum befinden, da diese vor allem Gene der Transkription, Translation aber auch der Replikation der DNA, der Biosynthese der Membran und Enzyme für die Zellteilung verstärkt transkribieren. Weitere deutliche Unterschiede liegen im Bereich des Zentralmetabolismus vor. Die Staphylokokken sind wahrscheinlich aufgrund eines geringen Sauerstoffgehalts im Biofilm dazu gezwungen, Nitrat- und Laktatatmung durchzuführen, wohingegen die Bakterien im Überstand verstärkt die Enzyme des TCA Zyklus exprimieren. Für die bessere „Versorgungslage“ des Überstandes spricht auch, dass diese Bakterien sowohl den pleiotropen Repressor CodY, der stationären-Phase Gene unterdrückt, wie auch den Katabolit-Repressor *ccpA* verstärkt exprimieren (Abbildung 31). Des Weiteren wird im Überstand das Zwei-Komponentensystem *srrAB* verstärkt exprimiert. Dieses wurde bereits in *S. aureus* als Bindeglied zwischen Sauerstoffversorgung, Stoffwechselregulation und Virulenz beschrieben (Tabelle A6) (Pragman *et al.*, 2004). Auch das Quorum-sensing System *agr* war in den Bakterien des Überstandes deutlich stärker induziert als in denen des Biofilms (Abbildung 31, Tabelle A6). Ein Weiterer Regulator, *ycyG*, der bereits in ähnlichem Zusammenhang in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Kränzler im Rahmen seiner Dissertation beschrieben wurde, konnte als verstärkt exprimiert im Überstand gefunden werden sowie einige davon abhängige Gene, wie *ssaA* und *isaA* (Tabelle A6).

Insgesamt wurde eine hohe Anzahl an konservierten hypothetischen Genen, in Biofilm und Überstand zu beiden Zeitpunkten gefunden. Diese zählen sicherlich mit zu den interessantesten, da besonders in der Phase des Biofilms neue unbeschriebene Gene, mit zentraler Bedeutung für die Etablierung und Regulation der Biofilmbildung, zu finden sein dürften.

Diese Ergebnisse stehen zum größten Teil in Übereinstimmung mit der Veröffentlichung von Yao *et al.* (Yao *et al.*, 2005). Die dort beschriebenen Ergebnisse in einem ähnlichen System nach einem Probenzeitpunkt von 24 h decken sich in den zentralen Punkten. So kommen auch Yao *et al.* zu dem Schluss, dass *S. epidermidis* im Biofilm eine erheblich reduzierte Stoffwechselaktivität hat. Auch stimmen die Ergebnisse bezüglich des Agr-Systems, des Proteinstresses, des SrrAB sowie des

Stoffwechsels grundlegend überein (Yao *et al.*, 2005). Die von Yao *et al.* beschriebene verminderte Expression von *sarA* im Biofilm lag jedoch in dem von uns getesteten System nicht vor. Stattdessen war jedoch ein anderes Sar-Homolog *sarR* differentiell reguliert (Tabelle A6). Interessanterweise wurde SarR als Repressor von SarA und Aktivator des *agr*-Operons in *S. aureus* beschrieben (Manna and Cheung, 2006). Leider verzichteten Yao *et al.* auf eine Veröffentlichung der gesamten Expressionsergebnisse ihrer Untersuchungen und zeigen in ihrer Veröffentlichung nur Auszüge, weshalb ein weiterreichender Vergleich der beiden Studien nicht möglich war (Yao *et al.*, 2005).

Zusammenfassend kann auf Basis der gegebenen Daten festgestellt werden, dass die Biofilmbildung in *S. epidermidis* ein strikt regulierter Vorgang ist, der zu einem deutlich veränderten Stoffwechsel führt. Daraus resultiert ein erheblich langsames Wachstum, welches die Bakterien weniger anfällig gegenüber Antibiotika macht (Yao *et al.*, 2005). *S. epidermidis* exprimiert nur in der frühen Phase der Biofilmbildung Pathogenitätsfaktoren. Dies könnte für die Etablierung eines Biofilms *in vivo* von zentraler Rolle sein. Im Kontrast dazu verhält sich der ausgebildete Biofilm eher nicht aggressiv und im geringeren Maße inflammatorisch, welches das Anlocken von Immunzellen zum Infektionsherd erheblich reduzieren dürfte (Yao *et al.*, 2005). Dieses Ausweichen, im Zusammenhang mit dem jüngst erkannten invasiven Potential von *S. epidermidis*, zeigt auf, wie geschickt sich dieses Bakterium dem Immunsystem zu entziehen weiß und somit zu einem gefährlichen Erreger nosokomialer Infektionen werden konnte.

## **5.7 Die Suche nach neuen Substanzen mit Wirksamkeit gegen die Biofilmbildung von Staphylokokken**

Diese Dissertation wurde im Rahmen des SFB630 durchgeführt, kam der Suche nach neuen Substanzen, die hemmend auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* wirken, ein großer Stellenwert zu. In diesem Rahmen wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Michael Elofsson an der Universität Umeå 800 Substanzen mittels eines Hochdurchsatzverfahrens getestet. Insgesamt zeigte nur eine Substanz ein viel versprechendes Profil (ID210775, Abbildung 34, Tabelle 23), bei einer jedoch zu hohen Zytotoxizität. Entsprechende Derivatisierung zur Verminderung der Toxizität sind in Abbildung 34 vorgeschlagen.

Insgesamt gestaltete sich die Suche nach entsprechenden Substanzen aus einer Reihe von Gründen als recht schwierig: (i) die meisten der getesteten Substanzen sind wasserunlöslich und damit in der Regel nicht aktiv oder geben im ungünstigsten Fall durch Kristallbildung ein falsch-positives Ergebnis (durch Blockierung der Oberfläche kommt es zur Verhinderung der Biofilmbildung auf der Polystyren-Oberfläche); (ii) Viele der aktiven Substanzen sind in der Regel hochtoxisch und

damit nicht als Medikament geeignet. Da die Aktivität gegen die Biofilmbildung meist auf eine Einlagerung der Substanz in die Membran zurückzuführen ist, sind Modifikationen, die die Substanz weniger toxisch machen ohne Verlust der entsprechenden Aktivität sehr unwahrscheinlich. (iii) Da die Biofilmbildung in Staphylokokken teilweise sehr unterschiedlich reguliert wird (proteinogener Biofilm, PIA-basiert, Teichonsäuren-basiert) muss ein entsprechender Wirkstoff diese verschiedenen Mechanismen gleichermaßen blockieren.

Nimmt man die Daten der Regulation von Quorum-sensing System und Biofilmbildung dieser Arbeit als Grundlage zur Wirkstofffindung, so sind neben der bis heute durchgeführten Substanzsuche auch andere Ansätze, die mehr auf der biochemischen und physiologischen Anpassung von *S. epidermidis* beruhen, denkbar. Es stellt sich die grundlegende Frage, an welcher Stelle der Biofilmbildung man diesen Prozess unterbinden kann. Die primäre Adhäsion wird man, aufgrund der Vielfältigkeit der verschiedenen Adhäsionsmechanismen (über ionische Wechselwirkungen, Proteine die an Polysteren binden und Proteine, die an Wirtsproteine binden) durch Wirkstoff eher schlecht unterbinden können. Hier wäre eine entsprechende Modifikation von künstlichen Oberflächen mittels „Lotus-Effekt“ sicherlich ein sinnvoller Ansatz. Ein weiterer interessanter Ansatz könnte im Verständnis der biochemischen Bedürfnisse und Verhältnisse im Biofilm von *S. epidermidis* selber liegen. Der Schlüssel hierzu wäre es, Prozesse zu behindern, die das Wachsen der Bakterien im Biofilm und das Ablösen der Staphylokokken aus dem Biofilm regulieren bzw. ermöglichen. Denn letztlich geht vor allem von einer Verbreitung der Bakterien in den Organismus und damit von der Etablierung systemischen Infektion die größte Gefahr für den Patienten aus.

Zusätzlich sollte bedacht werden, dass mit dem Einsatz von biofilminhibierenden Substanzen unter Umständen stark invasive Staphylokokken evolutionär bevorteilt werden könnten. Um dies zu verhindern, sollte am besten eine entsprechende Doppelstrategie zur Unterbindung der Biofilmbildung und der Invasion von Staphylokokken das Ziel zukünftiger Forschung sein.

## 6 Referenzen

- Arvidson, S., and Tegmark, K. (2001) Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **291**: 159-170.
- Bassler, B.L. (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **2**: 582-587.
- 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.
- Benito, Y., Kolb, F.A., Romby, P., Lina, G., Etienne, J., and Vandenesch, F. (2000) Probing the structure of RNAIII, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *Rna* **6**: 668-679.
- Blevins, J.S., Gillaspay, A.F., Rechten, T.M., Hurlburt, B.K., and Smeltzer, M.S. (1999) The *Staphylococcal* accessory regulator (sar) represses transcription of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesin gene (cna) in an agr-independent manner. *Mol Microbiol* **33**: 317-326.
- Blomberg A. (1995) Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **16**.
- Bowden, M.G., Chen, W., Singvall, J., Xu, Y., Peacock, S.J., Valtulina, V., Speziale, P., and Hook, M. (2005) Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **151**: 1453-1464.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., and Beachey, E.H. (1982) Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* **37**: 318-326.
- Conlon, K.M., Humphreys, H., and O'Gara, J.P. (2002a) 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. (2002b) Regulation of icaR gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* **216**: 171-177.
- 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.
- Cramton, S.E., Ulrich, M., Gotz, F., and Doring, G. (2001) Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **69**: 4079-4085.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., and Penades, J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**: 2888-2896.
- Dobinsky, S., Kiel, K., Rohde, H., Bartscht, K., Knobloch, J.K., 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.
- Dunman, P.M., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., Brown, E.L., Zagursky, R.J., Shlaes, D., and Projan, S.J. (2001) Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. *J Bacteriol* **183**: 7341-7353.
- Dunne, W.M., Jr. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* **15**: 155-166.

- Fey, P.D., Ulphani, J.S., Gotz, F., Heilmann, C., Mack, D., and Rupp, M.E. (1999) Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **179**: 1561-1564.
- Fournier, B., Klier, A., and Rapoport, G. (2001) The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **41**: 247-261.
- Gerke, C., Kraft, A., Sussmuth, R., Schweitzer, O., and Gotz, 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.
- Gladstone, G.P. (1937). *Br. J. Exp. Pathol.* **18**: 322-333.
- Görg A. (1995) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-DALT): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* **16**: 1079-1086.
- Gotz, F. (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* **43**: 1367-1378.
- Guedon, E., Serron, P., Ehrlich, S.D., Renault, P., and Delorme, C. (2001) Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* **40**: 1227-1239.
- Hecker, M., Schumann, W., and Volker, U. (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 417-428.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G., and Gotz, F. (1997) Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* **24**: 1013-1024.
- Huebner, J., and Goldmann, D.A. (1999) Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med* **50**: 223-236.
- Huntzinger, E., Boisset, S., Saveanu, C., Benito, Y., Geissmann, T., Namane, A., Lina, G., Etienne, J., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Jacquier, A., Vandenesch, F., and Romby, P. (2005) *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *Embo J* **24**: 824-835.
- 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.
- Isberg, R.R., and Van Nhieu, G.T. (1994) Two mammalian cell internalization strategies used by pathogenic bacteria. *Annu Rev Genet* **28**: 395-422.
- Janzon, L., and Arvidson, S. (1990) The role of the delta-lysin gene (hld) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *Embo J* **9**: 1391-1399.
- Jarvis, W.R., and Martone, W.J. (1992) Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother* **29 Suppl A**: 19-24.
- Ji, G., Beavis, R.C., and Novick, R.P. (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 12055-12059.
- Ji, G., Beavis, R., and Novick, R.P. (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**: 2027-2030.
- Kloos, W.E., and Bannerman, T.L. (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **7**: 117-140.
- Klose J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik* **26**: 231-243.
- Knobloch, J.K., 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., Jager, S., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Mack, D. (2004) RsbU-dependent regulation of Staphylococcus epidermidis biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene icaR. *Infect Immun* **72**: 3838-3848.
- Koenig, R.L., Ray, J.L., Maleki, S.J., Smeltzer, M.S., and Hurlburt, B.K. (2004) Staphylococcus aureus AgrA binding to the RNAIII-agr regulatory region. *J Bacteriol* **186**: 7549-7555.
- Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A., and Jabbouri, S. (2006) Biofilms of clinical strains of Staphylococcus that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Lett* **255**: 11-16.
- Kong, K.F., Vuong, C., and Otto, M. (2006) Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* **296**: 133-139.
- Kozitskaya, S., Cho, S.H., Dietrich, K., Marre, R., Naber, K., and Ziebuhr, W. (2004) The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial Staphylococcus epidermidis isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect Immun* **72**: 1210-1215.
- Kresken, M., and Hafner, D. (2001) [How can we protect against broad-band pathogens? The situation with quinolone resistance]. *Pharm Unserer Zeit* **30**: 436-445.
- Kruger, E., Msadek, T., and Hecker, M. (1996) Alternate promoters direct stress-induced transcription of the Bacillus subtilis clpC operon. *Mol Microbiol* **20**: 713-723.
- Li, M., Guan, M., Jiang, X.F., Yuan, F.Y., Xu, M., Zhang, W.Z., and Lu, Y. (2004) Genetic polymorphism of the accessory gene regulator (agr) locus in Staphylococcus epidermidis and its association with pathogenicity. *J Med Microbiol* **53**: 545-549.
- Liang, X., Yu, C., Sun, J., Liu, H., Landwehr, C., Holmes, D., and Ji, Y. (2006) Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of Staphylococcus aureus. *Infect Immun* **74**: 4655-4665.
- 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., Riedewald, J., Rohde, H., Magnus, T., Feucht, H.H., Elsner, H.A., Laufs, R., and Rupp, M.E. (1999) Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of Staphylococcus epidermidis in hemagglutination. *Infect Immun* **67**: 1004-1008.
- Manna, A.C., Bayer, M.G., and Cheung, A.L. (1998) Transcriptional analysis of different promoters in the sar locus in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* **180**: 3828-3836.
- Manna, A.C., and Cheung, A.L. (2006) Transcriptional regulation of the agr locus and the identification of DNA binding residues of the global regulatory protein SarR in Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* **60**: 1289-1301.
- Mayville, P., Ji, G., Beavis, R., Yang, H., Goger, M., Novick, R.P., and Muir, T.W. (1999) Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from Staphylococcus aureus responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1218-1223.
- Mittenhuber, G. (2002) A phylogenomic study of the general stress response sigma factor sigmaB of Bacillus subtilis and its regulatory proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 427-452.



