

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

Direktor: Prof. Dr. med. Werner Solbach

in Zusammenarbeit mit

dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

**Wechselwirkung des *agr-Quorum sensing*-Systems mit dem Regulon des
alternativen Sigmafaktors σ^B im Rahmen der Regulation von Virulenzfaktoren
in *Staphylococcus epidermidis***

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Sandra Schewe

aus Neumünster

Lübeck 2009

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Johannes Knobloch
2. Berichtstatter: Priv. Doz. Dr. med. Bernhard Schaaf

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2010
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 05.07.2010

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

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Fragestellung und Arbeitshypothese	7
2 Einleitung	8
2.1 Staphylokokken	8
2.2 Infektionen durch Staphylokokken	9
2.3 Biofilmbildung	9
2.3.1 Primäre Adhäsion in <i>Staphylococcus epidermidis</i>	12
2.3.2 Akkumulative Phase der Biofilmbildung	13
2.4 Regulative Mechanismen der Biofilm-Bildung	15
2.5 Andere potentielle Virulenzfaktoren in <i>Staphylococcus epidermidis</i>	19
2.5.1 Proteasen	19
2.5.2 Lipasen	22
2.6 Quorum-sensing in Staphylokokken	23
2.6.1 Aufbau und Mechanismus des <i>agr</i> -System	24
2.6.2 Rolle von <i>agr</i> im Biofilm	25
2.6.3 Rolle von <i>agr</i> innerhalb von Infektionen	26
3 Material und Methoden	27
3.1 Material	27
3.1.1 Chemikalien und Einwegartikel	27
3.1.2 Laborgeräte	27
3.1.3 Medien	29
3.1.4 Lösungen	31
3.1.5 Bakterienstämme	33
3.2 Methoden	35
3.2.1 Kultivierung von Bakterien	35
3.2.2 Herstellung von Phagenlysaten	35
3.2.3 Phagentransduktion	36
3.2.4 Semiquantitative Bestimmung der Biofilmbildung	36
3.2.5 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	37
3.2.6 Nachweis des δ -Hämolysins	37
3.2.7 DNA-Präparation	38
3.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
3.2.9 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	39

3.2.10	Lipaseaktivität	40
3.2.11	Proteaseaktivität	40
3.2.12	Amicon Ultra Präparation	40
3.2.13	Lipaseaktivität Quantifizierung	41
3.2.14	Wachstumskurvenbestimmung der Stämme	41
3.2.15	Bestimmung der statistischen Signifikanz	42
4	Ergebnisse	42
4.1	Beginn der δ-Hämolyseproduktion in drei <i>S. epidermidis</i>-Isolaten	42
4.2	Etablierung der Deletionsmutanten	43
4.3	Phänotypische Charakterisierung der <i>agr</i>-Mutanten	46
4.3.1	Einfluss von <i>agr</i> auf das Wachstumsverhalten	46
4.3.2	Regulation von Virulenzfaktoren durch <i>agr</i>	53
5	Diskussion	66
5.1	Generierung der Mutanten und Nachweis korrekter Transduktion	66
5.2	<i>agr</i> und Biofilmbildung	70
5.3	Einfluss von <i>agr</i> auf extrazelluläre Proteasen	72
5.4	Einfluss von <i>agr</i> auf extrazelluläre Lipasen	75
6	Zusammenfassung	81
7	Literaturverzeichnis	83
8	Danksagung	99
9	Lebenslauf	100

Abkürzungsverzeichnis

<i>aap</i>	Gen des Akkumulation-assoziierten Proteins (<i>accumulation associated protein</i>)
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
bp	Basenpaare
BHI	Hirn-Herz-Glukose-Bouillon (<i>brain heart infusion</i>)
<i>bap</i>	Gen des Biofilm-assoziierten Proteins (<i>biofilm-associated protein</i>)
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
<i>embp</i>	Gen des Fibronectin-bindenden Proteins (<i>fibronectin binding protein</i>)
EtOH	Ethanol
<i>fbe</i>	Gen des Fibrinogen-bindenden Proteins (<i>fibrinogen binding protein</i>)
h	Stunde
<i>ica</i>	Gen des Interzellulären Adhäsins (<i>intercellular adhesin</i>)
kDa	Kilodalton
KBE	Kolonien-bildende Einheiten
Min	Minute
NB2+	<i>nutrient broth no. 2</i> mit CaCl ₂
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
OD ₅₇₀	optische Dichte bestimmt bei einer Wellenlänge von 570 nm
PBE	Plaque-bildende Einheiten
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PSM	<i>phenol-soluble modulines</i>
PIA	interzelluläres Polysaccharid-Adhäsins (<i>polysaccharide intercellular adhesin</i>)
<i>rsb</i>	Regulator von σ^B
s	Sekunde

<i>sigB</i>	Sigma B
STA	Staphylokokkentypisierungsgar
TSB _{BBL}	Trypton Soja Brühe (<i>trypticase soy broth</i>) der Firma Becton Dickinson, Cockseyville, MD, USA
U	Enzymatische Einheit (<i>units</i>)
U/min	Umdrehung pro Minute
VE	vollentionisiert
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Fragestellung und Arbeitshypothese

Staphylococcus epidermidis ist der häufigste Erreger Fremdkörper-assoziiierter Infektionen, wobei die Fähigkeit, mehrlagige Biofilme auf implantierten Fremdkörpern auszubilden, einen entscheidenden Pathogenitätsfaktor darstellt (Mack *et al.*, 2006b). Darüber hinaus gab es Hinweise darauf, dass Exoproteine, wie Proteasen und Lipasen als wichtige Komponenten für die Virulenz von *S. epidermidis* fungieren können. In *S. epidermidis* werden diese Virulenzfaktoren durch den alternativen Sigmafaktor σ^B reguliert (Kies *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression vieler Oberflächenproteine in *S. epidermidis* durch das *agr*-System, ein weiterer zentraler Regulator, herunterreguliert werden und dass im Gegensatz dazu ein Großteil der sezernierten Exoproteine hochreguliert werden (Vuong *et al.*, 1999). In unserer Arbeitsgruppe wurde bewiesen, dass der alternative Sigmafaktor σ^B *agr* beeinflusst (Kneschke, unpubliziert). Um diesen Einfluss genauer charakterisieren zu können, wurden neben σ^B - und *agr*-Einzelmutanten Doppelmutanten des σ^B - und *agr*-Systems etabliert.

Als Voraussetzung für die Etablierung der notwendigen Mutanten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Knobloch zur Klärung der Frage, ob RsbU selbst als Regulator der Biofilmbildung fungiert, bereits Mutanten von drei unabhängigen *S. epidermidis*-Isolaten generiert, bei denen Einzelgene des σ^B -Operons und die gesamte regulative Kaskade inaktiviert sind. Die Arbeitsgruppe Otto (NIH, Hamilton, USA) generierte eine definierte Mutante des *agr*-Operons von *S. epidermidis* mit einer Spectinomycin-Resistenzkassette, die als Grundlage für die Transduktion benutzt wurde. Um die Frage zu klären, inwiefern ein Zusammenhang der Regulation zwischen dem alternativen Sigmafaktor σ^B und dem *agr*-System besteht, wurden in dieser Arbeit *agr*-Mutanten der *S. epidermidis*-Wildtypen 1457, 1057 und 8400 und den entsprechenden Einfachmutanten *rsbU*, *rsbUVW* und *sigB* generiert und der Einfluss des *agr*-Quorum-sensing Systems auf die Biofilmbildung und die Expression extrazellulärer Proteasen und Lipasen untersucht.

2 Einleitung

2.1 Staphylokokken

Bereits im April 1880 hielt der schottische Arzt A. Ogston den grundlegenden Vortrag beim 9. Kongress der Deutschen Chirurgischen Gesellschaft in Berlin, in dem er den Begriff *Staphylococcus* prägte (Hof and Dörries, 2000). Früher wurden Staphylokokken mit den Gattungen *Stomatococcus*, *Planococcus* und *Micrococcus* zu der Familie der *Micrococcae* zugeordnet. Neuerdings wurden sie jedoch der Familie der *Staphylococcaceae* zugeordnet, die fakultativ anaerob wachsen. Eine Ausnahme ist *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius*, eine obligat anaerobe Subspezies (Garrity, 2005). Im Vergleich zu den anderen Gattungen weisen Staphylokokken einen niedrigen GC-Gehalt der DNA auf (Kloos *et al.*, 1997; Wilkinson, 1997). Sie sind runde bis ovale nichtsporenbildende, fakultativ anaerobe grampositive Kokken von 0,5-1,5 µm Durchmesser, die sich bei der Beobachtung unter dem Lichtmikroskop in Haufen oder Trauben darstellen (griech: *staphyle*; die Traube) (Hof and Dörries, 2000). Staphylokokken sind unbeweglich und bilden Katalase, die die Reduktion von H_2O_2 zu $H_2O + O_2$ katalysiert. Innerhalb des Genus *Staphylococcus* können die Spezies mit einer Vielzahl an Methoden differenziert werden, wobei eine Reihe dazu noch in Subspezies unterteilt werden kann, sodass zur Zeit insgesamt 64 Taxa bekannt sind (Devriese *et al.*, 2005; Kloos *et al.*, 1997; Kloos *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1998; Pantueck *et al.*, 2005; Probst *et al.*, 1998; Spergser *et al.*, 2003; Takashi *et al.*, 1999; Trulzsch *et al.*, 2002; Vernozy-Rozand *et al.*, 2000). Die Differenzierung erfolgt in der klinischen Diagnostik durch Beurteilung der Koloniemorphologie, des Antibiogramms, der spezifischen Enzymausstattung und der Fähigkeit zur Säurebildung aus verschiedenen Kohlenhydraten. Außerdem kann durch Analysen der Aminosäurezusammensetzung der Interpeptidbrücken des Peptidglykans, der Teichonsäuren der Zellwand, sowie der zellulären Fettsäurekomponente und gentechnischen Methoden zum Nachweis von speziesspezifischen DNA-Sequenzen, eine weitere Differenzierung erreicht werden. Nicht alle Staphylokokkenspezies kommen beim Menschen regelmäßig als Besiedlungsflora der Haut vor. Einige

Spezies weisen eine besondere Präferenz zu einer bestimmten Körperregion auf. So wird *S. capitis* fast ausschließlich auf der behaarten Kopfhaut isoliert, während *S. auricularis* besonders im äußeren Gehörgang, *S. haemolyticus* und *S. hominis* im Bereich der apokrinen Schweißdrüsen gefunden werden. Andere Spezies werden ubiquitär auf der Körperoberfläche isoliert, wobei *S. epidermidis* die am häufigsten isolierte Spezies ist.

