

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters -

Molekulare Charakterisierung des *Staphylococcus aureus*-Oberflächenproteins
SasC und Rolle in der Zell-Zell-Interaktion

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Mario Jularic
aus
Dortmund
2016

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms- Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. C. Heilmann

2. Berichterstatter: PD Dr. med. A. Mellmann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2016

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
- Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. W. Schmitz -
Referent: PD Dr. rer. nat. C. Heilmann
Konferent: PD Dr. med. A. Mellmann

ZUSAMMENFASSUNG

Molekulare Charakterisierung des *Staphylococcus aureus*-Oberflächenproteins SasC und
Rolle in der Zell-Zell-Interaktion

Mario Jularic

In der vorliegenden Arbeit wurde das vormals uncharakterisierte Oberflächenprotein SasC von *Staphylococcus aureus* auf seine Funktion hin untersucht. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Prävalenz des entsprechenden Gens *sasC* im Genom von 66 *S. aureus*- Stämmen, die im Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster isoliert wurden. Es zeigte sich, dass das für SasC kodierende Gen in 64 der 66 klinischen Isolate vorkommt und damit möglicherweise eine wichtige Funktion in der Pathogenese hat. Nach Klonierung des *sasC*-Gens in den Expressionsvektor pCX19 und Transformation in den apathogenen Stamm *S. carnosus* TM300 konnte erstmals die Funktion des SasC als Zell-Zell-Adhäsion vermittelndes Protein bestimmt werden. Nach Expression des Proteins an der Oberfläche von *S. carnosus* zeigten sich im Gegensatz zum Wildtypstamm schon bei Wachstum in der planktonischen Phase makroskopisch und mikroskopisch sichtbare Zellaggregate, die konzentrationsabhängig durch die Serinproteinase Trypsin aufgelöst werden konnten. Auch zeigten die Bakterien aufgrund ihrer Expression des SasC- Proteins eine verstärkte Biofilmbildung auf Polystyroloberflächen, was am ehesten auf die Vermittlung von interzellulärer Adhäsion durch das Protein zurückzuführen ist. Für die Akkumulationsphase der Biofilmentstehung wurde zuletzt bei einer Vielzahl von Untersuchungen das Vorhandensein von sogenannten PIA-unabhängigen Mechanismen nachgewiesen und vor allem bei *S. aureus*-Biofilmen die Bedeutung von extrazellulärer DNA und insbesondere Proteinen herausgestellt. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass das Protein SasC eine mögliche Rolle in der proteinvermittelten Biofilmmakkumulation hat und einen wichtigen Pathogenitätsfaktor in der Pathogenese der klinisch schwierig zu beherrschenden Biofilm-assoziierten Infektionen von *Staphylococcus aureus* darstellen könnte.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2016

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel

Molekulare Charakterisierung des *Staphylococcus aureus*-Oberflächenproteins SasC und Rolle in der Zell-Zell-Interaktion

im Institut für Medizinische Mikrobiologie

unter der Anleitung von PD Dr. rer. nat. Christine Heilmann

1. selbstständig angefertigt,
2. unter der Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe.

Münster, 23.06.2014

Mario Jularic

Diese Dissertation widme ich meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das humanpathogene Bakterium <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2	<i>S. aureus</i> -Infektionen	2
1.3	Pathogenese von <i>S. aureus</i> -Infektionen	3
1.4	Biofilme	7
1.4.1	Struktureller Aufbau des Biofilms.....	10
1.4.2	Mechanismus der Biofilmbildung	11
1.4.3	Initiale Adhärenz	12
1.4.4	Akkumulative Phase	12
1.4.5	Dispersion.....	15
1.5	Biofilm-assoziierte <i>S. aureus</i> -Infektionen	16
1.5.1	Mechanismen der Antibiotikaresistenz in Biofilmen.....	2
1.5.2	Immunevasion	3
1.6	Sortase und LPXTG-Motif	6
1.7	SasC	7
1.8	Fragestellung	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.1.1	Bakterienstämme.....	9
2.1.2	Primer	10
2.1.3	Enzyme.....	10
2.1.4	Antibiotika	11

2.1.5	Chemikalien	11
2.1.6	Laborgeräte	12
2.1.7	Kits.....	14
2.2	Methoden.....	15
2.2.1	Anzucht und Stammhaltung der Bakterien	15
2.2.2	Isolierung chromosomaler DNA.....	16
2.2.3	DNA-Konzentrationsbestimmung	17
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	17
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
2.2.6	Reinigung der PCR-Produkte	21
2.2.7	Genexpression in <i>S. carnosus</i> (pSasC4074).....	21
2.2.8	Isolierung von Oberflächen-assoziierten Proteinen	21
2.2.9	Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	22
2.2.10	Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der Zellaggregation.	26
2.2.11	Trypsin-Desaggregationsassay	26
2.2.12	Biofilmassay.....	27
2.2.13	Bioinformatische Strukturanalyse	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Prävalenz des <i>sasC</i> -Gens bei klinischen <i>S. aureus</i> -Isolaten	29
3.2	Expression des <i>sasC</i> -Gens in <i>S. carnosus</i> (pSasC4074)	31
3.3	SasC vermittelt starke Zellaggregation in <i>S. carnosus</i>	32
3.4	SasC-vermittelte Zellaggregation ist Protease-sensitiv	35

3.5	Biofilmbildung auf Polystyrol.....	37
3.6	Bioinformatische Strukturanalyse des SasC-Protein	38
3.6.1	Analyse der SasC-Aminosäuresequenz	38
3.6.2	COILS - Prediction of Coiled Coil Regions in Proteins	39
4	Diskussion	41
4.1	Epidemiologie des <i>sasC</i> -Gens	41
4.2	SasC-vermittelte Zellaggregation	41
4.3	Mechanismus der Zell-Zell-Interaktion	42
4.4	Bedeutung von SasC in der Biofilmentstehung	45
4.5	Expression des <i>sasC</i> -Gens in <i>S. aureus</i> Wildtypstämmen	47
4.6	Regulation des <i>sasC</i> -Gens.....	48
4.7	Zusammenfassung und Ausblick.....	52
5	Literaturverzeichnis.....	56
6	Abbildungsverzeichnis	76
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	76
6.2	Tabellenverzeichnis.....	76
7	Anhang	I
7.1	Abkürzungen und Maßeinheiten.....	I
7.2	Tabellen	IV
7.3	Publikation	VII
7.4	Lebenslauf	VIII
7.5	Danksagung	X

1 Einleitung

1.1 Das humanpathogene Bakterium *Staphylococcus aureus*

Friedrich Julius Rosenbach beschrieb im Jahr 1884 zwei unterschiedlich pigmentierte Kolonietypen von Staphylokokken, *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus albus*. Die letztere Spezies beschreibt eine wachsende Zahl von Koagulase-negativen Staphylokokken, darunter auch *Staphylococcus epidermidis*. Die Bezeichnung *Staphylococcus* bezieht sich auf die typische Wachstumsmorphologie der Bakterien. Die sphärischen Zellen, welche einen Durchmesser von 1 µm haben, erscheinen mikroskopisch als kleine Zellhaufen und zeigen als solche Ähnlichkeit mit Trauben (griechisch: staphyle) (54). Zugrunde liegt eine Zellteilung in mehreren Ebenen, die jeweils orthogonal zueinander liegen.

Das humanpathogene Bakterium *S. aureus* gehört zur Gattung *Staphylococcus*. Diese wurde aus historischen Gründen bezüglich des Phänotyps der heterogenen Familie der Micrococcaceae zugeordnet. Bei diesen werden die vier Gattungen *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Planococcus* und *Stomatococcus* unterschieden, bei denen es sich um Gram-positive, meist Katalase-positive Kokken handelt, die überwiegend fakultativ anaerob wachsen (77). Sie metabolisieren Kohlenhydrate demnach sowohl aerob als auch durch Fermentation. Die vier genannten Gattungen unterscheiden sich jedoch stark auf molekularer Ebene wie z.B. im GC-Gehalt und in der Zusammensetzung der Zellwand (22, 36). Die Bakterienchromosome der Staphylokokken besitzen diesbezüglich im Gegensatz zu *Micrococcus* einen niedrigen GC-Gehalt und sind die einzige Gattung der genannten Gruppe, welche Teichonsäure in der Zellwand und eine Kapsel enthalten (98). Aufgrund von 16S rRNA-Vergleichen werden daher die Gattungen *Enterococcus*, *Bacillus*, *Salinicoccus*, *Planococcus*, *Brochothrix* und *Listeria* und nicht die Gattung *Micrococcus* als die nächsten Verwandten der Staphylokokken angesehen (22). *S. aureus* ist in der Lage innerhalb eines Temperaturbereichs

von 15 bis 45 °C und bei NaCl-Konzentrationen von bis zu 15% zu wachsen. Das Temperaturoptimum von *S. aureus* korreliert jedoch mit der Körpertemperatur des menschlichen Wirts und liegt bei 30-37 °C. Auf bluthaltigen Nährmedien sind *S. aureus*-Kolonien häufig von einem vollständigen gelblichen Hämolysehof (beta-Hämolyse) umgeben, in dem keine intakten Erythrozyten mehr vorhanden sind. Die Bakterien sind relativ resistent gegenüber UV-Strahlen, Austrocknung und verschiedenen Desinfektionsmitteln. Die hohe Tenazität ist ein Grund für die rasche Verbreitung von *S. aureus* im Krankenhaus, was man als Staphylokokken-Hospitalismus bezeichnet. Das Genus *Staphylococcus* weist eine große Spezies-Vielfalt auf und wurde aufgrund der Praktikabilität und klinischen Relevanz in Plasmakoagulase-positive (*S. aureus*-Gruppe) und -negative Arten unterteilt (77). Eine infektiologische Bedeutung als Krankheitserreger beim Menschen haben vor allem die Koagulase-positive Staphylokokken-Spezies *Staphylococcus aureus* sowie die Koagulase-negativen Arten *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus saprophyticus*.

1.2 *S. aureus*-Infektionen

Obwohl mehr als 30 Staphylokokken-Spezies beschrieben sind, scheinen insbesondere *S. aureus* und *S. epidermidis* eine Rolle als menschliches Pathogen zu spielen. *Staphylococcus aureus* ist eines der häufigsten bakteriellen Pathogene, das neben oberflächlichen Haut- und Bindegewebsinfektionen auch schwere Krankheitsbilder wie endovaskuläre Infektionen, wie zum Beispiel Endokarditis, Ventrikulitis, tiefe Gewebsabszesse sowie Knochen- und Gelenksinfektionen verursacht (91). *S. aureus* ist verantwortlich für 70-80% aller Wundinfektionen, 50-60% aller Osteomyelitiden, 15-40% aller Gefäßprotheseninfektionen, bis zu 30% aller Fälle von Sepsis und Endokarditis und 10% aller Pneumonien. Er ist damit einer der häufigsten bakteriellen Erreger sowohl von ambulant erworbenen als auch von nosokomialen Infektionen (54)

und hat insbesondere bei schwerst kranken Patienten einen großen Einfluß auf die Mortalität (140, 176).

Aufgrund der immer fortschrittlicheren medizinischen Versorgung, welche unter anderem die häufige Verwendung medizinischer Fremdkörper beinhaltet, sind die Infektionen selber und damit auch ihre Therapie deutlich komplexer und schwieriger geworden (53, 87). Vor allem die Verwendung einer Vielzahl von Kathetern und anderen medizinischen Fremdkörpern ist hier problematisch. So betrug in einer Studie beispielsweise die 12-Wochen-Mortalität aufgrund von Staphylokokken-Infektionen 17% bei Patienten mit permanenten Blasenkathe tern und sogar 35% bei Patienten mit künstlichen Herzklappen (83). Die infektiöse Endokarditis gehört zu den schwersten Komplikationen einer *S. aureus*-Infektion und nimmt in ihrer Inzidenz zu (53). *S. aureus* wurde im Rahmen einer internationalen Kohortenstudie in 30% aller Endokarditisfälle als Pathogen isoliert und stellt damit die häufigste Ursache infektiöser Endokarditis-Erkrankungen dar (115).

Insgesamt haben Staphylokokken eine große Bedeutung als Pathogen und *Staphylococcus aureus*-Infektionen haben nicht nur eine hohe Prävalenz, sondern nehmen aktuell in einem weltweiten Rahmen zu (16, 44, 185). In einer Studie zeigte sich, dass im Jahr 2003 allein in den USA 400 000 Patienten wegen einer *S. aureus*-Infektion stationär behandelt werden mussten (110).

1.3 Pathogenese von *S. aureus*-Infektionen

S. aureus stellt sowohl ein Kommensal als auch ein Pathogen dar. Der Nasenvorhof ist die hauptsächliche ökologische Nische für *S. aureus*. Beinahe 20% der Bevölkerung sind permanent an dieser Lokalisation kolonisiert, während weitere 30% zumindest intermittierend betroffen sind. Daneben gibt es weitere Prädilektionsstellen wie die Axilla, Leiste und den Gastrointestinaltrakt. Im Krankenhaus kann die Trägerrate bei Ärzten und beim Pflegepersonal über 90% betragen. Bei diesem Personenkreis findet sich der Erreger v.a. im Nasenvorhof,

auf den Händen und im Perinealbereich (54). Die kolonisierten Bereiche stellen ein Reservoir dar, von dem zum Beispiel bei Zerstörung der schützenden epithelialen Hautbarriere eine Infektion ausgehen kann. Eine Besiedlung mit *S. aureus* stellt verschiedenen Studien nach eindeutig ein Risikofaktor für eine nachfolgende Infektion dar (73, 177, 184). In der Mehrzahl der Fälle finden sich Infektionen mit den kolonisierenden Stämmen (73, 177). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die aus Blutkulturen von Bakteriämie-Patienten isolierten Stämme zu 82% identisch mit den jeweils kolonisierenden Stämmen waren (73). Besondere Gefährlichkeit kommt dem Erreger deshalb zu, weil über 80% aller Stämme im Krankenhaus Penicillinase bilden und daher gegen Penicillin G und die meisten seiner Derivate resistent sind. Seit 1962 sind Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme aufgetaucht, so genannte MRSA-Stämme, die gegen alle beta-Laktam-Antibiotika resistent sind (54) und die Therapie von Staphylokokkeninfektionen dementsprechend zunehmend schwieriger machen.

Bei der Initiierung einer Staphylokokkeninfektion als erster Phase des Infektionsprozesses hat eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen eine zentrale Bedeutung. Diese sogenannten MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) fungieren als Adhäsine, die an verschiedene Moleküle der extrazellulären Matrix und des Serums wie Fibrinogen, Fibronectin und Kollagen binden (125). MSCRAMMs haben desweiteren eine Schlüsselrolle in der Initiierung von endovaskulären, Fremdkörper-assoziierten sowie Knochen- und Gelenkinfektionen (40, 108, 125, 172). Während des weiteren Infektionsprozesses produziert *S. aureus* Enzyme wie Proteasen, Lipasen und Elastasen. Diese ermöglichen durch ihre enzymatischen Eigenschaften, weiter in das Wirtsgewebe einzudringen und im für den Patienten ungünstigsten Fall Anschluß an das Gefäßsystem zu gewinnen. Sobald *S. aureus* an Wirtsgewebe oder Fremdkörper gebunden hat, kommen neben den genannten Enzymen zur Etablierung der Infektion des weiteren verschiedene wichtige Mechanismen zum Tragen. Eine entscheidende Strategie, um dabei dem Immunsystem des Wirtes und der Wirkung von Antibiotika zu

entgehen, ist die Ausbildung eines Biofilms (31), der es dem Pathogen ermöglicht, im Wirt zu persistieren. Die Fähigkeit, Biofilme auszubilden scheint in diesem Zusammenhang einer der Hauptgründe zu sein, aus dem bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen in der Regel die Biomaterialien entfernt werden müssen, um die Infektion beherrschen zu können. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *S. aureus* in der Lage ist, in epitheliale und endotheliale Zellen sowie Osteoblasten einzudringen und in diesen zu persistieren (34, 42, 55, 62, 111, 121, 156). Grundlage der Persistenz scheint die Bildung sogenannter „small colony variants“ (SVCs) zu sein. Dieser Phänotyp zeichnet sich durch ein verzögertes Wachstum, kleine Koloniegroße und stark reduzierte Stoffwechselaktivität aus. SVCs sind *in vitro* in der Lage, innerhalb von Wirtszellen zu existieren ohne einen Zelltod hervorzurufen. Zu späteren Zeitpunkten können sie dann zum virulenteren Wild-Typ revertieren und dann nach einer Phase der Infektionsremission erneut Infektionen verursachen (71, 133, 134). Neben diesen beiden Mechanismen besitzt *S. aureus* weitere Möglichkeiten, dem Immunsystem während einer Infektion zu entgehen. So besitzen viele *S. aureus*-Stämme eine Polysaccharid-Kapsel, die antiphagozytäre Eigenschaften besitzt und wohl dadurch an der Formation von Abszessen beteiligt ist (119, 173). Das zur MSCRAMM-Familie gehörende Protein A kann auf der Oberfläche nahezu aller *S. aureus*-Stämme nachgewiesen werden. Es bindet den Fc-Teil von Immunglobulinen (29) und verhindert damit die Opsonisierung der Bakterien durch die Antikörper. Auch der Fibrinogen-bindende Clumpingfaktor (Fibrinogenrezeptor) ist Bestandteil beinahe aller *S. aureus*-Zelloberflächen (106). Die Plasmakoagulase (91) bewirkt eine Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Dies führt letztlich zur Bildung der charakteristischen Fibrinkapsel, die das Bakterium in der frühen Phase der Infektion vor der Wirtsabwehr schützt. Dieser Fibrinschutzwall kann später nach entsprechender Vermehrung durch die ebenfalls von den Staphylokokken gebildete Staphylokinase über die Umwandlung von körpereigenem Plasminogen in Plasmin wieder gelöst werden.

Auch die extrazellulären Proteine wie das CHIPS (chemotaxis inhibitory protein of staphylococci) und das später näher diskutierte Eap (extracellular adherence protein), welche mit der Chemotaxis und Neutophilenextravasation interferieren, haben in der Immunevasion eine Bedeutung (39). Ein weiteres extrazelluläres Protein ist das Leukozidin, das über eine Homoaggregation zu Porenbildung in der Zellmembran von Leukozyten führt und diese dadurch lysiert (50).

In der aus pathogenetischer Sicht letzten Phase der Infektion kommt es zur Schädigung des Wirts durch das Pathogen. Diese Fähigkeit ist grundsätzlich das Ergebnis ihrer Toxinproduktion (77).

Des Weiteren kann *S. aureus* einen septischen Schock induzieren, indem es mit dem Immun- und dem Komplementsystem interagiert und diese aktiviert. Peptidoglykan, Lipoteichonsäure und alpha-Toxin spielen hier eine Rolle (6, 61, 167). Zusätzlich dazu produzieren einige *S. aureus*-Stämme Superantigene, die zu verschiedenen Toxikosen führen wie zum Beispiel dem *toxic shock syndrome* (30, 105). Andere Stämme wiederum produzieren Epidermolysine, die das *staphylococcus scalded skin syndrome* und eine Infekt-assoziierte Impetigo bullosa auslösen können (132).

Die Regulation der Virulenzfaktoren spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese von *S. aureus*-Infektionen. Um unnötige metabolische Belastungen zu reduzieren und den jeweiligen Umweltbedingungen anzupassen, erfolgt ihre Expression in einer hochkoordinierten Weise (11). Die Expression der MSCRAMMs erfolgt so zum Beispiel vor allem in der Replikationsphase, auch exponentielle oder log-Phase genannt, während sekretierte Proteine vorwiegend in der stationären Phase exprimiert werden (11). Die Expression der MSCRAMMs in der frühen Infektionsphase ermöglicht die Initiierung und Etablierung der Infektion, die Expression zum Beispiel der sekretierten Virulenzfaktoren, wie Toxinen oder Enzymen in der späteren Phase dient der weiteren Invasion und Verbreitung der Infektion.

Eine zentrale Rolle in der Regulation der Genexpression spielen dabei vor allem zwei globale Regulatorsysteme. Neben den so genannten *quorum sensing*-

Systemen, zu denen das als am intensivsten untersuchte *accessory gene regulator* (*agr*)-System zählt, nimmt die SarA-Protein-Familie, zu der das namensgebende SarA gehört, eine wichtige Stellung bei der Regulation der Genexpression ein. Die *quorum sensing* Systeme, auch als Zwei-Komponenten-Systeme bezeichnet, ermöglichen durch Sensorproteine an der Zellmembran (erste Komponente) die Wahrnehmung verschiedener Umweltbedingungen, wie zum Beispiel der Zelldichte, und führen in einem weiteren Schritt über einen *response regulator* (zweite Komponente) und Mitglieder der zuvor erwähnten SarA-Proteinfamilie und weiterer alternativer Transkriptionsfaktoren zu einer differentiellen Expression verschiedener Gene (166, 187). Diese stellen die Effektormoleküle dieses Systems dar und ermöglichen den Bakterien neben Änderungen des Phänotyps einzelner Zellen mittels sezernierter Botenstoffe auch eine Kommunikation und damit eine interzelluläre Koordination in Abhängigkeit des vorliegenden Mikromilieus (116, 187). Insgesamt ist die Regulation der Expression der verschiedenen Virulenzfaktoren ein hochkomplexer Prozess, der in seiner Gesamtheit noch nicht vollständig verstanden ist. Die einzelnen Regulatorsysteme sind jedoch häufig mit typischen Veränderungen des Genexpressionmusters, und bestimmten Phänotypen assoziiert und ihre Wichtigkeit in der Pathogenese ist in verschiedenen Untersuchungen belegt. So haben zum Beispiel *agr*-Mutanten eine signifikant geringere Virulenz verglichen mit dem Wildtyp (12).

1.4 Biofilme

Wie oben beschrieben ist für die Persistenz der Staphylokokken im Rahmen des Infektionsprozesses insbesondere die Ausbildung von Biofilmen von herausragender Bedeutung. Biofilme werden als sessile Populationen mikrobieller Zellen angesehen, die an biologische oder künstliche Oberflächen binden und in der Folge zu einer vielschichtigen Struktur akkumulieren, in welcher die Mikroorganismen von einer extrazellulären Matrix aus polymeren Substanzen

umschlossen sind. Biofilme sind strukturell komplexe biologische Systeme und stellen in natürlichen Umgebungen häufig die dominierende bakterielle Lebensform dar, bei der sich die Bakterien bezüglich Genexpression und in der Folge auch phänotypisch deutlich von planktonischen Zellen unterscheiden (31). Die Biofilmformation ist Bestandteil einer intrinsischen bakteriellen Überlebensstrategie, die gewöhnlich im Rahmen von suboptimalen Umweltbedingungen induziert wird, und ermöglicht das Wachstum und Überleben auch unter diesen Umständen. Der Übergang von planktonischen in Biofilm-assoziierte Zellen wird grundsätzlich unter anderem durch verschiedene Umweltfaktoren induziert. So wird eine Verstärkung der Biofilmbildung beobachtet bei bestimmten Glukosekonzentrationen (13) sowie Zuständen wie Eisenlimitation (41), subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen (88), Temperaturerhöhung, hoher Osmolarität des umgebenden Mediums (88), anaeroben Bedingungen (49) oder unter Einfluss von Ethanol (147).