- Miyazaki, E., Chen, J.M., Ko, C., and Bishai, W.R. (1999) The *Staphylococcus aureus* *rsbW* (*orf159*) gene encodes an anti-sigma factor of SigB. *J Bacteriol* **181**: 2846-2851.
- Nair, S.P., Bischoff, M., Senn, M.M., and Berger-Bachi, B. (2003) The sigma B regulon influences internalization of *Staphylococcus aureus* by osteoblasts. *Infect Immun* **71**: 4167-4170.
- Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., and Moghazeh, S. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Embo J* **12**: 3967-3975.
- Novick, R.P., Projan, S.J., Kornblum, J., Ross, H.F., Ji, G., Kreiswirth, B., Vandenesch, F., and Moghazeh, S. (1995) The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* **248**: 446-458.
- Novick, R.P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48**: 1429-1449.
- Novick, R.P., and Jiang, D. (2003) The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiology* **149**: 2709-2717.
- O'Farrell P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- Otto, M., Sussmuth, R., Vuong, C., Jung, G., and Gotz, F. (1999) Inhibition of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus* by the *Staphylococcus epidermidis* *agr* pheromone and derivatives. *FEBS Lett* **450**: 257-262.
- Palma, M., and Cheung, A.L. (2001) sigma(B) activity in *Staphylococcus aureus* is controlled by RsbU and an additional factor(s) during bacterial growth. *Infect Immun* **69**: 7858-7865.
- Pane-Farre, J., Jonas, B., Forstner, K., Engelmann, S., and Hecker, M. (2006) The sigmaB regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *Int J Med Microbiol* **296**: 237-258.
- Peters, G., Locci, R., and Pulverer, G. (1981) Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* **173**: 293-299.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Pragman, A.A., Yarwood, J.M., Tripp, T.J., and Schlievert, P.M. (2004) Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **186**: 2430-2438.
- 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., Witte, W., Hacker, J., and Ziebuhr, W. (2000b) 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.
- Rechtin, T.M., Gillaspay, A.F., Schumacher, M.A., Brennan, R.G., Smeltzer, M.S., and Hurlburt, B.K. (1999) Characterization of the SarA virulence gene regulator of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **33**: 307-316.
- Rogasch, K., Ruhmling, V., Pane-Farre, J., Hoper, D., Weinberg, C., Fuchs, S., Schmutde, M., Broker, B.M., Wolz, C., Hecker, M., and Engelmann, S. (2006) Influence of the

- Two-Component System SaeRS on Global Gene Expression in Two Different *Staphylococcus aureus* Strains. *J Bacteriol* **188**: 7742-7758.
- Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K., Heilmann, C., Herrmann, M., and Mack, D. (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* **55**: 1883-1895.
- Rupp, M.E., and Archer, G.L. (1994) Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* **19**: 231-243; quiz 244-235.
- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G., and Jabbouri, S. (2005) Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun* **73**: 3007-3017.
- Saenz, H.L., Augsburg, V., Vuong, C., Jack, R.W., Gotz, F., and Otto, M. (2000) Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. *Arch Microbiol* **174**: 452-455.
- Sarubbi, E., Rudd, K.E., and Cashel, M. (1988) Basal ppGpp level adjustment shown by new spoT mutants affect steady state growth rates and rrnA ribosomal promoter regulation in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **213**: 214-222.
- Shivers, R.P., and Sonenshein, A.L. (2004) Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. *Mol Microbiol* **53**: 599-611.
- Sinha, B., Francois, P.P., Nusse, O., Foti, M., Hartford, O.M., Vaudaux, P., Foster, T.J., Lew, D.P., Herrmann, M., and Krause, K.H. (1999) Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol* **1**: 101-117.
- Sinha, B., Francois, P., Que, Y.A., Hussain, M., Heilmann, C., Moreillon, P., Lew, D., Krause, K.H., Peters, G., and Herrmann, M. (2000) Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun* **68**: 6871-6878.
- Slack, F.J., Serron, P., Joyce, E., and Sonenshein, A.L. (1995) A gene required for nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. *Mol Microbiol* **15**: 689-702.
- Sonenshein, A.L. (2005) CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* **8**: 203-207.
- Takano, M., Oshida, T., Yasojima, A., Yamada, M., Okagaki, C., Sugai, M., Suginaka, H., and Matsushita, T. (2000) Modification of autolysis by synthetic peptides derived from the presumptive binding domain of *Staphylococcus aureus* autolysin. *Microbiol Immunol* **44**: 463-472.
- Tormo, M.A., Marti, M., Valle, J., Manna, A.C., Cheung, A.L., Lasa, I., and Penades, J.R. (2005) SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J Bacteriol* **187**: 2348-2356.
- Veenstra, G.J., Cremers, F.F., van Dijk, H., and Flier, A. (1996) Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **178**: 537-541.
- von Eiff, C., Heilmann, C., Herrmann, M., and Peters, G. (1999) Basic aspects of the pathogenesis of staphylococcal polymer-associated infections. *Infection* **27 Suppl 1**: S7-10.
- von Eiff, C., Proctor, R.A., and Peters, G. (2000a) *Staphylococcus aureus* small colony variants: formation and clinical impact. *Int J Clin Pract Suppl*: 44-49.
- von Eiff, C., Proctor, R.A., and Peters, G. (2000b) Small colony variants of Staphylococci: a link to persistent infections. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **113**: 321-325.

- 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.
- Watnick, P., and Kolter, R. (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**: 2675-2679.
- 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.
- 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.
- Ziebandt, A.K., Becher, D., Ohlsen, K., Hacker, J., Hecker, M., and Engelmann, S. (2004) The influence of agr and sigmaB in growth phase dependent regulation of virulence factors in Staphylococcus aureus. *Proteomics* **4**: 3034-3047.
- Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lossner, I., Gotz, F., and Hacker, J. (1999) A novel mechanism of phase variation of virulence in Staphylococcus epidermidis: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* **32**: 345-356.

## 7 Anhang

Im Folgenden sind die Tabellen mit den Gesamtdaten der 2-D Gelelektrophorese, sowie der Mikroarray-Analysen angefügt. Aus Gründen der Übersicht sind die Tabellenbeschreibungen vorweg als Block gestellt. Die Tabellen sind in der Kopfzeile der Seiten zur Orientierung gekennzeichnet.

### Tabelle A1:

Vergleich der zytoplasmatischen Proteinmenge von *S. epidermidis* 567 und seiner isogenen *agr* Mutante *S. epidermidis* 567-1 in der früh- und spät-exponentiellen Wachstumsphase. Das Verhältnis (Ratio) wurde über DIGE basierte 2-D Gelelektrophorese mit anschließender Computeranalyse bestimmt. Positive Werte bedeuten eine x-fach höhere Menge an Protein im Wildtyp-Stamm im Vergleich zur *agr* Mutante und negative Werte zeigen eine entsprechend höhere Menge an Protein in der *S. epidermidis agr* Mutante an. Alle Proteinspots sind in den Abbildungen 10 und 11 entsprechend markiert.

### Tabelle A2:

Ergebnisse der Mikroarray-Analyse. Gene die signifikant in der *S. epidermidis agr* Wildtyp hoch reguliert sind (d.h. reprimiert oder nicht exprimiert in der *agr* Mutante *S. epidermidis* 567-1): Gruppe (i) OD<sub>600</sub> 1 und OD<sub>600</sub> 4; Gruppe (ii) nur bei OD<sub>600</sub> 1; Gruppe (iii) nur bei OD<sub>600</sub> 4; Gruppe (iv) Gene die hoch reguliert sind bei OD<sub>600</sub> 1 im *S. epidermidis agr* Wildtyp Stamm, aber bei OD<sub>600</sub> 4 signifikant hoch reguliert sind in der *S. epidermidis agr* Mutante.

### Tabelle A3:

Ergebnisse der Mikroarray Analyse. Gene die signifikant in der *S. epidermidis agr* Mutante hoch reguliert sind (d.h. reprimiert oder nicht exprimiert im *agr* Wildtyp *S. epidermidis* 567) Gruppe (v) OD<sub>600</sub> 1 und OD<sub>600</sub> 4; Gruppe (vi) nur bei OD<sub>600</sub> 1, Gruppe (vii) nur bei OD<sub>600</sub> 4.)

Tabelle A1-A3 sind in Analogie zu der Veröffentlichung in englischer Sprache gehalten, um einen entsprechenden Vergleich zu vereinfachen.

Fußnoten zu den Tabellen 1 bis 3:

<sup>a</sup> Annotation nach *S. epidermidis* ATCC 12228

<sup>b</sup> Annotation nach *S. epidermidis* RP62A

<sup>c</sup> Annotation nach *S. aureus* COL

## Tabelle A4:

Ergebnisse der Mikroarray-Analyse. Gene die nach 7 h signifikant im *S. epidermidis* 678 Überstand über dem Biofilm hoch reguliert waren.

## Tabelle A5:

Ergebnisse der Mikroarray-Analyse. Gene die nach 7 h signifikant im *S. epidermidis* 678 Biofilm hoch reguliert waren. (1/Wert zum unmittelbaren Vergleich mit dem reziproken Gegenwerten)

## Tabelle A6:

Ergebnisse der Mikroarray-Analyse. Gene die nach 24 h signifikant im *S. epidermidis* 678 Überstand über dem Biofilm hoch reguliert waren.

## Tabelle A7:

Ergebnisse der Mikroarray-Analyse. Gene die nach 24 h signifikant im *S. epidermidis* 678 Biofilm hoch reguliert waren. (1/Wert zum unmittelbaren Vergleich mit reziproken Gegenwerten)

Label	Locus <sup>a</sup>	Common name <sup>a</sup>	X times amount	
			OD <sub>600</sub> 1	OD <sub>600</sub> 4
<b>Amino acid biosynthesis and metabolism</b>				
<i>Aromatic amino acid family</i>				
Cyt11	SE1410 <sup>b</sup>	chorismate mutase/prephenate dehydratase (tyrA/pheA)	-10.1	1.9
Cyt12	SE1410 <sup>b</sup>		-2.3	-1.8
Cyt13	SE1410 <sup>b</sup>		-3.3	-1.5
Cyt14	SE1410 <sup>b</sup>		-3.1	-1.6
Cyt15	SE1410 <sup>b</sup>		-2.1	-1.5
Cyt16	SE1410 <sup>b</sup>		-2.3	-1.7
Cyt17	SE1410 <sup>b</sup>		-1.94	-1.0
Cyt18	SE1410 <sup>b</sup>		-1.83	-2.2
<i>Aspartate family</i>				
MetE(1)	SE2382 <sup>b</sup>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate- homocysteine S-methyltransferase	-39	-15
MetE(2)	SE2382 <sup>b</sup>		-44	-13.1
MetE(3)	SE2382 <sup>b</sup>		1.15	1.3
MetE(4)	SE2382 <sup>b</sup>		-5.6	-15
MetE(5)	SE2382 <sup>b</sup>		-3.04	-3.5
ThrC(1)	SE1010 <sup>b</sup>	threonine synthase	-4.7	-3.6
ThrC(2)	SE1010 <sup>b</sup>		-6.6	-4.1
DapB	SE1076 <sup>b</sup>	dihydrodipicolinate reductase	-1.9	-1.94

*Valine, Leucine, Isoleucine family*

IlvC(1)	SE1657 <sup>b</sup>	ketol-acid reductoisomerase	-1.2	-3.4
IlvC(2)	SE1657 <sup>b</sup>		-	-15.5
IlvC(3)	SE1657 <sup>b</sup>		1.7	-3.5
IlvD(1)	SE1654 <sup>b</sup>	dihydroxy-acid dehydratase	-3.5	-1.3
IlvD(2)	SE1654 <sup>b</sup>		-11.3	-3.1
IlvD(3)	SE1654 <sup>b</sup>		-6.8	-15.4
IlvD(4)	SE1654 <sup>b</sup>		-1.4	-2.0

*Putative aminotransferases*

AspC(1)	SE1400 <sup>b</sup>	aminotransferase, class V	-9.9	-4.7
AspC(2)	SE1400 <sup>b</sup>		-16.7	-5.3
AspC(3)	SE1400 <sup>b</sup>		-8.3	-3.6
AspC(4)	SE1400 <sup>b</sup>		-4.0	-2.5
AspB-4	SE2122 <sup>b</sup>	aminotransferase, class I	-3.6	-2.4
Cyt19	SE1627	Aspartate transaminase, putative	2.7	2.8
Cyt20	SE1627		2.3	2.1

**Oligopeptide transporters and ATP-binding proteins**

Cyt6	SE0682 <sup>b</sup>	oligopeptide transport ATP-binding protein subunit	-4.5	-4.0
OppF	SE0683 <sup>b</sup>	oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein	-15.3	-2.5
Cyt22	SE2322 <sup>b</sup>	ABC transporter, ATP-binding protein	-1.5	-2.5
Cyt23	SE2322 <sup>b</sup>		-15.4	-27.8

**Protein synthesis**

RplF(1)	SE1808	50s ribosomal protein l6	2.2	-1.1
RplF(2)	SE1808		1.7	-3.5
IleS	SE0868	isoleucyl-tRNA synthetase	1.7	-2.2
MetS	SE2293	methionyl-tRNA synthetase	-1.5	2.7

**Central intermediary metabolism***Glycolysis/ gluconeogenesis*

Gap	SE0557	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.2	-2.1
GpmA	SE0560	2 (2) 3-diphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	-1.6	-1.3
Eno	SE0561	enolase (ec 4.2.1.11)	-3.8	-5
Pgi	SE0658	glucose-6-phosphate isomerase	1.3	2.4
Pyc	SE0813	pyruvate carboxylase	-1.4	2.5
Fba(1)	SE1723 <sup>b</sup>	fructose-1,6-bisphosphate aldolase, class II	2.9	2.0
Fba(2)	SE1723 <sup>b</sup>		3.0	-
GpmA	SE1995	phosphoglycerate mutase	-2.0	-37.0

*Fermentation, Pentose phosphate pathway, TCA cycle*

Cyt21	SE2098 <sup>b</sup>	sorbitol dehydrogenase-like protein	-2.4	-2.9
Tkt	SE1025	transketolase	-3.2	-1.1
AcnA(1)	SE1032 <sup>b</sup>	aconitate hydratase	2.1	2.1
AcnA(2)	SE1032 <sup>b</sup>	aconitate hydratase	2.0	2.1



*Pyruvate metabolism*

PdhB	SE0792	pyruvate dehydrogenase complex, E1 component, pyruvate dehydrogenase beta subunit	2.8	1.5
AceF(1)	SE0793	dihydrolipoamide S-acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex E3	-	23.9
AceF(2)	SE0793		1.9	2.8
AceF(3)	SE0793		-1.7	-4.6
AceF(4)	SE0793		-1.8	-7.1
AceF(5)	SE0793		-	-49.5

*Fructose and mannose metabolism*

CpsG(1)	SE2042	phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein	1.7	2.2
CpsG(2)	SE2042		2.2	2.3
CpsG(3)	SE2042		1.5	1.6

*Nitrogen and sulfur metabolism*

UreC	SE1863	urease, alpha subunit	1.2	2.0
UreE	SE1864	urease accessory protein UreE	3.9	4.2
CysI	SE2179 <sup>b</sup>	sulfite reductase (NADPH) hemoprotein beta- component	-2.9	-2.8

*Fatty acid and phospholipid metabolism*

FabI(1)	SE0712	trans-2-enoyl-ACP reductase	-1.2	-2.2
FabI(2)	SE0712		-3.9	-2.6
FabI(3)	SE0712		-1.5	-1.9

**Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers***Pantothenate, CoA and menaquinon biosynthesis*

Cyt8	SE0746	naphthoate synthase MenB	1.6	
PanC(1)	SE2140	pantoate--beta-alanine ligase	-2.7	-3.4
PanC(2)	SE2140		4.7	6.5
PanB	SE2141	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	-1.5	-2.0

*Folate synthesis/ Glyoxylate and dicarboxylate metabolism*

Fhs(1)	SE1408	formate--tetrahydrofolate ligase	2.33	3.9
Fhs(2)	SE1408		1.7	3.9
Fhs(3)	SE1408		1.8	3
Fhs(4)	SE1408		1.34	-2.3
Fhs(5)	SE1408		2.4	3.9