2.2 Infektionen durch Staphylokokken

Der zu den Koagulase-positiven Staphylokokken zugeordnete *Staphylococcus aureus* besitzt ein großes pathogenes Potential und ist in der Lage beim Menschen zum Teil lebensbedrohliche, eitrige Infektionen der Haut, der Weichteile und der Knochen hervorzurufen. Die Bildung von Toxinen ist die Ursache für eine Reihe ernstzunehmender Krankheitsbilder, wie Lebensmittelvergiftungen, das *staphylococcal scaled skin syndrome* und das Toxische Schocksyndrom (Tenover and Gaynes, 2000). Mit der Ausnahme von *Staphylococcus saprophyticus*, der als Erreger von Harnwegsinfektionen gilt, wurden Koagulase-negative Staphylokokken lange als apathogen eingestuft (Arremark and Telander, 1978). Besonders im Rahmen von nosokomialen Infektionen wurde *S. epidermidis* erst in den letzten beiden Jahrzehnten eingehender untersucht. Die Infektionsrate korreliert mit dem in den Krankenhäusern zugenommenen Gebrauch von Fremdkörperimplantaten und der wachsenden Anzahl von immunsupprimierten Patienten. Koagulase-negative Staphylokokken gehören zu den häufigsten Erregern von Infektionen an implantierten Fremdkörpern wie zum Beispiel Venenkathetern, CAPD-Kathetern, Liquorshunts, künstlichen Herzklappen und Gelenken sowie Gefäßprothesen, intraokulären Linsen und Herzschrittmachern. Die Therapie von Fremdkörper-assoziierten Infektionen stellt wegen einer ausgeprägten und häufig multiplen Antibiotikaresistenz ein zunehmendes Problem dar.

2.3 Biofilmbildung

Definitionsgemäß handelt es sich bei Biofilmen um eine Gemeinschaft von Mikroorganismen, die an eine Oberfläche gebunden und von einer selbst

synthetisierten Matrix umgeben sind (Costerton *et al.*, 1999; O'Toole *et al.*, 2000). Diese, zum Teil als Schleimbildung bezeichnete Fähigkeit von *S. epidermidis* wurde bereits vor Jahrzehnten charakterisiert (Marrie *et al.*, 1982; Peters *et al.*, 1981). Eine besondere Bedeutung erlangen heutzutage fremdkörperassoziierte Biofilminfektionen in Hinblick auf nosokomiale Erkrankungen (Bayston and Penny, 1989). 1989 postulierten Bayston und Penny zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen der Produktion eines mukoiden Materials durch *S. epidermidis*-Stämme und der Fähigkeit zur Kolonisation von Holter-Shunts (Bayston and Penny, 1989). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass *S. epidermidis* Polymeroberflächen in Form von adhärennten Biofilmen aus mehreren Zellschichten besiedeln kann, die von Exopolysacchariden umhüllt sind, welche als Schleim oder Glycocalyx bezeichnet werden (Mack, 1999). Ein Biofilm ist ein komplexes Gebilde, das den Bakterien günstige Lebensbedingungen und Schutz vor Umwelteinflüssen bietet (Costerton *et al.*, 2003). Nach Anlagerung der Bakterien an der Oberfläche bilden sich Mikrokolonien, die dann durch Zellaggregation und Einbettung in eine Exopolysaccharidmatrix zum eigentlichen Biofilm akkumulieren (Stoodley *et al.*, 2002). Betrachtet man *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilme unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop erkennt man, dass diese von Kanälen durchzogen sind, die alle Bereiche des Biofilms mit Nährstoffen versorgen (Costerton *et al.*, 2003; Stoodley *et al.*, 2002). In *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* durchgeführte Expressionsstudien zeigten, dass Genregulationsvorgänge den Übergang von einer planktonischen in eine sessile Lebensform kontrollieren (Prigent-Combaret *et al.*, 1999; Stoodley *et al.*, 2002). In *Pseudomonas aeruginosa* sind vor allem Gene betroffen, die am Stoffwechsel, Membranaufbau, Transport und der Regulation von Genexpression beteiligt sind (Whiteley *et al.*, 2001). Auch innerhalb des Biofilms durchlaufen Bakterien verschiedene Expressionsmuster, die es der funktionell heterogenen Gemeinschaft ermöglichen, sich an wechselnde physiologische Gegebenheiten anzupassen (Sauer *et al.*, 2002; Stoodley *et al.*, 2002). Die differentielle Genexpression innerhalb eines *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilms unterliegt einerseits der Kontrolle durch *quorum sensing*, also der Steuerung der Zelldichte über frei diffusible Signalstoffe (Davies *et al.*, 1998; Whiteley *et al.*,

1999), andererseits stellen Flüssigkeitsverteilung und Nährstoffangebot wichtige äußere Determinanten dar, die Einfluss auf die Biofilmarchitektur nehmen.

Die Biofilmbildung verläuft in zwei Phasen (Götz, 2002). In der ersten Phase heften sich die Zellen durch eine Reihe von spezifischen und unspezifischen Faktoren an der Polymeroberfläche beziehungsweise an dort gebundenen extrazellulären Matrixbestandteilen an (Abbildung 1). In der zweiten Phase der Biofilmbildung akkumulieren die Zellen als mehrlagiger Biofilm, wobei die Mehrzahl der Zellen keinen direkten Kontakt zu der Polymeroberfläche beziehungsweise den Matrixbestandteilen besitzt und durch interzelluläre Adhäsion in den Biofilm eingebunden ist (Abbildung 1).

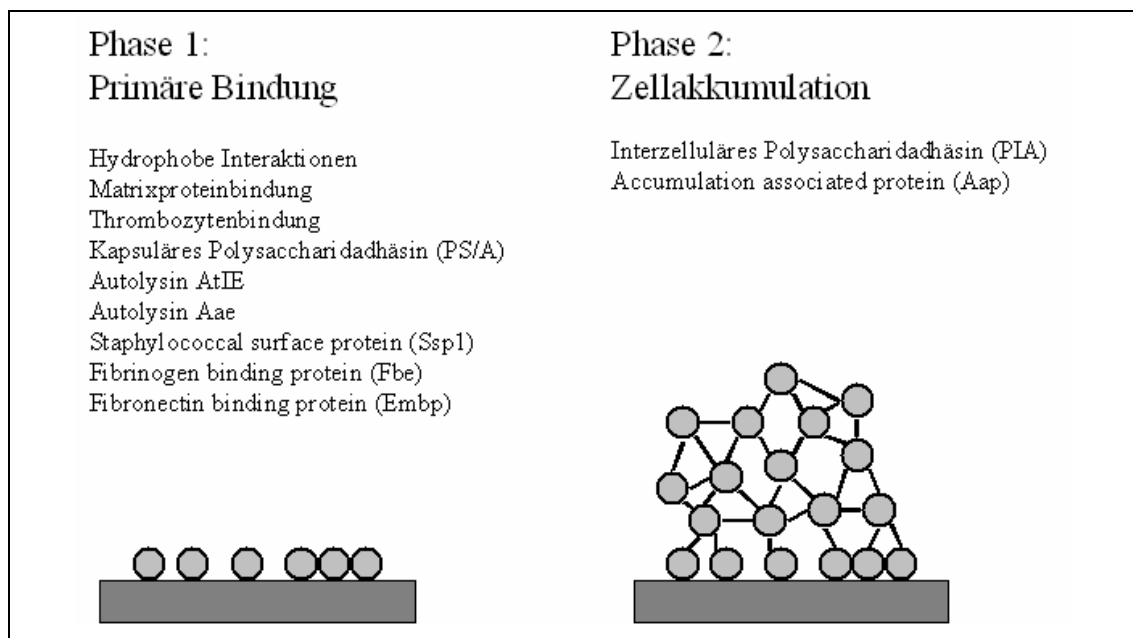


Abbildung 1 Schematische Darstellung des zweiphasigen Verlaufes der Biofilmbildung von *S. epidermidis* mit Auflistung der beteiligten Faktoren. Während der primären Bindung kommt es durch eine Reihe von spezifischen und unspezifischen Faktoren zur Adhärenz an die Polymeroberfläche. In der zweiten Phase kommt es durch Zellakkumulation zur Bildung eines mehrlagigen Biofilms, in dem die meisten Zellen keinen direkten Kontakt zur Polymeroberfläche besitzen.

2.3.1 Primäre Adhäsion in *Staphylococcus epidermidis*

Eine große Anzahl an Studien hat gezeigt, dass die primäre Bindung von *S. epidermidis* an Polymeroberflächen ein komplexer Vorgang ist. Eigentlich alle *S. epidermidis*-Stämme können an Polymeroberflächen binden, auch wenn quantitative Unterschiede zu beobachten sind (Espersen *et al.*, 1990; Hogt *et al.*, 1986; Muller *et al.*, 1993; Tojo *et al.*, 1988). Das Bindungsvermögen unterscheidet sich bei verschiedenen Stämmen in Abhängigkeit von der Hydrophobizität der Zelloberfläche der Stämme und ist auch vom Material abhängig. Die Bindung von *S. epidermidis* an Polymeroberflächen lässt sich durch eine Vorbehandlung durch Proteasen hemmen, was auf eine funktionelle Beteiligung von Oberflächenproteinen hinweist (Pascual *et al.*, 1986). In Gegenwart von Serum, Plasma oder Albumin ist die Bindungskapazität an Polymeroberflächen merklich herabgesetzt (Muller *et al.*, 1991). Dahingegen wurde in verschiedenen Versuchen nachgewiesen, dass die Bindung von *S. epidermidis* in Gegenwart unterschiedlicher Matrixproteine wie Fibronectin und zu einem geringeren Teil auch Fibrinogen wesentlich verstärkt wird, während Laminin nicht zu einer vermehrten Bindung im Vergleich zu einer mit Albumin vorbehandelten Oberfläche beiträgt (Hermann *et al.*, 1988; Vaudaux *et al.*, 1989). Vergleicht man eine native Polymeroberfläche mit einer mit Fibronectin beziehungsweise Fibrinogen vorbehandelten, so scheint die Bindung an der nativen Oberfläche quantitativ höher zu sein (Muller *et al.*, 1993). In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Faktoren entdeckt, die an der primären Bindung von *S. epidermidis* an Polymeroberflächen funktionell beteiligt sind. Als einer der ersten Faktoren wurde ein Kapselpolysaccharid (PS/A) als funktioneller Faktor für die primäre Bindung von *S. epidermidis* RP62A an Silastic-Kathetern beschrieben (Tojo *et al.*, 1988), während PS/A keinen Einfluss auf die Bindung an Polyethylen aufweist. Die chemische Struktur von PS/A konnte bisher nicht schlüssig aufgeklärt werden. Die Tatsache, dass der für die Synthese des interzellulären Polysaccharids (PIA) essentielle Genlokus *icaADBC* (Mckenney *et al.*, 1998) ebenfalls für die Synthese von PS/A verantwortlich sein soll, lässt die Existenz von PS/A als eigenständiges, im Rahmen der primären Bindung fungierendes Adhäsins, als unwahrscheinlich erscheinen. Das *S. epidermidis* Autolysin AtIE vermittelt die Bindung an das Matrixprotein Vitronectin sowie an

Polystyroloberflächen. Eine Transposonmutante, in der das Gen des Autolysins AtlE inaktiviert war, zeigte im Vergleich zum Wildtyp *S. epidermidis* O-47 neben einer erheblich verminderten Bindung an Polystyrol eine verminderte Oberflächenhydrophobizität (Heilmann *et al.*, 1996). Da der Stamm aber erstaunlicherweise weiterhin in der Lage ist, einen Biofilm an Glas auszubilden, müssen weitere Adhäsionsfaktoren eine Rolle spielen. Das 220 kDa große Oberflächenprotein 1 (*Staphylococcal surface protein* Ssp-1) findet sich in einer Fimbrien-ähnlichen Struktur auf der Zelloberfläche und vermittelt eine Bindung an Polystyrol (Timmerman *et al.*, 1991; Veenestra *et al.*, 1996). Spezifische, gegen dieses Protein gerichtete Antikörper inhibierten konzentrationsabhängig die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* an Polystyrolkugeln. Weiterhin sind das Fibrinogen-bindende Protein Fbe und das Fibronectin-bindende Protein Embp für die Bindung an wirtseigene Matrixproteine von Bedeutung. Für die extrazelluläre Lipase GehD konnte gezeigt werden, dass sie die Bindung an Kollagen vermittelt (Bowden *et al.*, 2002). Des Weiteren sollen Lipoteichonsäuren an der Bindung von *S. epidermidis* an Fibrin-Thrombozytentromben und Fibronectin beteiligt sein (Chugh *et al.*, 1990; Hussain *et al.*, 1997).