Mit der Ausbildung eines Biofilms geht die Notwendigkeit eines hohen Maßes an Organisation und Koordination zwischen den Zellen innerhalb des Biofilms einher. Da Biofilmbakterien in dichten mikrobiellen Verbänden existieren, ist die Verfügbarkeit von Nährstoffen und die Konzentration toxischer Abfallprodukte von der metabolischen Aktivität benachbarter Zellen abhängig.

Der Sauerstoffpartialdruck in den Mikrokolonien ist äußerst gering, zum Teil herrschen sogar anaerobe Bedingungen (93). Durch offene Fließverbindungen werden Nährstoffe zwar zum Teil in den Biofilm transportiert, gelangen aber aufgrund von Diffusionsbarrieren oft nicht bis ins Zentrum der Mikrokolonien, so dass vor allem in zentralen Anteilen des Biofilms ein Nährstoffmangel herrscht (28, 31, 97). Die Bakterien in adhärenen Biofilmen unterscheiden sich in der Folge hinsichtlich vieler Merkmale deutlich von ihren planktonischen Verwandten. Sessile Zellen exprimieren verschiedene Gene stärker oder exprimieren zum Teil andere Gene als planktonische Bakterien (21, 74, 135). Diese veränderte Genexpression hat die Ausbildung eines für Biofilme typischen Phänotyps bakterieller Zellen zur Folge. Verglichen mit planktonischen Zellen sind Bakterien

in adhärennten Biofilmen kleiner, haben eine stärker ausgeprägte Zellwand und enthalten weniger Gesamtprotein. Als besonders wichtige Eigenschaft zeigen sie des Weiteren ein stark differierendes Wachstumsverhalten. Bei zunächst exponentiellem Wachstum bei entschieden geringerer Wachstumsgeschwindigkeit findet sich ein frühes Eintreten in die stationäre Wachstumsphase (28). Molekulare Grundlage dieser Veränderungen sind eine Reihe verschiedener Regulationsysteme. Am besten untersucht sind hierbei die bereits erwähnten *staphylococcal accessory regulator (sarA)* und *accessory gene regulator (agr)*-Systeme. SarA wird in verschiedenen Studien als essentiell für die Ausbildung eines Biofilms beschrieben (4, 5, 174). Die Transkription von *sarA* wird in Biofilmen hochreguliert und Mutationen im *sarA*-Genlokus führen zu deutlich verringerter Biofilmbildung (112, 174). Dieser Effekt kann durch die externe Wirkung von Proteaseinhibitoren oder einer Deletion im Gen *nuc*, welches die thermostabile DNAse von *Staphylococcus aureus* kodiert, umgekehrt werden (171). Es ist daher vorstellbar, dass durch den bekannt negativen Einfluss von *sarA* auf die Gentranskription von *nuc* und extrazellulären Proteasen die Degradation von Proteinen und extrazellulärer DNA verhindert wird, die als wichtige Strukturelemente der Biofilme gelten (66, 139, 158) und so Biofilmbildung ermöglicht wird. Bezüglich des *agr*-Systems zeigte sich, dass eine entscheidende Voraussetzung für die Ausbildung eines Biofilms die Repression des *agr*-Systems ist (8). Die Induktion des Systems erfolgt unter anderem bei hoher Konzentration von *auto-inducing peptide (AIP)*, welches ein von den Bakterien produziertes Peptid ist und konzentrationsabhängig die Zelldichte anzeigt. Es führt unter anderem über eine Induktion extrazellulärer Proteasen und Surfactant-ähnlicher Peptide zu einer Dispersion von Zellen oder ganzen Zellverbänden aus den Biofilmen (8, 78, 82). Die beiden Systeme scheinen daher bezüglich der Biofilmregulation komplementär zu agieren, wobei sie jeweils gegensätzliche Wirkung zu haben scheinen. SarA induziert Biofilmformation durch Induktion Biofilm-fördernder Adhäsine sowie die Repression von Biofilm degradierenden Faktoren wie Proteasen und Nukleasen. Bei entsprechend hoher

Zelldichte im Biofilm wird demgegenüber durch Aktivierung des *agr*-Systems die Dispersion einzelner Teile des Biofilms gefördert, so dass es zu einer weiteren Dissemination der Infektion kommen kann. Neben den in dieser vereinfachten Darstellung genannten Regulatoren sind zahlreiche an der Biofilmregulation beteiligte Systeme wie MgrA (170), *icaR* (9), SigB (175), ArlRS (168), RsbU (74), Rbf (25), TcaR (67), Rsp (85), und *luxS* (81) bekannt, deren genaues Zusammenwirken bisher aufgrund des hohen Grades an Komplexität noch nicht überzeugend in einem zusammenfassenden Modell dargestellt werden konnte und daher Gegenstand intensivster Forschung ist.

1.4.1 Struktureller Aufbau des Biofilms

Die Entwicklung des konfokalen Rasterelektronenmikroskops (REM) ermöglichte es, den Aufbau nativer Biofilme in situ zu untersuchen (51, 148). Es konnte gezeigt werden, dass Biofilme eine heterogene und dynamische Struktur besitzen. Die Zellen im Biofilm existieren als gruppiert liegende Zellverbände, so genannte Mikrokolonien (31, 93, 120), und sind häufig in eine von ihnen produzierte Exopolysaccharidmatrix eingebettet, die bei der REM-Darstellung in Form von fibrillären Strukturen zur Darstellung kommt (Abb. 1-1). Die chemische Zusammensetzung dieser polymeren Substanz ist speziesspezifisch (165). Zwischen den matrixumschlossenen Mikrokolonien finden sich Flüssigkeitskanäle, die einen hydrodynamischen Fluss durch den Biofilm gewährleisten und eine offene Verbindung zwischen oberflächlichen und tiefen Schichten des Biofilms herstellen. Diese Kanäle ermöglichen den Nährstofftransport vom umgebenden Medium in den Biofilm und den Abtransport metabolischer Stoffwechselendprodukte (26, 31, 120, 148, 165).

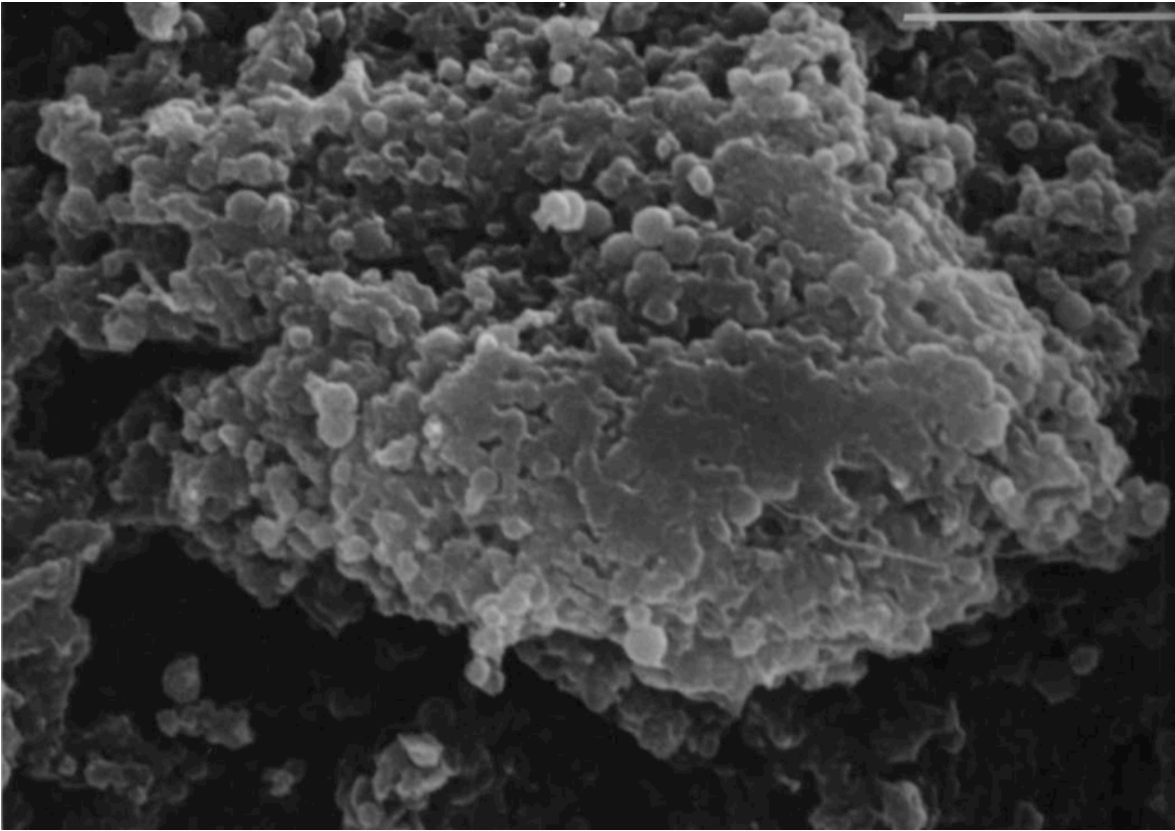


Abbildung 1-1 *S. aureus* Biofilm (aus Archer et al. 2011 (2))

1.4.2 Mechanismus der Biofilmbildung

Der Prozess der Biofilmbildung verläuft grundsätzlich in mehreren Phasen (122). In der ersten Phase erfolgt die primäre Adhäsion an eine zu besiedelnde Oberfläche. In der darauf folgenden Akkumulationsphase vermehren sich die Bakterien, bilden Mikrokolonien aus, produzieren in vielen Fällen eine charakteristische Exopolysaccharidmatrix und erzeugen somit einen vielschichtigen, reifen Biofilm (Abb. 1-2). Der letzte Schritt im Rahmen der Biofilmentstehung ist ein diskreter Prozess. Er bezieht sich auf die transiente Mobilität und die Loslösung von einzelnen Zellen und Zellhaufen des Biofilms und hat zentrale Bedeutung in der Reifung, aber auch der Ausbreitung und Disseminierung einer Infektion (122).

1.4.3 Initiale Adhärenz

Die primäre Adhärenz ist insbesondere in vivo ein komplexer Prozess. Sowohl die Bakterienoberfläche als auch die Polymeroberfläche im Falle von Fremdkörper-assoziierten Infektionen werden durch verschiedene Mechanismen von Seiten des Wirtsorganismus verändert. Durch Kontakt mit Serum beziehungsweise interstitieller Flüssigkeit können zum Beispiel Fibronektin, Fibrinogen, Kollagen oder andere Moleküle die Oberflächen der Fremdkörper beschichten und dadurch die adhäsiven Eigenschaften entscheidend beeinflussen (72, 178).

Zunächst ist die initiale Bindung von mehreren unspezifischen Charakteristika der beiden an der Adhärenz beteiligten Oberflächen abhängig. Die Oberflächenstruktur, Ladung und vor allem die Hydrophobizität haben einen Einfluss auf diesen Prozess. So verstärkt eine hydrophobe Zelloberfläche die Bindung von Staphylokokken an Polymerstrukturen. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass spezifische Bindungen notwendig sind, um eine dauerhafte Adhärenz und die Entwicklung eines Biofilms zu ermöglichen. Es sind in der Vergangenheit eine Reihe spezifischer Faktoren für die primäre Adhäsion von Staphylokokken an beschichteten oder unbeschichteten Polymeren identifiziert und untersucht worden. Insbesondere Autolysin/Adhäsine AtlE (58), sowie das Autolysin/Adhesin Aae (60) bei *S. epidermidis* und das homologe Aaa bei *Staphylococcus aureus* (57) sind aufgrund ihrer adhäsiven Eigenschaften in der Lage, diesen ersten Schritt der Biofilmformation zu vermitteln.

1.4.4 Akkumulative Phase

In einem mehrschichtigen Biofilm haben nur sehr wenige Bakterien direkten Kontakt zur Polymeroberfläche (131). Zu seiner Ausbildung sind demnach Faktoren notwendig, die eine Bindung zwischen den Zellen vermitteln können, um eine permanente und vor allem unkontrollierte Ablösung von Bakterien zu verhindern. Erste Erklärungen eines molekularen Mechanismus dieser spezifischen Bindungen bezogen sich auf die Bildung einer amorphen Substanz, die hauptsächlich aus dem interzellulären Polysaccharidadhäsine PIA besteht und

in welche die proliferierenden Bakterien eingebettet sind (56, 96). Dieses Polysaccharid ist ein lineares, aus circa 130 α -1,6-N-Acetylglucosamin-Monomeren aufgebautes Homoglykan und wurde zunächst bei *Staphylococcus epidermidis* isoliert und auf seine chemische Komposition hin untersucht (96). Jedoch kommt es ebenso bei *S. aureus*-Stämmen vor – dort als PNAG bezeichnet – und wird während des Infektionsprozesses exprimiert (20, 107). Die PIA-Biosynthese ist abhängig vom Genprodukt der *icaADBC*-Gene, die einem gemeinsamen Operon angehören (59). Bei Transposon-Insertionen innerhalb dieses Operons entstehen Mutanten, die keine interzelluläre Aggregation zeigen und daher nicht mehr Biofilm-bildend sind. Genauso zeigen sich bei *ica*-komplementierten Klonen des Biofilm-negativen Stamms *S. carnosus* große Zellaggregate, was eine PIA-vermittelte Zell-Zell-Interaktion nahelegt (56). Es hat sich gezeigt, dass *icaADBC* in beinahe allen *S. aureus*-Stämmen (43, 75, 107, 127, 146) vorkommt und ebenso bei klinisch relevanten *S. epidermidis*-Stämmen (45, 145). Trotz dieser hohen Prävalenz wurde zuletzt die Rolle von PIA/PNAG in bei der Biofilmentstehung insbesondere bei *S. aureus* in Frage gestellt. Das PIA/PNAG-degradierende Enzym Dispersin B war bei *S. epidermidis*-Biofilmen in der Lage diese aufzulösen, hatte jedoch keinen Einfluss auf *S. aureus*-Biofilme (66). Es scheinen bei vielen *S. aureus*-assoziierten Biofilmen zusätzlich vor allem Proteine und extrazelluläre DNA wichtiger struktureller Bestandteil zu sein.

Neben PIA/PNAG konnte dementsprechend für eine Reihe weiterer Faktoren eine Bedeutung in der interzellulären Adhäsion gezeigt werden, die *ica*-unabhängig verläuft und in welcher offenbar das Fehlen von PIA kompensiert werden konnte (38, 144, 154, 164, 168). Nach Mitomycin-Mutagenese von *S. epidermidis* RP62A wurde eine Biofilm-negative Mutante isoliert, bei der allein ein 140 kDa Oberflächenprotein, das sogenannte Akkumulations-assoziierte Protein Aap, nicht exprimiert wurde, während die PIA-Biosynthese nicht beeinträchtigt und auch die initiale Adhärenz unverändert war (152). Auch in *S. aureus* konnte für das homologe Protein SasG eine Rolle in der Biofilmbildung gezeigt werden (19). Der transformierte Stamm SH1000, bei welchem die Genexpression von *sasG* durch

das eingebrachte Plasmid pMUTIN4sasG induziert wurde, bildete deutlich mehr Biofilm als der Wildtyp. Auch in diesem Fall war der Biofilm nicht abhängig von *ica*. Desweiteren wurde von Cucarella et al. nach Transposon-Insertion eine *S. aureus*-Mutante isoliert, bei welcher das sogenannte *biofilm associated protein* (Bap) nicht exprimiert wurde und in Folge dessen die interzelluläre Adhäsion signifikant reduziert war (23). Es scheint, als könne Bap das vollkommene Fehlen der Funktion der *ica*-Gene kompensieren, wie eine Studie zeigt, in der das *ica*-Operon eines Bap-positiven *S. aureus*-Stammes ausgeschaltet wurde. Die Biofilmbildung war im Gegensatz zu einem Stamm, bei welchem weder PIA noch Bap exprimiert wurden, nicht beeinträchtigt (24). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass das Bap-Protein bei der Biofilmbildung humanpathogener Stämme keine Bedeutung hat, da sich das entsprechende Gen *bap* nur bei Isolaten infizierter Rinder findet. Zuletzt wurde auch für Protein A eine Biofilm-vermittelnde Funktion gefunden. Bei einer *ica*-Deletionsmutante war der Biofilm-positive Phänotyp abhängig von *spa* (109). Auch für die bereits erwähnten Fibrinogen-bindenden Proteine (FnBPs) konnte eine Rolle in der Biofilmbildung gefunden werden (118). Insgesamt unterstützen diese Arbeiten die Hypothese, dass insbesondere bei *S. aureus* Protein-vermittelte Zell-Zell-Bindung in vielen Fällen das Fehlen von PIA kompensieren kann. Ein weiterer wichtiger Bestandteil von Biofilmen ist wie erwähnt extrazelluläre DNA (eDNA). Die Mutation des *cidA* Gens, welches an der Regulation von Apoptose beteiligt ist, führte zu einem deutlich geringeren Anteil an eDNA in der Biofilmmatrix. Die Behandlung dieses von eDNA unabhängigen Biofilmtypus mit DNaseI führte nicht zu einer Dispersion, während der eDNA enthaltende Biofilm des Wildtypstamms durch die DNaseI deutlich vermindert wurde (139). Im Hinblick auf eDNA gibt es weitere Möglichkeiten, DNA in der Biofilmmatrix zu akkumulieren. So ist das während der Biofilmbildung hochregulierte *Staphylococcus aureus* Autolysin Atl durch seine Fähigkeit zur Hydrolyse von Zellen in der Lage, die Biofilmmatrix mit eDNA zu verstärken. In Zusammenschau ist es sehr wahrscheinlich, dass bei der Biofilmbildung unterschiedliche Mechanismen Bedeutung haben, welche sich ergänzen oder

einander gegenseitig kompensieren können. Diese könnten möglicherweise auch abhängig von Umweltbedingungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Biofilmentstehung zum Tragen kommen.

1.4.5 Dispersion

Nach und wahrscheinlich bereits während der Akkumulation muss im Hinblick auf die Versorgung aller Zellen des Biofilms mit Nährstoffen eine diesen Anforderungen gerecht werdende Biofilmarchitektur aufgebaut werden. Dieser notwendigerweise fein regulierte Prozess beinhaltet eine kontrollierte Ablösung einzelner Zellen oder ganzer Zellverbände und wird mit dem Begriff Biofilmstrukturierung (engl. *biofilm structuring*) beschrieben (123). Um eine geordnete Dispersion möglich zu machen, sind verschiedene Regulationssysteme wie das bereits erwähnte *agr*-System notwendig. Bezüglich der Effektormoleküle dieser Regulationsmechanismen sind zuletzt Surfactant-ähnliche Peptide (PSM, phenol-soluble modulins) in den Fokus der Forschung gekommen (128). Diese Moleküle vermitteln sowohl die Ausbildung der charakteristischen Kanäle innerhalb des Biofilms, als auch die Ablösung und Disseminierung von Zellen aus dem Biofilmverband. Daneben gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von extrazellulären Proteasen (8) und DNA degradierenden Enzyme (100) an diesem Prozess.

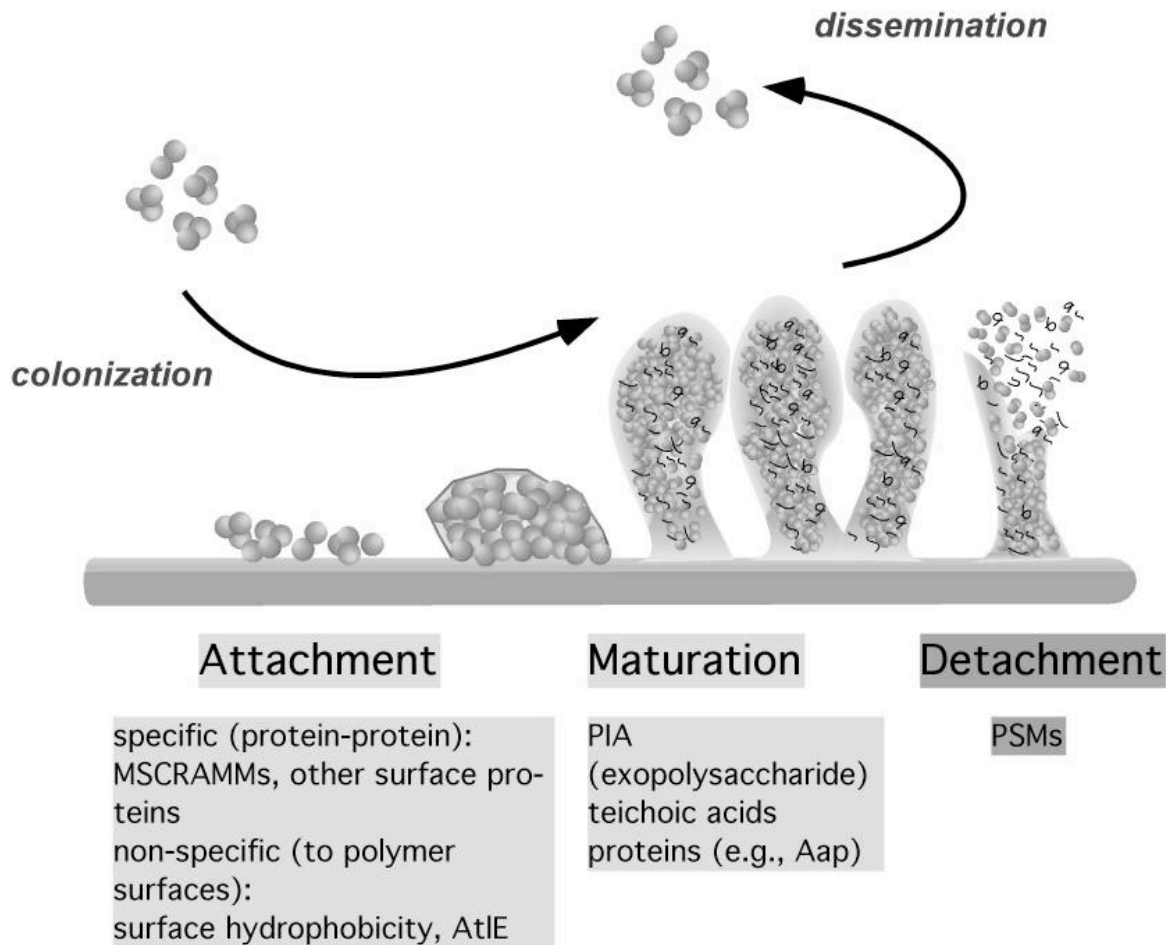


Abbildung 1-2 Mechanismus der Biofilmenstehung (aus Otto et. al 2008 (122))

Schematische Darstellung der Phasen der Biofilmentstehung: initiale Adhärenz (*attachment*), akkumulative Phase (*maturation*) sowie Dispersion (*detachment*) mit beteiligten Faktoren

1.5 Biofilm-assoziierte *S. aureus*-Infektionen

Es ist heutzutage grundsätzlich anerkannt, dass Biofilme insbesondere bei chronischen Infektionen eine bedeutende Rolle spielen. Einen kausalen Zusammenhang im Rahmen der Pathogenese dieser Infektionen im Sinne der Kochschen Postulate zu beweisen ist jedoch schwierig. Daher werden aktuell Infektionen als Biofilm-assoziiert angesehen, wenn die Präsenz von adhärennten, in einer Matrix eingebetteten Bakterienclustern nachgewiesen werden kann, die

eine erhöhte Antibiotikaresistenz verglichen mit planktonischen Zellen besitzen (124). Vor allem die bei Staphylokokken-Infektionen häufig beobachteten chronischen und remittierenden Infektionen stellen ein besonderes medizinisches Problem dar (52) und können nach den genannten Kriterien in der Regel als Biofilm-assoziiert gelten. Des Weiteren bieten gerade im Rahmen der medizinischen Versorgung verwendete medizinische Fremdkörper Oberflächenstrukturen, auf welchen Staphylokokken vorzugsweise adhären und Biofilme bilden. Diese sind unter anderem intravenöse Katheter, Gelenkprothesen, Herzschrittmacher und künstliche Herzklappen. Bakterien in Biofilmen sind gut geschützt gegen die Immunabwehr und in hohem Maße resistent gegen Antibiotika (63, 69, 76, 162). Selbst durch eine hochdosierte und gezielte Antibiotikatherapie können viele Biofilme nicht eliminiert werden (69, 162). Diese Eigenschaften liefern eine Erklärung für die oft chronische und therapieresistente Natur von Infektionen mit *S. aureus*, aber auch *S. epidermidis*. Da in der klinischen Krankenversorgung aktuell sehr häufig Fremdkörper zum Einsatz kommen, die wie oben beschrieben ideale Bedingungen für Biofilmbildung liefern, steht *S. aureus* vor allem bei nosokomial erworbenen Infektionen als Erreger nunmehr an erster Stelle. Von allen nosokomialen Infektionen sind ungefähr 65 % mit Biofilmbildung assoziiert (162).