**Degradation of proteins, signal transduction and cell division**

Trap(1)	SE1514	signal transduction protein TRAP	-1.1	2
Trap(2)	SE1514		-	1.4
SspA(1)	SE1543 <sup>b</sup>	glutamyl endopeptidase precursor / serine protease	-1.1	1.2

SspA(2)	SE1543 <sup>b</sup>		-6.2	1.4
SspA(3)	SE1543 <sup>b</sup>		-	10.5
SspA(4)	SE1543 <sup>b</sup>		2.1	9.2
SspA(5)	SE1543 <sup>b</sup>		1.2	2.4
SspA(6)	SE1543 <sup>b</sup>		-	18.0
Cyt10	SE1385	universal stress protein family	-1.9	-1.5
FtsA	SE0860	cell division protein	-	-26.0
AmiB	SE1731 <sup>b</sup>	Amidase	-4.5	-2.4

### Energy metabolism

AtpH	SE1703	ATP synthase F1, delta subunit	1.9	-2.0
------	--------	--------------------------------	-----	------

### *Purine biosynthesis and nucleotide interconversion*

GuaC(1)	SE1019	guanosine monophosphate reductase	3.5	2.1
GuaC(2)	SE1019		2.5	2.4
GuaC(3)	SE1019		-2.9	-5.0
GuaC(4)	SE1019		1.9	1.3
GuaC(5)	SE1019		1.7	2.5
GuaB(1)	SE2348	inosine-5-monophosphate dehydrogenase	2.0	2.3
GuaB(2)	SE2348		1.5	2.1
GuaB(3)	SE2348		-	-1.4
GuaB(4)	SE2348		1.1	2.7
GuaB(5)	SE2348		1.5	3.2
GuaB(6)	SE2348		1.7	7.3
GuaB(7)	SE2348		1.0	-1.1
GuaB(8)	SE2348		-	-22.0

---

GuaB(9)	SE2348		1.1	3.1
GuaB(10)	SE2348		1.0	-4.4
GuaB(11)	SE2348		-1.4	-2.4
GuaB(12)	SE2348		-1.6	-1.5
<b>DNA replication, recombination, and repair</b>				
PriA	SE0888	primosomal protein N'	2.1	2.1
<b>Protein folding and stabilization</b>				
DnaK(1)	SE1267	chaperone protein dnaK	2.1	2.0
DnaK(2)	SE1267		-1.3	-47.0
DnaK(3)	SE1267		2.3	65.5
<b>Hypothetical proteins and proteins of unknown specificity</b>				
Cyt9	SE0995 <sup>b</sup>	conserved hypothetical protein	-2.1	-2.2
Cyt4	SE0607	Uncharacterized protein family (UPF0051) family	1.2	2.0
HmpA	SE0440 <sup>b</sup>	putative flavohemoprotein	1.9	2.7
Cyt3	SE0531	degV family protein	1.3	2.4

---

Gene	Locus <sup>a</sup>	Common name, function <sup>a,b</sup>	X times induction	
			OD <sub>600</sub> 1	OD <sub>600</sub> 4
<b>Group (i):</b>				
<b>Up-regulated genes in the early- and late-exponential growth phase in the wild type</b>				
<b>Information pathways</b>				
<i>saeS</i>	SE0478	histidine protein kinase	1.79	2
<i>saeR</i>	SE0479	response regulator SaeR	2.04	2.63
	SE0480	conserved hypothetical protein Sae system	2	2.44
	SE0481	conserved hypothetical protein Sae system	2.13	2.56
<i>codY</i>	SE0931	transcription pleiotropic repressor CodY	3.13	3.7
	SE1891	transcription regulator RpiR family	2.5	5.26
<b>Transport and cellular processes</b>				
<i>pfoR</i>	SE2082	regulatory protein; putative phosphotransferase system	9.09	2.08
<i>fruA</i>	SE0472	PTS system fructose-specific IIABC component	2.08	2.86
<i>hslU</i>	SE0930	heat shock protein HslU	3.23	2.22
	SE1623	membrane protein, putative	2.08	2.94
<i>adh</i>	SE2098	(sorbitol) alcohol dehydrogenase, zinc-containing	8.94	13.3
<i>nrdD</i>	SE2172	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	4.17	2.56

**Protein and lipid degradation**

<i>geh</i>	SE0185	glycerol ester hydrolase	2.13	3.13
	SE0184	Staphopain, cysteine proteinase	3.7	5.56
<i>sspA</i>	SE1543	V8 serine protease; glutamyl endopeptidase precursor	33.33	100
<i>sepA</i>	SE2219	zinc metalloproteinase aureolysin, extracellular elastase precursor	2.13	2.27

**Conserved hypothetical proteins**

	SE1775	hypothetical protein	3.03	1.89
	SE1776	hypothetical protein	4.55	2.44
	SE1888	hypothetical protein	2.38	6.25
	SE1889	GckR family protein VC0206	2.44	5.88
	SE2038	hypothetical protein	2.63	2.04

**Enzymes of unknown specificity**

<i>hmpA</i>	SE0440	putative flavohemoprotein	5.56	2
-------------	--------	---------------------------	------	---

**Group (ii)**

**Up-regulated genes in the early-exponential, but less strongly expressed or repressed in the late exponential growth phase in the wild type**

**Transport of sugars, amino acids, ions**

<i>ptsG</i>	SE1897	PTS system arbutin-like IIBC component	5.26	0.95
<i>rbsD</i>	SE2087	ribose permease	4.35	1.03

<i>rbsK</i>	SE2086	ribokinase	5	1.01
	SE0637	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter family family	2.63	0.53
<i>opuCB</i>	SE2017	OpuCB protein (Amino acid and peptide transporter)	2.63	1.56
	SE1356	lysine-specific permease	2.5	1.25
	SE2170	anaerobic dicarboxylate transport	2.17	1.32

### Fermentation

<i>pfl</i>	SE0214	formate acetyltransferase	5	0.6
<i>rof</i>	SE0215	formate acetyltransferase activating enzyme	5.88	0.83
<i>ldh</i>	SE2145	L-lactate dehydrogenase	3.03	1.2
<i>budA</i>	SE2143	alpha-acetolactate decarboxylase	2.08	1.25
<i>ackA</i>	SE1387	acetate kinase	2.7	0.78
	SE0197	acetoin(diacetyl)reductase	2.86	1.35
<i>fabG</i>	SE2225	acetoin(diacetyl)reductase	5	0.64

### Glycolysis, TCA cycle and electron transfer

<i>fba</i>	SE1723	fructose-bisphosphate aldolase	2.04	1.19
<i>acnA</i>	SE1032	aconitate hydratase	6.67	1.06
	SE0195	fumarate reductase, flavoprotein subunit precursor	3.85	0.92

### Urea and nitrogen metabolism

<i>nirB</i>	SE1978	assimilatory nitrite reductase [NAD(P)H], large subunit	3.03	-
-------------	--------	---	------	---

<i>nirC</i>	SE1985	formate/nitrite transporter family protein	2.5	1.45
<i>narU</i>	SE1968	nitrite extrusion protein	2.86	-4
<i>moeB</i>	SE1849	molybdopterin biosynthesis protein	2.13	1.3
	SE1976	uroporphyrin-III C-methyltransferase	3.33	-
<i>ureD</i>	SE1867	urease accessory protein	2.22	1.52
<i>arcC</i>	SE0228	putative carbamate kinase	7.14	1.39
<i>argF</i>	SE0229	ornithine carbamoyltransferase	7.69	1.45

### Protein synthesis

<i>serS</i>	SE0007	seryl-tRNA synthetase	2.78	1.37
<i>glyS</i>	SE1252	glycyl-tRNA synthetase	2.22	1.47

### DNA synthesis

<i>nrdG</i>	SE2171	putative anaerobic ribonucleotide reductase activator protein	4.35	0.66
-------------	--------	--	------	------

### Genes involved in the pathogenicity of *S. epidermidis*

<i>feoB</i>	SE2114	ferrous iron transport protein B	2.94	1.35
<i>icaA</i>	SE2293 <sup>b</sup>	intercellular adhesion protein A	2.22	1.2

### Conserved hypothetical proteins

	SE1940	permease, putative domain protein	6.67	1.37
	SE1960	conserved hypothetical protein	2.44	1.19
	SE0227	conserved hypothetical protein	2.17	1.67



**Enzymes of unknown specificity**

	SE0342	SIS domain protein	2.04	1.49
<i>pfpI</i>	SE1560	protease I	2.17	1.3

**Group (iii)****Up-regulated genes in the late-exponential growth phase in the wild type****Transport and cellular processes**

<i>pfoS/R</i>	SE1542	regulatory protein; putative phosphotransferase system	1.61	2.44
	SE1622	ABC transporter (ATP-binding protein)	1.41	3.45
	SE2021	amino acid transporter	1.2	2
	SE0662	type-1 signal peptidase 1B (protein and peptide secretion)	1.14	2.38
	SE1962	general stress protein 26	1.41	2.13
	SE0241	drug resistance transporter, EmrB/QacA subfamily	1.64	6.67
	SE0418	multidrug resistance protein	1.61	4.55

**Conserved hypothetical proteins**

	SE2367	conserved hypothetical protein	1.54	2.08
	SE1620	conserved hypothetical protein	1.25	2.08
	SE1621	membrane protein, putative	1.56	2.56

Gene	Locus <sup>a</sup>	Common name <sup>a,b</sup>	X times	
			induction	
			OD <sub>600</sub>	OD <sub>600</sub>
			1	4
Group (v)				
Up-regulated genes in the early- and late exponential growth phase in the <i>agr</i> mutant				
Transport of sugars and oligopeptides				
<i>pfoR/S</i>	SE2129	regulatory protein PfoR/S; putative phosphotransferase system	-9.64	-6.53
<i>pfoR</i>	SE2337	regulatory protein PfoR; putative phosphotransferase system	-10.27	-10.61
<i>oppB</i>	SE0680	oligopeptide transport system permease protein	-14.31	-4.85
<i>oppC</i>	SE0681	oligopeptide transport system permease protein	-13.69	-3.83
	SE0682	oligopeptide transport ATP-binding protein subunit	-8.4	-3.47
<i>oppF</i>	SE0683	oppF protein	-11.71	-3.01
<i>oppA</i>	SE0684	peptide binding protein OppA	-9.53	-2.76
	SE2320	lactococcal lipoprotein; lipoprotein, YaeC family	-19.12	-8.23
	SE2321	ABC transporter permease protein	-21.71	-10
	SE2322	ABC transporter ATP-binding protein	-19.01	-8.04
Amino acid biosynthesis and metabolism				
Degradation, transporter				
<i>azlC</i>	SE0009	amino acid permease	-7.25	-2.29
	SE0010	conserved hypothetical protein	-10.37	-2.27
	SE1079	putative alanine racemase	-2.14	-2.03
	SE1730	conserved hypothetical protein	-2.31	-2.56

<i>amiB</i>	SE1731	amidase	-2.76	-2.73
	SE1906	amino acid amidohydrolase; peptidase, M20/M25/M40 family	-6.18	-3.99
	SE2147	amino acid transporter	-16.94	-17.36
	SE2356	2-oxo-hepta-3-ene-1,7-dioate hydratase	-9.13	-10.97
Arginine family				
<i>argC</i>	SE1212	N-acetylglutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	-2.14	-2.4
<i>argD</i>	SE1209	ornithine aminotransferase; succinylornithine transaminase	-2.03	-2.45
Aspartate family				
	SE0011	homoserine-o-acetyltransferase	-3.74	-3.24
	SE1008	aspartate kinase-like protein	-2.28	-3.1
	SE1009	homoserine dehydrogenase	-9.28	-11.37
<i>thrC</i>	SE1010	threonine synthase	-16.76	-16.93
<i>thrB</i>	SE1011	homoserine kinase	-7.79	-6
	SE1012	hydrolase, haloacid dehalogenase-like family	-5.48	-8.66
<i>asd</i>	SE1074	aspartate semialdehyde dehydrogenase	-2.98	-2.24
<i>dapA</i>	SE1075	dihydrodipicolinate synthase	-2.87	-1.97
<i>dapB</i>	SE1076	dihydrodipicolinate reductase	-3.42	-2.05
	SE2323	trans-sulfuration enzyme family protein	-2.1	-4.43
	SE2379	cystathionine gamma-synthase	-6.63	-4.68
	SE2380	trans-sulfuration enzyme family protein	-8.53	-7.13
	SE2381	homocysteine S-methyltransferase	-9.28	-4.69

<i>metE</i>	SE2382	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	-7	-3.86
	SE2383	Putative cyclase superfamily	-6.75	-4.05
	SE0994	conserved hypothetical protein	-4.82	-3.07
	SE0995	Threonine aldolase	-4.55	-3.05
Glutamate synthesis				
<i>gltB</i>	SE2312	glutamate synthase large subunit	-18.54	-15.83
	SE2311	NADH-glutamate synthase small subunit	-18.62	-10.64
<i>argB</i>	SE1210	acetylglutamate kinase	-2.34	-2.9
Valine, Leucine and Isololeucine Biosynthesis				
<i>ilvD</i>	SE1654	dihydroxy-acid dehydratase	-8.12	-5.82
<i>ilvB</i>	SE1655	acetolactate synthase large subunit	-21.98	-14.55
<i>ilvC</i>	SE1657	alpha-keto-beta-hydroxylacil reductoisomerase	-39.13	-20.2
<i>leuA</i>	SE1658	2-isopropylmalate synthase	-17.72	-13.15
<i>leuB</i>	SE1659	3-isopropylmalate dehydrogenase	-28.88	-21.07
<i>leuC</i>	SE1660	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	-18.55	-10.93
<i>leuD</i>	SE1661	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	-30	-16.42
<i>ilvA</i>	SE1662	thereonine dehydratase	-23.52	-13.66
Histidine family				
	SE0270	ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit	-5.27	-10.86
<i>hisG</i>	SE0271	ATP phosphoribosyltransferase	-3.51	-17.97
<i>hisD</i>	SE0272	histidinol dehydrogenase	-4.9	-10.86
	SE0273	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	-2.85	-15.07
<i>hisH</i>	SE0274	imidazole glycerol phosphate synthase, glutamine amidotransferase subunit	-7.2	-9.05

	SE0275	phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase	-5.66	-10.86
<i>hisF</i>	SE0276	imidazoleglycerol phosphate synthase, cyclase subunit	-4.74	-8
<i>hisIE</i>	SE0277	histidine biosynthesis bifunctional protein	-3.97	-6.28
Aromatic amino acid family				
<i>trpF</i>	SE1048	anthranilate synthase component I	-15.45	-7.68
<i>trpD</i>	SE1049	anthranilate synthase component II	-7.11	-6.75
<i>trpE</i>	SE1050	anthranilate phosphoribosyltransferase	-6.03	-6.89
	SE1052	N-(5phosphoribosyl)anthranilate isomerase	-9.74	-7.05
<i>trpB</i>	SE1053	tryptophan synthase beta chain	-9.34	-11.12
<i>trpA</i>	SE1054	tryptophan synthase alpha chain	-6.29	-3.54
	SE1055	ThiJ/PfpI family protein	-4.31	-3.28
<i>tyrA/</i>	SE1410	chorismate mutase/prephenate dehydratase	-3.22	-4.73
<i>pheA</i>				
Other amino acid families				
<i>serA</i>	SE1401	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-6.55	-3.21
<i>cysK</i>	SE2270	cysteine synthase A	-2.11	-3.56
<i>cysK</i>	SE2324	cysteine synthase	-2.65	-4.88
<b>Sulfur metabolism</b>				
<i>cysC</i>	SE2174	Adenylylsulfate kinase	-2.53	-9.74
<i>sat</i>	SE2175	sulfate adenylyltransferase	-2.44	-9.25
	SE2176	Predicted permeases	-2.17	-7.42
<i>cysI</i>	SE2179	sulfite reductase (NADPH) hemoprotein beta- component	-2.63	-6.29