2.3.2 Akkumulative Phase der Biofilmbildung

Eine wesentliche Voraussetzung in einem vielschichtigen Biofilm ist die Fähigkeit der Bakterienzellen, untereinander adhäsive Kräfte auszuüben. Als bedeutendster Faktor hinsichtlich dieser Eigenschaft hat sich das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA) herausgestellt. PIA ist ein lineares Homoglykan bestehend aus 130 β -(1,6)-verknüpften N-Acetylglucosamineinheiten (Mack *et al.*, 1996). Es wurde erstmals aus dem biofilmpositiven Stamm *S. epidermidis* 1457 isoliert (Mack, 1992) und lässt sich mittels Ionenaustauschchromatographie in zwei Polysaccharidfraktionen aufreinigen, die als Polysaccharid I (>80%) und II (<20%) bezeichnet werden. In einer Auswahl von über 179 *S. epidermidis*-Stämmen konnte die Korrelation zwischen biofilmpositivem Phänotyp und PIA-Produktion gezeigt werden (Mack *et al.*, 1996). In der biofilmnegativen Transposonmutante M11 des biofilmpositiven *S. epidermidis* 13-1 lässt sich hingegen kein PIA nachweisen (Mack *et al.*, 1994). Der für die PIA-Synthese verantwortliche Genort wurde 1996 von

Heilmann identifiziert (Heilmann *et al.*, 1996). Es handelt sich hierbei um das *ica* (*intercellular adhesion*)- Operon, bestehend aus den vier in gleicher Transkriptionsrichtung ausgerichteten Genen *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* (Gerke *et al.*, 1998). Das Gen *icaR*, welches als Repressor fungiert, ist diesem Operon vorgelagert (Conlon *et al.*, 2002b). Das negative Regulatorgen *icaR* wurde als Mitglied der *tetR* Transkriptionsregulatoren-Familie beschrieben, dessen eigene Transkription durch hohe Konzentrationen an Ethanol supprimiert wird. Hierbei erfolgt eine *ica*-Induktion durch Ethanol auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene über eine verminderte *icaR*-Transkription (Conlon *et al.*, 2002a), während die Induktion durch NaCl *icaR*-unabhängig erfolgt (Conlon *et al.*, 2002a). Auch die Induktion der *ica*-Transkription durch stammabhängige subinhibitorische Tetracyclinkonzentrationen war mit einer Repression der *icaR*-Transkription assoziiert (Conlon *et al.*, 2002a). IcaA allein zeigte nur eine geringe N-Acetylglucosaminyl-Transferaseaktivität bei dem Versuch die Synthese von PIA *in vitro* in Extrakten von rekombinanten *S. carnosus*-Stämmen wiederherzustellen (Gerke *et al.*, 1998). Durch Koexpression von IcaD konnte die N-Acetylglucosaminyl-Transferaseaktivität jedoch um ein Vielfaches gesteigert werden. Diese beiden Proteine führten zur Synthese von N-Acetylglucosamin-Oligomeren bis zu einer Länge von 20 Zuckerresten. Nur in dem Fall, dass IcaC zusätzlich exprimiert wurde, wurden aber Oligomere synthetisiert, die mit dem PIA-spezifischen Antiserum reagierten. IcaC ist als Transmembranprotein vermutlich am Export von PIA beteiligt (Heilmann *et al.*, 1996). IcaB hat die Aufgabe einer Deacetylase. Sie wird sezerniert und findet sich im Kulturüberstand (Vuong *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu *S. aureus* besitzen nicht alle *S. epidermidis*-Isolate den *icaADBC* Genlokus. Es konnte aber gezeigt werden, dass in Infektions-assoziierten Isolaten im Vergleich zu kommensalen Isolaten der *icaADBC* Genlokus signifikant höher nachgewiesen wurde (Arciola *et al.*, 2001; Baddour *et al.*, 1988; Christensen *et al.*, 1994; Galdbart *et al.*, 2000; Ziebuhr *et al.*, 1997). Das 220 kDa große *accumulation associated protein* (Aap) ist ebenfalls an der Bildung eines proteinvermittelten Biofilms beteiligt. Aap besteht aus zwei Domänen, wobei Domäne A dem SasG von *S. aureus* ähnelt und die Domäne B aus fünf repetitiven Einheiten von jeweils 128 Aminosäuren Länge und einer

unvollständigen Einheit von 68 Aminosäuren besteht. Die 140 kDa große Domäne B erlangt durch proteolytische Spaltung des nativen Aap seine Funktionsfähigkeit und ist entscheidend für die interzelluläre Adhäsion im Biofilm (Hussain *et al.*, 1997; Rohde *et al.*, 2005). Dem *biofilm-associated protein* (Bap) wurde als Pathogenitätsfaktor eine Korrelation zur Genese einer chronischen Mastitis bei Rindern zugesprochen. Bap ist ein 2276 Aminosäuren großes Zellwand-assoziiertes Protein, welches sowohl an der primären Bindung als auch an der interzellulären Adhäsion und Biofilmbildung beteiligt ist (Cucarella *et al.*, 2001; Ubeda *et al.*, 2003). Eine Homologie von Bap konnte bei RP62A mittels Homologie-Recherche nachgewiesen werden. Das Bap-homologe Protein (Bhp) findet sich jedoch nur in weniger als 10% der invasiven *S. epidermidis*-Isolate (Rohde *et al.*, 2004).

2.4 Regulative Mechanismen der Biofilm-Bildung

Sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* wird eine ausgeprägte phänotypische Variabilität hinsichtlich der Biofilmbildung von *S. epidermidis* beobachtet (Baddour *et al.*, 1990; Ziebuhr *et al.*, 1997; Ziebuhr *et al.*, 1999). Es spielen unterschiedliche Umweltfaktoren wie die Zuckerkonzentration (Knobloch *et al.*, 2002; Rachid *et al.*, 2000), die Osmolarität im Medium (Fitzpatrick *et al.*, 2002; Knobloch *et al.*, 2001; Rachid *et al.*, 2000), die Temperatur (König *et al.*, 1998; Rachid *et al.*, 2000; Van Wamel *et al.*, 1998), die O₂-Spannung (Cramton *et al.*, 2001) sowie subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika (Fitzpatrick *et al.*, 2002; Rachid *et al.*, 2000) und Desinfektionsmitteln (Fitzpatrick *et al.*, 2002) eine Rolle. Diese Komponenten können die Transkriptionsaktivität von *icaADBC* und infolgedessen die PIA-Synthese und somit letztlich die Biofilmbildung von Staphylokokken modulieren.

Als ein weiterer Mechanismus, welcher zu einem biofilmbildungsnegativen Phänotyp führt, konnte die Insertion des *insertion sequence element* IS256 im *ica*-Operon beobachtet werden. Dieser Mechanismus konnte durch exakte Exzision des Insertionselementes rückgängig gemacht werden (Ziebuhr *et al.*, 1997; Ziebuhr *et al.*, 1999) Mittels Transposonmutagenese mit Hilfe des temperatursensitiven Plasmids pTV1ts, welches das aus *Enterococcus faecalis* stammende Transposon Tn917 (Shaw and

Clewell, 1985; Youngman *et al.*, 1983) enthält, konnten biofilmbildungsfähige Mutanten, beziehungsweise Mutanten mit verminderter Biofilmbildung generiert werden (Mack *et al.*, 2000). Diese Mutanten wurden in die Klassen I bis IV eingeteilt. Für die Klasse I-Mutanten konnte gezeigt werden, dass der biofilmbildungsfähige Phänotyp auf einer Inaktivierung des *icaADBC*-Operons beruht (Mack *et al.*, 2000). Die Klasse II-Mutante *S. epidermidis* M12 wies außer einem biofilmbildungsnegativen Phänotyp auch eine veränderte Koloniemorphologie auf. Graue bis durchscheinende Kolonien grenzten sich deutlich von den weißen Kolonien des Wildtyps ab. Die Klasse III-Mutanten M15 und M19 zeichneten sich ebenfalls durch eine stark verminderte Biofilmbildung und eine graue Koloniemorphologie aus, während die hinsichtlich der Koloniemorphologie unveränderte Klasse IV-Mutante M17 charakteristischer Weise in Medien unterschiedlicher Hersteller eine differentielle Expression der Biofilmbildung zeigte (Mack *et al.*, 2000). Durch Expression des *icaADBC*-Operons *in trans* in den Mutanten der Klasse II bis IV und der daraus resultierenden Rekonstitution der PIA- und Biofilmbildung konnte gezeigt werden, dass es sich bei den inaktivierten Genorten um regulative Elemente der Biofilmbildung handelt (Mack *et al.*, 2000). Weiterhin konnte für die inaktivierten Genorte der Mutanten der Klasse II bis IV ein Einfluss auf die Expression der Oxacillinresistenz in *S. epidermidis* 1057 nachgewiesen werden (Mack *et al.*, 2002).

Mit Hilfe eines arbitrary PCR Verfahrens wurde für die Klasse II-Mutante *S. epidermidis* M12 gezeigt, dass die Tn917 Insertion in einem offenen Leserahmen mit hoher Homologie zu den *purR* Genen von *Bacillus subtilis* und *S. aureus* lokalisiert ist (Knobloch *et al.*, 2003). Die Insertion führt unter anderem zu der Inaktivierung eines *circa* 1 kb großen Transkriptes, welches zwei offene Leserahmen mit Homologie zu den *B. subtilis* Genen *yabJ* und *spoVG* umfasst. Mittels Komplementierungsversuchen konnte gezeigt werden, dass die *yabJ* und *spoVG* Homologen gemeinsam für die Rekonstitution der Biofilmbildung notwendig sind, während *purR* nicht essentiell ist (Bartsch, 2001). Da für die auch in *S. aureus* zu findenden homologen Gene in Staphylokokken bisher keine Funktion bekannt ist, werden die Gene entsprechend ihrer nachgewiesenen Funktion in *S. epidermidis* als *biofilm accumulation regulator A* und *B* (*barAB*) bezeichnet (Knobloch, 2005).