1.5.1 Mechanismen der Antibiotikaresistenz in Biofilmen

Eine intrinsische Eigenschaft von Biofilmen ist wie bereits beschrieben eine erhöhte Resistenz sowohl gegenüber einer Antibiotikatherapie (69, 76, 162) als auch dem wirtseigenen Immunsystem, was entscheidend zur Persistenz des bakteriellen Erregers beiträgt (99, 161). Adhärenzte Biofilmbakterien zeigen eine bis zu 1000-fache Erhöhung der Resistenz gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Substanzen verglichen mit planktonischen Zellen der gleichen Spezies (95). Der verminderten Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika liegen eine Reihe von Mechanismen seitens der Bakterien zugrunde, von denen ein verändertes bakterielles Wachstumsmuster insbesondere in tiefen Schichten des

Biofilms, ein differierender Phänotyp sowie eine insgesamt abweichende Genexpression und die Ausbildung einer Diffusionsbarriere mittels extrazellulärem Polysaccharid zu den Wichtigsten gehören (27, 46). Durch das Zusammenspiel dieser unterschiedlichen Faktoren kommt es bei Biofilmbildenden Bakterien unter antibiotischer Therapie insgesamt nur zu einem Abtöten der Bakterien, welche sich in den Randbereichen der Mikrokolonien befinden, während die tiefer liegenden Zellen häufig nicht eliminiert werden können. Jene bilden wiederum einen Nidus, der zu persistierenden und wiederkehrenden Infektion beiträgt (64, 189).

Durch die Expression von Exopolysaccharid wird beispielsweise die Diffusion von antimikrobiellen Substanzen erschwert und die Wirkung einzelner antibiotischer Moleküle durch Interaktionen mit verschiedenen Matrixmolekülen abgeschwächt (32, 157). Weiterhin sind Biofilm-assoziierte Zellen verglichen mit planktonischen Zellen durch eine reduzierte Wachstumsrate gekennzeichnet, was zu einer geringeren Aufnahme antimikrobieller Substanzen und im Speziellen bei beta-Lactam-Antibiotika zu einer verminderten Wirkung führt (31). So hat eine reduzierte Wachstumsrate auch bei Fluorchinolonen einen direkten Einfluss auf die Empfindlichkeit von *S. epidermidis*-Biofilmen (33). Aktuelle Studien zeigen, dass hauptsächlich so genannte Persisterzellen, die eine phänotypische Variante bei in Biofilmen organisierten Bakterien darstellen, für die Antibiotikaresistenz verantwortlich sind (1). Bei einem Mangel an Nährstoffen oder anderen extremen Umweltbedingungen teilen bakterielle Zellen sich nicht weiter, sondern konvertieren langsam zu Persisterzellen. Diese können vom Persisterstatus zu einem späteren Zeitpunkt zum normalen Phänotyp revertieren und dann ein Nachwachsen des Biofilms bewirken (141, 153).

1.5.2 Immunevasion

Haupteffektorzellen des Immunsystems im Kampf gegen Staphylokokken-Infektionen sind polymorphkernige Granulozyten (PMN). Sie werden chemotaktisch angelockt, phagozytieren und töten die aufgenommenen

Mikroorganismen mit oxidativen (Sauerstoffradikalproduktion) und nicht-oxidativen (Defensinausschüttung) Mechanismen (47) ab. Erstgenannter Mechanismus führt über die Bildung toxischer Sauerstoffradikale durch Enzyme wie Myeloperoxidase und NADPH-Oxidase zur Zerstörung der phagozytierten Bakterien (113). Defensine sind kleine kationische antimikrobielle Peptide (CAMPs), die ubiquitär in der Natur vorkommen und in erster Linie die bakterielle Zytoplasmamembran schädigen. Dies führt über die Erhöhung der Permeabilität und den Zusammenbruch des Membranpotentials zum Zelltod (18, 47, 155). Als Beispiele seien die humanen neutrophilen Proteine (HNP 1-3) genannt, die in den Granula humaner PMN gespeichert sind und nach der Ingestion von Mikroorganismen ausgeschüttet werden. *S. aureus* ist resistent gegenüber einer Vielzahl von Defensinen und bakteriolytischen Enzymen (188). Die Entdeckung zweier *S. aureus*-Gene (*dlt* und *mprf*) zeigte, dass dabei vor allem die Oberflächenladung der Zellmembran eine Rolle spielt. Das Vorhandensein des *dltABCD* Operons führt zum vermehrten Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren der bakteriellen Zellwand. Das *mprf*-Gen kodiert für MprF, welches die Modifikation von Membranlipiden mit L-Lysin vermittelt. Beide Mechanismen reduzieren die Oberflächennegativität von *S. aureus*, erschweren somit die Bindung der positiv geladenen Defensine und stellen entscheidende Resistenzfaktoren gegen nicht-oxidative Abwehrmechanismen von PMN dar (79, 80, 129, 130). Auch die Ladung der CAMPs scheint von Bedeutung zu sein. *S. aureus* ist resistent gegen die humanen-beta-Defensine HBD1 und HBD2, die von diversen menschlichen epithelialen Zellen produziert werden (149). Es konnte jedoch ein drittes beta-Defensin HBD3 aus epidermalen Keratinozyten von Psoriasis-Patienten isoliert werden, welches bakterizide Aktivität gegen *S. aureus* besitzt (68). HBD3 unterscheidet sich neben der höheren Affinität zur Dimerbildung in Lösungen durch eine höhere positive Oberflächenladung als HBD1 und HBD2, was als Ursache für die Bakterizidität gegen *S. aureus* vermutet wird (149). Gegenüber toxischen Sauerstoffmetaboliten sind planktonische *S. aureus*-Einzelzellen in vitro sensibel und werden von PMNs effizient abgetötet,

wenn die Produktion von Sauerstoffradikalen gewährleistet ist (68). Sind PMNs jedoch nicht in der Lage, toxische Sauerstoffmetabolite zu bilden, können *S. aureus*-Bakterien nicht suffizient abgetötet werden. Dieses wurde am Beispiel von Patienten entdeckt, die an einer chronischen septischen Granulomatose (engl. chronic granulomatous disease) litten und deren PMNs aufgrund eines erblichen Defektes keine Sauerstoffradikale bilden konnten (90).

Adhärenente *S. aureus*-Zellen hingegen induzieren im Vergleich zu planktonischen *S. aureus*-Zellen eine reduzierte Superoxidanionenproduktion von PMNs (138). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres Polysaccharid per se die Sauerstoffradikalproduktion der PMN reduziert (84). Untersuchungen mit dem Bakterium der oralen Flora *Streptococcus mutans* zeigten, dass die Produktion von Exopolysacchariden die bakterizide Aktivität von PMN durch Formation einer physiologischen Barriere und Reduktion der Sauerstoffradikalproduktion vermindert (159). Leid et al. (86) zeigten in einem in-vitro Modell, dass humane Leukozyten an einen sieben Tage alten *S. aureus* Biofilm adhäreren und auch tief in den Biofilm eindringen können, wenn dieser unter dem Einfluss laminärer Scherkräfte gebildet wurde. Sie sind jedoch nicht in der Lage, die *Staphylokokken* im Biofilm zu phagozytieren, wohingegen planktonische *S. aureus*-Zellen aktiv phagozytiert werden. Erfolgt die Biofilmbildung unter statischen Bedingungen, können die Leukozyten zwar an die Oberfläche eines zwei Tage alten Biofilms binden, ihn aber nicht penetrieren (86). *S. aureus* bildet unter statischen Bedingungen deutlich mehr Biofilm und dieser enthält mehr extrapolymeres Substrat (in diesem Fall PIA) als ein unter dem Einfluss von Scherkräften entstandener Biofilm (160). Vuong et al. zeigten, dass PIA per se *S. epidermidis* vor Phagozytose durch humane PMN schützt (179). Somit bildet der Biofilm eine Art mechanischen Schutz gegen Angriffe des menschlichen Immunsystems und zusätzlich besteht die Vermutung, dass PIA *S. aureus* direkt vor Phagozytose schützt.

1.6 Sortase und LPXTG-Motif

Die Zellwand gram-positiver Bakterien ist eine makromolekulare, exoskeletale Struktur, die sich an designierten Stellen organisiert und verändert. Funktionell erlaubt die Zellwand eine Interaktion mit der Umwelt der Bakterien, im Speziellen mit infizierten Geweben. Unabdingbar ist in diesem Zusammenhang die korrekte räumliche Anordnung der oberflächlichen Proteine und Enzyme, welche ebendiese Funktionen erfüllen (114). Es gibt diesbezüglich zwei grundsätzliche Mechanismen, das *sorting* und das *targeting*, wobei *sorting* den Vorgang der kovalenten Bindung von Oberflächenproteinen an das Peptidoglykan der Zellwand beschreibt, während *targeting* auf der Herstellung einer korrekten, nichtkovalenten Bindung zwischen spezifisch aufgebauten Domänen der Proteine einerseits und polymeren Molekülen der Zelloberfläche wie beispielsweise Polysacchariden oder Teichonsäuren andererseits beruht (114). Das *sorting* der Oberflächenproteine gram-positiver Bakterien beruht auf der Funktion des Enzyms Sortase (102), welches eine Transpeptidationsreaktion zwischen dem zuvor abgespaltenen N-Terminus des Oberflächenproteins und Peptidoglykanvorstufen der noch nicht polymerisierten Zellwand katalysiert (102, 169). Das für diesen Vorgang benötigte Signal besteht aus einem LPXTG-Motif, einer C-terminalen hydrophoben Domäne und einem geladenen Endteil, welche innerhalb des C-terminalen Endes der Gram-positiven Bakterien zu finden sind (37, 150).

Die wichtige Rolle, welche das Enzym Sortase beziehungsweise die von dieser an der bakteriellen Oberfläche verankerten Proteine in der Pathogenese von Infektionen mit Staphylokokken einnimmt, wurde in einer Vielzahl von experimentellen Studien gezeigt (70, 101, 163, 183). Auf diesen Erkenntnissen basierend sind erste erfolgreiche Versuche gemacht worden, ein Vakzin auf Grundlage dieser Oberflächenproteine zu entwickeln (163). Welche der bekannten Staphylokokkenproteine in diesem Zusammenhang als Vakzine am geeignetsten sind, hängt sicherlich von Ihrer jeweiligen Funktion und Bedeutung im Rahmen der Pathogenese ab und ist Gegenstand aktueller Forschung.

1.7 SasC

Nachdem ihre Charakteristika auf Ebene der Aminosäuresequenz bekannt wurden, wurden die ORFs (open reading frames) teilweise komplett sequenzierter Genome sechs verschiedener *S. aureus*-Stämme auf mögliche Oberflächenproteine hin untersucht (142). Neben elf bereits untersuchten wurden in diesem Zusammenhang zehn weitere, ein LPXTG-Motif enthaltende Oberflächenproteine identifiziert (142), welche der Namensgebung von Mazmanian et al. folgend *Staphylococcus aureus* surface (Sas) proteins genannt wurden (103). Die von Roche et al. (142) durchgeführte bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenzen dieser Proteine zeigte für das im Rahmen dieser Dissertation untersuchte SasC neben dem sogenannten (Y/F)SIRK-Signal eine modulare Organisation, bei der eine N-terminale, 585 Aminosäuren lange sogenannte A-Region gefunden wird, dessen vorausgesagte Sekundärstruktur Ähnlichkeit zu den A-Regionen der bereits beschriebenen Clf-Sdr Proteine aufweist. Dieser Region folgen zwei 300 Aminosäuren lange Domänen mit 38% Identität. Innerhalb der zweiten dieser Domänen findet sich ein 12 Aminosäuren umfassendes Motif [AT(D/T)EEKQ(A/V)A(L/V)NQ], welches noch zwei Mal wiederholt wird (142).

1.8 Fragestellung

Da die Zellwand der Bakterien eine Interaktion mit der Umwelt erlaubt und daher im Rahmen der Pathogenese eine wichtige Rolle spielt, wurden in der Vergangenheit eine Reihe von Oberflächen- und oberflächenassoziierten Proteinen untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese wichtige Virulenzfaktoren darstellen und unter anderem Adhärenz an Komponenten der extrazellulären Matrix des infizierten Wirts oder Serumproteine vermitteln (40, 127). Desweiteren sind sie an der Immunevasion und Invasion von epithelialen und endothelialen Zellen beteiligt (126). Auch im Hinblick auf die pathogenetisch wichtige Fähigkeit,

Biofilme zu bilden, wurde bei einigen dieser Proteine eine wichtige Bedeutung gefunden (19, 48, 109). Es gibt jedoch eine Reihe von Proteinen, die erkennbar an einem LPXTG-Motif an ihrem C-terminalen Ende kovalent mit der Zellwand verbunden sind, aber noch nicht Gegenstand intensiver Untersuchungen wurden. In dieser Arbeit sollte daher die Funktion des bisher nicht charakterisierten Oberflächenproteins SasC untersucht werden, um eine mögliche Rolle bei der Pathogenese von Staphylokokkeninfektionen zu eruieren. Es sollte zunächst überprüft werden, wie oft das kodierende Gen *sasC*, das in allen bisher komplett sequenzierten *S. aureus*-Genomen gefunden wurde, in klinischen Isolaten vorkommt, um eine niedrige Prävalenz des Gens und eine dadurch angedeutet geringere Bedeutung des Proteins bei pathogenen Stämmen auszuschließen. Zum Zweck der funktionellen Charakterisierung sollte ein das *sasC*-Gen heterolog exprimierender *S. carnosus* Stamm insbesondere auf mögliche adhäsive Eigenschaften im Vergleich zu seinem Wildtyp untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Organismen und Vektoren sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Spezies	Stamm		Charakteristika	Referenz
<i>Staphylococcus aureus</i>	COL		Klinikisolat, Methicillin-resistent	Dyke, Jevons und Parker, 1966
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA113 35556)	(ATCC	Restriktionsnegatives Derivat von <i>S.</i> <i>aureus</i> NCTC 8325, Biofilm-positiv	Iordanescu und Surdenau, 1976
<i>Staphylococcus aureus</i>	4074		Klinikisolate, FnBP- positiv	Heilmann et al., 2002
<i>Staphylococcus carnosus</i>	TM300		Klonierungseinheit	Schleifer und Fischer, 1982
<i>Staphylococcus carnosus</i>	TM300(pSasC4047)		Wildtyp, pCX19sasC- transformiert	Schroeder et al., 2009

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pCX19(sasC4074)	sasC-enthaltender pCX19	Schroeder et al., 2009
pCX19	Low-copy-number Plasmid, Xylose-induzierbar, Chloramphenicol- Resistenzgen, <i>Bam</i> HI und <i>Sma</i> I Restriktionsstellen, (5.8 kb Cm ^R)	Krismer, B. A., 1999

Die bei der Prävalenzstudie verwendeten Stämme sind klinische Isolate von Patienten des Universitätsklinikums Münster und nach Resistenzverhalten im Rahmen der Ergebnisse im Anhang tabellarisch dargestellt (vgl. Tab 6-1 und 6-2).

2.1.2 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg bezogen.

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz
CHsasC1for	5' – GCA ACG AAT CAA GCA TTG G -3'
CHsasC2rev	5' – TGA CAG CAC TTC GTT AGG – 3'

2.1.3 Enzyme

Lysostaphin	Ambi Products LLC, NY, USA
Trypsin-EDTA	Biochrom KG, Berlin
DNAse	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

2.1.4 Antibiotika

Chloramphenicol (Stammlösung 10 mg/ml) Serva, Heidelberg

2.1.5 Chemikalien

Agarose Multi Purpose	LE Segenetic, Borken
Acrylamid (30%)/ Bisacrylamid (0,8%)	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Albumin Fraktion V) (pH 7,0)	AppliChem, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Columbia-Fertigagar	Becton Dickinson, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue	G250 Serva, Heidelberg
Coomassie Protein Assay Reagent	Pierce, Perbio Science, Bonn
D (+)-Glucose-Monohydrat (Dextrose)	Merck, Darmstadt
DNA-Größenstandard: 1 kb DNA <i>ladder</i>	Biolabs, Frankfurt
DNA-Größenstandard: 100 bp DNA <i>ladder</i>	Biolabs, Frankfurt
DNA-Größenstandard: λ DNA <i>HindIII</i> fragments	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Mix	Roth, Karlsruhe
D-PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fibrinogen	Calbiochem, Darmstadt
Fibronektin	Roche, Mannheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Imidazol	Roth, Karlsruhe
IPTG	AppliChem, Darmstadt
Kaninchenplasma (STAPH-ASE)	Biomérieux, Lyon, Frankreich
LB-Agar	Becton Dickinson, Heidelberg

LB-Medium	Becton Dickinson, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
NBT	Merck, Darmstadt
Ni-NTA	Agarose Qiagen, Hilden
Protein-Größenstandard: Page Ruler™ Prestained Protein ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Schafblut	Oxoid, Wedel
10% SDS	Invitrogen, Karlsruhe
Sigma Fast™ <i>p</i> -Nitrophenyl-Phosphate Tablet Sets (pNPP Alkaline Phosphatase Substrat)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Skim Milk Powder	Unipath Ltd., England
TEMED (N, N, N'-Tetramethylethylendiamin)	Bio-Rad, München
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris-Base <i>ultrapure</i>	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	Merck, Hohenbrunn
TSB	Difco Laboratories, Augsburg
Vitronektin	BioPur AG, Bubendorf, Schweiz

2.1.6 Laborgeräte

<i>Anthos fluido microplate washer</i>	Anthos, Eugendorf, Österreich
Biofuge fresco Düsseldorf	Heraeus Instruments GmbH,
<i>Block Heater</i>	Stuart Scientific Co. Ltd., UK
Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Centricon <i>Centrifugal Filter Devices</i> (10,000 MWCO)	Millipore, Schwalbach
Elektrophoresekammern <i>sub-cell</i> ® GT	Bio-Rad, München
Erlenmeyerkolben	Duran, Mainz
Filterpapier Schleicher & Schuell	Bioscience GmbH, Dassel

Greiner-Röhrchen (steril)	Greiner bio-one, Solingen
Inkubator Typ B 6200 (Heraeus)	Kendro, Langenselbold
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Microplatte 96 Well F-Form	Greiner bio-one, Solingen
Mikrowelle Panasonic ProII 1400	Niggestrach Grossküchentechnik,
Münster	
Minishaker MS1 IKA	Labortechnik, Staufen
Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments GmbH,
Düsseldorf	
Multiron HAT Schüttelinkubator	Infors, Übach-Patenberg
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Ni-NTA <i>Spin Columns</i>	Qiagen, Hilden
Ni-NTA <i>Superflow Columns</i>	Qiagen, Hilden
pH-Meter inoLab	WTW GmbH, Weilheim
Photometer Ultrospec® 1000	Pharmacia Biotech, Uppsala,
Schweden	
Pipetten Eppendorf® Reference Series 2000	Eppendorf, Hamburg
Schüttler KS 501 digital	IKA Labortechnik, Staufen
Slab Gel Dryer SGD4050	Savant Instruments, USA
Spannungsgeber Power Pac 300	Bio-Rad, München
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Instruments GmbH,
Düsseldorf	
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	NeoLab, Heidelberg
Transferpipette®-12	Brand, Wertheim
VersaMax™ <i>tunable microplate reader</i>	Molecular Devices, Sunnyvale,
USA	
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Rieber Normset, Reutlingen
Ultrospec 1100 pro	Amersham Bioscience, England

2.1.7 Kits

QIAamp®DNA Mini Kit

Qiagen, Hilden

QIAquick® *PCR Purification Kit*

Qiagen, Hilden

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht und Stammhaltung der Bakterien

Die Anzucht der verwendeten Bakterienstämme erfolgte in Flüssigmedien oder auf Agarnährböden bei 37°C. Die Flüssigkulturen wurden durch Schütteln bei 37°C und 160 rpm in Erlenmeyerkolben belüftet. Die Anzucht der Staphylokokkenstämme auf Festmedium fand auf Blut-Agar-Nährböden üN bei 37°C statt. Der *S. carnosus*-Transformant wurde zwecks Selektion auf mit Chloramphenicol (10 µg/ml) versetzten TSB-Agarplatten angezogen. Die Kulturen wurden danach bei 4°C gelagert und in vierwöchigen Abständen auf frische Nährböden überimpft.

Um die Stämme über einen längeren Zeitraum zu konservieren, wurden Gefrier Röhrchen mit 1 ml TSB-Medium und 20% Glycerin verwendet. Das TSB-Medium enthielt bei dem Stamm *S. carnosus* (pSasC4074) zusätzlich 10 µg/ml Chloramphenicol. Die Stämme wurden üN bei 37°C inkubiert und die Röhrchen anschließend bei -70°C gelagert.