<i>cysJ</i>	SE2180	sulfite reductase (NADPH) flavoprotein	-3.15	-7.15
<i>cysH</i>	SE2181	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	-4.56	-8.26
<b>Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers</b>				
<i>panE</i>	SE2009	2-dehydropantoate 2-reductase	-3.46	-3.65
	SE2089	gamma-glutamyltranspeptidase, putative	-2.47	-2.66
	SE2177	precorrin-2 oxidase	-2.84	-8.55
<i>cobA</i>	SE2178	uroporphyrin-III C-methyltransferase	-2.72	-7.5
<b>Central metabolism</b>				
	SA0235 <sup>c</sup>	hexitol dehydrogenase	-8.94	-13.29
	SE2121	D-specific D-2-hydroxyacid dehydrogenase Ddh	-5.28	-5.17
<b>Protein synthesis</b>				
	SE0534	ribosomal subunit interface protein	-3.45	-4.62
<b>Genes involved in the pathogenicity of <i>S. epidermidis</i></b>				
<i>lip</i>	SE0245	triacylglycerol lipase precursor	-5.65	-2.06
<b>Conserved hypothetical proteins</b>				
	SA0077 <sup>c</sup>	hypothetical protein, similar to serine/threonine protein kinase	-5.17	-3.24
	SE0505	conserved hypothetical protein	-2.11	-2.27
	SE0734	conserved hypothetical protein	-8.77	-6.36
	SE1904	conserved hypothetical protein	-2.26	-2
	SE0729	conserved hypothetical protein	-7.02	-6.57

**Enzymes of unknown specificity**

	SE0736	LysE/YggA family protein	-6.69	-5.51
<i>aspC</i>	SE1400	aminotransferase, class V	-8.3	-3.54
<i>ydaD</i>	SE1905	general stress protein 39	-2.71	-2.74
	SE2077	N-acetyltransferase	-1.95	-2.54
<i>aspB-4</i>	SE2122	aminotransferase, class I	-4.09	-5.13
<i>goaG</i>	SE2148	aminotransferase, class-III	-6.75	-13.48
	SE2435 <sup>b</sup>	metallo-beta-lactamase family protein	-27.14	-17.44

**Group (vi)****Up-regulated genes in the early-exponential growth phase in the *agr* mutant****Amino acid biosynthesis and metabolism**

<i>ilvE</i>	SE0318	Branched-chain amino acid aminotransferase-like protein	-2.58	-1.53
<i>hisC</i>	SE0504	putative histidinol-phosphate aminotransferase	-3.2	-1.81
<i>tyrA</i>	SE1047	prephenate dehydrogenase	-4.03	-1.88
	SE2066	membrane protein, putative	-2.24	-1.65
<i>pgsC</i>	SE2092	poly-gamma-glutamate synthesis protein	-2.11	-1.6
<i>pgsB</i>	SE2093	poly-gamma-glutamate synthesis protein	-3.23	-1.76
	SE2104	membrane protein, putative	-2.09	-1.25

**Cellular processes: Toxin production and resistance**

<i>fofB</i>	SE0231	fosfomycin resistance protein	-6.36	-1.71
-------------	--------	-------------------------------	-------	-------

**Protein fate: Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides**

	SE1078	hippurate hydrolase	-2.46	-1.6
--	--------	---------------------	-------	------

**Central intermediary metabolism**

SE2210	indole-3-pyruvate decarboxylase	-2.6	-1.35
--------	---------------------------------	------	-------

**Conserved hypothetical proteins**

SE1402	haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative	-2.3	-1.82
--------	--	------	-------

**Group (vii)****Up-regulated genes in the late exponential growth phase in the *agr* mutant****Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers**

<i>bioD</i>	SE0179	dethiobiotin synthetase	-1.03	-5.7
<i>bioF-1</i>	SE0181	8-amino-7-oxononanoate synthase; aminotransferase, class II	-1.24	-3.79
	SE0182	6-carboxyhexanoate--CoA ligase	-1.22	-2.06

**Transporter surface proteins**

	SE1939	ABC transporter (ATP-binding protein)	-1.02	-2.01
	SE1993	ABC transporter (amino acid-binding protein)	-1.13	-3.24

---



Abbildung A1: Der zeitliche Verlauf der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 678 in TSB Medium, bei 37°C. Die Bilder wurden in Intervallen von 15 min. mit einem konfokalem Lasermikroskop aufgenommen, von denen hier jedoch nur jedes fünfte Bild dargestellt werden kann.