Für die Klasse III Mutante M15 konnte nachgewiesen werden, dass Tn917 19 Basen unterhalb des Translationsstarts eines offenen Leserahmens mit hoher Homologie zu dem ersten Gen *rsbU* des σ^B -Operons in *S. aureus* (Knobloch, 1999; Knobloch *et al.*, 2003; Kullik, I and Giachino, 1997; Wu *et al.*, 1996), sowie der entsprechenden Homologen in *B. subtilis* und *Listeria monocytogenes* lokalisiert ist.

Das σ^B -Operon kodiert für den alternativen Sigmafaktor σ^B , welcher 1979 erstmalig von Haldenwang und Losick in *B. subtilis* beschrieben wurde (Haldenwang and Losick, 1979; Haldenwang and Losick, 1980). Sigmafaktoren vermitteln durch Bindung an die RNA-Polymerase die Erkennung spezifischer Promotorsequenzen und erlauben somit eine gezielte Transkription einzelner Gene. Die Charakterisierung der flankierenden chromosomalen Bereiche ergab, dass in *S. epidermidis* unterhalb des homologen Gens von *rsbU* drei weitere offene Leserahmen mit identischer Abfolge und hoher Homologie zu *rsbV*, *rsbW* und σ^B von *S. aureus*, *B. subtilis* und *L. monocytogenes* lokalisiert sind (Knobloch *et al.*, 2001). Wie in *S. aureus* wurden für *S. epidermidis* keine Homologie der Gene *rsbR*, *rsbS*, *rsbT* und *rsbX* des σ^B -Operons von *B. subtilis* nachgewiesen (Knobloch *et al.*, 2001), so dass aufgrund der hohen Homologie zu den Genen in *S. aureus* die entsprechenden Gene in *S. epidermidis* als *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* und *sigB* bezeichnet wurden (Knobloch *et al.*; 2004). In *B. subtilis* und *S. aureus* konnte demonstriert werden, dass die σ^B -Aktivität auf posttranskriptioneller Ebene durch die im σ^B -Operon kodierten Regulatorproteine (RsbU, RsbV, RsbW) kontrolliert wird. RsbW fungiert als negativer Regulator (Anti-Sigmafaktor), da es in der Lage ist, σ^B zu binden und somit die Bindung des alternativen Sigmafaktors an die RNA-Polymerase zu verhindern (Benson and Haldenwang, 1992; Benson and Haldenwang, 1993; Dufour and Haldenwang, 1994; Miyazaki *et al.*, 1999). Gleichzeitig besitzt RsbW eine spezifische Kinase-Aktivität für den Anti-Anti-Sigma-Faktor RsbV (Alper *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Lediglich die nicht-phosphorierte Form von RsbV ist in der Lage, RsbW zu binden und somit den Anti-Sigmafaktor zu inaktivieren. Der Phosphorylierungsgrad von RsbV wird durch den Energiezustand der Zelle sowie die RsbV-spezifische Phosphatase RsbU reguliert (Bandow *et al.*, 2002; Brody *et al.*, 2001; Eymann and Hecker, 2001; Giachino *et al.*, 2001; Palma and Cheung, 2001; Vijay *et al.*, 2000; Voelker *et al.*, 1995; Voelker *et al.*, 1996). Die

Inaktivierung des *rsbU*-Gens führt zu einer stark verminderten *icaADBC*-Transkription, PIA-Synthese und Biofilmbildung (Mack *et al.*, 2000). Die *rsbU*-abhängige Regulation der Biofilmbildung wird über den alternativen Sigmafaktor σ^B durch Unterdrückung des negativen Regulatorgens *icaR* vermittelt (Knobloch *et al.*, 2004). Weiterhin scheint die Aktivierung der PIA-Expression unter verschiedenen Stresssituationen unterschiedlichen regulativen Mechanismen zu unterliegen. Die Induktion der PIA-Synthese durch NaCl ist von einem funktionellen *rsbU*-Gen abhängig (Knobloch *et al.*, 2004), wohingegen Ethanol *rsbU*-unabhängig zur Induktion der PIA-Synthese und Biofilmbildung führt. NaCl besitzt durch einen noch unbekanntem Mechanismus einen positiven Einfluss auf σ^B und führt zu einer vermehrten Biofilmbildung und PIA-Synthese (Knobloch *et al.*, 2001). Die Transposonmutagenese von *rsbU* führt neben einem biofilmmnegativen Phänotyp bei *S. epidermidis* 1457 zu einer verminderten Methicillinresistenz (Mack *et al.*, 2001).

Neben den bereits aufgeführten Genorten konnte für *S. epidermidis* gezeigt werden, dass dem *icaADBC*-Operon in entgegengesetzter Orientierung vorgeschaltete Gen *icaR* für einen negativen Regulator der *icaADBC*-Transkription kodiert und somit auch der PIA-Expression (Götz, 2002). Weiterhin wurde ein positiver regulativer Einfluss des *sarA* Gens (*staphylococcal accessory gene regulator A*) auf die *icaADBC*-Transkription in *S. epidermidis* demonstriert (Conlon *et al.*, 2004). Es konnte erstaunlicherweise in einer Mutante mit inaktiviertem *sarA* durch erhöhte Osmolarität und Supplementierung des Mediums mit Ethanol die *icaADBC*-Transkription wiederhergestellt werden, ohne dass es zur Rekonstitution der Biofilmbildung kam. Dieses könnte ein Hinweis dafür sein, dass die regulative Funktion von SarA auf einer posttranskriptionellen Stufe der PIA-Synthese ansetzt (Conlon *et al.*, 2004; Dobinsky *et al.*, 2003).

2.5 Andere potentielle Virulenzfaktoren in *Staphylococcus epidermidis*

2.5.1 Proteasen

Proteasen besitzen die Fähigkeit der Spaltung von Peptiden an Peptidbindungen. Sie übernehmen unterschiedliche Aufgaben wie Proteindegradation, Enzymaktivierung oder den Membrantransport von Proteinen.

Bakterien synthetisieren eine große Anzahl an Exoproteasen, die Amino- oder Carboxylenden abspalten und Endoproteasen, die spezielle Peptidbindungen spalten. Es sind hochspezifische Enzyme, die beispielsweise beim Entfernen von Signalpeptiden, der Aktivierung von intakten Vorstufen und dem Abbau von fehlerhaften Proteinen eine große Rolle spielen (Gottesman, 1984; Mount, 1980). Einige Bakterien sezernieren Proteasen in den Extrazellularraum, wo sie als Virulenzfaktoren oder Toxine wirken. Grampositive Bakterien synthetisieren extrazelluläre Proteasen häufig als Precursor mit einer N-terminalen Signalsequenz (prä-Fragment). Dieses Signalpeptid wird im Sezernierungsprozess abgespalten und das reife extrazelluläre Protein in den Extrazellularraum abgegeben. In *S. epidermidis* sind bisher drei Proteasen bekannt. Die Serinprotease (Esp), eine Endoprotease, die Peptidbindungen spaltet, die Cysteinprotease (Ecp), die eine Esteraseaktivität aufweist und die Metalloprotease (SepP1), die eine breite proteolytische Aktivität besitzt und Casein hydrolysiert (Teufel and Götz, 1993). Die Serinprotease Esp mit einer theoretischen Größe von 23 580 Da weist eine 95%ige Ähnlichkeit mit der in *S. aureus* sezernierten V8 Serinprotease (SspA) auf (Dubin, 2002). Die Genanalyse von *esp* zeigte, dass Esp als prä-pro-Enzym synthetisiert wird und einer Prozessierung ähnlich der von SspA unterliegt (Dubin *et al.*, 2001). Die Prozessierung in SspA erfolgt durch autokatalytische und Metalloproteasen-abhängige Spaltung des Propeptides. Es konnte für die Serinprotease Esp eine lytische Aktivität gegenüber Fibrinogen, denaturiertem Keratin und dem Komplementfaktor C5 gezeigt werden. Die Spaltung von Fibrinogen könnte einen hemmenden Einfluss auf die Blutgerinnungskaskade haben, wie bereits in *S. epidermidis* beobachtet werden konnte (Bykowska *et al.*, 1985). Die Spaltung des Komplementfaktors C5 könnte zur Dysregulation der

Komplementkaskade führen, was einen Schutz der Zelle vor dem unspezifischen Immunsystem in der frühen Phase der Infektion darstellen würde. Die Cysteinprotease Ecp von *S. epidermidis* ist ein prä-pro-Enzym und besitzt eine große Ähnlichkeit zu anderen von Staphylokokken sezernierten Proteasen (Carmona and Gray, 1987; Rice *et al.*, 2001; Sabat *et al.*, 2000). *S. aureus* besitzt zwei extrazelluläre Cysteinproteasen Staphopain A (ScpA) und Staphopain B (SspB). Beide Cysteinproteasen von *S. aureus* werden von einem *open reading frame (ORF)* gefolgt, welcher für ein prä-pro-Protein, das Staphostatin, codiert. Die Cysteinprotease Ecp von *S. epidermidis* wird ebenfalls von einem *ORF* gefolgt, der ein Protein mit großer Ähnlichkeit zum Staphostatin codiert. Die Konfiguration des Operons der Cysteinprotease von *S. epidermidis* entspricht somit der des Operons von *S. aureus* (Dubin, 2003; Massimi *et al.*, 2002; Rice *et al.*, 2001; Rzychon *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2004). Eine zweite Cysteinprotease konnte bei *S. epidermidis* jedoch nicht gefunden werden (Dubin *et al.*, 2001). In *S. aureus* liegt die Cysteinprotease SspC mit dem Staphopain B und der V8 Serinprotease in einem Operon, dem *staphylococcus serine protease operon (ssp)*. Die entsprechenden drei Gene werden von demselben Promotor gesteuert und *agr*-abhängig in der postexponentiellen Wachstumsphase transkribiert (Dubin, 2002). *agr*-Mutanten von *S. aureus* produzierten keine nachweisbare mRNA des *staphylococcus serine protease operon*. Wie bei vielen weiteren extrazellulären Proteinen, findet eine Herunterregulation der Expression des *sspABC*-Operons durch SarA statt (Rice *et al.*, 2001). Die Konfiguration der Proteasegene bei *S. aureus* konnte in *S. epidermidis* nicht nachgewiesen werden, somit stellt wahrscheinlich die außerhalb des *ssp*-Operons gelegene Cysteinprotease ScpA das Homolog zur Ecp in *S. epidermidis* dar. Die Cysteinprotease von *S. epidermidis* weist eine proteolytische Aktivität gegenüber humanen IgA, IgM, Serumalbumin, Fibronectin und allen drei Untereinheiten von Fibrinogen auf. Diese Funktion könnte eine Rolle innerhalb der Modulation des humanen Immunsystems spielen und einen Schutz des Biofilms vor der Immunantwort des Wirtes darstellen. Darüber hinaus macht die Cysteinprotease gemeinsam mit der Metalloprotease die Elastaseaktivität in *S. epidermidis* aus. Die von *S. epidermidis* gebildete Metalloprotease SepP1 wird als prä-pro-Enzym

synthetisiert und weist eine hohe Ähnlichkeit zu Thermolysinen wie von *S. aureus* und *Bacillus ssp.* auf (Dubin, 2002;Teufel and Götz, 1993).