Die zur Anzucht von *S. aureus* und *S. carnosus* verwendeten Medien wurden folgendermaßen hergestellt:

Tryptic Soy Broth-Medium (TSB)	3% Tryptic Soy Broth pH 7,2
--------------------------------	--------------------------------

Brain Heart Infusion-Medium (BHI)	3,7% Brain Heart Infusion pH 7,3
-----------------------------------	-------------------------------------

Blut-Agar	Columbia-Fertigagar (42,5 g/l) mit Schafblut: 1,2% pankreatisch abgebautes Casein 0,5% peptisch abgebautes Tiergewebe 0,3% Hefextrakt 0,3% Rindfleischextrakt 0,1% Maisstärke 0,5% NaCl 1,3% Agar 5% Schafblut, defibriniert pH 7,3
-----------	---

2.2.2 Isolierung chromosomaler DNA

Zur Isolierung chromosomaler DNA wurde das QIAamp®DNA Mini Kit verwendet. Es wurden einige Kolonien einer auf Blutagarplatten angezogenen Übernachtskultur in 180 µl TE Puffer suspendiert und mit 15 µl Lysostaphin einer Konzentration von 2 mg/ml behandelt. Nach einer halbstündigen Inkubation bei 37 °C wurden 25 µl Proteinase K und 200 µl AL Puffer hinzupipettiert und ausgiebig geschüttelt. Nach Erhitzen auf 56 °C für 30 min und 5 min bei 95 °C wurden 200 µl Ethanol hinzugegeben, die Suspension wurde auf eine Anionenaustauschersäule gegeben und bei 9000 rpm 1 min zentrifugiert. Nach Umsetzen der Säule und der Zugabe des AW1-Puffers wurde dieser Schritt wiederholt. Nach Verwerfen des Zentrifugats wurden 500 µl AW2-Puffer hinzugefügt und für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert, bevor die Austauschersäule in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß platziert und 200 µl AE-Elutionspuffer zugegeben wurden. Nach Inkubation bei 56 °C für 1 min schloß sich ein letzter Zentrifugationsschritt bei 9000 rpm für 1 min an. Das Zentrifugat wurde zur Mengen- und Reinheitsbestimmung photometrisch gemessen und per Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration der DNA-Isolate wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Anhand der Extinktion kann auf den DNA-Gehalt einer Lösung geschlossen werden, wobei einer $OD_{260} = 1$ 50 µg/ml doppelsträngiger (ds) DNA entspricht. Da dieser bei einem pH von 7,0 gilt, wurden die zu untersuchenden DNA-Lösungen im Verhältnis 1:9 mit TE-Puffer versetzt. Anhand des Quotienten von OD_{260} und OD_{280} wurde der Grad an Verunreinigung durch Protein oder Phenol bestimmt, wobei ein Verhältnis von 1,8 für ein reines DNA-Isolat spricht und bei signifikant kleinen Werten eine Kontamination spricht. Anhand der Bestimmung des Verhältnisses von OD_{230} zur OD_{260} , das im Idealfall bei 0,45 liegen sollte, wurde des Weiteren auf eine mögliche Verunreinigung durch hauptsächlich Polysaccharide geprüft.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein molekularbiologisches Standardverfahren, um DNA und RNA ihrer Größe nach aufzutrennen. Diese Auftrennung wird durch die Tatsache ermöglicht, dass die Wanderungsgeschwindigkeit der in Agarose-Gel eingebrachten Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld von Größe und Form der Moleküle abhängt. Nach erfolgter Elektrophorese werden die Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht beurteilt. Die Größe von DNA-Molekülen lässt sich durch den Vergleich der Laufstrecken der untersuchten Nukleinsäuren mit denen von Standardmarkern bekannter Größe und Zusammensetzung abschätzen, während die Menge anhand eines Vergleichs der Intensität ungefähr ermittelt werden kann.

Puffer und Lösungen:

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer, 50x)

Tris	2 M	pH 8,2
Essigsäure	1 M	
EDTA	0,1 M	

TAE-Puffer (1x)		
Tris	4 mM	pH 8,0
EDTA	2 mM	

Agarosegel-Lösung (1%)	
Agarose	2,5 g
TAE-Puffer (1x)	250 ml

Ethidiumbromid-Stammlösung (1 µg/ml)	
EtBr-Lösung (10 mg/ml)	25 µl
TAE-Puffer (1x)	250 ml

Probenpuffer (2 x)		
Orange G	0,15 %	
Xylencyanol	0,03 %	
Tris-HCl	10 mM	pH 7,6
EDTA	60 mM	
Glycerol	60%	

Durchführung:

Abhängig von der Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurde ein Agarosegel aus 1-2% (w/v) Agarose in 100 ml 1xTAE-Puffer hergestellt. Zu den Proben wurden 1/5 Volumen Probenpuffer zugesetzt und in die Geltaschen gefüllt. Als Standard wurden die 1 kb DNA-Leiter oder die DNA-Längenstandards λ DNA *Hind*III verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 80-140 Volt in TAE-Puffer durchgeführt, wobei die Stromstärke 60-

130 mA betrug. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15-20 min in die Ethidiumlösung gelegt und daraufhin 5 min in Leitungswasser entfärbt. Die so angefärbten DNA-Banden wurden unter UV-Licht erkennbar gemacht und photographisch festgehalten.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die gezielte, exponentielle in-vitro-Vervielfältigung eines genau definierten DNA-Abschnitts. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass Oligonukleotide beliebiger Sequenz, in diesem Fall eines bestimmten DNA-Abschnitts komplementär, synthetisch hergestellt werden können und dann durch Hybridisieren dieser sogenannten Primer mit der als Matrize dienenden Template-DNA der Startpunkt einer DNA-Polymerisation festgelegt ist. Um einen zu amplifizierenden DNA-Abschnitt beidseitig zu begrenzen, wird jeweils ein Primerpaar verwendet. Die PCR vollzieht sich in mehreren Phasen. Zunächst werden die beiden DNA-Doppelstränge durch Erhitzen auf circa 95°C voneinander getrennt. Im nachfolgenden *annealing* lagern die Primer am komplementären 5'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz beider Stränge an, was abhängig von der Primersequenz bei Temperaturen von 45°C und 60°C geschieht. In der nachfolgenden Phase wird ein komplementärer DNA-Strang von den angelagerten Primern an in 3'-Richtung fortschreitend synthetisiert. Dies geschieht bei einer Temperatur von 68°C -72°C, abhängig vom Temperaturoptimum der verwendeten, hitzestabilen *taq*-DNA-Polymerase. Als Substrat dieser Reaktion dienen Desoxyribonukleotidtriphosphate, auch dNTPs genannt, die dem Reaktionsansatz zugegeben werden müssen. Nach üblicherweise 30 Wiederholungen dieser Schritte ist eine exponentielle Vervielfältigung eines durch die Primerwahl genau definierten Abschnitts der Template-DNA erreicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR genutzt, um einen repräsentativen Abschnitt innerhalb von *sasC* zu amplifizieren und damit das Vorhandensein des

Gens im Genom der klinischen Isolate zu zeigen. Als Primer wurden dazu folgende Oligonukleotide verwendet:

	Primer	Sequenz 5' - 3'
sasC	CHsasC1for	GCA ACG AAT CAA GCA TTG G
	CHsasC1rev	TGA CAG CAC TTC GTT AGG

Folgender PCR-Reaktionsansatz wurde für die Amplifikation des repräsentativen Genabschnitts in sasC gewählt:

PCR-Reaktionsansatz	
PCR-Puffer + MgCl ₂	5 µl
CHsasC1for	0,5 µl
CHsasC1rev	0,5 µl
Biopur Enzymmix	0,75 µl
H ₂ O HPLC	42,25 µl
Genomische DNA	1 µl

Nachdem die genomische DNA der klinischen Stämme isoliert wurde, wurden nach obigem Schema Reaktionsansätze auf Eis hergestellt und in 200 µl Reaktionsgefäßen im Thermocycler platziert. Nachdem die optimale *annealing*-Temperatur zuvor mit Hilfe der *annealing*-Temperaturgradient-Funktion des Thermocyclers ermittelt wurde, wurden alle Proben mit folgenden Einstellungen amplifiziert:

Initiale Denaturierung	92 °C	3 min
Denaturierung	92 °C	30 s
Annealing	49 °C	30 s
Elongation	68 °C	40 s
Terminale Elongation	68 °C	10 min
Kühlung	4 °C	∞

2.2.6 Reinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick *PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt und anschließend mit 30 µl Elutionspuffer (Kit) von der Säule eluiert. Die Aufreinigung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.7 Genexpression in *S. carnosus* (pSasC4074)

Die Expression von *sasC* erfolgte im mit pCX19-transformierten *S. carnosus* TM300 durch Induktion mit dem Zusatz von Xylose (1% Endkonzentration). Der zur Transformation verwendete Vektor pCX19 ist ein Derivat des Expressionsvektors pCX15 und enthält neben einem der Selektion dienenden Chloramphenicol-Resistenzgen einen Xylose-induzierbaren Promoter. Die Expression des SasC-Proteins wurde danach mit Hilfe einer SDS-PAGE überprüft.

2.2.8 Isolierung von Oberflächen-assoziierten Proteinen

Um kovalent an die Zellwand gebundene Proteine zu isolieren, wird ein Lysostaphinlysat hergestellt. Lysostaphin ist eine von *Staphylococcus simulans* produzierte Metalloendopeptidase, die spezifisch Glycyl-Glycin-Verbindungen spaltet. Diese sind Bestandteil der Peptidbrücken zwischen zwei Polysaccharidketten des Peptidoglykans der Zellwände von Staphylokokken.

Durch Behandlung mit Lysostaphin werden so zellwandgebundene Proteine freigesetzt, welche dann weiter untersucht werden können.

Tris-gepufferte Kochsalzlösung		
Tris/HCl	0,05 M	pH 7,4
NaCl	0,125 M	
In H ₂ O _{dest}		
Lysostaphin	2 mg/ml	
DNase	1 mg/ml	

Durchführung:

Die Übernachtskultur eines frisch überimpften Stammes wird in 500 ml BHI, welche mit 1% Xylose und 10 µl/ml Chloramphenicol versetzt sind, eingepflegt und bei 37 °C für 18-24 h im Schüttelinkubator bebrütet. Nach Zentrifugation bei 3000 Upm für 15 min bei 4 °C wird je 1 g des Zellpellets in 20 ml TBS-Puffer resuspendiert und 500 µg Lysostaphin sowie 100 µg DNase hinzugegeben. Der Ansatz wird dann bei 37 °C für 4 h im Schüttelinkubator inkubiert und anschließend bei 13 000 Upm und 4 °C für 45 min zentrifugiert. Der Überstand stellt das Lysostaphinlysat dar und wird zur Inaktivierung von Proteasen 10 min bei 80 °C erhitzt. Danach erfolgt die elektrophoretische Auftrennung mittels SDS-PAGE.

2.2.9 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE bietet die Möglichkeit, Proteine nach ihren Molekulargewichten aufzutrennen. Zunächst werden die zu untersuchenden Proteine in einem großporigen Sammelgel im oberen Teil des zweiteiligen, auf Polyacrylamidbasis aufgebauten SDS-Gels durch ein System vertikal ausgerichteter elektrischer Felder fokussiert. Nach Eintritt in das kleinporige Trenngel herrscht eine konstante Feldstärke, so dass sich die Proteine abhängig

von Molekulargewicht, Ladung und Tertiärstruktur bewegen. Um jedoch eine Bewegung allein abhängig von der Größe/Molekulargewicht zu erreichen, wird das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) verwendet, das durch seine negative Ladung die Eigenladung der Proteine nach Bindung an deren Oberfläche überdeckt und zur Ausbildung globulärer Proteinstrukturen mit konstant negativer Ladung pro Masseneinheit führt. Anhand der bekannten Molekulargewichte von Eichproteinen und deren Wanderungsstrecke kann eine logarithmierte Eichgerade erstellt werden, aus welcher die Größe verschiedener Proteine abgeschätzt werden kann.

Die SDS-PAGE wurde mit einem Tris-HCl-Puffersystem durchgeführt. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese mit SDS-Probenpuffer versetzt und durch Erhitzen für 10 min bei 95°C denaturiert.

Herstellung der Gele:

Puffer und Lösungen

Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung	30% Acrylamid		
	0,8% Bisacrylamid		
4 x Separationsgel-Puffer (separation buffer)	1,5 mM Tris/Hcl		pH 8,8
	0,4% SDS		
4 x Sammelgel-Puffer (stacking buffer)	Tris/Hcl	0,5 mM	pH 6,8
	SDS	0,4%	
Ammoniumpersulfat (APS)	Ammoniumpersulfat		10%
TEMED (N,N,N',N'Tetramethylethyldiamin)			

Gelzusammensetzung

	Trenngel	Sammelgel
	10%	4,2%
Acrylamid/Bisacrylamid	8 ml	1,5 ml
4 x Trenngel-Puffer	6 ml	
4 x Sammelgel-Puffer		2,5 ml
H ₂ O bidest.	10 ml	2,5 ml
TEMED	25 µl	40 µl
APS (10%)	120 µl	70 µl

Durchführung

Nach gründlicher Reinigung der Glasplatten mit 70% Alkohol und dem Aufbau der Apparatur wurde die Trenngellösung nach obigem Schema hergestellt und zwischen die Glasplatten gegossen. Um eine gerade Schicht zu erhalten, wurde Isobutanol zugegeben. Nach 20-45 min Polymerisation wurde das Isobutanol abgegossen und mit H₂O_{bidest} gespült. Die Sammelgellösung wurde daraufhin auf die Trenngelschicht gegeben und ein entsprechender Kamm eingesetzt.

Elektrophorese

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden folgendermaßen hergestellt:

Puffer und Lösungen

Probenpuffer (2x)		
Tris/HCl	125 mM	
Glycerin	20 %	
2-Mercaptoethanol	10 %	
SDS	4 %	
Bromphenolblau	0,002 %	pH 6,8

Elektrophoresepuffer (1x)

Tris	0,025 M	pH 8,4
Glycin	0,192 M	
SDS	0,1 %	

Durchführung

Das Gel wurde vertikal in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, die Kammern mit Laufpuffer gefüllt, der Kamm entfernt und die Taschen ausgespült. Nachdem die Proben mit ½ Volumen Probenpuffer versehen und 5 min gekocht wurden, wurden 10-40 µl der Proben in die Taschen gegeben und zusammen mit einem Proteinstandard bei 20 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Eindringen der Proben in das Gel wurde 2-3 h aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-110 V. Das relative Molekulargewicht der Proteine wurde mit Hilfe der mitgeführten Proteinreferenz des *Page Ruler™ Prestained Proteinladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) bestimmt.

Färbung der Proteine im Gel mit Coomassie-Blau**Lösungen:**

Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue G250	0,15 %
Methanol (v/v)	45,5 %
Essigsäure (v/v)	9 %
In H ₂ O _{dest}	

Entfärbelösung	
Ethanol (v/v)	10 %
Methanol (v/v)	10 %
Essigsäure (v/v)	7 %
In H ₂ O _{dest}	

Durchführung

Das Gel wurde in die Färbelösung gegeben und unter leichtem Schütteln 30 min gefärbt, bevor es mit H₂O_{dest} abgespült und einige Stunden in die Entfärbelösung gegeben wurde. Diese wurde während der Entfärbung zweimal gewechselt.

2.2.10 Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der Zellaggregation

Eine Übernachtskultur der Staphylokokkenstämme *S. carnosus* TM300 und *S. carnosus* (pSasC4074) wurde jeweils in 50 ml TSB-Medium, das im zweiten Falle mit Xylose und Chloramphenicol supplementiert wurde, überimpft und unter Schütteln bei 37°C weiter angezogen. Das Wachstum der Bakterien wurde phasenkontrastmikroskopisch dokumentiert, indem in Abständen von 2, 4, 8 und 16 Stunden je 1 ml der Kultur in Zellkulturplatten überführt und in unterschiedlichen Vergrößerungen in Phasenkontrast dargestellt und photographiert wurde.

2.2.11 Trypsin-Desaggregationsassay

Den wie oben beschrieben acht Stunden in TSB-Medium angezogenen Bakterien wurden nach der phasenkontrastmikroskopischen Darstellung verschieden hohe Konzentrationen der Serinprotease Trypsin hinzugefügt und eine mögliche Auflösung der Zellcluster nach Inkubation über Nacht mittels Phasenkontrastmikroskopie überprüft. Die Trypsinendkonzentrationen betragen 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,25 mg/ml sowie 2,5 mg/ml. Des weiteren wurden wiederum wie oben beschrieben Übernachtskulturen in TSB-Medium angezogen, welches jedoch in diesem Fall mit 2,5 mg/ml supplementiert war. Im weiteren

Verlauf wurde festgehalten, ob sich unter diesen Umständen ebenfalls Zellaggregate ausbildeten und in welchem zeitlichen Rahmen dieses auftrat.

2.2.12 Biofilmassay

Die Fähigkeit der Biofilmbildung an verschiedenen Materialien lässt sich mit Hilfe des Biofilmproduktionsassays nach Christensen (15) erfassen, bei welchem der gebildete Biofilm durch Safranin nachgewiesen wird. Der Test wird in Mikrotiterplatten (Polystyrol, 96 wells, Greiner) durchgeführt und erlaubt die Bestimmung der Ausmaße der Biofilmproduktion durch photometrische Messung mit einem Mikro-ELISA-Reader. Definitionsgemäß haben biofilmpositive Stämme bei 490 nm eine optische Dichte von $> 0,415$.

Lösungen:

Safraninlösung	
Safranin (Serva)	0.1 %
In H_2O_{bidest}	

Phosphatgepufferte Saline (PBS)	
Na_2HPO_4	5 mM
NaH_2PO_4	5 mM
NaCl	0,85 %

Durchführung:

Die zu untersuchenden Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C auf einer TSB-Platte angezogen und daraufhin in 50 ml TSB-Medium, das mit 0,25 % Glukose und gegebenenfalls entsprechendem Antibiotikum supplementiert wurde, überimpft. Nachdem unter photometrischer Kontrolle die Kultur bis zu einer optischen Dichte entsprechend 10^5 CFU/ml angezogen wurde, wurden je 200 μ l der Suspension steril in einen Well der Mikrotiterplatte gegeben. Von jeder Probe wird wenigstens eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Platten werden

abgeklebt und 24 h bei 37 °C bebrütet bevor sie entleert, zweimal mit steriler PBS gewaschen und danach getrocknet werden. Nach ausreichender Trocknung werden die Wells mit jeweils 200 µl Safranin für 30 s gefärbt. Nach Entfernung überschüssiger Safranin-Lösung wurde mit Hilfe eines Mikro-ELISA-Readers das Ausmaß der Biofilmbildung anhand der optischen Dichte der Wells photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt. Getestet wurden die Stämme *S. carnosus* TM300 sowie *S. carnosus* (pCX19) als Negativkontrollen sowie der Stamm *S. carnosus* (pSasC4074).

2.2.13 Bioinformatische Strukturanalyse

Um bereits bekannte Strukturinformationen zu erhalten, wurde der InterPro Datenbank-Eintrag (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/Isearch?query=Q5HF18+>) für das SasC-Protein unter der Interpro-Accession-Nummer Q5HF18 aufgerufen. InterPro integriert die Informationen einer Vielzahl von Datenbanken, die jeweils verschiedene Methoden und unterschiedliche biologische Informationen von bereits beschriebenen und gut charakterisierten Proteinen nutzen, um Proteinsignaturen zu erkennen (65). Des Weiteren wurden in silico-Sequenzanalysen mit Programmen, welche im Bereich des Bioinformatiktoolkits auf den Servern des Max-Planck-Instituts für Entwicklungsbiologie in Tübingen zu finden sind, durchgeführt (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/>). Es handelt sich dabei um eine Plattform, auf welcher neben dort entwickelten Programmen verschiedene öffentliche Tools zugänglich gemacht werden (7). Mit dem Programm SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) wurde die Lokalisation der Schnittstelle des Signalpeptides bei SasC ermittelt. Um die Eigenschaften einer im Rahmen dieser Methoden erkannten sich wiederholenden Domäne weiter zu eruieren, wurden weitere Sequenzanalysen dieser Repeatschnitte unter Verwendung der Toolbox des European Bioinformatics Institute EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>) und des Swiss Institute of Bioinformatics SIB (<http://www.ch.embnet.org/index.html>) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Prävalenz des *sasC*-Gens bei klinischen *S. aureus*-Isolaten

Um die Prävalenz des *sasC*-Gens bei klinischen Isolaten zu bestimmen, wurden insgesamt 66 am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster isolierte *S. aureus*-Stämme untersucht. Dazu wurde ein exemplarischer Abschnitt des für das *SasC* kodierenden Gens mittels PCR unter Verwendung der Primer CH*sasC*1for und CH*sasC*1rev (vgl. 2.1.2) amplifiziert. Das Erscheinen einer DNA-Bande der erwarteten Größe von circa 500 bp unter der UV-Lampe wurde als Vorhandensein interpretiert. Bei fehlendem Nachweis eines PCR-Produkts wurde der Stamm nach dreimaliger Wiederholung der PCR als *sasC*-negativ gewertet. Die Isolate entstammen Blutkulturen, Gewebsproben, Abstrichen, Punktaten sowie von infizierten Kathetern und sind ihrem Resistenzverhalten nach geordnet im Anhang dargestellt (vgl. Tab 6-1 und 6-2). Das Ergebnis einer exemplarischen Agarosegelelektrophorese ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

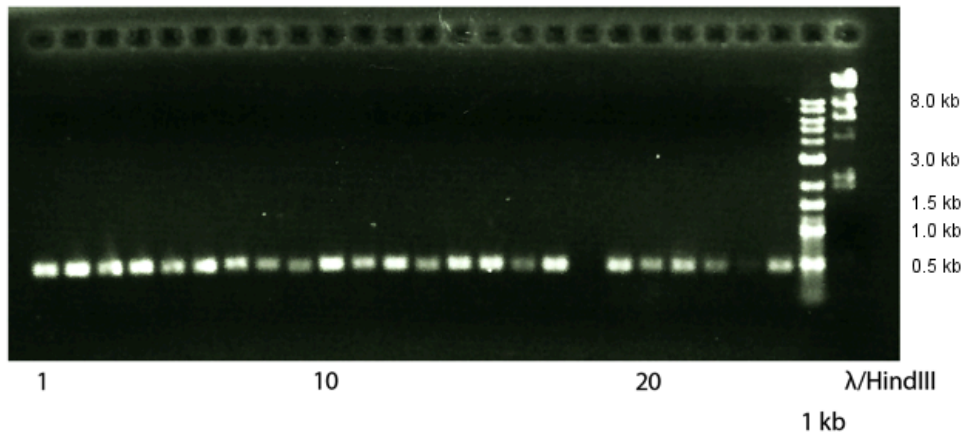


Abbildung 3-1 Nachweis von *sasC* in klinischen *S. aureus*-Isolaten

Agarosegelelektrophoretische Darstellung des PCR-Produkts unter Verwendung der Primer CHsasC1for und CHsasCrev von 24 der 66 untersuchten *S. aureus*-Isolate. *sasC*: für das *sasC*-Gen repräsentativer Basenpaarabschnitt; 1 kb: DNA-Größenstandard; λ /HindIII: DNA-Größenstandard. Das DNA-Fragment ist bis auf in Spur 18 in jeder Probe nachweisbar

Von den insgesamt 66 untersuchten Klinikisolaten konnte der repräsentative Genbereich des *sasC*-Gens in 64 Isolaten und somit etwa 97% der Fälle nachgewiesen werden. Bei den Methicillin-resistenten (MRSA) Isolaten waren alle 31 untersuchten Stämme *sasC*-positiv, bei den Methicillin-sensiblen (MSSA) Isolaten wurde das *sasC*-Gen in 33 von 35 Stämmen nachgewiesen (Abb. 3-2). Dies deutet auf eine sehr hohe Prävalenz des *sasC*-Gens bei klinischen *S. aureus*-Stämmen hin.