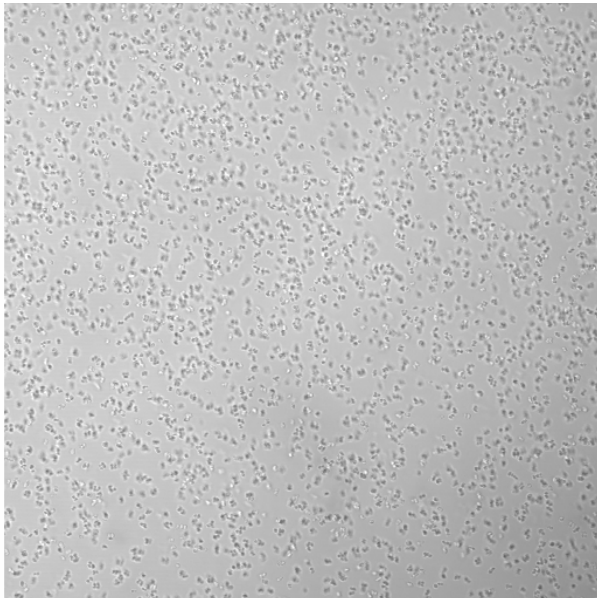
0 h



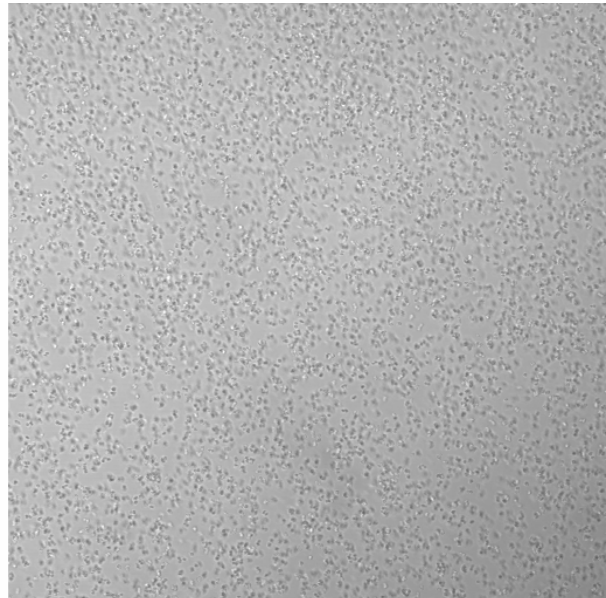
1 h 15 min



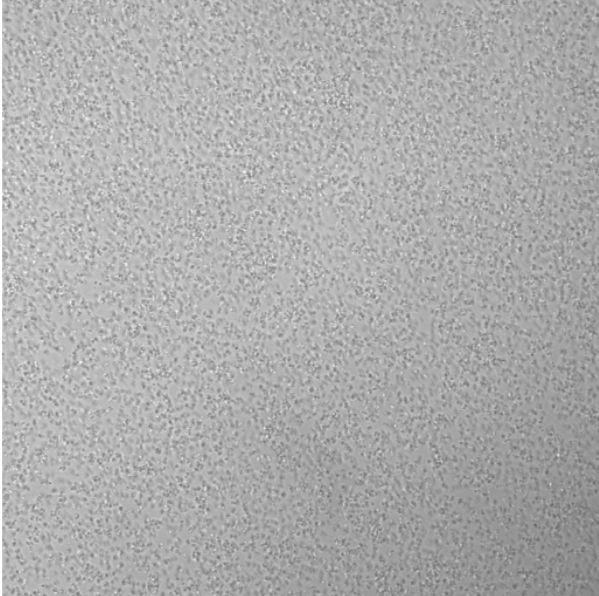
2 h 30 min



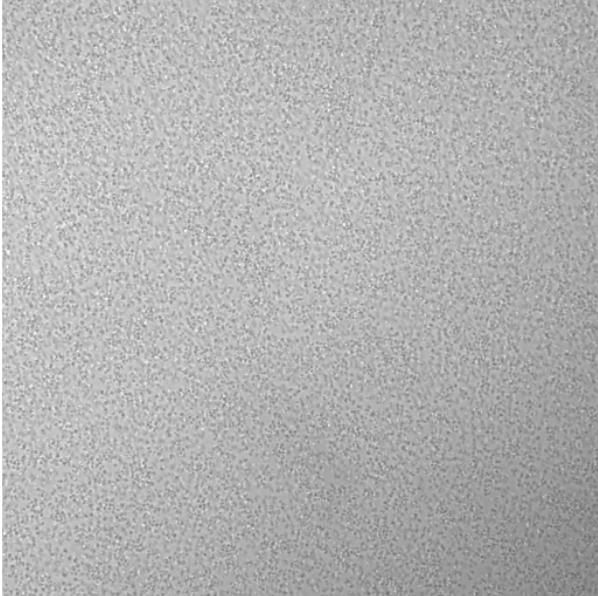
3 h 45 min



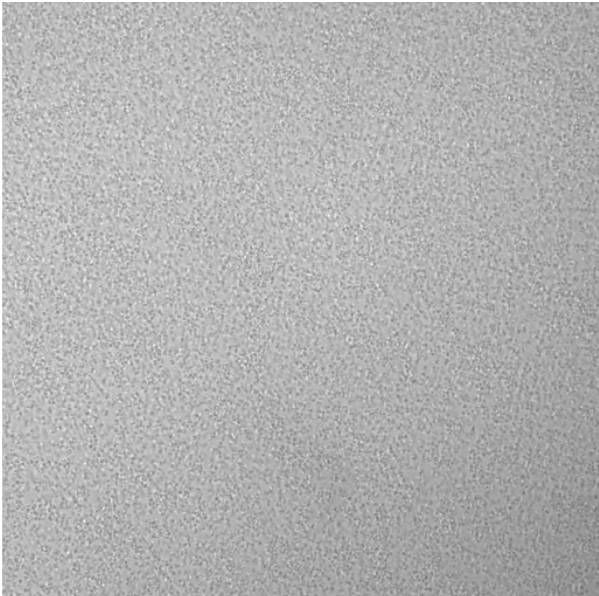
5 h



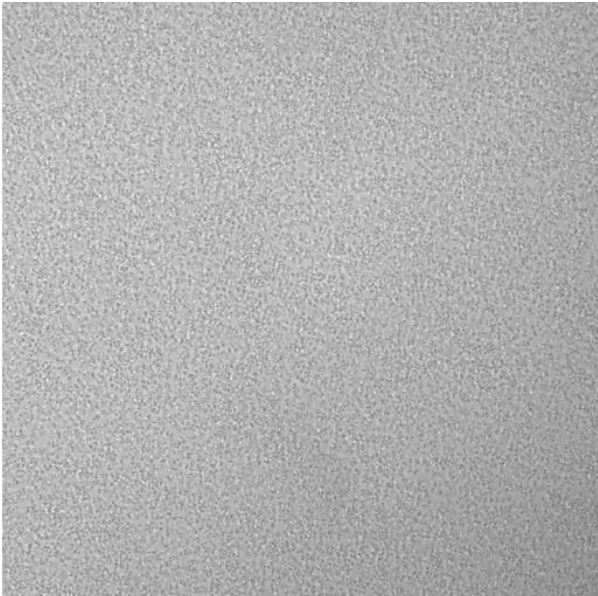
6 h 15 min



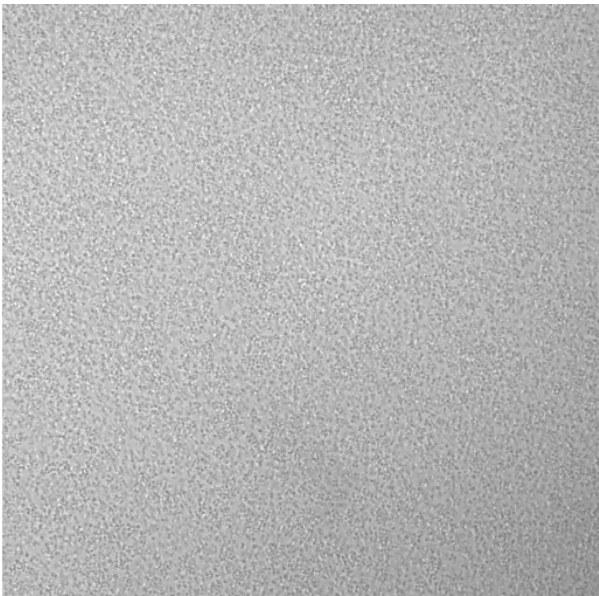
7 h 30 min



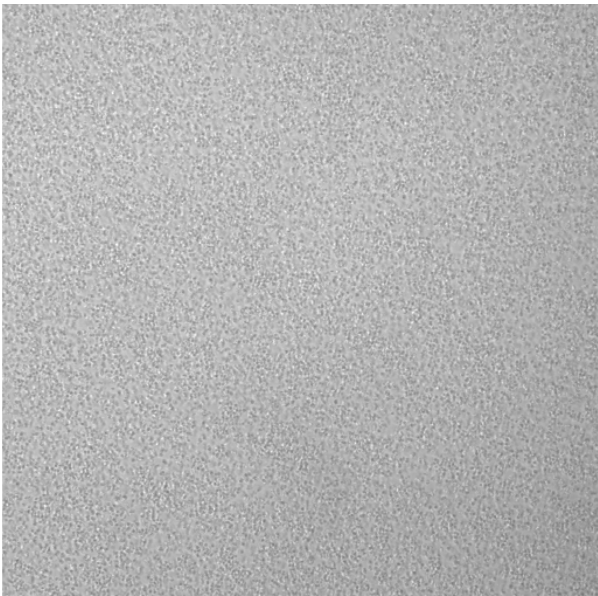
8 h 45 min



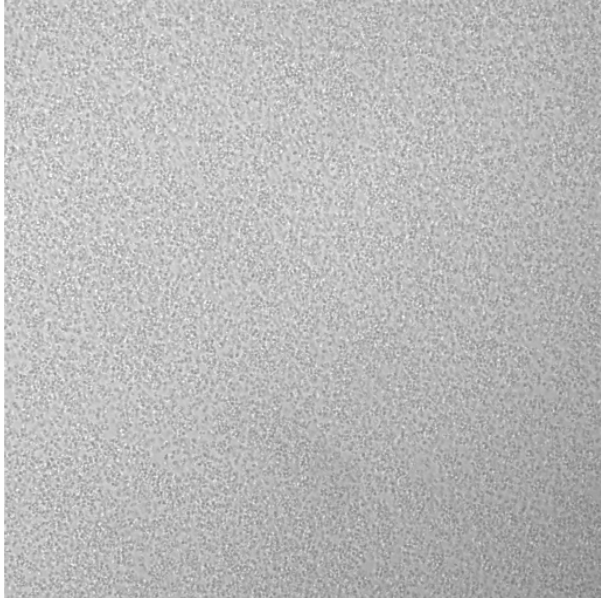
10 h



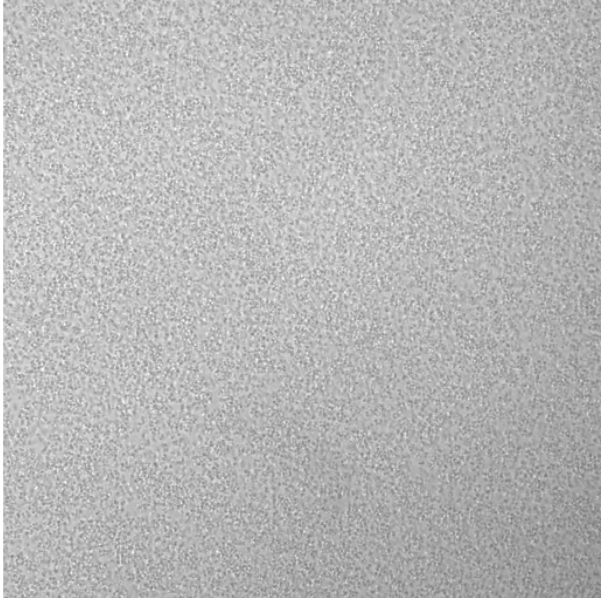
11 h 15 min



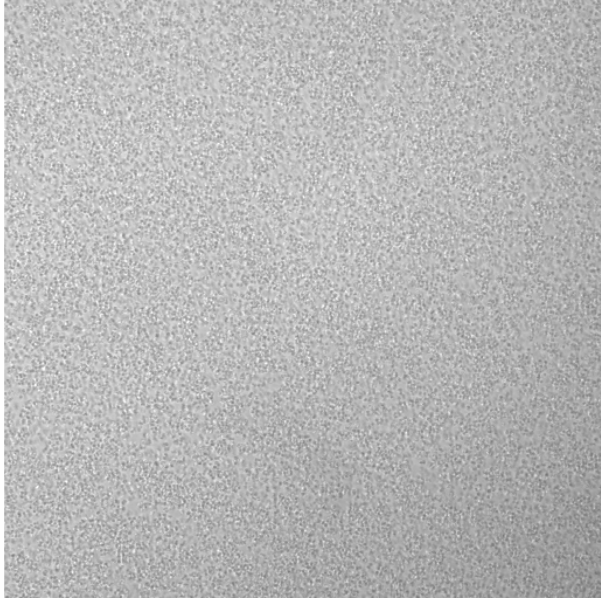
12 h 30 min



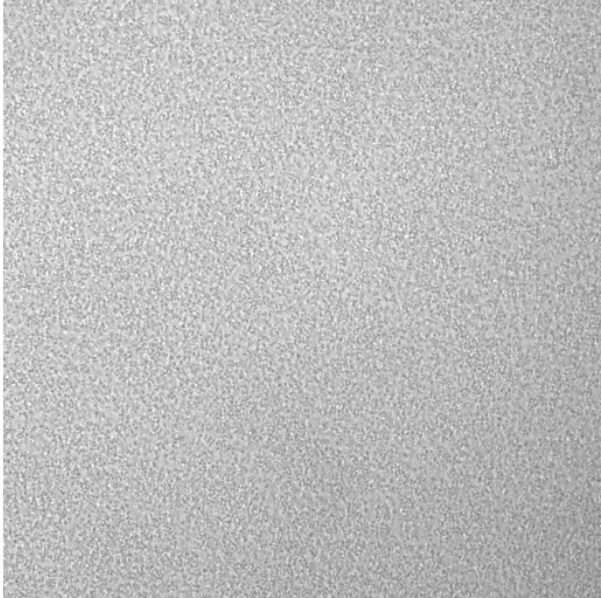
13 h 45 min



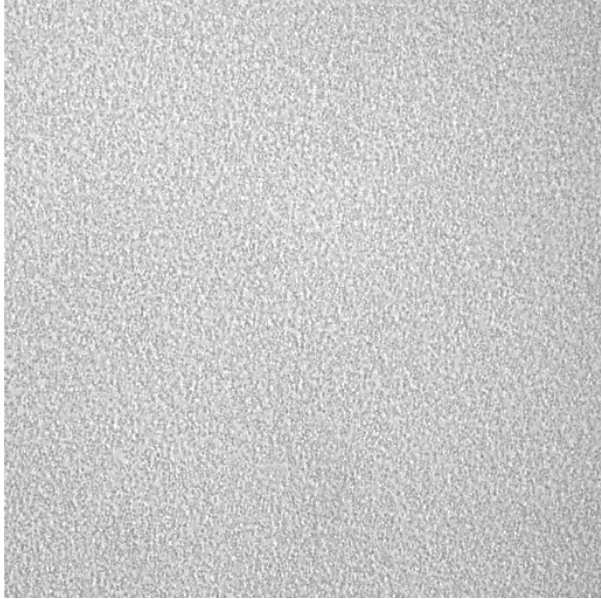
15 h



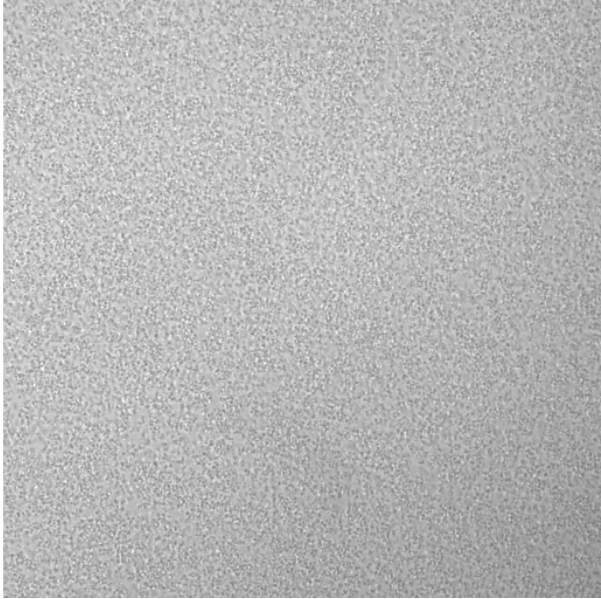
16 h 15 min



17 h 30 min



18 h 45 min



<b>Id</b>	<b>Name</b>	<b>Mean (Stats)</b>	<b>SD (Stats)</b>	<b>One Sample t-Test</b>
<b>Regulatoren</b>				
SERP2292	intercellular adhesion regulator (icaR)	3.672	0.086	0.007583
SERP2096	perfringolysin O regulator protein	2.336	0.096	0.021880
<b>Stressproteine</b>				
SERP1273	universal stress protein family	2.330	0.045	0.004938
<b>Ribosomale Proteine</b>				
SERP0139	ribosomal Protein L25 (rplY)	1.754	0.068	0.024910
SERP0181	ribosomal protein L7-L12 (rplL)	1.745	0.064	0.022616
SERP1822	ribosomal protein S17 (rpsQ)	1.791	0.054	0.014680
SERP1823	ribosomal protein L29 (rpmC)	1.809	0.068	0.022200
<b>t-RNA Synthetasen</b>				
SERP2545	seryl-tRNA synthetase (serS) [6.1.1.11]	2.615	0.009	0.000147
<b>Zelluläre Prozesse:</b>				
SERP0059	alkyl hydroperoxide reductase	1.887	0.063	0.016854
<b>Transporter</b>				
SERP0016	ABC transporter	1.797	0.071	0.025273
SERP0960	phosphate ABC transporter	1.667	0.134	0.102831
SERP0290	ABC transporter	2.310	0.059	0.008787
SERP0291	ABC transporter	1.754	0.098	0.049366
SERP0292	ABC transporter	1.817	0.070	0.023278
SERP1951	ABC transporter	2.514	0.119	0.028251
SERP1952	ABC transporter	4.692	0.044	0.029561
SERP2101	ribose transport protein	1.954	0.073	0.020252
SERP2371	peptide ABC transporter	2.154	0.044	0.005870
<b>Energiestoffwechsel</b>				
SERP0389	alcohol dehydrogenase	2.552	0.090	0.016081
SERP0442	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gapA-1) [1.2.1.12]	1.765	0.054	0.015488
SERP0443	phosphoglycerate kinase (pgk) [2.7.2.3]	1.665	0.077	0.038273
SERP0682	pyruvate dehydrogenase complex E2 component	2.074	0.073	0.017391
SERP1275	acetate kinase (ackA) [2.7.2.1]	1.905	0.036	0.005484
SERP1760	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	1.796	0.086	0.035773
SERP1793	tagatose-6-phosphate kinase (lacC) [2.7.1.144]	1.768	0.061	0.019811
SERP2095	L-serine dehydratase	2.186	0.102	0.028545
SERP2257	acetoin reductase	2.118	0.052	0.008289
SERP2312	malate:quinone oxidoreductase (mqo-3) [1.1.99.16]	3.550	0.145	0.022518
SERP2365	pyruvate formate-lyase-activating enzyme (pflA) [1.97.1.4]	3.369	0.065	0.005063
SERP2366	formate acetyltransferase (pflB) [2.3.1.54]	3.195	0.091	0.010637
<b>Energiestoffwechsel: Nitratatmung</b>				
SERP1978	nitroreductase family protein	2.102	0.089	0.024212
SERP1985	respiratory nitrate reductase	2.186	0.071	0.014325
SERP1986	respiratory nitrate reductase	2.033	0.065	0.014513
SERP1987	respiratory nitrate reductase	2.308	0.094	0.021435
SERP1988	uroporphyrinogen-III methylase SirB	1.870	0.034	0.005132
SERP1989	nitrite reductase [NAD(P)H]	1.789	0.060	0.018377

---

SERP1990	nitrite reductase [NAD(P)H]	2.011	0.072	0.018294
<b>Energie- Lipidstoffwechsel</b>				
SERP2345	dihydroxyacetone kinase family protein	1.982	0.097	0.033530
SERP2346	glycerol dehydrogenase (gldA) [1.1.1.6]	1.864	0.088	0.033638
<b>Harnstoffzyklus und Metabolismus von Aminogruppen</b>				
SERP2351	ornithine carbamoyltransferase (arcB-2) [2.1.3.3]	3.226	0.054	0.003747
SERP2352	carbamate kinase (arcC) [2.7.2.2]	3.077	0.053	0.003856
SERP2353	membrane protein	1.754	0.057	0.017929
<b>Purin Ribonukleotid Biosynthese</b>				
SERP2536	adenylosuccinate synthetase (purA) [6.3.4.4]	1.966	0.021	0.001706
<b>Biosynthese von Cofaktoren und prosthetischen Gruppen</b>				
SERP0158	pyridoxine biosynthesis protein	1.963	0.094	0.032650
SERP2382	ApbE family protein	2.839	0.065	0.006734
<b>Aminosäure Biosynthese und Sulfatmetabolismus</b>				
SERP0095	trans-sulfuration enzyme family protein	2.259	0.079	0.016127
<b>Konservierte hypothetische Gene</b>				
SERP0159	conserved hypothetical protein	2.125	0.039	0.004728
SERP0270	conserved hypothetical protein	1.914	0.041	0.007031

---

<b>Id</b>	<b>Name</b>	<b>Mean (Stats)</b>	<b>SD (Stats)</b>	<b>One Sample t-Test</b>
<b>Regulatoren</b>				
SERP0110	transcriptional regulator, LysR family	0.478	0.031	0.003123
SERP1679	anti-anti-sigma factor RsbV (rsbV)	0.568	0.087	0.039696
SERP2059	gluconate operon transcriptional repressor (gntR)	0.338	0.197	0.183011
<b>PIA - Biofim Synthese</b>				
SERP2293	intercellular adhesion protein A (icaA)	0.393	0.058	0.006782
SERP2294	intercellular adhesion protein D (icaD)	0.379	0.025	0.001185
SERP2295	intercellular adhesion protein B (icaB)	0.333	0.043	0.002679
SERP2296	intercellular adhesion protein C (icaC)	0.413	0.026	0.001548
<b>Zelluläre Prozesse: Pathogenität, Toxin Produktion und Resistenz</b>				
SERP0641	fnt protein	0.466	0.032	0.003082
SERP1422	DNA-binding response regulator VraR (vraR)	0.483	0.016	0.000895
SERP1423	sensor histidine kinase VraS (vraS)	0.461	0.022	0.001473
SERP1886	sugE protein (sugE-1)	0.534	0.071	0.021988
SERP1920	abortive infection family protein	0.530	0.050	0.010794
SERP1947	tcaB protein (tcaB)	0.513	0.023	0.002023
SERP2120	secretory antigen precursor SsaA-related protein	0.442	0.089	0.020320
SERP2435	metallo-beta-lactamase family protein	0.243	0.067	0.049107
SERP2519	methicillin-resistance regulatory protein Mecl (mecl)	0.407	0.068	0.010101
SERP2520	methicillin-resistance regulatory protein MecR1 (mecR1)	0.430	0.078	0.014697
SERP2390	cysteine protease precursor SspB (sspB)	0.481	0.037	0.004598
<b>Protein und Peptid Sekretion</b>				
SERP1226	type III leader peptidase family protein	0.531	0.066	0.018380
SERP1287	aminotransferase	0.548	0.041	0.008047
<b>Zelluläre Prozesse: Anpassung an atypische Verhältnisse</b>				
SERP0466	cold shock protein (beta-ribbon, CspA family)	0.396	0.044	0.003941
<b>Zelluläre Prozesse Detoxifikation</b>				
SERP2194	glutathione peroxidase (gpxA-2) [1.11.1.9]	0.407	0.111	0.025912
<b>Protein Modifikation und Reparatur</b>				
SERP2337	4-phosphopantetheinyl transferase family protein	0.518	0.109	0.045346
<b>Transkription: Degradation von RNA</b>				
SERP0135	endoribonuclease L-PSP	0.495	0.108	0.039423
<b>Zelluläre Prozesse: DNA Transformation</b>				
SERP0417	comF operon protein 1	0.505	0.118	0.174599
SERP0578	negative regulator of competence MecA	0.560	0.096	0.045626
SERP0815	DNA processing protein DprA	0.526	0.062	0.016171
SERP1109	competence protein ComGA	0.583	0.076	0.032898
<b>Zelluläre Prozesse: Mobiles DNA Element mit extrachromosomaler Funktion</b>				
SERP2458	CRISPR-associated protein	0.481		
<b>Transporter</b>				
SERP0068	xanthine permease (pbuX)	0.562	0.062	0.019677
SERP0315	ABC transporter	0.497	0.018	0.001221
SERP0689	spermidine-putrescine ABC transporter	0.514	0.036	0.005189
SERP1909	PTS system	0.296	0.077	0.006947
SERP2038	ABC transporter	0.487	0.088	0.025204