Regulationsuntersuchungen der Proteasen in *S. aureus* zeigten, dass sich die Proteasen gegenseitig durch Prozessierung proteolytisch aktivieren. Die Serinprotease V8 (SspA) wird dabei von der Metalloprotease (Aur) abhängig von autokatalytischen Prozessierungen proteolytisch aktiviert (Drapeau, 1978;Lindsey and Foster, 1999;Nickerson *et al.*, 2007). Shaw *et al.* konnte zeigen, dass bei einer *Aur-knock-out* Mutante eine Restaktivität von SspA nachweisbar war (Shaw *et al.*, 2004). Neben einer Aktivierung durch die Metalloprotease muss demnach ein weiterer Aktivierungsmechanismus der Serinprotease existieren. Nickerson *et al.* konnten sowohl eine autokatalytische als auch Metalloproteasen-abhängige Prozessierung der Serinprotease SspA nachweisen, die in einem komplexen Zusammenspiel die Aktivierung der Protease induzieren (Nickerson *et al.*, 2007). Die Cysteinprotease SspB wird mit SspA cotranskribiert. Die Protease SspB wird durch proteolytische Spaltung durch SspA im Kulturüberstand aktiviert (Chan and Foster, 1998;Rice *et al.*, 2001). Die zweite Cysteinprotease ScpA besitzt eine sehr breite Substratspezifität und wird unabhängig von allen bekannten Proteasen von *S. aureus* wahrscheinlich durch autokatalytische Prozessierung aktiviert (Bjoorklind and Jornvall, 1974;Shaw *et al.*, 2004). Die Prozessierung der Metalloprotease ist noch weitgehend unklar. Eine autokatalytische Spaltung, wie es bei Thermolysin-ähnlichen Proteinen häufig der Fall ist, konnte durch Shaw *et al.* ausgeschlossen werden (Shaw *et al.*, 2004). Eine Analyse der Schnittstellen des pro-Proteins zeigte eine hohe Spezifität von einer Gruppe von Serinproteasen Spl, die in den Überstand von *S. aureus* sezerniert werden. Diese Serinproteasen besitzen nur ein prä-Fragment und benötigen somit keine proteolytische Aktivierung (Reed *et al.*, 2001). Es ist möglich, dass die Proteinaktivierungskaskade seinen Beginn bei den Spl Proteasen hat und sich über Aur zu SspA und SspB fortsetzt. Die genaue Funktion der Spl Proteasen ist jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Die Proteinkaskade von Shaw zeigt eine Übersicht über den möglichen Weg der posttranskriptionellen Aktivierung der Proteasen in *S. aureus* (**Abbildung 2.**)

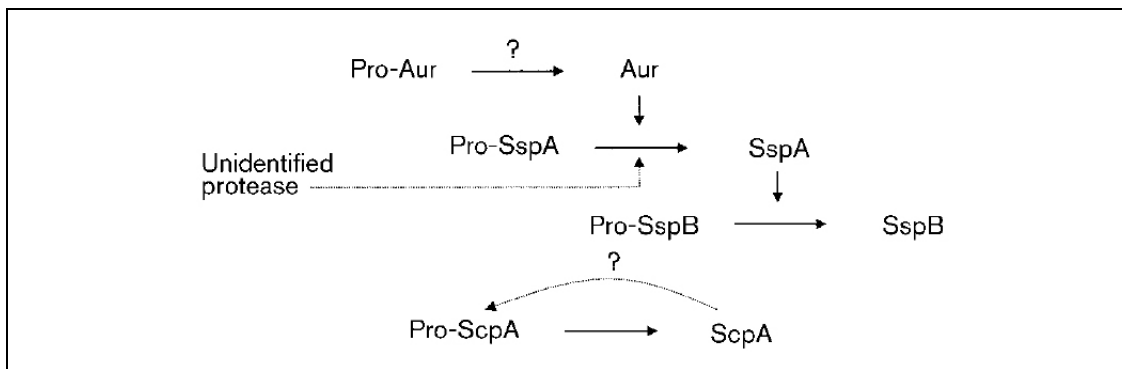


Abbildung 2 Proteinkaskade von Shaw

2.5.2 Lipasen

Lipasen besitzen die Fähigkeit Lipidemulsionen zu hydrolysieren und Fettsäuren freizusetzen (Rosenstein and Götz, 2000). Bisher sind in *S. epidermidis* drei unterschiedliche Lipasen identifiziert worden, die nach Rosenstein and Götz in SEL-1 (GehC), SEL-2 (GehD) und SEL-3 (Geh1) eingeteilt wurden. Sie werden als Prä-Pro-Enzyme synthetisiert, als Pro-Form sezerniert und durch spezielle Proteasen in ihre reife Form umgewandelt (Rosenstein and Götz, 2000). In *S. aureus* konnten zwei unterschiedliche Lipasen identifiziert werden, SAL-1 und SAL-2, die von dem Gen *geh* codiert werden (Lee and Iandolo, 1986). Die Lipase SEL-1 von *S. epidermidis* besitzt eine 84%ige Identität mit der Lipase SAL-1, wobei SEL-2 eine 58%ige Identität mit SAL-2 besitzt. Es ist bisher nur wenig über die Regulation von Lipasen in Staphylokokken bekannt. Untersuchungen in einer σ^B -Mutante von *S. epidermidis* zeigten eine Abnahme der Prozessierung der Lipasen im Kulturüberstand (Tabelle 5.1) (Kies *et al.*, 2001), welches im Gegensatz zu Untersuchungen von drei unabhängigen Stämmen von *S. aureus* steht, in denen eine erhöhte Lipaseaktivität in den σ^B -Mutanten beobachtet wurde (Kullik *et al.*, 1998). Für einige der Lipasen konnte ein Anstieg der Synthese in der stationären Wachstumsphase beobachtet werden, welches die Regulation durch das globale Regulatorsystem *agr* wahrscheinlich macht (Farrell *et al.*, 1993; Janson, 1990; Peng *et al.*, 1988; Recsei *et al.*, 1986; Talon *et al.*, 1995). Vuong *et al.* bestätigten diese Vermutung mittels einer *agr*-abhängigen positiven Regulation der Lipaseaktivität im Aktivitätsvergleich in *S. epidermidis*. Außerdem konnte eine *agr*-abhängige Prozessierung der Proform der Lipasen gezeigt werden (Vuong *et al.*, 2000). Ob die

Regulation durch Prozessierung oder auf Transkriptionsebene geschieht, wurde nicht untersucht. Batzilla *et al.* stellten ebenfalls eine positive Regulation durch *agr* in der späten exponentiellen und stationären Wachstumsphase fest (Batzilla *et al.*, 2006). In *S. aureus* konnte im Phänotyp die Regulation einer Glycerolesterhydrolase durch *sarA* beobachtet werden (Batzilla *et al.*, 2006). Transkriptionsdaten unserer Arbeitsgruppe ergaben nur leicht unterschiedliche Transkriptionsniveaus der Lipasen. Auffallend ist jedoch eine hohe Transkription bei beiden Stämmen 1057 und 1057*sigB* in der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zu den anderen Stämmen (Kneschke, unpubliziert).

2.6 Quorum sensing in Staphylokokken

Definitionsgemäß handelt es sich bei *quorum sensing* um die Steuerung der Zelldichte über frei diffusible Signale. Die *quorum sensing*-Systeme von Bakterien regulieren die Genexpression als Reaktion auf eine Veränderung der Zelldichte. Hierbei sind hormonähnliche Moleküle (Autoinduktoren) erforderlich, die während des Wachstums der Zellpopulation in der externen Umwelt akkumulieren. Sobald die Zelldichte zunimmt und die Autoinduktoren einen Grenzwert überschreiten wird ein Transkriptionsfaktor aktiviert, der die Expression unterschiedlicher Gene reguliert (Yao *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den diffusiblen Autoinduktoren gramnegativer Systeme binden die Autoinduktoren in grampositiven Organismen häufig an membran-assoziierte Proteine und aktivieren ein Zwei-Komponenten-System (Kong *et al.*, 2006). In Staphylokokken sind zwei Formen des *Quorum sensing*-Systems bekannt, zum einen das *agr*-System, welches Thema dieser Arbeit ist und zum anderen das *luxS*-System, welches in grampositiven und gramnegativen Bakterien vorkommt und in einigen Bakterien eine regulative Funktion in Hinblick auf Virulenzfaktoren besitzt (Bassler, 1999). In *S. aureus* und *S. epidermidis* kontrolliert das *agr*-System (*accessory gene regulator*-System) die Expression von Toxinen und Virulenzfaktoren, die in der Interaktion mit dem Immunsystem des Wirtes eine Rolle spielen. Interessanterweise sind *S. epidermidis*-Stämme mit einer *agr*-Mutation oder einem nicht-funktionierenden *agr*-System öfter in Hautisolaten gesunder Personen zu finden als die Wildtypisolate (Vuong *et al.*, 2004).

2.6.1 Aufbau und Mechanismus des *agr*-System

Das *agr*-System besteht aus zwei zu transkribierenden voneinander unabhängigen Einheiten, die RNAII und RNAIII, mit den korrespondierenden Promotoren P2 und P3. RNAII kodiert für die vier Gene *agrB*, *agrD*, *agrC* und *agrA* (Novick *et al.*, 1995). Die Autoinduktoren sind Peptide von *circa* acht Aminosäuren Länge, welche als längeres Peptid von *agrD* kodiert und schließlich von dem *agrB*-Genprodukt prozessiert werden, um eine Thiolactonringstruktur zu bilden (Ji *et al.*, 1995). Autoinduktoren unterschiedlicher Staphylokokken-Stämme formen diese Ringstruktur mit variierenden Aminosäuresequenzen. Sie zeigen das Phänomen der Kreuzinhibierung (*cross inhibition*), was bedeutet, dass Autoinduktoren von *S. epidermidis* das *agr*-System in *S. aureus* inhibieren (Ji *et al.*, 1995). Es wurde überlegt, ob dieser *agr*-Antagonismus als Mittel zur Kontrolle von Staphylokokkeninfektionen genutzt werden könne (Ji *et al.*, 1995). Der Autoinduktor bindet an das Transmembranprotein AgrC, welches als Sensor kinase des bakteriellen Zweikomponentensystems fungiert (Ji *et al.*, 1995). Nach der Bindung aktiviert AgrC den Regulator AgrA, welcher die Transkription von RNAII in RNAIII induziert (Abbildung 3). AgrA ist ein DNA-bindendes Protein, welches ein Paar direkter *repeats* mit der Sequenz 5'-ACAGT-TAAG-3' getrennt von einer Zwischenregion von 12 bp erkennt (Koenig *et al.*, 2004). RNAIII, die als Effektormolekül für das *agr*-System gilt (Novick *et al.*, 1995), ist gleichzeitig die mRNA für das *hld*-Gen, welches für das δ -Toxin kodiert. Das 5'-Ende der RNAIII reguliert positiv die Translation des α -Hämolysins in *S. aureus* (Morfeldt *et al.*, 1995), während das 3'-Ende für die Repression von Protein A zuständig ist. Jedoch ist derzeit noch unbekannt inwiefern die RNAIII für weitere Virulenzfaktoren reguliert.