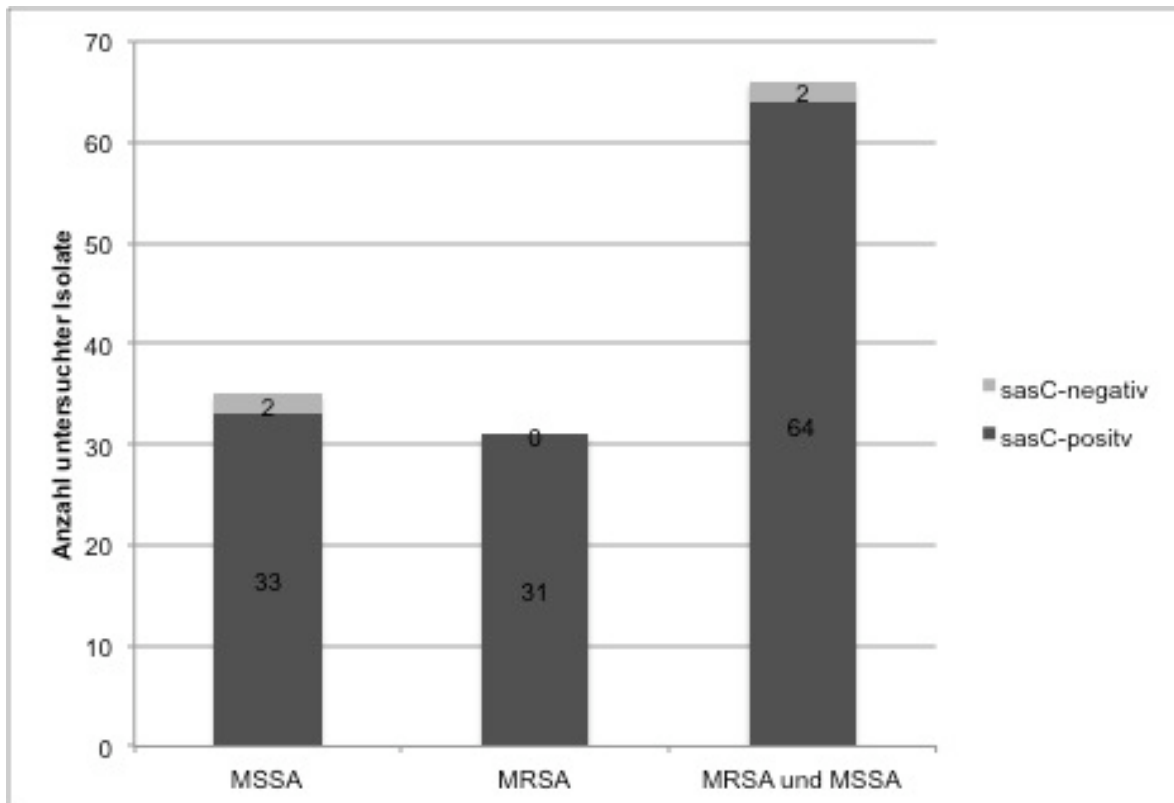


Abbildung 3-2 Prävalenz des *sasC*-Gens bei klinischen *S. aureus*-Isolaten

3.2 Expression des *sasC*-Gens in *S. carnosus* (pSasC4074)

Nach der Klonierung des *sasC* in den apathogenen Stamm *S. carnosus* TM300 mit Hilfe des Vektors pCX19 sollte gezeigt werden, dass durch Induktion mit 1% Xylose im Wachstumsmedium das entsprechende Protein SasC exprimiert wird. Nach Erstellen eines Lysostaphinlysates der Stämme *S. carnosus* (pSasC4074) und *S. carnosus* (pCX19) als Negativkontrolle wurden diese Proteine mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Im Lysat des mit pSasC4074 transformierten *S. carnosus* TM300 ist eine Bande entsprechend der für das exprimierte SasC erwarteten Größe von 238 kDa zu erkennen, welche im Lysat des *S. carnosus* (pCX19) nicht vorhanden ist und somit das heterolog exprimierte SasC-Protein darstellt (Abb. 3-3).

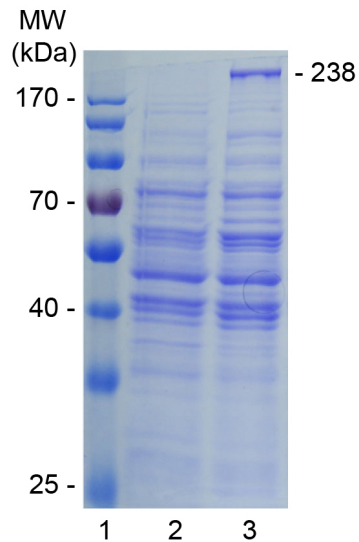


Abbildung 3-3 Expression von SasC in *S. carnosus* (pSasC4074)

SDS-PAGE (10% Separationsgel) von Lysostaphinlysaten. MW: Molekulargewicht; 1: Proteingrößenstandard PageRuler Prestained Protein Ladder (10-170kDa); 2 *S. carnosus* (pCX19); 3 *S. carnosus* (pSasC4074) nach Induktion mit 1% Xylose.

3.3 SasC vermittelt starke Zellaggregation in *S. carnosus*

Nach der Phase der initialen Adhäsion ist in der darauf folgenden Akkumulationsphase die Ausbildung von Zell-Zell-Interaktionen von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung eines bakteriellen Biofilms (56). Um diese Zellaggregation zu untersuchen, wurden die Stämme *S. carnosus* (pSasC4074) und *S. carnosus* (pCX19) wie beschrieben (vgl. 2.2.11) in TSB-Medium, das mit Chloramphenikol und Xylose supplementiert wurde, unter Schütteln angezogen und makroskopisch und mikroskopisch beurteilt. Dabei ist ein deutlicher Unterschied in der Beziehung der einzelnen Zellen zueinander zu erkennen. Der SasC exprimierende Stamm *S. carnosus* (pSasC4074) bildet große Zellaggregate aus, die sowohl mikroskopisch (Abb. 3-4) als auch makroskopisch (Spur B2) (Abb. 3-5) sichtbar werden. Demgegenüber bilden die Zellen des Wildtyp-Stamms (nicht dargestellt) genauso wie nicht mit Xylose

induzierte Zellen weder makroskopisch (Spur B1) (Abb. 3-5) noch mikroskopisch sichtbare Zellaggregate aus (nicht dargestellt). Die Zellen liegen größtenteils als Einzelzellen und Zellpaare vor. Die Expression des SasC an der Zelloberfläche scheint eine starke interzelluläre Adhäsion zu vermitteln.

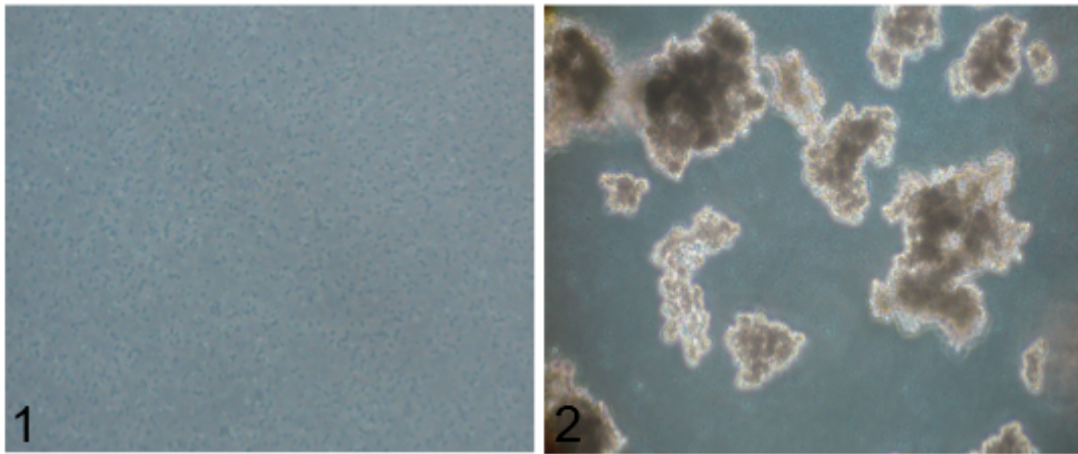


Abbildung 3-4 SasC-vermittelte Zellaggregation

Phasenkontrasmikroskopische Darstellung. 1: *S. carnosus* (pCX19); 2: *S. carnosus* (pSasC4074) nach planktonischem Wachstum über Nacht unter Xyloseinduktion.

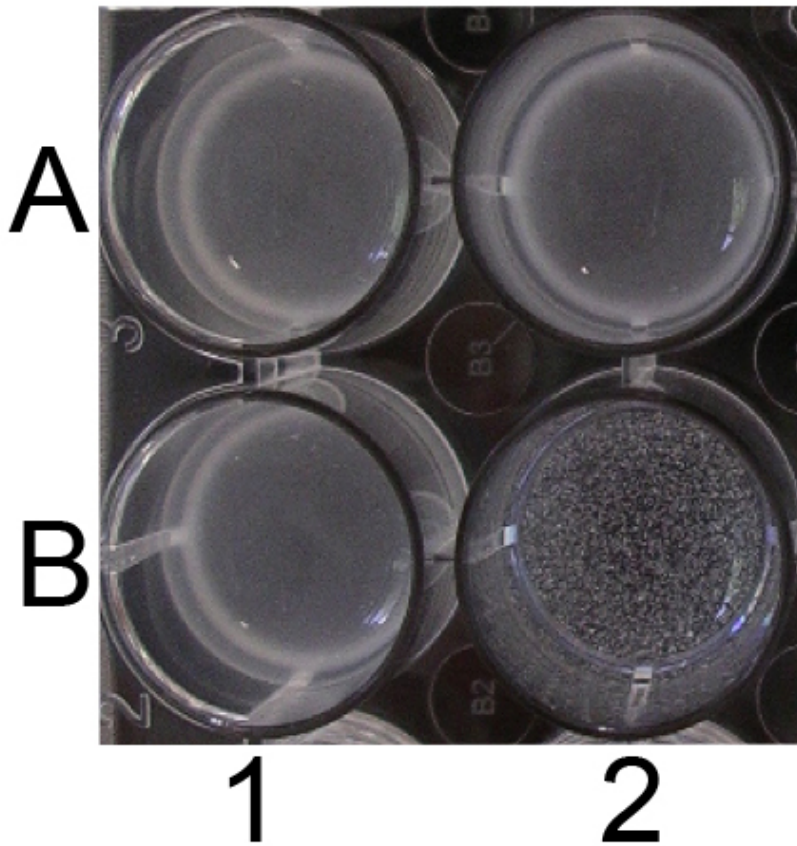


Abbildung 3-5 SasC-vermittelte Zellaggregation (makroskopisch)

Makroskopische Darstellung. Wachstum der Bakterien erfolgte über Nacht ohne Xylose (1) und mit 1% Xylose (2). A: *S. carnosus* (pCX19); B: *S. carnosus* (pSasC4074)

3.4 SasC-vermittelte Zellaggregation ist Protease-sensitiv

Da der Stamm *S. carnosus* (pSasC4074) im Gegensatz zu seinem Wildtyp-Stamm große Zellcluster ausbildet, sollte gezeigt werden, dass diese Zell-Zell-Interaktion durch das an der Oberfläche exprimierte SasC vermittelt wird. Falls die Interaktion tatsächlich durch SasC zustande kommt und damit proteinvermittelt ist, sollte die Bindung durch Proteolyse wieder aufgehoben werden können. Dazu wurden wie beschrieben (vgl. 2.2.11) die als Zellaggregate vorliegenden Zellen einer 8 Stunden in TSB-Medium angezogenen Kultur mit der Serin-Protease Trypsin unterschiedlicher Konzentrationen behandelt und die Desaggregation phasenkontrastmikroskopisch nach Einwirkung über Nacht beurteilt. Als Resultat konnte eine Auflösung der Zellcluster beobachtet werden, die konzentrationsabhängig war. Bei der Hinzugabe von Trypsin mit Erreichen einer Endkonzentration von 0,25 mg/ml im Medium waren noch deutliche Zellaggregate ohne eindeutigen Hinweis auf Dispersion erkennbar. Diese trat jedoch mit zunehmender Konzentration deutlich hervor, bis bei einer Endkonzentration von 2,5 mg/ml nur noch einzelne Bakterien zu beobachten waren, die sich von den planktonischen Zellen des Wildtyp-Stamms nicht mehr unterscheiden (Abb. 3-6) ließen.

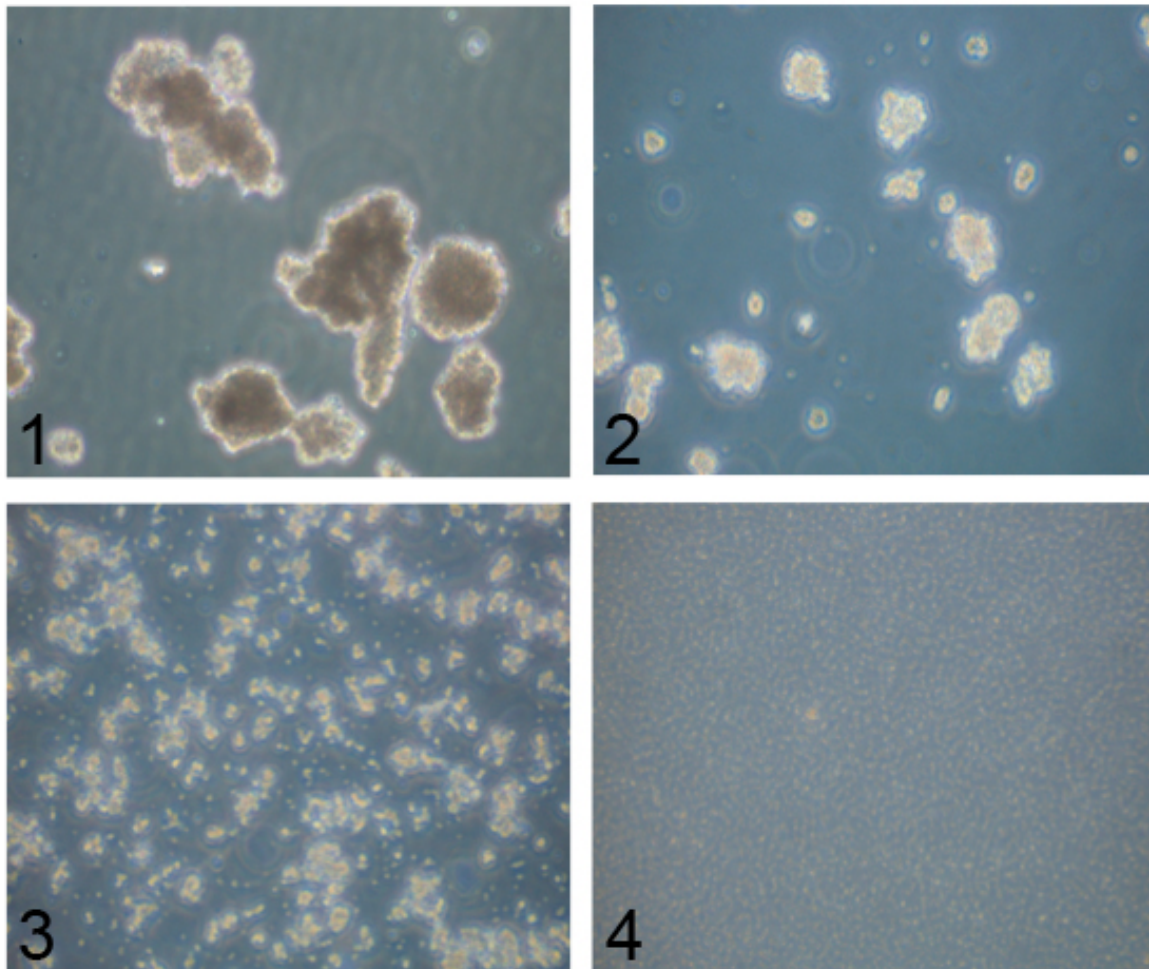


Abbildung 3-6 SasC-vermittelte Zellaggregation ist Protease-sensitiv

Phasenkontrastmikroskopische Darstellung von mit über Nacht Trypsin behandelten 8-Stunden-Kultur von *S. carnosus* (pSasC4074). Trypsinkonzentrationen: 1: 0,25 mg/ml; 2: 0,5 mg/ml; 3: 1,25 mg/ml; 4: 2,5 mg/ml

Bei bereits anfänglicher Hinzugabe von Trypsin bis zu einer Endkonzentration von 2,5 mg/ml zur frisch überimpften Kultur, zeigte sich auch nach 8 Stunden keine Aggregation der Zellen. Die Bakterien waren in phasenkontrastmikroskopischer Darstellung nicht von den Zellen der Negativkontrolle TM300 (pCX19) zu unterscheiden (s. Abb. 3-4, 1).

3.5 Biofilmbildung auf Polystyrol

Die Bildung von Biofilmen auf Polystyrol wurde mittels quantitativem Biofilmassay nach Christensen (15) bestimmt. Nach Inkubation in Polystyrolmikrotiterplatten für 24 Stunden zeigte sich nach Waschen und Safraninfärbung bei dem Stamm *S. carnosus* (pSasC4074) eine deutlich stärkere Biofilmbildung im Vergleich zum Wildtypstamm *S. carnosus* TM300 sowie *S. carnosus* (pCX19), der zur Kontrolle das leere Plasmid trug. Die letzteren waren wie erwartet Biofilm-negativ mit einer OD_{490} von 0.07 bei *S. carnosus* TM300 und OD_{490} von 0.11 bei *S. carnosus* (pCX19). Die OD_{490} war bei dem sasC-exprimierenden Stamm 0.43 und somit lag definitionsgemäß ein Biofilm-positiver Stamm vor (s. Abb 3-8).

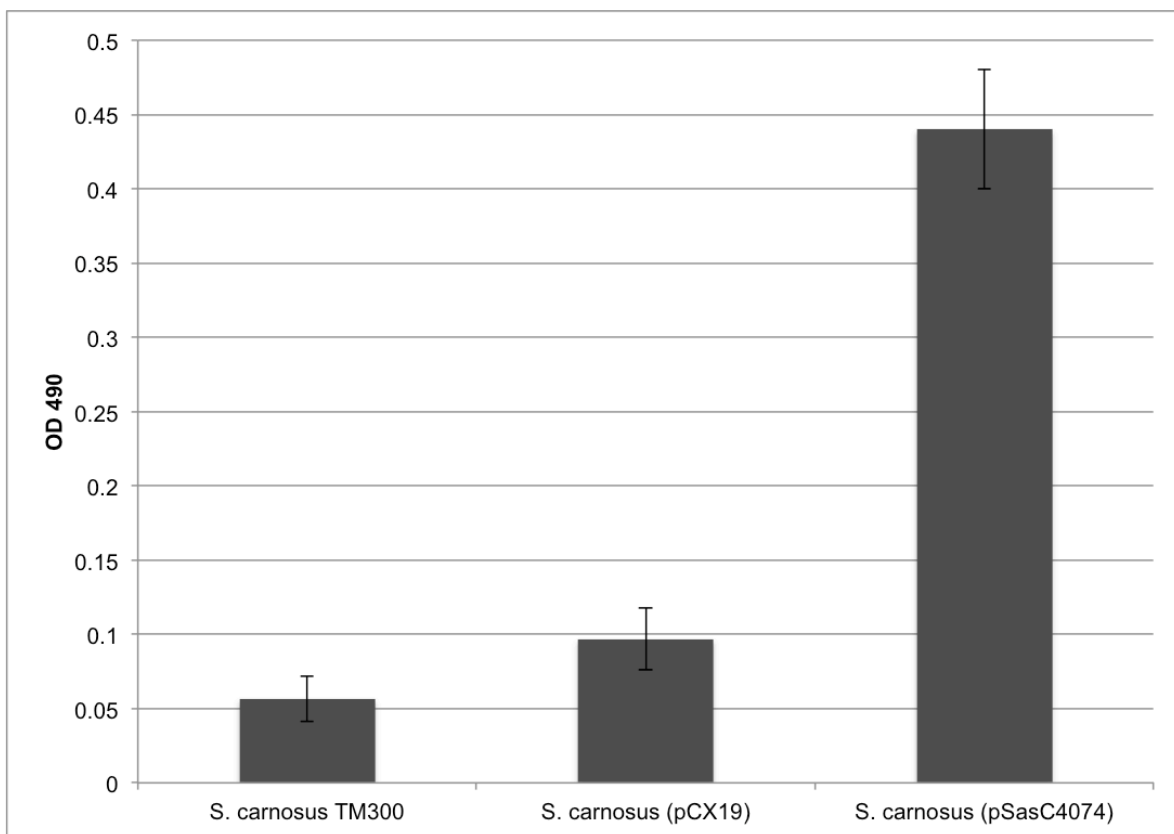


Abbildung 3-7 SasC-vermittelte Biofilmbildung auf Polystyrol

Biofilmassay nach Christensen. y-Achse: Optische Dichte bei 490 nm nach Färbung der Biofilme mit Safranin

3.6 Bioinformatische Strukturanalyse des SasC-Protein

3.6.1 Analyse der SasC-Aminosäuresequenz

Der dem SasC entsprechende Eintrag Q5HF18 in der InterPro-Datenbank zeigt auf den ersten Blick einen Teil der strukturellen Organisation des Proteins (Abb. 3-8). Zunächst findet sich ein Signalpeptid sowie ein sogenanntes YSIRK-Motif, welches bei der Prozessierung des Signalpeptides eine Rolle spielt. Die Schnittstelle des Signalpeptides befindet sich nach Analyse mittels SignalP 3.0 zwischen den Aminosäuren A-37 und L-38 (Erkennungssequenz A-X-A). Des Weiteren findet sich das bereits beschriebene LPXTG-Motif am C-terminalen Ende, eine sogenannte FIVAR-Domäne (AS 590 - 643) sowie eine Wiederholung von insgesamt 17 Domänen mit einer Länge von jeweils 72 Aminosäuren (AS 671 – 742, AS 748 – 819, AS 825 – 896, AS 902 – 973, AS 979 – 1050, AS 1056 – 1127, AS 1133 – 1204, AS 1210 – 1281, AS 1287 – 1358, AS 1364 – 1435, AS 1441 – 1512, AS 1518 – 1589, AS 1595 – 1666, AS 1672 – 1743, AS 1749 – 1820, AS 1826 – 1897, AS 1903 – 1974). Diese sind jeweils homolog zu der Sequenz einer *domain of unknown function 1542* (DUF1542). Die DUF1542-Repeats sind untereinander zu 18 bis 47% identisch. Das FIVAR-Motif und die DUF1542-Domäne sind auch Bestandteil im Mrp- und FmtB-Protein, welche mit Methicillin-Resistenz assoziiert wurden, sowie im Zellwand-assoziierten Protein Ebh von *S. aureus* und seinem homolog Embp von *S. epidermidis* zu finden, das eine Funktion in der Biofilmformation hat.

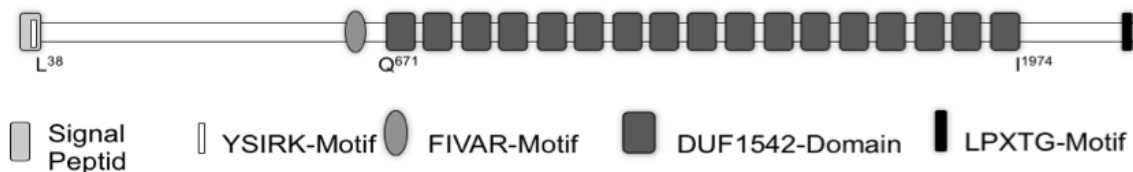


Abbildung 3-8 Struktureller Aufbau des SasC-Proteins

3.6.2 COILS - Prediction of Coiled Coil Regions in Proteins

Das Programm Coils vergleicht eine Aminosäuresequenz mit einer Datenbank bekannter paralleler, doppelsträngiger sogenannter coiled-coils und errechnet die Wahrscheinlichkeit, dass eine Aminosäuresequenz in einem bestimmten Bereich eine coiled-coil-Formation annimmt (94). Coiled-coil bezeichnet eine Proteintertiär- oder Quartärstruktur, bei welcher sich in der Regel zwei Alpha-helices von hydrophoben Wechselwirkungen stabilisiert umeinanderwinden. Eine Coiled-coil Struktur findet sich in einer Vielzahl struktureller und regulatorischer Proteine und vermittelt vielfältige Funktionen wie die Erkennung makromolekularer Strukturen oder die Ausbildung makromolekularer Komplexe (94). Nach Untersuchung der Frequenz mittels Coils zeigte sich folgender Aufbau des SasC-Proteins.