SERP2217	cytosine-purines, uracil, thiamine, allantoin permease family protein	0.399		
SERP2289	transporter, unbekanntes Substrat	0.460	0.088	0.022130
<b>Eisentransporter</b>				
SERP0306	iron compound ABC transporter	0.412	0.054	0.006533
SERP0465	cation efflux family protein Eisentransporter	0.311	0.156	0.030100
SERP2131	cation-transporting ATPase	0.464	0.026	0.002030
SERP2132	heavy metal-binding protein	0.461	0.021	0.001263
<b>Aminosäure und Oligopeptid Transporter</b>				
SERP0570	oligopeptide ABC transporter	0.421	0.108	0.026484
SERP0571	oligopeptide ABC transporter	0.482	0.055	0.009933
SERP0573	oligopeptide ABC transporter	0.476	0.022	0.001513
SERP0574	oligopeptide ABC transporter	0.489	0.031	0.003248
SERP0576	glutaredoxin	0.425	0.044	0.004707
SERP2142	amino acid permease family protein	0.567	0.135	0.087420
<b>Energiestoffwechsel</b>				
SERP0216	hexulose-6-phosphate synthase	0.366	0.102	0.017777
SERP0217	SIS domain protein	0.476	0.132	0.051649
SERP0218	hydrolase	0.582	0.108	0.063679
SERP0220	acetyl-CoA acetyltransferase	0.443	0.063	0.010487
SERP1390	glucosamine-6-phosphate isomerase family protein	0.436	0.080	0.015892
SERP1729	aldehyde dehydrogenase	0.410	0.186	0.069055
SERP1786	alcohol dehydrogenase	0.526	0.167	0.101917
SERP2012	glycerate kinase 2 (gark) [2.7.1.31]	0.543	0.047	0.010398
SERP2084	aldehyde dehydrogenase (aldA-2) [1.2.1.3]	0.581	0.143	0.104456
SERP2195	alpha keto acid dehydrogenase complex	0.318	0.123	0.019776
<b>Energiestoffwechsel Fettsäure und Phospholipid Degradation</b>				
SERP0449	carboxylesterase (est) [3.1.1.1]	0.404	0.154	0.047659
<b>Energiestoffwechsel Aminosäuren und Amine</b>				
SERP1324	proline dehydrogenase (putA) [1.5.99.8]	0.496	0.090	0.028095
<b>Zentraler Intermediary Metabolismus</b>				
SERP2133	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family protein	0.424	0.073	0.012483
SERP2192	phosphoadenylyl-sulfate reductase (cysH) [1.8.4.8]	0.407	0.103	0.022549
<b>Pyrimidin Metabolismus</b>				
SERP0120	thymidylate kinase (tmk) [2.7.4.9]	0.538	0.096	0.040034
<b>Aminosäure Biosynthese Aspartat Familie</b>				
SERP0964	aspartate-semialdehyde dehydrogenase (asd) [1.2.1.11]	0.429	0.063	0.009498
SERP0965	dihydrodipicolinate synthase (dapA) [4.2.1.52]	0.535	0.061	0.016322
SERP0996	carboxyl-terminal protease [3.4.21.-]	0.535	0.049	0.010872
<b>Aminosäure Biosynthese Tryptophan Familie</b>				
SERP2242	indole-3-pyruvate decarboxylase (ipdC) [4.1.1.74]	0.334	0.128	0.023325
<b>Biosynthese von Cofaktoren und prosthetischen Gruppen</b>				
SERP2393	6-carboxyhexanoate--CoA ligase (bioW) [6.2.1.14]	0.405	0.166	0.185029
SERP2394	aminotransferase	0.399		
<b>Gene/Proteine mit unbekannter Funktion oder Spezifität</b>				
SERP0100	LysM domain protein	0.515	0.034	0.004630
SERP0273	hydrolase	0.317	0.090	0.010684
SERP0318	LysM domain protein	0.436	0.068	0.011768

---

SERP0362	oxidoreductase Aldoketo Reductase	0.376	0.192	0.061899
SERP0480	OsmC-Ohr family protein	0.374	0.104	0.019281
SERP0507	CBS domain protein	0.303	0.079	0.007627
SERP0944	ThiJ-Pfpl family protein	0.330	0.123	0.020975
SERP1350	oxidoreductase Aldoketo Reductase	0.600	0.127	0.093648
SERP1413	ThiJ-Pfpl family protein	0.474	0.102	0.031442
SERP1917	oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family	0.415	0.088	0.017390
SERP2082	acetyltransferase	0.559	0.083	0.034536
SERP2129	oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family	0.438	0.097	0.023463
SERP2505	RadC domain protein	0.353	0.130	0.026299
<b>Konservierte hypothetische Gene</b>				
SERP0065	conserved hypothetical protein	0.365	0.103	0.017916
SERP0066	conserved hypothetical protein	0.496	0.089	0.027274
SERP0221	conserved hypothetical protein	0.240	0.029	0.000706
SERP0224	conserved hypothetical protein	0.377	0.085	0.013112
SERP0280	conserved hypothetical protein	0.191	0.132	0.011087
SERP0294	conserved hypothetical protein	0.515	0.044	0.007768
SERP0336	conserved hypothetical protein	0.579	0.112	0.067201
SERP0337	conserved hypothetical protein	0.422	0.118	0.031595
SERP0467	conserved hypothetical protein	0.511	0.123	0.054567
SERP0469	conserved hypothetical protein	0.321	0.091	0.011096
SERP0474	conserved hypothetical protein	0.218	0.104	0.008153
SERP0475	conserved hypothetical protein	0.202	0.095	0.006247
SERP0495	conserved hypothetical protein	0.417	0.074	0.012337
SERP0617	conserved hypothetical protein	0.385	0.061	0.007047
SERP0858	conserved hypothetical protein	0.546	0.115	0.058741
SERP1017	conserved hypothetical protein	0.515	0.074	0.021184
SERP1104	conserved hypothetical protein	0.350	0.563	0.457469
SERP1299	conserved hypothetical protein	0.529	0.144	0.079258
SERP1311	conserved hypothetical protein	0.359	0.120	0.023518
SERP1424	conserved hypothetical protein	0.401	0.014	0.000405
SERP1425	conserved hypothetical protein	0.365	0.045	0.003480
SERP1749	conserved hypothetical protein	0.561	0.096	0.045305
SERP1754	conserved hypothetical protein	0.382	0.126	0.029115
SERP1772	conserved hypothetical protein	0.427	0.146	0.048022
SERP1784	conserved hypothetical protein	0.500	0.186	0.107475
SERP2066	conserved hypothetical protein	0.497	0.053	0.010039
SERP2209	conserved domain protein	0.592	0.108	0.067173

---



<b>Id</b>	<b>Name</b>	<b>Mean (Stats)</b>	<b>SD (Stats)</b>	<b>One Sample t-Test</b>
<b>Regulatoren</b>				
SERP0365	DNA-binding response regulator SaeR (saeR)	6.130	0.392	0.215616
SERP0821	transcriptional regulator CodY (codY)	13.356	0.922	0.334049
SERP1296	catabolite control protein A (ccpA)	2.954	0.132	0.124495
SERP1419	phosphotyrosine protein phosphatase [3.1.3.48]	2.268	0.046	0.058195
SERP1755	transcriptional regulator CzrA (czrA)	9.378	0.742	0.314915
SERP1876	Staphylococcal accessory regulator R (sarR)	8.812	0.505	0.230110
SERP1893	transcriptional regulator	2.987	0.202	0.186293
SERP1901	phosphosugar-binding transcriptional regulator	4.497	0.065	0.044456
SERP2533	sensory box histidine kinase YycG (yycG)	3.502	0.131	0.107197
<b>Zelluläre Prozesse: Pathogenität, Toxin Produktion und Resistenz</b>				
SERP0131	dimethyladenosine transferase (ksgA) [2.1.1.-]	3.509	0.115	0.094093
SERP0636	bifunctional autolysin (atlE) [3.5.1.28]	2.733	0.104	0.105953
SERP0676	metallo-beta-lactamase family protein	3.143	0.068	0.061253
SERP0946	femA protein (femA)	5.361	0.528	0.301311
SERP1054	sensor histidine kinase SrrB (srrB)	8.835	0.268	0.125987
SERP1055	DNA-binding response regulator SrrA (srrA)	4.439	0.220	0.150396
SERP1493	accessory gene regulator protein A (agrA)	5.586	0.311	0.182075
SERP1920	abortive infection family protein	5.781	0.462	0.258082
SERP2136	secretory antigen precursor SsaA	5.561	0.188	0.112287
<b>Zelluläre Prozesse: Anpassung an atypische Verhältnisse</b>				
SERP0586	GTP pyrophosphokinase (relA-1) [2.7.6.5]	3.505	0.101	0.083202
SERP1196	GTP pyrophosphokinase (relA-2) [2.7.6.5]	13.939	1.173	0.399284
<b>Zelluläre Prozesse: Detoxifikation</b>				
SERP0059	alkyl hydroperoxide reductase	3.296	0.101	0.087331
<b>Transkription</b>				
SERP0183	DNA-directed RNA polymerase	2.448	0.016	0.019049
SERP0184	DNA-directed RNA polymerase	3.658	0.137	0.108155
SERP1085	N utilization substance protein B (nusB)	3.220	0.128	0.112397
SERP1174	transcription elongation factor GreA (greA)	24.958	0.240	0.076900
SERP1805	DNA-directed RNA polymerase	2.508	0.046	0.051247
<b>Proteinsynthese: Translation</b>				
SERP0188	translation elongation factor G (fusA)	4.528	0.074	0.050816
SERP0609	peptide chain release factor 3 (prfC)	6.951	0.612	0.302131
SERP0826	ribosome recycling factor (frr)	12.134	0.750	0.289570
SERP0836	translation initiation factor IF-2 (infB)	4.009	0.318	0.227269
SERP1093	translation elongation factor P (efp)	4.123	0.181	0.130597
SERP1312	pseudouridine synthase	10.209	0.198	0.087591
SERP1809	translation initiation factor IF-1 (infA)	2.960	0.015	0.014256
<b>Ribosomale Proteine</b>				
SERP0001	ribosomal protein L34 (rpmH)	2.573	0.124	0.134399
SERP0044	ribosomal protein S6 (rpsF)	3.054	0.014	0.012700
SERP0178	ribosomal protein L11 (rplK)	2.945	0.001	0.000828
SERP0180	ribosomal protein L10 (rplJ)	5.025	0.042	0.026751
SERP0185	30S ribosomal protein L7Ae	3.108	0.018	0.016201
SERP0186	ribosomal protein S12 (rpsL)	4.007	0.054	0.040479
SERP0187	ribosomal protein S7 (rpsG)	3.881	0.038	0.029264
SERP0840	ribosomal protein S15 (rpsO)	5.578	0.118	0.070919

SERP1153	ribosomal protein S20 (rpsT)	3.993	0.361	0.255687
SERP1211	ribosomal protein L21 (rplU)	3.672	0.065	0.051321
SERP1284	ribosomal protein S4 (rpsD)	17.537	0.038	0.013708
SERP1804	ribosomal protein L17 (rplQ)	2.892	0.057	0.055591
SERP1806	ribosomal protein S11 (rpsK)	2.504	0.003	0.003640
SERP1807	ribosomal protein S13-S18 (rpsM)	2.355	0.002	0.001970
SERP1812	ribosomal protein L15 (rplO)	3.443	0.021	0.017330
SERP1814	ribosomal protein S5 (rpsE)	5.701	0.056	0.033284
SERP1815	ribosomal protein L18 (rplR)	5.209	0.003	0.001606
SERP1816	ribosomal protein L6 (rplF)	5.694	0.075	0.044528
SERP1817	ribosomal protein S8 (rpsH)	8.820	0.002	0.000824
SERP1818	ribosomal protein S14 (rpsN-2)	5.951	0.028	0.016518
SERP1819	ribosomal protein L5 (rplE)	5.966	0.080	0.046212
SERP1822	ribosomal protein S17 (rpsQ)	5.657	0.034	0.020476
SERP1823	ribosomal protein L29 (rpmC)	5.236	0.058	0.036475
SERP1824	ribosomal protein L16 (rplP)	6.137	0.047	0.026941
SERP1825	ribosomal protein S3 (rpsC)	6.050	0.025	0.014513
SERP1826	ribosomal protein L22 (rplV)	4.784	0.116	0.076624
SERP1827	ribosomal protein S19 (rpsS)	5.222	0.023	0.014482
SERP1828	ribosomal protein L2 (rplB)	6.218	0.085	0.048168
SERP1829	ribosomal protein L23 (rplW)	7.121	0.070	0.037060
SERP1830	ribosomal protein L4 (rplD)	6.937	0.047	0.025014
SERP1831	ribosomal protein L3 (rplC)	8.418	0.087	0.042412
SERP1832	ribosomal protein S10 (rpsJ)	5.988	0.138	0.079360
SERP2538	ribosomal protein L9 (rplI)	3.256	0.223	0.189853
<b>Proteinsynthese: tRNA Aminoacylation</b>				
SERP1437	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase	6.649	0.547	0.279849
SERP1438	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase	6.620	0.130	0.070865
SERP1439	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase	7.910	0.351	0.171854
<b>Proteinfaltung und Stabilisierung</b>				
SERP1239	trigger factor (tig) [5.2.1.8]	7.352	0.153	0.079159
<b>Proteindegradation</b>				
SERP0611	serine protease	5.596	0.165	0.098401
SERP0829	membrane-associated zinc metalloprotease	10.477	0.342	0.148364
SERP1310	dipeptidase family protein	19.764	1.089	0.341396
SERP1740	amidohydrolase family protein	3.579	0.249	0.196055
<b>Protein-Sekretion</b>				
SERP0176	preprotein translocase	4.456	0.051	0.035039
SERP1376	protein export protein PrsA	4.398	0.056	0.038800
SERP1811	preprotein translocase	3.057	0.044	0.040877
<b>DNA Metabolismus: Replikation, Rekombination und Reparatur</b>				
SERP0045	single-stranded DNA-binding protein (ssb)	4.409	0.040	0.027943
SERP0114	DNA polymerase III	9.764	0.403	0.178498
SERP0116	recombination protein RecR (recR)	2.828	0.103	0.101745
SERP0816	DNA topoisomerase I (topA) [5.99.1.2]	3.100	0.222	0.197167
SERP0863	DNA mismatch repair protein HexA (hexA)	11.250	0.278	0.117507
SERP0925	DNA topoisomerase IV	4.813	0.111	0.072989
SERP0926	DNA topoisomerase IV	2.518	0.008	0.009496
SERP1019	recombination protein U (recU)	3.270	0.076	0.066147
SERP1080	DNA repair protein RecN (recN)	2.580	0.056	0.061406