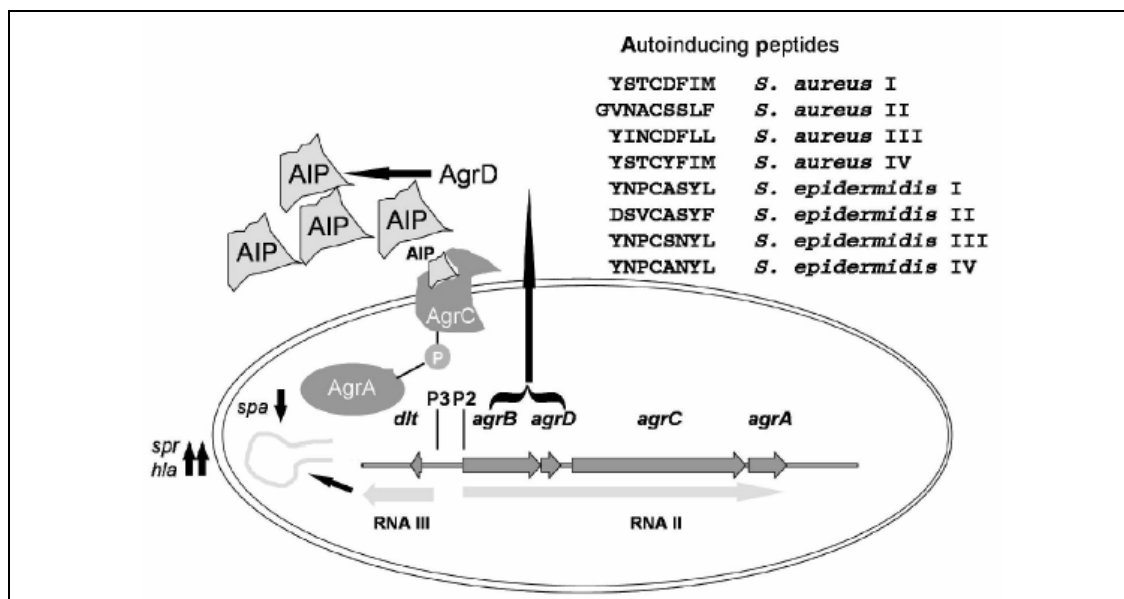


Abbildung 3 Mechanismus des Quorum sensing-Systems. Die Autoinduktoren werden als längeres Peptid von *agrD* codiert und dann von dem *agrB*-Genprodukt geschnitten. Der Autoinduktor bindet an das Transmembranprotein *AgrC*, hierdurch wird der Regulator *AgrA* aktiviert, welcher die Transkription von *RNAII* in *RNAIII* bewirkt (Mack et al., 2006a).

2.6.2 Rolle von *agr* im Biofilm

Die Bakterien innerhalb eines Biofilms sind in einer Matrix von extrazellulären Polymersubstanzen eingebettet und zeigen zusammen einen veränderten Phänotyp, was die Bakterienphysiologie, den Stoffwechsel und die Gentranskription anbetrifft (Donlan and Costerton, 2002). In Staphylokokken scheint das *quorum sensing*-System in mehreren Biofilmstadien eine Rolle zu spielen. Die primäre Adhäsion an Oberflächen benötigt die physikalisch-chemische Interaktion zwischen Zellen und Oberfläche. Ist *agr* inaktiviert, so wird die primäre Anlagerung an Polymeroberflächen gefördert, mutmaßlich aufgrund der Herunterregulation von Faktoren, die das Ablösen von Bakterienzellen unterstützen (Vuong et al., 2000). Das Oberflächenprotein *AtIE* ist in einer *agr*-Mutante von *S. epidermidis* überexprimiert, diese Hochregulation von *AtIE* könnte zusätzlich die Adhäsion erhöhen. Interessanterweise ist das homologe *AtIE*-Protein von *S. aureus* nicht *agr*, sondern *sarA*-kontrolliert, dies zeigt, dass das *agr*-Regulon in beiden Spezies unterschiedliche Aufgaben ausübt (Vuong et al., 2000). Die Produktion von PIA, die für die Akkumulationsphase essentiell ist, wird nicht durch *agr* reguliert (Vuong et al., 2000). Es wurde kürzlich beobachtet, dass das *luxS*-System von *S. epidermidis*

die PIA-Produktion herunterreguliert (Xu *et al.*, 2006). *Quorum sensing* reguliert also auch diesen Schritt der Biofilmbildung, wenn auch nicht über *agr*. Nach der Reifung des Biofilms ist die Abtrennung der Zellen vom Zellverband essentiell für eine weitere Ausbreitung der Infektion. Es wird vermutet, dass auch hier das *agr*-System eine große Rolle spielt (Kong *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2005; Yarwood *et al.*, 2004). Die Arbeitsgruppe um Vuong beobachtete, dass eine *S. epidermidis agr*-Mutante einen dickeren Biofilm bildet, als der Wildtyp (Vuong *et al.*, 2000; Vuong *et al.*, 2004). Dieses Phänomen ist nicht durch vermehrtes Bakterienwachstum oder veränderten Zelltod begründet, sondern dadurch, dass sich die Zellen nicht mehr vom Biofilm lösen können (Vuong *et al.*, 2004). Dies ist wahrscheinlich auf die Produktion einer Gruppe kleiner amphipathischer Peptide, bekannt als *phenol-soluble modulines* (PSM) in der *agr*-Mutante zurückzuführen (Vuong *et al.*, 2004). *S. aureus* und *S. epidermidis* besitzen eine Gruppe der PSM, die das RNAPIII kodierte δ -Toxin enthält (Mehlin *et al.*, 1999). Aufgrund der amphipathischen Eigenschaft begünstigen sie das Lösen der Zellen vom Biofilm.

2.6.3 Rolle von *agr* innerhalb von Infektionen

Der Verlust des *agr*-Systems in *S. aureus* führt zu verminderter Virulenz in verschiedenen Infektionsmodellen. Zum Beispiel zeigte die Arbeitsgruppe um Abdelnour, dass das *S. aureus-agr*-System eine essentielle Determinante der Induktion und Progression von septischer Arthritis in einem Mausmodell ist (Abdelnour *et al.*, 1993). Gillaspay *et al.* veröffentlichten zwei Jahre später, dass die Mutation von *agr* die Inzidenz und den Schweregrad von Osteomyelitis in einem Kaninchenmodell verringert (Gillaspay *et al.*, 1995). Vuong zeigte mit seiner Arbeitsgruppe 2004, dass der Wildtyp das Gewebe um einen Fremdkörper intensiver infiltriert als die *agr*-Mutante. *agr* ist also für die Eindringtiefe der Bakterien verantwortlich, jedoch konnte die Mutante den Fremdkörper besser besiedeln.

Aus den bisher gesammelten Daten geht hervor, dass die Inaktivierung von *agr* möglicherweise den Erfolg der Bakterien bei einer fremdkörperassoziierten und eventuell auch bei anderen Infektionen erhöht. Kong *et al.* vermuteten, dass die niedrige *quorum sensing*-Aktivität Vorteile für die Zellen bietet, indem ein dickerer Biofilm gebildet wird und die pro-inflammatorische Antwort verringert wird (Kong

et al., 2006). Wright *et al.* postulierte 2005, dass ein früherer Beginn an *agr*-Aktivität und damit eine exzessive frühe Produktion an Virulenzfaktoren kritisch für das anhaltende Überleben der Bakterien ist (Wright III *et al.*, 2005).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Einwegartikel

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma (Taufkirchen, Deutschland) in *Pro-analysi*-Qualität bezogen. Plastikartikel und Einwegmaterialien kamen, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Becton Dickinson (Cockeysville, MD, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Greiner (Nütingen, Deutschland).

3.1.2 Laborgeräte

Tabelle 3.1 Verwendete Geräte

Laborgerät	Hersteller
Cryofuge 6-6 Kühlzentrifuge	Heraeus-Christ, Osterode, Deutschland
Biofuge pico Tischzentrifuge	
Brutschrank 5050E	
Digital-pH-Meter 646	Knick, Berlin, Deutschland
Eppendorfszentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Feinwaage	Leitz, Wetzlar, Deutschland
GelCam Photodokumentationssystem	Phase, Lübeck, Deutschland
Gelkammern	Kreutz Laborgeräte, Hamburg, Deutschland
Icycler iQ Thermocycler	BioRad, München, Deutschland
Gelkammern	
Geldokumentationsgerät ChemiDoc XRS	

J2-21 Kühlzentrifuge	Beckmann, München, Deutschland
Spectrophotometer 34	
Lab Shaker Schüttelinkubator	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co, New Brunswick, USA
Spectrophotometer ELISA Processor II	Behring, Marburg, Deutschland
Sterilfilter 0,22 µm	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tischzentrifuge Rotana/S	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Ultraschallzerkleinerer	Branson, Danbury, USA
Waagen	Mettler, Giessen, Schweiz
	Sartorius, Göttingen, Deutschland

3.1.3 Medien

Alle Medien wurden, falls nicht extra erwähnt, mit entionisiertem Wasser (VE-Wasser) angesetzt und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert.

BHI-Brühe: 30 g/l Brain Heart Infusion Broth
 20 mM NaCitrat

BHI-Agar: 30 g/l Brain Heart Infusion Broth
 12 g/l Bacto-Agar
 20 mM NaCitrat

BHI-Softagar: 30 g/l Brain Heart Infusion Broth
 7 g/l Bacto-Agar
 20 mM NaCitrat

Blut-Agar: 42 g/l Columbia-Agar
 1 g/l Bacto-Agar
 2,2 g/l Glukose
 72 ml/l Schafblut
 pH 7,0

Humanblutagar: 42 g/l Columbia-Agar
 1 g/l Bacto-Agar
 2,2 g/l Glukose
 72 ml/l Humanblut
 pH 7,0

STA-Agar: 20 g/l Nutrient Broth No 2
5 g/l NaCl
0,4 g/l CaCl₂
12 g/l Bacto-Agar

STA-Softagar: 20 g/l Nutrient Broth No 2
5 g/l NaCl
0,4 g/l CaCl₂
7 g/l Bacto-Agar

Lipaseagar: 15 g/l Bacto-Agar
12,1 g/l Tris HCl pH 8
2,77 g/l CaCl₂-Dihydrat
Nach dem Autoklavieren wurden 5ml Glycerintributyrat hinzugefügt und anschließend 2x1,5 min bei einer Amplitude von 70% mit einer Mikrotip Ultraschallspitze (Branson Sonifier) behandelt.