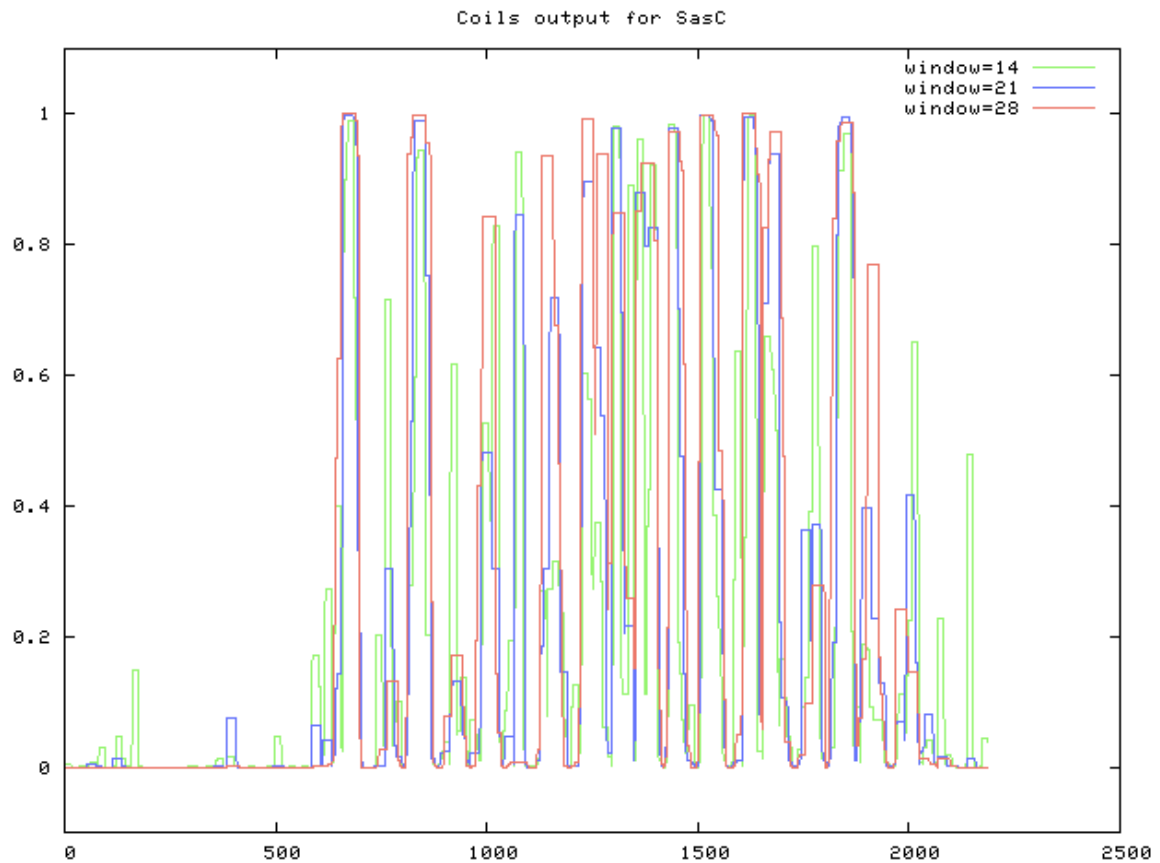


Abbildung 3-9 Coiled-Coils-Output für die Aminosäuresequenz des SasC-Proteins

Passend zur bereits in der InterPro-Datenbank gesehenen Analyse zeigt sich auch hier ein Zerteilung des Proteins, wobei ab AS 671 durchgehend eine Coiled-Coil-Tertiärstruktur vorausgesagt wird. Dieser Abschnitt des Proteins besteht aus den sich wiederholenden DUF1542-Domänen

4 Diskussion

4.1 Epidemiologie des *sasC*-Gens

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das *sasC*-Gen bei 64 von 66 untersuchten klinischen Isolaten vorhanden war. Des Weiteren ließen sich durch Analyse acht komplett sequenzierter *S. aureus*-Genome jeweils homologe *sasC*-Gene mit einer Sequenzähnlichkeit von 89 bis 97% finden. Aufgrund des hohen Grades der Konservierung des Gens und des Vorkommens bei einem sehr hohen Prozentsatz der hier untersuchten klinischen Isolate ist grundsätzlich eine wichtige Rolle des Proteins in der Pathogenese von *S. aureus*-Infektionen denkbar. Diese Hypothese wird durch eine von McAdow et al. 2011 veröffentlichte Arbeit unterstützt (104). Dort konnte in einem Maus-Sepsismodell eine deutliche und statistisch hochsignifikante Verlängerung der medianen Überlebenszeit nach Infektion mit einem *S. aureus* Newman-Stamm nach insertionaler Deaktivierung des *sasC*-Gens gezeigt werden. Dabei wurden BALB/c-Mäusen 10^8 CFUs (colony forming units) des *S. aureus* Newman-Wildtypstamm oder Stämme mit insertionaler Inaktivierung verschiedener Oberflächen-assoziiierter Proteine in den retroorbitalen Plexus injiziert und die mediane Überlebenszeit ermittelt. Diese betrug bei dem Wildtypstamm $24 \pm 1,6$ Stunden und war nach Inaktivierung des *sasC*-Gens auf $54 \pm 8,8$ Stunden erhöht, während sich für zum Beispiel das *sasG*-Gen und weitere Gene bekannter Virulenzfaktoren keine Verlängerung der Überlebenszeit ergab (104). Daraus lässt sich grundsätzlich eine wichtige Rolle von *sasC* und dem korrespondierenden Protein in der Pathogenese zumindest bei diesem Tierversuchsmodell ableiten.

4.2 *SasC*-vermittelte Zellaggregation

Die hauptsächliche Zielsetzung dieser Arbeits bestand neben der Bestimmung der Prävalenz des *sasC*-Gens in dem Versuch einer Funktionsbestimmung des

SasC-Proteins. Da es erkennbar an der LPXTG-Sequenz am C-terminalen Ende an der Oberfläche der Bakterien kovalent gebunden vorliegt, sollten insbesondere adhäsive Eigenschaften untersucht werden. Tatsächlich zeigten sich bei *S. carnosus* durch die Expression von SasC nach Induktion des Plasmids pSasC4074 mit 1% Xylose mikroskopisch und makroskopisch deutliche Zellaggregate im Vergleich zum Wildtyp. Um zu zeigen, dass dieser neue Phänotyp durch die Expression des SasC bedingt ist, wurde ein nicht mit Xylose induzierter Stamm und ein mit dem leeren Vektor pCX19 transformierter und 1% Xylose induzierter *S. carnosus*-Stamm betrachtet. Wie erwartet zeigte sich dort keine Aggregation der Zellen und der Phänotyp entsprach jeweils dem des Wildtyp-Stamms. Danach wurde ein Lysostaphinlysate der transformierten und mit induzierten Stämme erstellt und eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt. Im Vergleich zu den Proteinen des Wildtyps zeigte sich bei dem Stamm eine zusätzliche Bande bei etwa 238 kDa, die etwa dem erwarteten Molekulargewicht des SasC-Proteins entspricht. Insgesamt konnte dadurch erwiesen werden, dass der mit pSasC4074 transformierte Stamm nach Induktion mit Xylose Zellaggregate bildet und damit erstmalig eine Funktion des Proteins herausgearbeitet werden. Die naheliegendste Erklärung dafür scheint, dass der aufgrund der Expression des SasC-Proteins entstandene Phänotyp mit Bildung deutlicher Zellaggregate durch neu vorhandene interzelluläre Adhäsion zustande kommt, die direkt durch SasC vermittelt wird.

4.3 Mechanismus der Zell-Zell-Interaktion

Um zu zeigen, dass die Expression von SasC an der Oberfläche erfolgt und direkt an dem Mechanismus der Zellagglomeration beteiligt ist, wurden den aggregierten Bakterien verschiedene hohe Konzentrationen der Serinprotease Trypsin hinzugegeben, unter deren Einfluss sich konzentrationsabhängig eine Auflösung der Bakteriencluster zeigte. Da *S. carnosus* TM300 keine

Oberflächenproteine exprimiert, die Zell-Zell-Bindungen vermitteln können, und die verwendete Proteasen daher am ehesten zu einer Proteolyse des an der Oberfläche verankerten SasC führen, scheint die Zellagglomeration tatsächlich direkt von dem Vorhandensein des SasC an der Zelloberfläche abzuhängen. Obwohl die Lokalisation des SasC an der Oberfläche des transformierten *S. carnosus* durch die Desaggregation zumindest angedeutet wurde, erfolgte in nachfolgenden Versuchen in dieser Arbeitsgruppe der Nachweis der Lokalisation an der Oberfläche über einen Kaninchen-Antikörper gegen einen in *E. coli* exprimierten Teil des SasC-Gesamtproteins. In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte sich nach Inkubation von Übernachtskulturen des transformierten *S. carnosus*-Stamms mit erwähntem Antikörper nach Hinzugabe von fluoreszierendem anti-rabbit F(ab')₂-Fragment eine deutliche Fluoreszenz an der Zelloberfläche der Bakterien. Somit wird das SasC-Protein sicher an der Oberfläche von *S. carnosus* (pSasC4074) exprimiert (151).

Um mögliche an der Zell-Zell-Interaktion beteiligte Strukturen des Proteins und Erklärungen für den Mechanismus für die Funktion zu finden, erfolgte zunächst eine bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenz. Die Ergebnisse der hier durchgeführten bioinformatischen Analyse zeigen zunächst einmal die bereits bekannten Charakteristika eines oberflächenassoziierten Proteins gram-positiver Bakterien wie eine Signalsequenz, eine die Zellwand überspannende Region und das zum Sorting benötigte LPXTG-Motif. Im Weiteren weist das Protein 17 C-terminale Domänen mit bisher ungeklärter Funktion (DUF1542) sowie ein N-terminal davon liegendes FIVAR-Motif auf, das innerhalb von Pfam, einer Datenbank zur Proteinklassifizierung, als uncharakterisiert Zucker-bindend bezeichnet wird (35) (<http://www.sanger.ac.uk/resources/databases/pfam.html>). Die Funktion der DUF-Domänen ist bisher dem Namen entsprechend unbekannt, jedoch zeigt die Coils-Analyse des Gesamtproteins in den DUF-Domänen entsprechenden Bereichen nicht nur eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit, eine α -Helix auszubilden, sondern auch in geordneten Abständen auftretende Coiled-Coil-Formationen anzunehmen (vgl. 2.2.13). Es ist daher denkbar, dass sich am

C-terminalen Ende zwischen zwei benachbarten SasC-Proteinen eine Coiled-Coil-Struktur ausbildet. Insgesamt scheint eine Einteilung in eine N-terminale funktionelle Domäne und eine C-terminale strukturelle Domäne vorstellbar.

Um diese Annahme zu prüfen, wurden daher in den dieser Dissertation nachfolgenden Versuchen zwei sogenannte Subklone erstellt. Dabei wurde erstens ein Subklon erstellt, welcher die N-terminale Domäne mit dem FIVAR-Motif exprimiert und zweitens ein Subklon, welcher 8 der 17 DUF1542-Repeats enthält. *S. carnosus* TM300, *S. aureus* 4074 sowie *S. aureus* SH1000 wurden daraufhin mit den entsprechenden Plasmiden pSasCsub1 (enthält das FIVAR-Motif) und pSasCsub2 (enthält die DUF1542-Repeats) transformiert. Es zeigte sich, dass die die N-terminale Domäne exprimierenden Stämme genauso wie die das komplette SasC exprimierenden Stämme eine makroskopisch sichtbare Zellaggregation verursachen (151).

Damit ist scheinbar die Funktion der Zell-Zell-Bindung auf die N-terminale Domäne zurückzuführen. An dieser Stelle sind zumindest zwei Theorien bezüglich des Mechanismus der Zell-Zell-Bindung denkbar und können damit Grundlage weiterer Versuche zur genaueren Analyse des Mechanismus der interzellulären Adhärenz durch SasC werden.

(i) In der Pfam-Datenbank wird unter FIVAR (PF07554) aufgrund fehlender katalytischer Aminosäuren in dieser Sequenz eine Bindungsdomäne als Funktion als am wahrscheinlichsten erachtet und N-Acetylglukosamin als Bindungspartner vermutet (35). Zunächst wäre darüber eine Bindung des FIVAR-Motifs des SasC-Proteins an die Peptidoglykanschicht eines benachbarten Bakteriums als möglicher Mechanismus denkbar. Desweiteren ist eine Bindung an die an dem Wandaufbau von *Staphylococcus aureus* beteiligte Teichonsäure über die hier ebenfalls als Bestandteil vorkommende N-Acetylglukosamineinheit (182) möglich. Sollte eine Bindung an diese Monosaccharideinheit eine Rolle in der Zell-Zell-Interaktion haben, müsste N-Acetylglukosamin welches bei Wachstum der klonierten *S. carnosus*-Bakterien dem Nährmedium hinzugegeben wird, die Ausbildung der Zellaggregationen idealerweise konzentrationsabhängig

inhibieren. Ein weiterer Ansatz wäre die Verwendung von Peptidoglykan, Teichonsäure oder isolierter bakterieller Zellwand anstelle des Monosacharids, sollte es sich um eine komplexere Wechselwirkung, bei welcher die korrekte dreidimensionale Struktur der Makromoleküle zur Wechselwirkung benötigt wird, handeln.

(ii) Desweiteren besteht natürlich die Möglichkeit, dass das N-terminale Ende des SasC mit einem SasC-Molekül eines anderen Bakteriums interagiert und über diese Protein-Protein-Wechselwirkung eine interzelluläre Bindung zustande kommt. Solch eine direkte Wechselwirkung konnte beispielsweise für das SasG gezeigt werden. Geoghegan et al. (48) fanden heraus, dass zwei SasG-Moleküle nach proteolytische Prozessierung über ihre sogenannten B-Domänen Zink-abhängig dimerisieren und darüber eine Adhäsion zwischen den Zellen vermitteln. Eine Proteolyse des Proteins ist jedoch bei SasC nicht notwendig und die Biofilmbildung auch durch den Proteaseinhibitor α 2-Makroglobulin nicht inhibierbar, so dass sicher ein anderer molekularer Mechanismus vorliegen muss. Unabhängig davon könnte die Notwendigkeit einer direkten Interaktion zweier SasC-Proteine geprüft werden, indem aufgereinigte SasC-Proteine oder nur das für die Bindung offenbar essentielle N-terminale Ende im Sinne eines kompetitiven Bindungspartner während des Wachstums von *Staphylococcus carnosus* (pSasC4074)-Bakterien der Wachstumslösung hinzugegeben wird. Eine daraufhin ausbleibende Zellaggregation würde auf eine Adhäsion zwischen SasC-Proteinen hinweisen.

4.4 Bedeutung von SasC in der Biofilmentstehung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass SasC zellaggregative Eigenschaften besitzt, wurde danach überprüft, ob durch Expression des SasC in dem nicht Biofilm-bildenden Stamm *S. carnosus* TM300 dessen Bildung begünstigt wird. Dabei wurde in einem quantitativen Biofilmassay auf Polystrol eine deutlich verstärkte Biofilmbildung des *sasC* exprimierenden Stamms *S. carnosus*

(pSasC4074) im Vergleich zum Stamm *S. carnosus* (pCX19) festgestellt (s. Abb 3-7). Ebenso wie für die Zellaggregation konnte diese Wirkung des SasC auch auf die das FIVAR-Motif beinhaltende N-terminale Domäne zurückgeführt werden. Wir konnten zeigen, dass bei verstärkter Expression des *sasC*-Gens in einem Expressionsvektor auch die Stämme *S. aureus* SH1000 und *S. aureus* 4074 im Vergleich zu ihren Wildtypen deutlich mehr Biofilm bildeten (151). Damit wird deutlich, dass die Expression von SasC speziesübergreifend die Fähigkeit zur Biofilmbildung vermittelt. Da die grundsätzliche Fähigkeit des SasC, Biofilmbildung zu vermitteln nachgewiesen wurde, in der Literatur jedoch verschiedene Faktoren beschrieben sind, die nachweislich ebenfalls in der Lage sind, interzelluläre Adhäsion zu vermitteln untersuchten wir weiterhin, wie sich die Biofilme von *sasC*-Insertionsmutanten in ihrer Quantität von denen ihrer Wildtypstämmen unterscheiden. Dazu wurde eine Tn917-Insertionsmutante (SMH2035) des Wildtypstamms *S. aureus* SH1000 im Hinblick auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung mittels Biofilmassay beurteilt. Dabei zeigte sich, dass der *sasC*-Deletionsmutant unter allen getesteten Umständen signifikant weniger Biofilm bildete. Dabei wurde die Biofilmbildung in TSB-Medium sowie unter Zugabe von 1% Xylose oder 0.25% Glukose getestet. Die Unterschiede waren ohne Zuckersupplementation am deutlichsten (OD_{492} 0,5 SMH2035 versus 1,0 SH1000), während bei Hinzugabe von Glukose eine insgesamt verstärkte Biofilmbildung erfolgte und der Unterschied insgesamt weniger deutlich war (OD_{492} 1,6 SMH2035 versus 1,8 SH1000). Da bei *S. epidermidis* unter Glukosesupplementation die PIA-Synthese induziert wird (97) und bei *S. aureus* möglicherweise das gleiche Phänomen auftritt, könnte dessen Wirkung unter diesen Umständen das Fehlen des SasC teilweise kompensieren. Insgesamt zeigen die Ergebnisse verschiedener epidemiologischer Studien das gleichzeitige Vorhandensein verschiedener an Zell-Zell-Interaktion beteiligter Faktoren wie zum Beispiel *icaADBC*, *sasG* und das hier beschriebene *sasC* (117), so dass auch eine kooperative Funktion dieser Moleküle möglich wäre. Dementsprechend ist es eine interessante Überlegung, ob im Rahmen einer *ica*-abhängigen Biofilmbildung

PIA und SasC miteinander interagieren könnten und das SasC über eine Bindung an PIA für die Zellakkumulation sorgen könnte. Dies ist aus den oben genannten Überlegungen bezüglich einer möglichen Bindung von SasC an die N-Acetylglukosamin-Einheiten des PIA vorstellbar. Analog zum oben beschriebenen Versuchsaufbau könnte eine kompetitive Hemmung der Zellagglomeration durch PIA geprüft werden.

Zusammenfassend ist denkbar, dass zur korrekten Ausbildung eines physiologischen Biofilms tatsächlich mehrere oder alle der bekannten Faktoren notwendig sind und die in der Literatur beschriebenen Stämme, die trotz des Fehlens zum Beispiel des *ica*-Lokus zwar als Biofilm-positiv beschrieben werden, tatsächlich aber dysfunktionale Biofilme bilden. Ein Beispiel für diese Hypothese sind die *agr*-defizienten Stämme, die als stark Biofilm-bildend beschrieben werden, bei welchen jedoch vor allem die Dispersion von einzelnen Zellclustern erschwert ist (8). Dadurch entsteht zwar ein Vorteil in bestimmten Phasen der Infektion, vor allem im Hinblick auf chronische Infektionen, eine *agr*-Dysfunktion führt jedoch zu fehlender Biofilmdispersion (128) und als endgültige Konsequenz in einem Mausmodell zu deutlich eingeschränkter Disseminierung einer Katheter-assoziierten Infektion in Lymphknoten, Leber, Milz und Nieren (180).

4.5 Expression des *sasC*-Gens in *S. aureus* Wildtypstämmen

Wenn das SasC-Protein eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese hat, wäre eine signifikante Expression des Proteins ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Rolle in der Biofilmentstehung. Es wurde daher die Expression des Proteins mittels SDS-Gelelektrophorese eines Lysostaphinlysates der Stämme *S. aureus* COL, SH1000 und 4074 nach Wachstum von 10, 16, 24 und 48 Stunden durchgeführt, bei dem sich jedoch keine dem SasC entsprechende Bande zeigte (151). Erst die bezüglich des Nachweises von Proteinen deutlich sensitivere Western-Blot-Analyse zeigte eine zarte Bande korrespondierend zu SasC (151). Insgesamt scheint jedoch die Expression des Proteins unter den untersuchten

Bedingungen wenig sinnvoll zu sein. Es ist zu berücksichtigen, dass dabei Zellen in planktonischem Wachstums beurteilt wurden und in dieser Phase bekanntermaßen in erster Linie für die initiale Adhäsion benötigte Gene transkribiert werden und die für die akkumulative Phase notwendigen Proteine nicht. Dies konnte in drei verschiedenen Arbeiten gezeigt werden (3, 5, 137). Durch transcriptional profiling zum Beispiel konnten Beenken et al. nachweisen, dass sich das Genexpressionmuster nicht nur wie bekannt zwischen exponentieller planktonischer und stationärer planktonischer Phase unterscheidet, sondern auch zwischen planktonisch und im Biofilm wachsenden Bakterien (5).

Einen Nachweis für die SasC-Expression *in vivo* findet sich in der Literatur, wenn man betrachtet, dass der Nachweis eines SasC-Antikörpers (17) einen serologischen Hinweis auf die Expression des Proteins während des Infektgeschehens darstellt. Das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern wird als beweisend für die Expression des entsprechenden Antigens *in vivo* angesehen. In einer Arbeit von Clarke et al. zeigte sich, dass im Laufe der *S. aureus*-Infektion bei einer großen Anzahl getesteter Seren spezifische IgGs gegen dieses Antigen gebildet werden (17). In einer weiteren Arbeit zeigte sich, dass bei 7 von 14 Patienten mit nachgewiesener *S. aureus*-Infektion spezifische Antikörper gegen SasC im Serum vorliegen (181). Beide Untersuchungen sprechen also unabhängig von einander für eine Expression des SasC-Proteins *in vivo*.

4.6 Regulation des sasC-Gens

Da die Biofilmentwicklung wie auch das Infektgeschehen insgesamt ein hochkomplexer Prozess ist, der eine koordinierte Expression verschiedenster Virulenzfaktoren notwendig macht, wäre es für das Verständnis der Rolle des SasC im Gesamtgeschehen interessant zu wissen, wie seine Expression reguliert wird. Die Eigenschaft, Biofilme zu bilden ist in großem Maße von den Umweltbedingungen abhängig (vgl. 1.4), so dass die Induktion einer Biofilm-

fördernden Genexpression am ehesten einen Mechanismus notwendig macht, der auf die Veränderungen des Mikromilieus reagiert. Diesbezüglich sind die sogenannten two-component-Systeme ein häufiger Sensing-Mechanismus, wobei zwei dieser Systeme, das unter 1.4 bereits erwähnte *agr* und *arRS*-System, eine Beziehung zu Biofilmformation haben. *Quorum sensing* ist definitionsgemäß die Steuerung der Zelldichte über frei diffusible Signalstoffe (186, 187). Im Falle von Bakterien wird so in Abhängigkeit von Zelldichte die globale Genexpression geändert. Mittler sind hierbei Autoinduktoren, die während des Wachstums der Zellpopulation akkumulieren. Wird eine bestimmte Konzentration der Induktoren in der Umgebung der Bakterien überschritten, kommt es über Bindung an membranständige Proteine zu einer Aktivierung eines Transkriptionsfaktors (166). Bei beiden *quorum-sensing*-Systemen wurde ein negativer Einfluss ihrer Aktivität auf die Biofilmformation gezeigt (8, 168) und die jeweiligen Deletions-Stämme bildeten einen deutlich stärkeren Biofilm aus.