SERP1199	single-stranded-DNA-specific exonuclease RecJ (recJ) [3.1.-.-]	3.418	0.300	0.240870
SERP1205	Holliday junction DNA helicase RuvB (ruvB)	2.918	0.207	0.194519
SERP1241	MutT-nudix family protein	13.685	0.550	0.209932
SERP2053	MutT-nudix family protein	4.054	0.066	0.048605
<b>DNA Metabolismus: Degradation</b>				
SERP1012	5'-3' exonuclease	2.715	0.072	0.074119
SERP1084	exodeoxyribonuclease VII	3.635	0.177	0.140064
<b>DNA Metabolismus: Chromosomen-Assoziierte Proteine</b>				
SERP1041	DNA-binding protein HU (hup)	3.369	0.092	0.078090
<b>Zelluläre Prozesse: Zellteilung</b>				
SERP0150	cell division protein FtsH	3.618	0.087	0.070163
SERP0750	cell division protein FtsA (ftsA)	4.031	0.049	0.036065
SERP0751	cell division protein FtsZ (ftsZ)	3.351	0.158	0.133115
SERP0800	chromosome segregation SMC protein	3.252	0.297	0.247614
SERP1301	FtsK-SpoIIIE family protein	11.902	0.447	0.182032
<b>Zellhülle: Biosynthese und Degradation des Mureinsacculus and des Peptidoglycans</b>				
SERP0299	teichoic acid biosynthesis protein X	7.250	0.383	0.194389
SERP0993	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl- (pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase (murG) [2.4.1.-]	2.117	0.025	0.034454
SERP1430	Mur ligase family protein	4.913	0.374	0.232534
SERP1690	D-alanine--D-alanine ligase [6.3.2.4]	8.505	0.162	0.078273
SERP2026	holin-like protein LrgA (lrgA)	14.864	0.128	0.049007
SERP2027	lrgB protein (lrgB)	23.053	0.009	0.003012
<b>Zellhülle: Biosynthese und Degradation der Polysaccharide und Lipopolysaccharide Hülle</b>				
SERP0520	D-alanyl carrier protein (dltC)	3.277	0.221	0.187290
SERP0521	dltD protein (dltD)	13.305	0.055	0.022193
SERP1330	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	6.746	0.614	0.307045
<b>Zellhülle: Proteine</b>				
SERP0602	membrane protein	4.334	0.011	0.007709
SERP2138	immunodominant antigen A	3.691	0.166	0.129608
SERP2540	membrane protein	3.418	0.261	0.211843
<b>Transporter</b>				
SERP0063	sodium:dicarboxylate symporter family protein	2.291	0.045	0.055623
SERP0068	xanthine permease (pbuX)	11.961	0.595	0.236901
SERP0092	sodium-dependent transporter	3.393	0.275	0.223994
SERP0314	ABC transporter	3.018	0.091	0.084885
SERP0383	ABC transporter	4.396	0.022	0.015692
SERP0537	Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> antiporter	2.714	0.115	0.117762
SERP0538	Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> antiporter	3.793	0.011	0.008428
SERP1245	amino acid permease family protein	6.755	0.475	0.244880
SERP1260	amino acid permease family protein	8.878	0.175	0.082478
SERP1835	xanthine-uracil permease family protein	4.247	0.393	0.264888
SERP1838	sugar transporter	2.675	0.147	0.152085
SERP2028	amino acid ABC transporter	2.412	0.090	0.105118
SERP2029	amino acid ABC transporter	9.240	0.683	0.295172
SERP2031	amino acid ABC transporter	3.517	0.170	0.137717
SERP2060	glycerol-3-phosphate transporter (glpT)	5.028	0.187	0.118830
SERP2069	major facilitator superfamily protein	40.414	0.489	0.135029
SERP2101	ribose transport protein	4.499	0.162	0.110340

SERP2102	membrane protein	17.928	0.799	0.269644
SERP2320	choline-carnitine-betaine transporter	7.769	0.729	0.334178
<b>Eisentransporter</b>				
SERP0496	FeS assembly ATPase SufC (sufC)	2.967	0.099	0.093637
SERP0497	FeS assembly protein SufD (sufD)	8.590	0.666	0.297365
SERP1431	ferritin family protein	3.280	0.247	0.207754
<b>Energiestoffwechsel</b>				
SERP1070	alpha-glucosidase (malA) [3.2.1.20]	2.966	0.143	0.134684
SERP1071	6-phosphogluconate dehydrogenase	2.608	0.060	0.064810
SERP1752	mannose-6-phosphate isomerase	8.416	0.839	0.362940
SERP2100	ribokinase (rbsK) [2.7.1.15]	3.381	0.121	0.101869
SERP2170	pyruvate phosphate dikinase (ppdK) [2.7.9.1]	3.214	0.075	0.066160
<b>Energiestoffwechsel: TCA Zyklus</b>				
SERP0813	succinyl-CoA synthase	3.401	0.104	0.087618
SERP0814	succinyl-CoA synthase	3.263	0.145	0.125470
SERP0921	aconitate hydratase (acnA) [4.2.1.3]	4.275	0.174	0.122847
SERP2168	malate:quinone oxidoreductase (mqo-2) [1.1.99.16]	2.943	0.029	0.028061
SERP2312	malate:quinone oxidoreductase (mqo-3) [1.1.99.16]	62.170	0.255	0.063676
<b>Energiestoffwechsel Aminosäuren und Amine</b>				
SERP1077	2-oxoisovalerate dehydrogenase	10.970	0.309	0.131633
SERP1079	2-oxoisovalerate dehydrogenase	16.076	0.046	0.017271
<b>Energiestoffwechsel: Elektronentransport</b>				
SERP0728	thioredoxin (trxA)	2.179	0.019	0.025462
<b>Energiestoffwechsel: ATP-Proton motive forces Interkonversion</b>				
SERP1708	ATP synthase F1	3.801	0.091	0.070205
SERP1709	ATP synthase F1	5.474	0.266	0.158990
SERP1710	ATP synthase F1	4.050	0.172	0.125490
SERP1711	ATP synthase F1	5.299	0.192	0.118069
SERP1712	ATP synthase F1	5.060	0.201	0.126544
SERP1713	ATP synthase F0	5.755	0.299	0.172655
SERP1714	ATP synthase F0	4.604	0.103	0.069691
SERP1715	ATP synthase F0	4.067	0.147	0.107568
<b>Nukleotid und Nucleosid Interkonversion</b>				
SERP0776	guanylate kinase (gmk) [2.7.4.8]	3.135	0.249	0.217435
SERP1810	adenylate kinase (adk) [2.7.4.3]	3.625	0.009	0.007495
<b>Purin Ribonukleotid Biosynthese</b>				
SERP0070	GMP synthase (guaA) [6.3.5.2]	2.659	0.041	0.043273
SERP0655	amidophosphoribosyltransferase (purF) [2.4.2.14]	8.311	0.042	0.020625
SERP0657	phosphoribosylglycinamide formyltransferase (purN) [2.1.2.2]	21.223	0.074	0.025034
SERP0658	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase-IMP cyclohydrolase (purH)	3.056	0.009	0.008131
SERP1582	thymidylate synthase (thyA-2) [2.1.1.45]	4.504	0.417	0.269721
SERP2536	adenylosuccinate synthetase (purA) [6.3.4.4]	19.275	0.542	0.184483
<b>Zentraler Intermediärstoffwechsel: Ein-Carbon Metabolismus</b>				
SERP1295	formate--tetrahydrofolate ligase (fhs) [6.3.4.3]	7.248	0.178	0.092688
SERP1352	S-adenosylmethionine synthetase (metK) [2.5.1.6]	14.367	0.069	0.026671

**Zentraler Intermediärstoffwechsel: Stickstoff Metabolismus**

SERP1869	urease	2.966	0.126	0.118444
SERP1870	urease	3.327	0.049	0.042042
SERP1871	urease	4.669	0.031	0.020798
SERP1873	urease accessory protein UreF (ureF)	3.255	0.013	0.011782
SERP1874	urease accessory protein UreG (ureG)	12.499	0.660	0.256023

**Zentraler Intermediärstoffwechsel: Sulfat Metabolismus**

SERP2185	adenylylsulfate kinase (cysC) [2.7.1.25]	3.652	0.264	0.204298
SERP2186	sulfate adenylyltransferase (sat) [2.7.7.4]	3.880	0.338	0.245641

**Aminosäure Biosynthese: Aspartat und Serin Familien**

SERP0095	trans-sulfuration enzyme family protein	6.827	0.246	0.130838
----------	---	-------	-------	----------

**Aminosäure Biosynthese: Serine Familie**

SERP0152	cysteine synthase (cysK) [4.2.99.8]	3.322	0.035	0.030027
----------	-------------------------------------	-------	-------	----------

**Aminosäure Biosynthese: Aromatische AS Familien**

SERP1034	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (aroA) [2.5.1.19]	3.463	0.158	0.129986
----------	--	-------	-------	----------

SERP1103	shikimate kinase (aroK) [2.7.1.71]	2.890	0.106	0.102404
----------	------------------------------------	-------	-------	----------

**Biosynthese von Cofaktoren und prosthetischen Gruppen**

SERP0239	mevalonate diphosphate decarboxylase (mvaD) [4.1.1.33]	3.885	0.049	0.037599
----------	--	-------	-------	----------

SERP1231	glutamate-1-semialdehyde-2	3.333	0.166	0.140531
----------	----------------------------	-------	-------	----------

SERP1232	delta-aminolevulinic acid dehydratase (hemB) [4.2.1.24]	9.525	0.506	0.223180
----------	---	-------	-------	----------

SERP1327	riboflavin synthase	3.704	0.007	0.005834
----------	---------------------	-------	-------	----------

SERP1368	uroporphyrinogen decarboxylase (hemE) [4.1.1.37]	2.180	0.008	0.010955
----------	--	-------	-------	----------

SERP2122		3.717	0.113	0.088348
----------	--	-------	-------	----------

	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [2.3.3.10]			
--	---	--	--	--

SERP2189	uroporphyrin-III C-methyltransferase	3.382	0.028	0.024213
----------	--------------------------------------	-------	-------	----------

SERP2191	sulfite reductase (NADPH) flavoprotein alpha-component (cysJ) [1.8.1.2]	3.650	0.291	0.223563
----------	---	-------	-------	----------

**Fettsäure und Phospholipid Biosynthese**

SERP0567	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III (fabH) [2.3.1.41]	3.720	0.069	0.054536
----------	---	-------	-------	----------

SERP0601	enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase (fabI) [1.3.1.9]	18.994	0.989	0.318664
----------	---	--------	-------	----------

SERP0797	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase (fabG) [1.1.1.100]	3.351	0.076	0.065033
----------	---	-------	-------	----------

SERP0850	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase (pgsA) [2.7.8.5]	3.202	0.144	0.126729
----------	---	-------	-------	----------

SERP1087	acetyl-CoA carboxylase	4.822	0.180	0.117490
----------	------------------------	-------	-------	----------

SERP1088	acetyl-CoA carboxylase	9.225	0.597	0.262665
----------	------------------------	-------	-------	----------

SERP1136	diacylglycerol kinase (dgkA) [2.7.1.107]	3.634	0.195	0.153928
----------	--	-------	-------	----------

SERP1264	acetyl-CoA carboxylase	3.926	0.338	0.243714
----------	------------------------	-------	-------	----------

**Gene/Proteine mit unbekannter Funktion oder Spezifität**

SERP0004	glucose inhibited division protein A (gidA)	3.453	0.193	0.158195
----------	---	-------	-------	----------

SERP0100	LysM domain protein	6.604	0.557	0.285277
----------	---------------------	-------	-------	----------

SERP0130	primase-related protein	3.312	0.234	0.196007
----------	-------------------------	-------	-------	----------

SERP0817	gid protein	3.374	0.158	0.132590
----------	-------------	-------	-------	----------

SERP0853	HD-HDIG-KH domain protein	3.574	0.264	0.206899
----------	---------------------------	-------	-------	----------

SERP1164	GTP-binding protein	4.509	0.046	0.031290
----------	---------------------	-------	-------	----------

SERP1165	hydrolase	5.902	0.487	0.267439
----------	-----------	-------	-------	----------

SERP1168	LamB-YcsF family	5.917	0.607	0.323036
----------	------------------	-------	-------	----------

---

SERP1208	GTP-binding protein	4.482	0.059	0.040956
SERP1282	GAF domain protein	4.248	0.118	0.083928
SERP1317	rhodanese-like domain protein	4.129	0.136	0.098437
SERP1373	HIT family protein	2.706	0.142	0.144925
SERP1765	ATP-binding protein	2.597	0.102	0.110135
SERP1882	NAD-NADP octopine-nopaline dehydrogenase family protein	2.689	0.004	0.004203
SERP1899	glucokinase regulator-related protein	3.742	0.040	0.031712
SERP2263	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain protein	2.905	0.112	0.107545
SERP2539	DHH family protein	3.899	0.025	0.019180
<b>Konservierte hypothetische Gene</b>				
SERP0115	conserved hypothetical protein	2.539	0.072	0.079326
SERP0171	conserved hypothetical protein	2.671	0.015	0.016312
SERP0255	conserved hypothetical protein	4.641	0.094	0.063194
SERP0666	conserved hypothetical protein	4.912	0.470	0.285239
SERP0717	conserved hypothetical protein	3.744	0.051	0.039682
SERP0834	conserved hypothetical protein	4.724	0.053	0.035067
SERP0884	conserved hypothetical protein	3.159	0.052	0.047111
SERP1016	conserved hypothetical protein	2.616	0.137	0.145587
SERP1075	conserved hypothetical protein	6.349	0.208	0.115129
SERP1137	conserved hypothetical protein	3.296	0.252	0.210800
SERP1249	conserved hypothetical protein	2.619	0.090	0.095732
SERP1210	conserved hypothetical protein	2.644	0.003	0.003049
SERP1276	conserved hypothetical protein	3.616	0.152	0.121309
SERP1365	conserved hypothetical protein	3.121	0.091	0.082116
SERP1418	conserved hypothetical protein	3.591	0.043	0.034923
SERP1469	conserved hypothetical protein	2.664	0.124	0.129518
SERP1707	conserved hypothetical protein	2.975	0.219	0.201570
SERP1898	conserved hypothetical protein	3.777	0.116	0.090247
SERP2169	conserved hypothetical protein	4.193	0.150	0.107667
SERP2413	conserved hypothetical protein	2.988	0.163	0.151674

---

<b>Id</b>	<b>Name</b>	<b>Mean (Stats)</b>	<b>SD (Stats)</b>	<b>One Sample t-Test</b>
<b>Regulatoren</b>				
SERP0162	transcriptional regulator CtsR (ctsR)	0.079	0.030	0.012289
SERP2059	gluconate operon transcriptional repressor (gntR)	0.333	0.009	0.008035
SERP2246	transcriptional regulator	0.216	0.023	0.015427
<b>Zelluläre Prozesse: Pathogenität, Toxin Produktion und Resistenz</b>				
SERP0663	67 kDa Myosin-crossreactive antigen	0.361	0.033	0.033420
<b>Proteindegradation</b>				
SERP0165	ATP-dependent Clp protease; ClpC	0.142	0.023	0.012113
SERP0436	ATP-dependent Clp protease; ClpP	0.223	0.093	0.064326
SERP0564	ATP-dependent Clp protease; ClpB	0.101	0.031	0.013813
SERP1640	M23-M37 peptidase domain protein	0.194	0.149	0.093701
<b>Proteinfaltung und Stabilisierung</b>				
SERP1148	dnaK protein (dnaK)	0.211	0.044	0.029370
SERP1149	heat shock protein GrpE (grpE)	0.203	0.078	0.050851
SERP1150	heat-inducible transcription repressor HrcA (hrcA)	0.200	0.076	0.048924
<b>tRNA Synthetasen</b>				
SERP0156	lysyl-tRNA synthetase (lysS) [6.1.1.6]	0.382	0.107	0.113889
<b>DNA Metabolismus: Replikation, Rekombination und Reparatur</b>				
SERP0166	DNA repair protein RadA (radA)	0.408	0.001	0.000947
SERP0852	recA protein (recA)	0.312	0.041	0.036594
<b>Zelluläre Prozesse: Zellteilung</b>				
SERP0324	scdA protein (scdA)	0.358	0.040	0.040754
<b>Zelluläre Prozesse: Anpassung an atypische Verhältnisse</b>				
SERP0466	cold shock protein	0.361	0.008	0.008159
SERP1273	universal stress protein family	0.278	0.087	0.069825
SERP1973	general stress protein 26	0.294	0.152	0.126895
SERP2071	glycine oxidase	0.349	0.106	0.103501
SERP2220	universal stress protein family	0.194	0.055	0.034925
<b>Zellhülle: Biosynthese und Degradation des Mureinsacculus and des Peptidoglycans</b>				
SERP1689	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase (murF) [6.3.2.10]	0.449	0.002	0.002050
<b>Zellhülle: Biosynthese und Degradation der Polysaccharide und Lipopolysaccharide Hülle</b>				
SERP2056	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (galU) [2.7.7.9]	0.483	0.019	0.027198
<b>Zellhülle: Proteine</b>				
SERP2353	membrane protein	0.480	0.017	0.024177
SERP2491	membrane protein	0.478	0.002	0.002109
<b>Transporter</b>				
SERP0161	nucleoside permease NupC (nupC)	0.284	0.103	0.084063
SERP0290	ABC transporter	0.372	0.090	0.093513
SERP0291	ABC transporter	0.351	0.149	0.144684
SERP0292	ABC transporter	0.264	0.042	0.032729
SERP0490	ABC transporter	0.453	0.038	0.050196
SERP0491	ABC transporter	0.330	0.042	0.038949
SERP2057	gluconate transporter	0.364	0.129	0.130201
SERP2247	arginine-ornithine antiporter (arcD)	0.209	0.052	0.034057
SERP2383	ABC transporter	0.034	0.224	0.068266