Proteaseagar: 60 g/l Tryptone Soya Broth
30 g/l Bacto-Agar
40 g/l Casein
Das Casein wurde nicht autoklaviert, sondern in der Dampftruhe für 12 min sterilisiert; zum Gießen des Agars musste das Casein auf 40°C im Wasserbad aufgewärmt werden, bevor die Bestandteile vorsichtig miteinander vermischt werden konnten.

NB2+ Brühe: 20 g/l Nutrient Broth No 2
0,4 g/l CaCl₂

Trypton Soja Brühe: 30 g/l TSB (Becton Dickinson)
(TSB) pH 7,3

TSB ohne Glukose: 17 g/l Trypton
(TSBØ) 3 g/l Soja Pepton
5 g/l NaCl
2,5 g/l K₂HPO₄
pH 7,3

3.1.4 Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit voll entionisiertem Wasser (VE-Wasser) angesetzt und ohne vorheriges Autoklavieren verwendet.

Ethidiumbromid-Stammlösung

Es wurde eine Ethidiumbromidlösung mit 10 mg/ml in dH₂O angesetzt.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4

NaCl 8 g/l
KCl 0,2 g/l
Na₂HPO₄ 1,44 g/l
KH₂PO₄ 0,24 g/l

Einfriermedium

100 ml 1,5% (wt/vol) Bacto-Pepton

60 ml Glycerin 87%

Die Bestandteile wurden getrennt autoklaviert und anschließend zusammengefügt.

5x TBE

Tris (Invitrogen) 54 g/l

Borsäure 27,5 g/l

EDTA 0,5 M, pH 8, 20 ml/l

DNA-Ladepuffer

Bromphenolblau 0,25 % (wt/vol)

Xylen Cyanol FF 0,25 % (wt/vol)

Ficoll 15 % (wt/vol)

3.1.5 Bakterienstämme

Tabelle 3.2 Verwendete Stämme

Stamm	Bemerkung	Referenzen
<i>S. epidermidis</i> Wildtypstämme		
<i>S. epidermidis</i> 1457	Stark biofilmpositives Isolat von einem zentralvenösen Katheter	(Mack <i>et al.</i> , 1996)
<i>S. epidermidis</i> 8400	biofilmpositives Blutkulturisolat	(Mack <i>et al.</i> , 1992)
<i>S. epidermidis</i> 1057	biofilmpositives Isolat eines zentralvenösen Katheters	(Nedelmann <i>et al.</i> , 1998)
<i>S. epidermidis</i> Deletionsmutanten		
1457 <i>rsbU</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion des Gens <i>rsbU</i>	(Knobloch <i>et al.</i> , 2004)
1457 <i>rsbUVW</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion der Gene <i>rsbUVW</i>	(Knobloch <i>et al.</i> , 2004)
1457 <i>sigB</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion des Gens <i>sigB</i>	(Knobloch <i>et al.</i> , 2004)
8400 <i>rsbU</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbU</i> in <i>S. epidermidis</i> 8400	(Knobloch <i>et al.</i> , 2004)
8400 <i>rsbUVW</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbUVW</i> in <i>S. epidermidis</i> 8400	(Knobloch <i>et al.</i> , 2004)
8400 <i>sigB</i>	Transduktante von 1457 <i>sigB</i> in <i>S. epidermidis</i> 8400	(Knobloch <i>et al.</i> , 2004)
1057 <i>rsbU</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbU</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057	(Knobloch, 2005)
1057 <i>rsbUVW</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbUVW</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057	(Knobloch, 2005)

1057 <i>sigB</i>	Transduktante von 1457 <i>sigB</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057	(Knobloch, 2005)
CV2	Definierte Mutante des gesamten <i>agr</i> -Operons von <i>S. epidermidis</i>	(Otto <i>et al.</i> , 1998)
8400 <i>agr</i>	Transduktante von CV2 in <i>S. epidermidis</i> 8400	Diese Arbeit
1057 <i>agr</i>	Transduktante von CV2 in <i>S. epidermidis</i> 1057	Diese Arbeit
1457 <i>rsbUagr</i>	Transduktante von CV2 in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>rsbU</i>	Diese Arbeit
1457 <i>rsbUVWagr</i>	Transduktante von CV2 in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>rsbUVW</i>	Diese Arbeit
1457 <i>sigBagr</i>	Transduktante von CV2 in <i>S. epidermidis</i> 1457 <i>sigB</i>	Diese Arbeit
8400 <i>rsbUagr</i>	Transduktante von CV2 in <i>S. epidermidis</i> 8400 <i>rsbU</i>	Diese Arbeit
8400 <i>rsbUVWagr</i>	Transduktante von CV2 in <i>S. epidermidis</i> 8400 <i>rsbUVW</i>	Diese Arbeit
8400 <i>sigBagr</i>	Transduktante von CV2 in <i>S. epidermidis</i> 8400 <i>sigB</i>	Diese Arbeit
1057 <i>rsbUagr</i>	Transduktante von CV2 in <i>S. epidermidis</i> 1057 <i>rsbU</i>	Diese Arbeit
1057 <i>rsbUVWagr</i>	Transduktante von CV2 in <i>S. epidermidis</i> 1057 <i>rsbUVW</i>	Diese Arbeit
1057 <i>sigBagr</i>	Transduktante von CV2 in <i>S. epidermidis</i> 1057 <i>sigB</i>	Diese Arbeit

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von Bakterien

Alle Bakterienstämme wurden in der Regel bei 37°C in Flüssigmedien kultiviert. Vorkulturen wurden entweder für 4 Stunden oder über Nacht inkubiert und für die Hauptkulturen 1:100 verdünnt. Schüttelkulturen wurden in sterilen Glasgefäßen bei 200 U/min vorkultiviert. Für eine Stammhaltung wurden die Bakterien auf Agarplatten, denen gegebenenfalls Antibiotika zur Selektion zugesetzt wurden, ausgestrichen. Diese wurden über Nacht bei 37°C bebrütet und anschließend bei 4°C gelagert. Für die langfristige Lagerung wurden die Bakterien in 500 µl Einfriermedium suspendiert und bei -80°C gelagert.

3.2.2 Herstellung von Phagenlysaten

Für die Herstellung von Phagenlysaten aus *S. epidermidis* wurden die Stämme bei 37°C in NB2+ unter Selektion von Spectinomycin (150 µg/ml) über Nacht im Schüttelinkubator (100-150 U/min) inkubiert. Die Vorkultur wurde 1:75 in NB2+ unter Selektion von Spectinomycin (150 µg/ml) verdünnt und in einem Schüttelinkubator (100-150 U/min) bis zu einer OD₅₇₀ von 0,1 bis 0,2 inkubiert. Diese Optische Dichte entspricht etwa einer Zellkonzentration von 5×10^7 KBE/ml. STA-Softagar wurde in der Mikrowelle aufgeköcht und in einem Wasserbad auf 46°C heruntergekühlt. Je 3 x 0,5 ml Bakterienkultur wurden mit jeweils *circa* 2×10^5 Plaque bildenden Einheiten (PBE) des *S. epidermidis* Phagen 71 (Φ 71) und 3 ml STA-Softagar vermischt und auf STA-Böden ausplattiert. Nach dem Festwerden der STA-Agarschicht wurden die Platten bei 30°C für 18 h im Brutschrank inkubiert. Für jeden Stamm wurden drei STA-Agar-Platten vorbereitet. Zu jeder Platte wurden dann 4 ml NB2+ gegeben und der Softagar von den Platten mit Hilfe eines Glasspatels gelöst und grob zerkleinert. In einem 50 ml Falcon-Röhrchen wurden das zugegebene NB2+ Medium und der abgelöste Softagar der drei Platten zusammengeführt. Zur Extraktion der Phagen aus dem Softagar wurde die NB2+/Softagarsuspension mit Ultraschall für *circa* 10 s bei einer Amplitude von 70% mit einer Mikrotip Ultraschallspitze (Branson Sonifier) behandelt. Die Falcon-Röhrchen wurden danach für 15 min bei 4332 U/min und 4°C zentrifugiert,

um den Agar und die Bakterien von der Phagensuspension zu trennen. Der Überstand wurde sterilfiltriert (Sterilfilter Porengröße 0,2 µm) und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Zur Bestimmung des Phagentiters wurde das Lysat zehnerlogarithmisch von 10^{-1} bis 10^{-9} in NB2+ verdünnt. Je 1 ml der Phagenverdünnung wurde mit 3 ml STA- Softagar (46°C) und 0,5 ml einer Suspension von *S. epidermidis* 1457 mit einer OD₅₇₀ von 0,1 bis 0,2 vermischt und auf einer STA-Platte ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C für 18 h inkubiert und die entstandenen Plaques ausgezählt, um den Phagentiter unter Berücksichtigung der Vorverdünnung des Ausgangslyses zu bestimmen.

3.2.3 Phagentransduktion

Für die Phagentransduktion wurde der Empfängerstamm auf jeweils drei Blutagarplatten über Nacht bei 37°C subkultiviert und in NB2+ bis zu einer OD von 11 (*circa* 0,5 bis 1×10^{10} KBE/ml) suspendiert. Zu 1 ml dieser Suspension wurde ein gleiches Volumen des entsprechenden verdünnten Phagenlyses gegeben, um ein Phagen-Bakterienverhältnis (*multiplicaty of infection*; MOI) von *circa* 0,1 bis 1,0 zu bekommen. Das Phagen-Bakterien-Gemisch wurde für 35 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorption von Phagenpartikel mittels Zugabe von 40 µl 1 M Natriumcitrat gestoppt. Der Phagenansatz wurde bei 6000 U/min, 4°C für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimalig in 2 ml BHI mit 20 mM Natriumcitrat gewaschen und anschließend in 3 ml dieses Mediums resuspendiert und für eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit 3 ml BHI-Softagar, der mit 20 mM Natriumcitrat und 150 µg/ml Spectinomycin versetzt war, gemischt, und auf BHI-Agar mit 150 µg/ml Spectinomycin verteilt. Die Agarplatten wurden für 24 bis 48 h bei 37°C inkubiert und auf Spectinoycin-resistente Zellen untersucht.