Tatsächlich könnte das *agr*-System als eine Art molekularer Schalter angesehen werden, der den Wechsel zwischen planktonischem und Biofilm-Phänotyp kontrolliert, wobei eine niedrige Aktivität des *agr*-Systems Voraussetzung für die Ausbildung eines Biofilms zu sein scheint (8). Eine Induktion des Systems durch beispielsweise die Erhöhung erwähnter Autoinduktoren oder in tiefen Biofilmschichten herrschende niedrige Glukosekonzentrationen (136) führt zur Loslösung einzelner Zellen oder Zellverbände aus dem Biofilm. Dieser Prozess wird wahrscheinlich von Surfactant-ähnlichen Peptiden (128) aber auch der Expression extrazellulärer Proteasen vermittelt. Bei *S. aureus* gibt es insgesamt 10 dieser sekretierten Proteasen, die Metalloprotease Aureolysin (*aur*), zwei Cystein-Proteasen (*scpA* und *sspB*) sowie sieben Serinproteasen (*sspA/V8*, *spIABCDEF*), die allesamt positiv von *agr* reguliert werden. Boles et al. fanden heraus, dass die durch *agr* induzierte Biofilmdispersion durch Proteaseinhibitoren deutlich eingeschränkt werden kann und die Deletion der für die Proteasen kodierenden Gene einen deutlich Biofilm-positiven Phänotyp zur Folge hat (8). In Analogie zu dieser Arbeit werden also die von Boles et. al und weiteren Autoren

(10, 143, 168) beschriebenen Biofilme durch verschiedene Proteasen aufgelöst. Daher ist es denkbar, dass Oberflächenproteine wie das hier untersuchte SasC den Angriffspunkt genannter Proteasen sind und daher vor allem in Hinblick auf Dispersion von Biofilmen und damit Dissemination von *S. aureus*-Infektionen wichtig sind. Aus dieser Darstellung wird ersichtlich, dass erst genaues Wissen um die Art der Regulation der *sasC*-Transkription zum Beispiel durch *quorum-sensing*-Systeme oder andere Regulationsmechanismen zu einem tieferen Verständnis der Rolle des SasC-Proteins im Gesamtprozess der Biofilmentstehung führt.

***sasC*-Expression wird von *ArlRS* und *MgrA* inhibiert**

Bei genauer Literaturrecherche lässt sich tatsächlich für das zweite oben erwähnte *two-component*-System *ArlRS* ein negativer Einfluss auf die *sasC*-Gen-Gen-Transkription finden (89). Interessanterweise zeigte eine Arbeit von Toledo-Arana et. al zuvor bereits, dass *arlRS*-Mutanten in zwei verschiedenen Nährmedien (TSB_g und HHWm) eine deutlich größere Kapazität zur Biofilmbildung haben. Da in dieser Studie gezeigt wurde, dass durch die *arlRS*-Deletion mehr PIA synthetisiert wird, wurde zunächst von einem entscheidenden Einfluss des PIA ausgegangen. Ein Stamm mit Doppelmutation hatte jedoch bei Wachstum in HHWm weiterhin einen Biofilm-positiven Phänotyp. Tatsächlich konnte dieser Biofilm nicht mit Metaperiodat, sondern nur mit Proteinase K aufgelöst werden, was für eine Protein-vermittelte Biofilmbildung spricht (168). Es ist daher vorstellbar, dass unter anderem der negative Einfluss des *arlRS*-Systems auf die *sasC*-Gen-Gen-Transkription bei den Mutanten aufgehoben wird und die offensichtlich Protein-vermittelten Biofilme unter anderem durch eine vermehrte Expression des SasC verursacht wird.

Ein zweites weniger gut untersuchtes Regulationssystem ist das *mgrA*-System, welches insbesondere einen positiven Einfluss auf die Expression von Exoproteinen sowie einen negativen Einfluss auf die Expression von Oberflächenproteinen hat (14). Luong et al. konnten auch für dieses System

zeigen, dass aus einer Dysfunktion des *mgrA*-Regulons eine verstärkte *sasC*-Transkription resultiert (92). Interessanterweise fanden Trotonda et al., dass die Aktivierung von *mgrA* die Biofilmbildung reprimiert, da stammunabhängig eine deutlich gesteigerte Biofilmbildung bei entsprechenden Deletionsmutanten auftrat (170). Desweiteren konnte in der Studie gezeigt werden, dass im entstehenden Biofilm PIA nicht vermehrt auftaucht. Ferner war die Transkription des *ica*-Operons nicht gesteigert. Im Gegensatz zum *ica*-Genlokus scheint jedoch das *srt*-Gen eine wichtige Rolle bei *mgrA*-Deletionsmutanten zu spielen. Eine Deletion führte zu einer signifikant reduzierten Biofilmbildung, so dass vermutet werden kann, dass die Biofilmbildung im *mgrA*-defizienten Stamm durch von der Sortase an die Zellwand gebundene Oberflächenmoleküle wie beispielsweise auch das SasC vermittelt werden. Auch bei dieser Studie wurde die Zusammensetzung des Biofilms analysiert, indem die Biofilme mit Proteinase K inkubiert wurden. Wie auch in dieser Arbeit konnte dabei eine vollständige Auflösung der gebildeten Biofilme festgestellt werden. Ebenfalls analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit bildeten sich unter anfänglicher Hinzugabe von Proteinase K zum Nährmedium keine Biofilme aus. Da auch extrazelluläre DNA als mögliche Biofilmkomponente diskutiert wird (139), wurde getestet ob Biofilme der *mgrA*-Mutante nicht nur durch Proteinase K, sondern auch durch DNaseI aufgelöst werden können. Interessanterweise zeigte sich kein Einfluss von DNaseI auf präformierte Biofilme, die Hinzugabe des Enzyms zum Nährmedium während der Biofilmbildung jedoch führte zu einem Biofilm-negativen Phänotyp. Hier ist es letztlich gut vorstellbar, dass eDNA und Proteine in den frühen Phasen der Biofilmentstehung eine Rolle spielen und möglicherweise beide notwendig sind. In den späteren Phasen scheinen dann Proteine eine zunehmend essentielle Bedeutung zu haben. Zusammenfassend fand sich in dieser Studie bei fehlender Aktivität des *mgrA*-Systems ein Biofilm-positiver Phänotyp, der offensichtlich von der Wirkung von Oberflächenproteinen, die durch die Sortase an die Zellwand gebunden werden, abhängt. Da SasC ein solches Protein darstellt und durch das

mgrA-System negativ reguliert wird, ist es gut vorstellbar, dass es entscheidend zu der Entstehung dieser Biofilme beiträgt.

In dieser Studie wurde weiterhin die Wechselwirkung von *mgrA* und *agr* untersucht. In einer vorherigen Studie konnte eine positive Regulation von *agr* durch das *mgrA*-System festgestellt werden. Trotonda et al. fanden, dass der Biofilm-positive Phänotyp bei *mgrA*-Mutanten nur teilweise durch eine reduzierte *agr*-Aktivität vermittelt wird und von weiteren Faktoren abhängt. Dies lässt den Schluss zu, dass *mgrA* und *agr* bezüglich ihrer regulativen Eigenschaften komplementär agieren, und zwar in Richtung einer Unterdrückung der Biofilmproduktion. Es scheint möglich, dass unterschiedliche Effektormoleküle dabei eine Rolle spielen. Als Modell vorstellbar ist daher, dass zur Biofilmbildung nicht nur *agr* sondern auch *mgrA* reprimiert sein muss. Die *mgrA*-Repression führt zu einer gesteigerten Produktion von Sortase-abhängigen Proteinen und diese tragen zunächst zusammen mit eDNA zum Aufbau eines Biofilms bei. Damit dieser nicht zeitgleich wieder aufgelöst wird, sorgt die unter anderem durch fehlende *mgrA*-Aktivität vermittelte *agr*-Repression für fehlende Expression von dispersionsfördernden Molekülen wie beispielsweise oben genannter Proteasen. Damit wäre gewährleistet, dass die Proteine, die an der Zelloberfläche für eine Zell-Zell-Bindung sorgen nicht sofort wieder abgebaut werden.

Diese Darstellung der beiden sowohl auf Biofilmformation als auch auf die *sasC*-Genexpression Einfluss habenden Regulationssysteme *arlRS* und *mgrA* liefert möglicherweise einen guten Ansatzpunkt für weitere experimentelle Arbeiten. Nachfolgende Untersuchungen könnten sich auf die regulatorischen Zusammenhänge verschiedener *quorum-sensing*-Systeme mit besonderer Betonung auf eine differentielle Genexpression des *sasC* richten (vgl. 4.7).

4.7 Zusammenfassung und Ausblick

Das SasC Protein stellt angedeutet durch seinen immunisierenden Charakter, welcher durch Produktion von Antikörpern bei infizierten Patienten während des

Infektgeschehens gekennzeichnet ist (17, 181), sowie seiner nachgewiesenen Virulenz in einem Sepsismodell (104) möglicherweise einen wichtigen Pathogenitätsfaktor in der Pathogenese von *S. aureus*-Infektionen dar. Durch diese Arbeit konnte für das vormals uncharakterisierte Oberflächenprotein eine Funktion als Zell-Zell-Adhäsion vermittelndes Molekül gezeigt werden. Als Modell wurde zunächst die Expression im apathogenen Stamm *S. carnosus* TM300 gewählt. Dies ist möglicherweise als erster Schritt geeigneter als die Deletion des Gens in virulenten und Biofilm-bildenden *S. aureus*-Stämmen, da bezüglich der Virulenz und insbesondere der Biofilmbildung mehrere Faktoren über verschiedene Mechanismen in die gleiche Richtung wirken und das Fehlen eines Virulenzfaktors durch das Wirken anderer kompensiert werden kann. Unter bestimmten Umständen könnte daher trotz des Fehlens eines grundsätzlich funktionellen Proteins in den zur Verfügung stehenden Modellen ein gleicher Phänotyp resultieren. Nach der Identifizierung der Funktion der interzellulären Bindung des SasC wurde als logische Folge eine mögliche Rolle bei der Biofilmentstehung untersucht. Hier zeigte sich, dass der Biofilm-negative Stamm *S. carnosus* TM300 nach Transformation mit *sasC* einen Biofilm-positiven Phänotyp hatte. In einer nachfolgenden Arbeit konnte auch für die *S. aureus*-Stämme SH1000 und 4047 nachgewiesen werden, dass die Biofilmbildung unter bestimmten Umständen deutlich verstärkt ist. Desweiteren war eine *sasC*-Deletionsmutante signifikant weniger Biofilm-positiv (151). Die funktionelle Domäne des SasC konnte dabei im Bereich des N-Terminus des Proteins lokalisiert werden, bezüglich des genauen molekularen Mechanismus sind aktuell nur Hypothesen möglich. Aufgrund des FIVAR-Motifs erscheint hier eine Bindung an das Peptidoglykan oder Teichonsäuren benachbarter Bakterien genauso wie zusätzlich eine Bindung an PIA bei *ica*-abhängigen Biofilmen möglich. Neben der Erörterung des genauen molekularen Mechanismus sollte sich nachfolgende Forschung in erster Linie auf die Regulation der *sasC*-Expression konzentrieren, um die Rolle während der Biofilmentstehung auch im Vergleich zu anderen Proteinfaktoren wie SasG, FnBP oder Protein A genauer zu verstehen. Bezüglich

der Expression zeigte sich in der stationären Phase planktonischer Bakterien keine signifikante Transkription von *sasC* (151). Da die Expression jedoch in Biofilmen eine deutlich andere ist und die Synthese des aufgrund seiner Größe von 2186 Aminosäuren sehr Stoffwechsel-intensiven SasC in dieser Wachstumsform biologisch wenig Sinn machen würde, wären bezüglich der Expression und insbesondere seiner Regulation weitere Versuche sinnvoll. Zunächst wäre es wichtig zu prüfen, ob das *sasC*-Gen in Biofilmen im Vergleich zu planktonischem Wachstum vermehrt exprimiert wird. Da die Biofilmentstehung dynamisch erfolgt und die Genexpression demnach wahrscheinlich ständigen Änderungen unterworfen ist, müsste der Nachweis der Transkription des *sasC* idealerweise nicht nur zu bestimmten Zeitpunkten erfolgen, sondern kontinuierlich, um auch kurze Phasen der Transkription zu erfassen. Des Weiteren wäre es interessant, nicht nur eine auf diese Art und Weise erreichte zeitliche Auflösung der Transkription sondern auch eine örtliche Auflösung zu erreichen, da die Transkription von Biofilm-vermittelnden Faktoren sicher durch das Mikromilieu beeinflusst wird und dieses im Biofilm nicht homogen ist, sondern deutliche örtliche Unterschiede aufweist.

Das aktuell diesen Idealvorstellungen am nächsten kommende Modell beschreiben unter anderem Yarwood et al. (187). Die Biofilmformation wird dabei mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie unter Verwendung von Propidiumjodid und fluoreszierenden Reporter genen verfolgt. Dadurch kann sowohl die genaue räumliche Struktur des Biofilms über Messung der Emissionswellenlänge des zuvor erregten Propidiumjodids verfolgt werden, als auch zeitgleich die Transkription eines gewünschten Gens – in diesem Fall *sasC* - über Messung der Emissionswellenlänge eines fluoreszierenden Reporter genprodukts (zum Beispiel *gfp*). Mit diesem Versuchsaufbau wäre ein Nachweis des *sasC*-Gentranskription möglich, der nicht nur Informationen darüber liefert, wann das *sasC*-Gen transkribiert wird, sondern auch in welcher Lokalisation innerhalb des Biofilms. Durch die parallele Darstellung weiterer an der Regulation (z.B. *agr*, *arlRS*, *mgrA*, *sarA*, *sigB* und weitere) oder direkt an

Akkumulation (*sasG*, *fnbp*, *spa*, *ica* und weitere) beteiligter Gene über Konstruktion eines zweiten Reportersystems mit anderer Emmissionswellenlänge, könnten nicht nur Fragen hinsichtlich der Regulation des *sasC* sondern auch im Bezug auf Wechselwirkung mit anderen Biofilm-akkumulierenden Molekülen beantwortet werden. Dies könnten helfen, die Rolle des SasC im überaus komplexen und von vielen Faktoren beeinflussten Prozess der Biofilmentstehung bei *S. aureus* noch genauer zu verstehen.

5 Literaturverzeichnis

1. Anderson GG, O'Toole GA (2008) Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322:85-105
2. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence.* 2(5):445-59
3. Becker P, Hufnagle W, Peters G, Herrmann M (2001) Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis. *Appl Environ Microbiol.* 67(7):2958-65
4. Beenken KE, Blevins JS, Smeltzer MS (2003) Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun.* 71(7):4206-11
5. Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Blevins JS, Smeltzer MS (2004) Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol.* 186(14):4665-84
6. Bhakdi S, Trantum-Jensen J (1991) Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev.* 55(4):733-51
7. Biegert A, Mayer C, Remmert M, Soding J, Lupas AN (2006) The MPI Bioinformatics Toolkit for protein sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 34(Web Server issue):W335-9
8. Boles BR, Horswill AR (2008) Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* 4(4):e1000052
9. Cerca N, Brooks JL, Jefferson KK (2008) Regulation of the intercellular adhesin locus regulator (*icaR*) by SarA, sigmaB, and IcaR in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 190(19):6530-3
10. Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah C, Ramasubbu N, Kaplan JB, Jabbouri S (2007) Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75(1):125-32

11. Cheung AL, Bayer AS, Zhang G, Gresham H, Xiong YQ (2004) Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol. 40(1):1-9
12. Cheung AL, Eberhardt KJ, Chung E, Yeaman MR, Sullam PM, Ramos M, Bayer AS (1994) Diminished virulence of a *sar-/agr-* mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. J Clin Invest. 94(5):1815-22
13. Cheung AL, Koomey JM, Butler CA, Projan SJ, Fischetti VA (1992) Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. Proc Natl Acad Sci U S A. 89(14):6462-6
14. Cheung AL, Nishina KA, Trottonda MP, Tamber S (2008) The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. Int J Biochem Cell Biol. 40(3):355-61
15. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of clinical microbiology. 22(6):996-1006
16. Chu VH, Crosslin DR, Friedman JY, Reed SD, Cabell CH, Griffiths RI, Masselink LE, Kaye KS, Corey GR, Reller LB, Stryjewski ME, Schulman KA, Fowler VG, Jr. (2005) *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with prosthetic devices: costs and outcomes. Am J Med. 118(12):1416
17. Clarke SR, Brummell KJ, Horsburgh MJ, McDowell PW, Mohamad SA, Stapleton MR, Acevedo J, Read RC, Day NP, Peacock SJ, Mond JJ, Kokai-Kun JF, Foster SJ (2006) Identification of in vivo-expressed antigens of *Staphylococcus aureus* and their use in vaccinations for protection against nasal carriage. J Infect Dis. 193(8):1098-108
18. Cohen MS (1994) Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. Clin Infect Dis. 18 Suppl 2:S170-9
19. Corrigan RM, Rigby D, Handley P, Foster TJ (2007) The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. Microbiology. 153(Pt 8):2435-46

20. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun.* 67(10):5427-33
21. Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G (2001) Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 69(6):4079-85
22. Crossley KB, Archer GL (1997) The Staphylococci in Human Disease. 1
23. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 183(9):2888-96
24. Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzon M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades JR (2004) Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 72(4):2177-85
25. Cue D, Lei MG, Luong TT, Kuechenmeister L, Dunman PM, O'Donnell S, Rowe S, O'Gara JP, Lee CY (2009) Rbf promotes biofilm formation by *Staphylococcus aureus* via repression of *icaR*, a negative regulator of *icaADBC*. *J Bacteriol.* 191(20):6363-73
26. Davey ME, O'Toole G A (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(4):847-67
27. Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2(2):114-22
28. Deighton M, Borland R (1993) Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun.* 61(10):4473-9
29. Deisenhofer J (1981) Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry.* 20(9):2361-70
30. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 13(1):16-34, table of contents
31. Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15(2):167-93

32. Duguid IG, Evans E, Brown MR, Gilbert P (1992) Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *J Antimicrob Chemother.* 30(6):803-10
33. Duguid IG, Evans E, Brown MR, Gilbert P (1992) Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency. *J Antimicrob Chemother.* 30(6):791-802
34. Dziwanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA (1999) Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infection and immunity.* 67(9):4673-8
35. Finn RD, Tate J, Mistry J, Coghill PC, Sammut SJ, Hotz HR, Ceric G, Forslund K, Eddy SR, Sonnhammer EL, Bateman A (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue):D281-8
36. Fischetti VA, Novick RP, Feretti JJ, Portnoy DA, J.I. R (2000) 1 ed: ASM Press, Washington D.C.
37. Fischetti VA, Pancholi V, Schneewind O (1990) Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol Microbiol.* 4(9):1603-5
38. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP (2005) Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 43(4):1973-6
39. Foster TJ (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol.* 3(12):948-58
40. Foster TJ, Höök M (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6(12):484-8
41. Fournier B, Hooper DC (2000) A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 182(14):3955-64
42. Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Höök M (2000) Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between

the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *European journal of cell biology*. 79(10):672-9

43. Fowler VG, Jr., Fey PD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME (2001) The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Med Microbiol Immunol*. 189(3):127-31

44. Fowler VG, Jr., Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, Corey GR, Spelman D, Bradley SF, Barsic B, Pappas PA, Anstrom KJ, Wray D, Fortes CQ, Anguera I, Athan E, Jones P, van der Meer JT, Elliott TS, Levine DP, Bayer AS (2005) *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA*. 293(24):3012-21

45. Frank KL, Hanssen AD, Patel R (2004) *icaA* is not a useful diagnostic marker for prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol*. 42(10):4846-9

46. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*. 13(1):34-40

47. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI (1985) Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*. 76(4):1427-35

48. Geoghegan JA, Corrigan RM, Gruszka DT, Speziale P, O'Gara JP, Potts JR, Foster TJ (2010) Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 192(21):5663-73

49. Giraud AT, Cheung AL, Nagel R (1997) The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch Microbiol*. 168(1):53-8

50. Gladstone GP, Van Heyningen WE (1957) Staphylococcal leucocidins. *Br J Exp Pathol*. 38(2):123-37

51. Gorman SP, Mawhinney WM, Adair CG, Issouckis M (1993) Confocal laser scanning microscopy of peritoneal catheter surfaces. *J Med Microbiol*. 38(6):411-7

52. Götz F (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*. 43(6):1367-78

-
53. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E (2006) Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet*. 368(9538):874-85
54. Hahn H, Kaufmann S, Schulz T, Suerbaum S (2009) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 6.
55. Hamill RJ, Vann JM, Proctor RA (1986) Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun*. 54(3):833-6
56. Heilmann C, Gerke C, Perdreau-Remington F, Götz F (1996) Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect Immun*. 64(1):277-82
57. Heilmann C, Hartleib J, Hussain MS, Peters G (2005) The multifunctional *Staphylococcus aureus* autolysin Aaa mediates adherence to immobilized fibrinogen and fibronectin. *Infect Immun*. 73(8):4793-802
58. Heilmann C, Hussain M, Peters G, Götz F (1997) Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol*. 24(5):1013-24
59. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol*. 20(5):1083-91
60. Heilmann C, Thumm G, Chhatwal GS, Hartleib J, Uekotter A, Peters G (2003) Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*. 149(Pt 10):2769-78
61. Heumann D, Barras C, Severin A, Glauser MP, Tomasz A (1994) Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun*. 62(7):2715-21
62. Hirschhausen N, Schlesier T, Schmidt MA, Götz F, Peters G, Heilmann C (2010) A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cellular microbiology*. 12(12):1746-64

-
63. Hoyle BD, Costerton JW (1991) Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res.* 37:91-105
64. Huang CT, Yu FP, McFeters GA, Stewart PS (1995) Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol.* 61(6):2252-6
65. Hunter S, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Binns D, Bork P, Das U, Daugherty L, Duquenne L, Finn RD, Gough J, Haft D, Hulo N, Kahn D, Kelly E, Laugraud A, Letunic I, Lonsdale D, Lopez R, Madera M, Maslen J, McAnulla C, McDowall J, Mistry J, Mitchell A, Mulder N, Natale D, Orengo C, Quinn AF, Selengut JD, Sigrist CJ, Thimma M, Thomas PD, Valentin F, Wilson D, Wu CH, Yeats C (2009) InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue):D211-5
66. Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB (2008) Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 74(2):470-6
67. Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA, Pier GB (2004) The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 186(8):2449-56
68. Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, Tack BF, Mitros JP, Rosenthal A, Ganz T, McCray PB, Jr. (2001) Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene.* 263(1-2):211-8
69. Jones SM, Morgan M, Humphrey TJ, Lappin-Scott H (2001) Effect of vancomycin and rifampicin on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet.* 357(9249):40-1
70. Jonsson IM, Mazmanian SK, Schneewind O, Bremell T, Tarkowski A (2003) The role of *Staphylococcus aureus* Sortase A and Sortase B in murine arthritis. *Microbes Infect.* 5(9):775-80

71. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, Proctor RA, Peters G (1998) Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 177(4):1023-9
72. Kloos WE, Bannerman TL (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 7(1):117-40
73. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 10(3):505-20
74. Knobloch JK, Bartscht K, Sabottke A, Rohde H, Feucht HH, 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(8):2624-33
75. Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D (2002) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol.* 191(2):101-6
76. Knobloch JK, Von Osten H, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D (2002) Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative *Staphylococcus epidermidis*. *Med Microbiol Immunol.* 191(2):107-14
77. Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G (2005) *Medizinische Mikrobiologie.*
78. Kong KF, Vuong C, Otto M (2006) *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol.* 296(2-3):133-9
79. Koprivnjak T, Peschel A, Gelb MH, Liang NS, Weiss JP (2002) Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal action of human group IIA phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 277(49):47636-44
80. Kristian SA, Durr M, Van Strijp JA, Neumeister B, Peschel A (2003) MprF-mediated lysinylation of phospholipids in *Staphylococcus aureus* leads to

protection against oxygen-independent neutrophil killing. *Infect Immun.* 71(1):546-9

81. Kuehl R, Al-Bataineh S, Gordon O, Luginbuehl R, Otto M, Textor M, Landmann R (2009) Furanone at subinhibitory concentrations enhances staphylococcal biofilm formation by *luxS* repression. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(10):4159-66

82. Lauderdale KJ, Boles BR, Cheung AL, Horswill AR (2009) Interconnections between Sigma B, *agr*, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect Immun.* 77(4):1623-35

83. Laupland KB, Church DL, Mucenski M, Sutherland LR, Davies HD (2003) Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect Dis.* 187(9):1452-9

84. Learn DB, Brestel EP, Seetharama S (1987) Hypochlorite scavenging by *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Infect Immun.* 55(8):1813-8

85. Lei MG, Cue D, Roux CM, Dunman PM, Lee CY Rsp inhibits attachment and biofilm formation by repressing *fnbA* in *Staphylococcus aureus* MW2. *J Bacteriol.* 193(19):5231-41

86. Leid JG, Shirliff ME, Costerton JW, Stoodley AP (2002) Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun.* 70(11):6339-45

87. Lescure FX, Biendo M, Douadi Y, Schmit JL, Eveillard M (2006) Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and effects on cross-transmission in a teaching hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 25(3):205-7

88. Liang X, Yu C, Sun J, Liu H, Landwehr C, Holmes D, Ji Y (2006) Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 74(8):4655-65

89. Liang X, Zheng L, Landwehr C, Lunsford D, Holmes D, Ji Y (2005) Global regulation of gene expression by ArlRS, a two-component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 187(15):5486-92

-
90. Liese JG, Jendrossek V, Jansson A, Petropoulou T, Kloos S, Gahr M, Belohradsky BH (1996) Chronic granulomatous disease in adults. *Lancet*. 347(8996):220-3
 91. Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 339(8):520-32
 92. Luong TT, Dunman PM, Murphy E, Projan SJ, Lee CY (2006) Transcription Profiling of the mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 188(5):1899-910
 93. Luong TT, Newell SW, Lee CY (2003) Mgr, a novel global regulator in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 185(13):3703-10
 94. Lupas A, Van Dyke M, Stock J (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*. 252(5010):1162-4
 95. Luppens SB, Reij MW, van der Heijden RW, Rombouts FM, Abee T (2002) Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Appl Environ Microbiol*. 68(9):4194-200
 96. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol*. 178(1):175-83
 97. Mack D, Siemssen N, Laufs R (1992) Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun*. 60(5):2048-57
 98. Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2001): Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
 99. Mah TF, O'Toole GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 9(1):34-9
 100. Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L, Tsang LH, Smeltzer MS, Horswill AR, Bayles KW (2009) Modulation of eDNA

release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. PLoS one. 4(6):e5822

101. Mazmanian SK, Liu G, Jensen ER, Lenoy E, Schneewind O (2000) *Staphylococcus aureus* Sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(10):5510-5

102. Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O (1999) *Staphylococcus aureus* Sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. Science. 285(5428):760-3

103. Mazmanian SK, Ton-That H, Schneewind O (2001) Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. 40(5):1049-57

104. McAdow M, Kim HK, Dedent AC, Hendrickx AP, Schneewind O, Missiakas DM (2011) Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. PLoS Pathog. 7(10):e1002307

105. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM (2001) Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Annu Rev Microbiol. 55:77-104

106. McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, McIntire L, Foster T, Höök M (1997) Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. Eur J Biochem. 247(1):416-24

107. McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Doring G, Lee JC, Goldmann DA, Pier GB (1999) Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. Science. 284(5419):1523-7

108. Menzies BE (2003) The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. Curr Opin Infect Dis. 16(3):225-9

109. Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, Lopez JA, Foster TJ, Penades JR, Lasa I (2009) Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 191(3):832-43

-
110. Miro JM, Anguera I, Cabell CH, Chen AY, Stafford JA, Corey GR, Olaison L, Eykyn S, Hoen B, Abrutyn E, Raoult D, Bayer A, Fowler VG, Jr. (2005) *Staphylococcus aureus* native valve infective endocarditis: report of 566 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. Clin Infect Dis. 41(4):507-14
111. Moreillon P, Que YA, Bayer AS (2002) Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis. Infect Dis Clin North Am. 16(2):297-318
112. Mrak LN, Zielinska AK, Beenken KE, Mrak IN, Atwood DN, Griffin LM, Lee CY, Smeltzer MS (2012) *saeRS* and *sarA* act synergistically to repress protease production and promote biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. PloS one. 7(6):e38453
113. Nauseef WM (1998) Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency. J Mol Med (Berl). 76(10):661-8
114. Navarre WW, Ton-That H, Faull KF, Schneewind O (1999) Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage phi11. Identification of a D-alanyl-glycine endopeptidase activity. J Biol Chem. 274(22):15847-56
115. Noskin GA, Rubin RJ, Schentag JJ, Kluytmans J, Hedblom EC, Jacobson C, Smulders M, Gemmen E, Bharmal M (2007) National trends in *Staphylococcus aureus* infection rates: impact on economic burden and mortality over a 6-year period (1998-2003). Clin Infect Dis. 45(9):1132-40
116. Novick RP (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol Microbiol. 48(6):1429-49
117. O'Gara JP (2007) *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 270(2):179-88
118. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, Foster TJ, O'Gara JP (2008) A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. J Bacteriol. 190(11):3835-50

119. O'Riordan K, Lee JC (2004) *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clin Microbiol Rev. 17(1):218-34
120. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 54:49-79
121. Ogawa SK, Yurberg ER, Hatcher VB, Levitt MA, Lowy FD (1985) Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. Infect Immun. 50(1):218-24
122. Otto M (2008) Staphylococcal biofilms. Curr Top Microbiol Immunol. 322:207-28
123. Otto M (2013) Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. Annual review of medicine. 64:175-88
124. Parsek MR, Singh PK (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu Rev Microbiol. 57:677-701
125. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu Rev Microbiol. 48:585-617
126. Peacock SJ, Foster TJ, Cameron BJ, Berendt AR (1999) Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. Microbiology. 145 (Pt 12):3477-86
127. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NP (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 70(9):4987-96
128. Periasamy S, Joo HS, Duong AC, Bach TH, Tan VY, Chatterjee SS, Cheung GY, Otto M (2012) How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. Proc Natl Acad Sci U S A.
129. Peschel A, Collins LV (2001) Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. Peptides. 22(10):1651-9
130. Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Götz F (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to

defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. J Biol Chem. 274(13):8405-10

131. Peters G, Locci R, Pulverer G (1982) Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. J Infect Dis. 146(4):479-82

132. Prevost G, Couppie P, Monteil H (2003) Staphylococcal epidermolysins. Curr Opin Infect Dis. 16(2):71-6

133. Proctor RA, Peters G (1998) Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. Clin Infect Dis. 27(3):419-22

134. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD (1995) Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 20(1):95-102

135. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W (2000) Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother. 44(12):3357-63

136. Regassa LB, Novick RP, Betley MJ (1992) Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 60(8):3381-8

137. Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Götz F (2005) Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. Appl Environ Microbiol. 71(5):2663-76

138. Riber U, Espersen F, Skinhoj P, Kharazmi A (1993) Induction of oxidative burst response in human neutrophils by adherent staphylococci. Comparison between *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. APMIS. 101(1):55-60

139. Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS, Bayles KW (2007) The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(19):8113-8

-
140. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP (1999) Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med.* 27(5):887-92
141. Roberts ME, Stewart PS (2005) Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology.* 151(Pt 1):75-80
142. Roche FM, Massey R, Peacock SJ, Day NP, Visai L, Speziale P, Lam A, Pallen M, Foster TJ (2003) Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology.* 149(Pt 3):643-54
143. Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, Scherpe S, Davies AP, Harris LG, Horstkotte MA, Knobloch JK, Ragunath C, Kaplan JB, Mack D (2007) Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials.* 28(9):1711-20
144. Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, Knobloch JK, Heilmann C, Herrmann M, Mack D (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol.* 55(6):1883-95
145. Rohde H, Kalitzky M, Kroger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK, Zander AR, Mack D (2004) Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol.* 42(12):5614-9
146. Rohde H, Knobloch JK, Horstkotte MA, Mack D (2001) Correlation of *Staphylococcus aureus icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. *J Clin Microbiol.* 39(12):4595-6

-
147. Said-Salim B, Dunman PM, McAleese FM, Macapagal D, Murphy E, McNamara PJ, Arvidson S, Foster TJ, Projan SJ, Kreiswirth BN (2003) Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. J Bacteriol. 185(2):610-9
148. Sanford BA, de Feijter AW, Wade MH, Thomas VL (1996) A dual fluorescence technique for visualization of *Staphylococcus epidermidis* biofilm using scanning confocal laser microscopy. J Ind Microbiol. 16(1):48-56
149. Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB, Jr., Tack BF, Vogel HJ (2002) The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. 277(10):8279-89
150. Schneewind O, Model P, Fischetti VA (1992) Sorting of Protein A to the staphylococcal cell wall. Cell. 70(2):267-81
151. Schroeder K, Jularic M, Horsburgh SM, Hirschhausen N, Neumann C, Bertling A, Schulte A, Foster S, Kehrel BE, Peters G, Heilmann C (2009) Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. PloS one. 4(10):e7567
152. Schumacher-Perdreau F, Heilmann C, Peters G, Götz F, Pulverer G (1994) Comparative analysis of a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain and its adhesion-positive, accumulation-negative mutant M7. FEMS Microbiol Lett. 117(1):71-8
153. Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K (2006) Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. BMC Microbiol. 6:53
154. Shanks RM, Donegan NP, Graber ML, Buckingham SE, Zegans ME, Cheung AL, O'Toole GA (2005) Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. Infect Immun. 73(8):4596-606
155. Shimoda M, Ohki K, Shimamoto Y, Kohashi O (1995) Morphology of defensin-treated *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 63(8):2886-91
156. Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH (1999) Fibronectin-binding protein acts as

- Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to Integrin alpha5beta1. Cellular microbiology. 1(2):101-17
157. Souli M, Giamarellou H (1998) Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother. 42(4):939-41
158. Spoering AL, Gilmore MS (2006) Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. Curr Opin Microbiol. 9(2):133-7
159. Steinberg D, Poran S, Shapira L (1999) The effect of extracellular polysaccharides from *Streptococcus mutans* on the bactericidal activity of human neutrophils. Arch Oral Biol. 44(5):437-44
160. Stepanovic S, Vukovic D, Jezek P, Pavlovic M, Svabic-Vlahovic M (2001) Influence of dynamic conditions on biofilm formation by staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 20(7):502-4
161. Stewart PS (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int J Med Microbiol. 292(2):107-13
162. Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 358(9276):135-8
163. Stranger-Jones YK, Bae T, Schneewind O (2006) Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(45):16942-7
164. Sun D, Accavitti MA, Bryers JD (2005) Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. Clin Diagn Lab Immunol. 12(1):93-100
165. Sutherland I (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology. 147(Pt 1):3-9
166. Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE, Horswill AR (2011) Peptide signaling in the staphylococci. Chem Rev. 111(1):117-51
167. Timmerman CP, Mattsson E, Martinez-Martinez L, De Graaf L, Van Strijp JA, Verbrugh HA, Verhoef J, Flier A (1993) Induction of release of tumor necrosis

factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. *Infect Immun.* 61(10):4167-72

168. Toledo-Arana A, Merino N, Vergara-Irigaray M, Debarbouille M, Penades JR, Lasa I (2005) *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arIRS* two-component system. *J Bacteriol.* 187(15):5318-29

169. Ton-That H, Mazmanian SK, Faull KF, Schneewind O (2000) Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Sortase catalyzed in vitro transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH(2)-Gly(3) substrates. *J Biol Chem.* 275(13):9876-81

170. Trottonda MP, Tamber S, Memmi G, Cheung AL (2008) MgrA represses biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 76(12):5645-54

171. Tsang LH, Cassat JE, Shaw LN, Beenken KE, Smeltzer MS (2008) Factors contributing to the biofilm-deficient phenotype of *Staphylococcus aureus* sarA mutants. *PloS one.* 3(10):e3361

172. Tung H, Guss B, Hellman U, Persson L, Rubin K, Ryden C (2000) A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem J.* 345 Pt 3:611-9

173. Tzianabos AO, Wang JY, Lee JC (2001) Structural rationale for the modulation of abscess formation by *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(16):9365-70

174. Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, Penades JR, Lasa I (2003) SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 48(4):1075-87

175. Valle J, Vergara-Irigaray M, Merino N, Penades JR, Lasa I (2007) sigmaB regulates IS256-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotypic variation. *J Bacteriol.* 189(7):2886-96

176. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, Wolff M, Spencer RC, Hemmer M (1995) The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of

Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. JAMA. 274(8):639-44

177. von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G (2001) Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. The New England journal of medicine. 344(1):11-6

178. Vuong C, Otto M (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. Microbes Infect. 4(4):481-9

179. Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR, Otto M (2004) Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. Cell Microbiol. 6(3):269-75

180. Wang R, Khan BA, Cheung GY, Bach TH, Jameson-Lee M, Kong KF, Queck SY, Otto M (2012) *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. J Clin Invest. 121(1):238-48

181. Weichhart T, Horky M, Sollner J, Gangl S, Henics T, Nagy E, Meinke A, von Gabain A, Fraser CM, Gill SR, Hafner M, von Ahsen U (2003) Functional selection of vaccine candidate peptides from *Staphylococcus aureus* whole-genome expression libraries in vitro. Infect Immun. 71(8):4633-41

182. Weidenmaier C, Peschel A (2008) Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. Nat Rev Microbiol. 6(4):276-87

183. Weiss WJ, Lenoy E, Murphy T, Tardio L, Burgio P, Projan SJ, Schneewind O, Alksne L (2004) Effect of *srtA* and *srtB* gene expression on the virulence of *Staphylococcus aureus* in animal models of infection. J Antimicrob Chemother. 53(3):480-6

184. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis. 5(12):751-62

-
185. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 39(3):309-17
186. Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP (2004) Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol.* 186(6):1838-50
187. Yarwood JM, Schlievert PM (2003) Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest.* 112(11):1620-5
188. Yeaman MR, Bayer AS, Koo SP, Foss W, Sullam PM (1998) Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. *J Clin Invest.* 101(1):178-87
189. Yu FP, McFeters GA (1994) Rapid in situ assessment of physiological activities in bacterial biofilms using fluorescent probes. *J Microbiol Methods.* 20:1-10

6 Abbildungsverzeichnis

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 <i>S. aureus</i> Biofilm (aus Archer et al. 2011 (2))	11
Abbildung 1-2 Mechanismus der Biofilmenstehung (aus Otto et. al 2008 (122))	16
Abbildung 3-1 Nachweis von <i>sasC</i> in klinischen <i>S. aureus</i> -Isolaten	30
Abbildung 3-2 Prävalenz des <i>sasC</i> -Gens bei klinischen <i>S. aureus</i> -Isolaten	31
Abbildung 3-3 Expression von SasC in <i>S. carnosus</i> (pSasC4074).....	32
Abbildung 3-4 SasC-vermittelte Zellaggregation	33
Abbildung 3-5 SasC-vermittelte Zellaggregation (makroskopisch).....	34
Abbildung 3-6 SasC-vermittelte Zellaggregation ist Protease-sensitiv.....	36
Abbildung 3-7 SasC-vermittelte Biofilmbildung auf Polystyrol	37
Abbildung 3-8 Struktureller Aufbau des SasC-Proteins	38
Abbildung 3-9 Coiled-Coils-Output für die Aminosäuresequenz des SasC-Proteins.....	40

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 7-1 Vorkommen von <i>sasC</i> bei Methicillin-sensiblen <i>S. aureus</i> -Isolaten (MSSA).....	V
Tabelle 7-2 Vorkommen von <i>sasC</i> bei Methicillin-resistenten <i>S. aureus</i> -Isolaten (MRSA)	VI

7 Anhang

7.1 Abkürzungen und Maßeinheiten

Aaa	<i>Staphylococcus aureus</i> autolysin
Aae	Autolysin/adhesin
Abb.	Abbildung
Agr	accessory gene regulator
AIP	auto inducing peptide
APS	Ammoniumpersulfat
AtIE	AutolysinE
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Bovine serum albumin
C	Celsius
CAMPs	kationische antimikrobielle Substanzen
CHIPS	chemotaxis inhibitory protein of staphylococci
DNA	Desoxyribonukleinacid
dl	Deziliter
Eap	extracellular adherence protein
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fa.	Firma
g	Gramm
h	hora (lat. Stunde)
HHWm	Hussain-Hastings-White modified medium
<i>ica</i>	intercellular adhesion
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kd	Kilodalton
kb	Kilobasenpaar

LB	lysogeny broth
M	molar, mol/l
mM	milimolar, mmol/l
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minuten
Mio.	Millionen
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	Methicillin-sensible <i>Staphylococcus aureus</i>
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMN	polymorphkernige Granulozyten
PMMA	Polymethylmethacrylat
PNAG	Poly-N-acetylglucosamine
PSM	phenol-soluble modulins
REM	konfokales Rasterelektronenmikroskop
rpm	rounds per minute
RNA	ribonukleinacid
Sas	<i>Staphylococcus aureus</i> surface
SarA	staphylococcal accessory regulator
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. carnosus</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>

<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate
SCVs	small colony variants
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TSB	Tryptic Soy Bouillon
üN	über Nacht

7.2 Tabellen

Senisibilität	Material	Nummer	sasC
MSSA	Blutkultur	d8330	positiv
MSSA	Blutkultur	k10426	positiv
MSSA	Blutkultur	k9891	positiv
MSSA	Blutkultur	k13843	positiv
MSSA	Blutkultur	k4732	positiv
MSSA	Blutkultur	a19024	positiv
MSSA	Blutkultur	k4050	positiv
MSSA	Blutkultur	k3516	positiv
MSSA	Blutkultur	k13737	positiv
MSSA	Blutkultur	k14155	positiv
MSSA	Blutkultur	k16290	positiv
MSSA	Blutkultur	k1341	positiv
MSSA	Blutkultur	k1373	positiv
MSSA	Blutkultur	k2259	positiv
MSSA	Blutkultur	k2479	positiv
MSSA	Blutkultur	k87511	positiv
MSSA	Blutkultur	k9521	positiv
MSSA	Gewebe	14799	positiv
MSSA	Gewebe	OM184/1	positiv
MSSA	Gewebe	OM209/2	positiv
MSSA	Gewebe	103041	positiv
MSSA	Gewebe	a22616	positiv
MSSA	Gewebe	OM372/1	positiv
MSSA	Gewebe	OM420/1	positiv
MSSA	Gewebe	OM299/1	positiv

MSSA	Abstrich	10768	positiv
MSSA	Abstrich	a260271	negativ
MSSA	Abstrich	10884	positiv
MSSA	Abstrich	7645a	positiv
MSSA	Abstrich	OM234	positiv
MSSA	Abstrich	A22755	positiv
MSSA	Punktat	4459II	positiv
MSSA	Punktat	k8294I	positiv
MSSA	Punktat	OM222/2	positiv
MSSA	Punktat	OM509/1	negativ

Tabelle 7-1 Vorkommen von *sasC* bei Methicillin-sensiblen *S. aureus*-Isolaten (MSSA)

Senisibilität	Material	Nummer	<i>sasC</i>
MRSA	Blutkultur	k15055	positiv
MRSA	Blutkultur	k1660	positiv
MRSA	Blutkultur	k17090	positiv
MRSA	Blutkultur	k2259	positiv
MRSA	Blutkultur	k5249	positiv
MRSA	Blutkultur	k13735	positiv
MRSA	Blutkultur	k7730	positiv
MRSA	Blutkultur	k15196	positiv
MRSA	Blutkultur	k17654	positiv
MRSA	Blutkultur	l2872	positiv
MRSA	Blutkultur	k10126	positiv
MRSA	Blutkultur	k6200	positiv
MRSA	Blutkultur	k7353	positiv
MRSA	Blutkultur	k767	positiv
MRSA	Blutkultur	k9831	positiv
MRSA	Blutkultur	k2713	positiv

MRSA	Blutkultur	k3402	positiv
MRSA	Blutkultur	k10484	positiv
MRSA	Blutkultur	k15379	positiv
MRSA	Blutkultur	k18554	positiv
MRSA	Blutkultur	k1539	positiv
MRSA	Blutkultur	l1334	positiv
MRSA	Abstrich	10884	positiv
MRSA	Abstrich	a24695VII	positiv
MRSA	Katheter	15515	positiv
MRSA	Katheter	a22209	positiv
MRSA	Katheter	a25621	positiv
MRSA	Katheter	a17384	positiv
MRSA	Katheter	a18460	positiv
MRSA	Katheter	a20734	positiv
MRSA	k. A.	17994	positiv

Tabelle 7-2 Vorkommen von *sasC* bei Methicillin-resistenten *S. aureus*-Isolaten (MRSA)

7.3 Publikation

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden publiziert in:

Schroeder K, Jularic M, Horsburgh SM, Hirschhausen N, Neumann C, Bertling A, Schulte A, Foster S, Kehrel BE, Peters G, Heilmann C (2009) Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. *PloS one*. 4(10):e7567

7.4 Lebenslauf

7.5 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Peters für die Möglichkeit diese Dissertation an Institut für Medizinische Mikrobiologie durchführen zu können herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Christine Heilmann für das Überlassen dieses sehr interessanten Themas, die engagierte und jederzeit hervorragende Betreuung während der experimentellen Arbeit sowie die unendliche Geduld nicht nur im Hinblick auf das Verfassen dieser Dissertation.

Den medizinisch-technischen des Instituts danke ich für die Einführung in die für mich neuen experimentellen Methoden und die Hilfe bei deren Anwenden im während meiner Tätigkeit. Insbesondere die tatkräftige Unterstützung von Katrin Schroeder war viele Male unermesslich wertvoll.

Meiner Freundin, Margarethe Broemel, danke ich für die große Hilfe während der Tage und Wochen der Korrektur dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für die immerwährende Unterstützung nicht nur im Laufe der Arbeit an dieser Promotion sondern auch in den Jahren des Studiums

Hamburg, den 23.06.2014