**Eisentransporter**

SERP2132	heavy metal-binding protein	0.354	0.051	0.050647
----------	-----------------------------	-------	-------	----------

**Energiestoffwechsel**

SERP2115	pyruvate oxidase [1.2.3.3]	0.246	0.114	0.083914
----------	----------------------------	-------	-------	----------

**Energiestoffwechsel Aminosäuren und Amine**

SERP1272	alanine dehydrogenase (ald) [1.4.1.1]	0.213	0.137	0.090905
----------	---------------------------------------	-------	-------	----------

SERP2094	L-serine dehydratase	0.327	0.063	0.057827
----------	----------------------	-------	-------	----------

SERP2095	L-serine dehydratase	0.430	0.065	0.079285
----------	----------------------	-------	-------	----------

SERP2249	ornithine carbamoyltransferase (arcB-1) [2.1.3.3]	0.257	0.114	0.086752
----------	---	-------	-------	----------

SERP2250	arginine deiminase (arcA) [3.5.3.6]	0.197	0.015	0.009283
----------	-------------------------------------	-------	-------	----------

SERP2351	ornithine carbamoyltransferase (arcB-2) [2.1.3.3]	0.387	0.002	0.002460
----------	---	-------	-------	----------

SERP2352	carbamate kinase (arcC) [2.7.2.2]	0.359	0.062	0.062622
----------	-----------------------------------	-------	-------	----------

SERP2155	acetolactate synthase	0.338	0.083	0.078550
----------	-----------------------	-------	-------	----------

**Energiestoffwechsel: Fermentation**

SERP2194	glutathione peroxidase (gpxA-2) [1.11.1.9]	0.369	0.064	0.066248
----------	--	-------	-------	----------

SERP2257	acetoin reductase	0.314	0.009	0.008185
----------	-------------------	-------	-------	----------

SERP2324	acetoin dehydrogenase	0.338	0.133	0.125298
----------	-----------------------	-------	-------	----------

SERP2379	acetoin reductase	0.203	0.060	0.039235
----------	-------------------	-------	-------	----------

**Energiestoffwechsel: TCA Zyklus**

SERP2195	alpha keto acid dehydrogenase complex	0.304	0.046	0.039811
----------	---------------------------------------	-------	-------	----------

**Energiestoffwechsel: Lactatatmung**

SERP1789	6-phospho-beta-galactosidase (lacG) [3.2.1.85]	0.190	0.027	0.017051
----------	--	-------	-------	----------

SERP1790	PTS system	0.192	0.035	0.022254
----------	------------	-------	-------	----------

SERP1791	PTS system	0.147	0.016	0.008750
----------	------------	-------	-------	----------

SERP1792	tagatose 1	0.133	0.037	0.019254
----------	------------	-------	-------	----------

SERP1793	tagatose-6-phosphate kinase (lacC) [2.7.1.144]	0.131	0.021	0.010635
----------	--	-------	-------	----------

SERP1794	galactose-6-phosphate isomerase	0.104	0.003	0.001529
----------	---------------------------------	-------	-------	----------

SERP1795	galactose-6-phosphate isomerase	0.092	0.009	0.003860
----------	---------------------------------	-------	-------	----------

**Energiestoffwechsel: Nitratatmung**

SERP1982	sensor histidine kinase	0.334	0.050	0.047103
----------	-------------------------	-------	-------	----------

SERP1983	conserved hypothetical protein	0.362	0.029	0.029849
----------	--------------------------------	-------	-------	----------

SERP1986	respiratory nitrate reductase	0.316	0.011	0.009659
----------	-------------------------------	-------	-------	----------

SERP1987	respiratory nitrate reductase	0.309	0.006	0.005356
----------	-------------------------------	-------	-------	----------

SERP1988	uroporphyrinogen-III methylase SirB	0.294	0.001	0.000607
----------	-------------------------------------	-------	-------	----------

SERP1989	nitrite reductase [NAD(P)H]	0.264	0.046	0.036015
----------	-----------------------------	-------	-------	----------

SERP1990	nitrite reductase [NAD(P)H]	0.308	0.024	0.021302
----------	-----------------------------	-------	-------	----------

**Energiestoffwechsel: Glycolyse/Gluconeogenese**

SERP2007	phosphoglycerate mutase (gpm) [5.4.2.1]	0.303	0.008	0.006825
----------	---	-------	-------	----------

SERP2012	glycerate kinase 2 (garK) [2.7.1.31]	0.431	0.060	0.073232
----------	--------------------------------------	-------	-------	----------

**Energiestoffwechsel: Elektronentransport**

SERP0483	thioredoxin	0.426	0.083	0.099522
----------	-------------	-------	-------	----------

SERP2381	NADH:flavin oxidoreductase-fumarate reductase	0.273	0.028	0.022577
----------	---	-------	-------	----------

**Nukleotid und Nucleosid Interkonversion**

SERP0120	thymidylate kinase (tmk) [2.7.4.9]	0.418	0.096	0.112650
----------	------------------------------------	-------	-------	----------

**Aminosäurebiosynthese: Aspartatfamilie**

SERP2541	homoserine O-acetyltransferase	0.479	0.011	0.015604
----------	--------------------------------	-------	-------	----------

**Biosynthese von Cofaktoren und prosthetischen Gruppen**

SERP0158	pyridoxine biosynthesis protein	0.294	0.094	0.079131
----------	---------------------------------	-------	-------	----------

SERP0500	FeS assembly protein SufB (sufB)	0.413	0.005	0.005928
----------	----------------------------------	-------	-------	----------

SERP2072	thiamine biosynthesis protein ThiS (thiS)	0.362	0.041	0.042160
----------	---	-------	-------	----------

SERP2382	ApbE family protein	0.256	0.011	0.008285
----------	---------------------	-------	-------	----------



**Fettsäure und Phospholipid Biosynthese**

SERP1705	(3R)-hydroxymyristoyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase (fabZ) [4.2.1.-]	0.437	0.067	0.083582
----------	---	-------	-------	----------

**Gene/Proteine mit unbekannter Funktion oder Spezifität**

SERP0163	UvrB-UvrC domain protein	0.088	0.035	0.014807
SERP0164	ATP:guanido phosphotransferase family protein	0.105	0.013	0.006149
SERP0165	ATP-dependent Clp protease	0.142	0.023	0.012113
SERP0218	hydrolase	0.286	0.162	0.131874
SERP0273	hydrolase	0.374	0.067	0.070548
SERP0576	glutaredoxin	0.242	0.095	0.068913
SERP0477	acetyltransferase	0.428	0.029	0.035031
SERP0480	OsmC-Ohr family protein	0.462	0.028	0.037329
SERP0694	inositol monophosphatase family protein	0.353	0.022	0.021422
SERP2045	short chain dehydrogenase-reductase family protein	0.422	0.063	0.075623
SERP2080	aldehyde dehydrogenase family protein	0.294	0.037	0.030998
SERP2082	acetyltransferase	0.308	0.175	0.150942
SERP2127	FeoA family protein	0.044	0.130	0.042875
SERP2244	capA-related protein	0.380	0.048	0.051667
SERP2446	PenN domain protein	0.280	0.073	0.059598

**Konservierte hypothetische Gene**

SERP0009	conserved hypothetical protein	0.356	0.018	0.017843
SERP0010	conserved hypothetical protein	0.393	0.021	0.023485
SERP0066	conserved hypothetical protein	0.294	0.072	0.060796
SERP0121	conserved hypothetical protein	0.396	0.101	0.111899
SERP0132	conserved hypothetical protein	0.303	0.012	0.010549
SERP0159	conserved hypothetical protein	0.382	0.085	0.091123
SERP0224	conserved hypothetical protein	0.120	0.223	0.108029
SERP0270	conserved hypothetical protein	0.455	0.043	0.055904
SERP0438	conserved hypothetical protein	0.437	0.033	0.041194
SERP0468	conserved hypothetical protein	0.360	0.035	0.035034
SERP0469	conserved hypothetical protein	0.235	0.183	0.129349
SERP0474	conserved hypothetical protein	0.368	0.086	0.088545
SERP0475	conserved hypothetical protein	0.380	0.042	0.044490
SERP0858	conserved hypothetical protein	0.234	0.052	0.037224
SERP1278	conserved hypothetical protein	0.340	0.059	0.056804
SERP1453	conserved hypothetical protein	0.447	0.010	0.012522
SERP1541	conserved hypothetical protein	0.308	0.131	0.114278
SERP1642	conserved hypothetical protein	0.299	0.050	0.042611
SERP1754	conserved hypothetical protein	0.419	0.032	0.037554
SERP2051	conserved hypothetical protein	0.347	0.030	0.029546
SERP2066	conserved hypothetical protein	0.463	0.036	0.048973
SERP2116	conserved hypothetical protein	0.364	0.074	0.075026
SERP2343	conserved hypothetical protein	0.473	0.008	0.010783

## 8 Lebenslauf – Curriculum Vitae

### Christoph Batzilla



#### Geboren am 19.04.1977 in Braunschweig

Friedenstr. 7, 97072 Würzburg, +49-179-3264040, C.Batzilla@gmail.com

#### Ausbildung:

- |           |  |
|-----------|--|
| 1990-1997 | Besuch des Gymnasiums CJD in Braunschweig  |
| 1997-1998 | Zivildienst an der behinderten Begegnungsstätte der Diakonie in Braunschweig   |
| 1998-2002 | Studium der Humanbiologie an der Ernst-Moritz-Arndt Universität in Greifswald  |
| 2002-2003 | Durchführung der Diplomarbeit in einer Kooperation der Universitäten Greifswald und Würzburg am Institut für molekulare Infektionsbiologie in Würzburg |
| 2003      | Abschluss des Studiums mit dem Grades Diplom Humanbiologe  |
| 2003-2006 | Promotion am Institut für molekulare Infektionsbiologie an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität in Würzburg                                  |
| 2002-2005 | Assoziiertes Mitglied des internationalen Graduiertenkolleges Würzburg-Umeå (Schweden)   |

#### Außer-curriculäre Aktivitäten:

##### Leitende Aktivitäten

- |           |   |
|-----------|---|
| 1998      | Gründung des Humanbiologie Greifswald e.V.  |
| 1998-2001 | Präsident des Humanbiologie Greifswald e.V.   |
| 1999      | Gründung des Projektes PULS (public understanding of life sciences) in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Schütt, Lehrstuhl für Immunologie, Universität Greifswald, sowie Organisation und Durchführung entsprechender Projekte in Schulen und der Öffentlichkeit |
| 2005-2006 | Doktorandensprecher des Graduate College Infectious Disease im Rahmen der neu gegründeten Graduiertenschule der Universität Würzburg  |
| 2006      | Mitglied des Organisations-Komitee des 2. internationalen Symposiums der internationalen Graduiertenschulen der Universität Würzburg:<br><a href="http://www.student-symposium.uni-wuerzburg.de">www.student-symposium.uni-wuerzburg.de</a>                   |

##### Hervorzuhebende musikalische Aktivitäten

- |           |  |
|-----------|--|
| 2003-2006 | Mitglied des Acapella Ensembles „Take This“ ( <a href="http://www.takethis-music.de">www.takethis-music.de</a> ):<br>Organisation von 4 „Tourenen“ und vielen kleineren Auftritten |
| 2005      | Produktion einer Studio CD mit „Take This“   |

## 9 Publikationsliste

### Vorträge:

Untersuchungen zum Proteom von *S. epidermidis*

C. Batzilla; W. Ziebuhr; J. Hacker; 13.10.03; Auf Einladung in der GBF, Braunschweig

Strategies to identify the effect of Tajixanthon derivatives on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation

C. Batzilla; W. Ziebuhr; J. Hacker; 12.12.03; SFB Seminarvortrag

The role of the *agr* Quorum-sensing system in *Staphylococcus epidermidis*

C. Batzilla; W. Ziebuhr; J. Hacker; 12.11.04; SFB Tagung; Würzburg

The role of the accessory gene regulator *Agr* in *Staphylococcus epidermidis* "more than just Quorum-sensing"

C. Batzilla; K. Ohlsen; W. Ziebuhr; J. Hacker; 2.12.05; Graduierten Pathogenomics Konferenz des NoE in Würzburg

The role of the accessory gene regulator *Agr* in *Staphylococcus epidermidis* "more than just Quorum-sensing"

C. Batzilla; K. Ohlsen; W. Ziebuhr; J. Hacker; 5.12.05; Auf Einladung an der Universität Linköping, Schweden

Biofilm formation of *S. epidermidis* and the „big search“ to prevent that

C. Batzilla; K. Ohlsen; W. Ziebuhr; J. Hacker; 7.12.05; Umea University, Schweden

Pathogenicity in *Staphylococcus epidermidis*: Quorum-sensing and metabolism an indirect network

C. Batzilla; K. Ohlsen; W. Ziebuhr; J. Hacker; 4.10.2006; DGHM Tagung; Würzburg

### Poster Präsentationen:

Staphylococcal trinity: Biofilm, Quorum-sensing and environmental condition

C. Batzilla; M. Hecker; J. Hacker; W. Ziebuhr; EGC 587 Evaluierung März 2005

Studying the dynamics of staphylococcal biofilm formation by a standardized protocol and a simple mathematical model

C. Batzilla, I. Burckhard, J. Hacker, W. Ziebuhr; Oktober 2005; Prokagen; Göttingen

---

The role of the accessory gene regulator Agr in *Staphylococcus epidermidis*  
C. Batzilla, S. Rachid, S. Engelmann, M. Hecker, J. Hacker, W. Ziebuhr; SFB  
Symposium; Februar 2006; Würzburg

The role of the accessory gene regulator Agr in *Staphylococcus epidermidis*  
C. Batzilla, S. Rachid, S. Engelmann, M. Hecker, J. Hacker, W. Ziebuhr; 10.5-  
17.5.2006; European Graduate Academy course and workshop; Umeå University,  
Schweden

## 10 Veröffentlichungen

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.

Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kranzler H, Batzilla C, Kozitskaya S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Aug;28 Suppl 1:S14-20. Epub 2006 Jul 7.