3.2.4 Semiquantitiven Bestimmung der Biofilmbildung

Zur Evaluierung der Fähigkeit zur Biofilmbildung in *S. epidermidis* wurde sich des nach Christensen modifizierten, semiquantitativen Tests in 96-Zellkulturplatten bedient. Für die Vorkultur wurden 2 ml TSB ohne Glucose mit je einer Kolonie der zu untersuchenden Stämme von einer über Nacht frisch kultivierten Blutagarplatte

beimpft und für 4 Stunden beziehungsweise über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Vorkultur wurde im Verhältnis 1:100 in 3 ml TSB_{BBL} verdünnt. Dem Medium der Hauptkultur wurde für einige Experimente zusätzlich 2% NaCl oder 3% Ethanol zugesetzt. Pro zu untersuchenden Stamm wurden je 4 Näpfe der Zellkulturplatte mit je 200 µl der Hauptkultur beimpft und die gesamte Platte mit Folie überklebt, um eine Verdunstung des Ethanols zu verhindern. Nach einer Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank von 20-22 Stunden wurden die Platten kräftig ausgeschlagen und mit je 200 µl/Napf PBS viermal gespült und erneut kräftig ausgeschlagen. Nach dem Trocknen der Platten im Brutschrank wurden die Biofilme mit je 50 µl Gentianaviolett-Lösung angefärbt. Die Platten wurden unter fließendem Wasser gründlich gespült, erneut kräftig ausgeschlagen und bei 37°C im Brutschrank getrocknet. Zur Biofilmquantifizierung wurde die Intensität der jeweiligen Färbung mittels eines BEP II-Photometers gemessen. Es wurde bei einer Absorption von 570 nm (A_{570}) und im evaluation mode 3 mit einer Referenzwellenlänge von 405 nm gemessen. Die Ergebnisse von dreimal 4 Einzelwerten wurden gemittelt und eine A_{570} größer oder gleich 0,1 als biofilmpositiv gewertet.

3.2.5 Pulsgelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsgelelektrophoresen wurden unter Verwendung eines CHEF-DR II Systems (Fa. BioRad, München) unter Anwendung eines Standardprotokolls (Schwarzkopf *et al.*, 1993) vom Bereich Krankenhaushygiene unseres Institutes durchgeführt.

3.2.6 Nachweis des δ -Hämolysins

Die Stämme wurden hierfür bei 37°C in BHI-Brühe über Nacht im Schüttelinkubator (100-150 U/min) kultiviert. 1000 µl der Bakterienkultur wurden in der Tischzentrifuge *circa* 2 min bei 8000 U/min von ihrem Überstand getrennt. Danach wurde dieser Vorgang mit 500 µl des Überstandes wiederholt, um sicher zu gehen, dass der Überstand vollständig geklärt wurde. Alle Überstände wurden bei 95°C im Wasserbad für eine Stunde erhitzt. 15 µl des abgekühlten Überstandes wurden auf Humanblutagarplatten aufgetropft. Die Platten wurden vor dem Auftropfen für *circa* 15 min bei 30°C im Brutschrank angetrocknet.

Für den Vergleich des Beginns der Hämolyse der Wildtypen wurden Vorkulturen der zu untersuchenden Stämme über Nacht bei 37°C in Flüssigmedium inkubiert und dann für die Hauptkultur 1:100 verdünnt. Nach 4 Stunden Wachstum bei 37°C im Schüttelinkubator wurde die erste Probe entnommen, mit 0,05% NaN₃ zur Verhinderung eines weiteren Bakterienwachstums versetzt und *circa* 2 min in der Tischzentrifuge bei 8000 U/min von ihrem Überstand getrennt und im Kühlschrank gelagert. Diese Prozedur erfolgte dann stündlich bis zu 22 Stunden Wachstum. Dann wurden alle Proben im Wasserbad bei 95°C erhitzt und je 20 µl auf eine vorher kurz im 37°C Brutschrank angetrocknete Humanblutagarplatte gegeben. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank belassen und die erste erkennbare Lysezone abgelesen. Um eine Unabhängigkeit der δ-Hämolysin-Produktion von der Zellzahl zu zeigen, wurde stündlich eine weitere Probe entnommen, die im Verhältnis 1:100 mit PBS verdünnt wurde. 10 µl dieses Ansatzes wurden auf eine STA-Agar-Platte gegeben, die bei 37°C über Nacht bebrütet wurde, um dann die Koloniezahl pro ml ermitteln zu können.

3.2.7 DNA-Präparation

Für die Präparation chromosomaler DNA wurde sich des QIAamp DNA Mini Kits bedient. Als Vorkultur wurden 2 ml BHI-Brühe mit einer Kolonie des entsprechenden Stammes beimpft. Die Anzucht erfolgte als Schüttelkultur über Nacht bei 37°C und 120 U/min. Nachdem 1 ml der Vorkultur zentrifugiert wurde (6000 U/min, 2 min, Raumtemperatur), konnte der Überstand verworfen werden und anschließend das entstandene Pellet in 180 µl ATL Puffer resuspendiert werden. Nach Zugabe von 5 µl (1500 U/ml) Lysostaphin und kräftigem Vortexen, wurde die Zellwand für 60 min bei 37°C lysiert. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K wurde der Ansatz für mindestens 1 h bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von AL Puffer und kräftigen Mischen auf dem Vortex wurde der Ansatz für 10 min auf dem Heizblock bei 73°C belassen. Danach wurden 200 µl 96-100%iges Ethanol dazugegeben, wieder 15 s gevortext und der Ansatz in QIAamp Spin Säulen überführt. Es wurde 2 min bei 8000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgegossen, der Vorgang mit 1 min Zentrifugieren wiederholt, 500 µl AW2 Puffer dazugegeben, 3 min zentrifugiert, der Abstand abgegossen und die Röhren leer zentrifugiert. Zum

Eluieren wurde das Pellet mit 200 µl Puffer AE versetzt und nochmals 1 min zentrifugiert. Für eine größere DNA-Ausbeute wurde der Elutionsvorgang mit dem Puffer AE wiederholt. Die Präparation wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Standardmethode zur Amplifikation von DNA Fragmenten. Dabei dient doppelsträngige DNA als Vorlage (*template*). Zwei zu den Einzelsträngen komplementäre, gegenläufige (*forward* und *reverse*) Oligonukleotide, die so genannten Primer, dienen der DNA-Polymerase als Start. Durch abwechselnde Zyklen von Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer (*annealing*) und Synthese des komplementären Stranges kommt es zur exponentiellen Amplifikation des vorliegenden Fragments. Die Standard-PCR wurden mit Hilfe des DyNazyme DNA Polymerase Kits (Finnzymes, Espoo, Finnland) in einem Primus 96 Thermocycler (MWG Biotech, München, Deutschland) durchgeführt. In einem 50 µl Ansatz wurden *circa* 25-100 ng *template*-DNA, je 10 pmol *forward*- und *reverse* Primer, 5 µl Optimized-DNAzyme-Puffer, Desoxynukleotide (dNTPs) in einer Konzentration von je 200 µM und 1 U Polymerase eingesetzt. Zuerst wurde die DNA für 5 min bei 95°C denaturiert, in den anschließenden Zyklen nur für 30 s. Die *annealing* Temperatur betrug 52°C für eine Dauer von 30 s. Der Zweitstrang wurde bei 72°C für 3 min synthetisiert. Nach 30 Zyklen schloss sich eine siebenminütige Synthesephase bei 72°C an, um eine vollständige Komplementierung aller Einzelstränge zu gewährleisten. Abschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und bei dieser Temperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Kontrolle der PCR fand anschließend eine Agarosegelelektrophorese statt.

3.2.9 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Bei der horizontalen Gelelektrophorese werden die DNA-Fragmente nach ihrer Ladung, Größe und Konformation in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Es wurde hierbei ein 1%iges [w/v] Agarosegel verwendet. SeaKem ME Agarose (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) wurde in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht, abgekühlt, mit 3,5 µl 1%iger Ethidiumbromid-Lösung versetzt und in

einen Gelträger mit Kämmen gegossen. Die einzelnen Proben wurden mit 2 µl DNA Gelladepuffer vermischt und in die Taschen des ausgehärteten und mit 0,5 x TBE-Puffer überschichteten Gels pipettiert. Als Größenstandard wurden in die jeweils äußersten Geltaschen 5 µl eines λ Phagen DNA-*Hind*III und ϕ X174 Phagen DNA-*Hae*III Verdaus (Finnzymes, Espoo, Finnland) mitgeführt. Eine Auftrennung erfolgte je nach Größe der zu analysierenden Fragmente bei konstanter Spannung von 1-6 V/cm. Die Gele wurden auf einem UV-Transilluminator mit einer angeschlossenen digitalen CCD-Kamera (GelCam Photodokumentationssystem) dokumentiert.

3.2.10 Lipaseaktivität

Um die Lipaseaktivität von Wildtyp und *agr*-Mutanten zu vergleichen, wurde ein Lipaseagar angefertigt (siehe Materialien 3.1.3). Die Stämme wurden bei 37°C in 3 ml TSB_{BBL} im Schüttler für 4 h inkubiert. Danach wurden je 50 µl in die vorher mit einer 1000 µl-Pipettenspitze ausgestanzten Löchern in den Agar gegeben. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h im Brutschrank belassen und am folgenden Tag mit dem Fotodokumentationssystem ChemiDoc XRS der Firma BioRad fotografiert. Entsprechend der Lipaseaktivität konnten unterschiedlich große Lysezonen dokumentiert werden.

3.2.11 Proteaseaktivität

Die Proteaseaktivität der Wildtypen und Mutanten wurde qualitativ mit Hilfe eines Agarplattenassays verglichen. Der Agar wurde wie oben beschrieben hergestellt und die Stämme bei 37°C im Schüttelinkubator für 4 h inkubiert. 5 µl der Vorkultur wurden auf den Agar gegeben und dieser bei 37°C im Brutschrank belassen. Die einzelnen Stämme zeigten entsprechend ihrer Proteaseaktivität charakteristische Lysezonen und wurden mit dem Fotodokumentationssystem ChemiDoc XRS der Firma Biorad fotografiert.

3.2.12 Amicon Ultra Präparation

Um eindeutige Enzymaktivitätsmessungen im Kulturüberstand machen zu können, muss gewährleistet sein, dass bei der Probenaufkonzentrierung zum Beispiel durch

Fällung keine Aktivitätsverluste entstehen. Deshalb wurde für diesen Versuch das Filtersystem Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Device (Milipore, USA) benutzt. Es wurden zwei Hauptkulturschalen eines Stammes vorbereitet und der Überstand mittels Zentrifugation (2 x 30 min, 4°C, 3000 U/min) von den Zellen getrennt. Bei 3500 U/min, 4°C wurde zuerst 45 min zentrifugiert. Die filtrierte Probe wurde abgegossen, Kulturüberstand nachgegossen und wieder zentrifugiert. Dies wurde so lange wiederholt, bis das Ausgangsvolumen von 10 ml auf 1,5 ml konzentriert war. Es wurde somit um den Faktor 7 aufkonzentriert. Um eine höhere Konzentration zu erhalten, musste der Überstand erneut zentrifugiert werden. Um sicherzustellen, dass die Vergleichsstämme um den gleichen Faktor aufkonzentriert sind, wurden die Volumina auf einer Feinwaage bestimmt und mit Aqua dest auf gleiche Volumina eingestellt.

3.2.13 Lipaseaktivität Quantifizierung

Zur Lipasequantifizierung wurde wie beschrieben der Kulturüberstand geerntet und mit einer Amicon Ultra Zentrifugation aufkonzentriert. Die eingesetzten Probenvolumina wurden zellzahladaptiert gegen die *sigB*-Mutante bestimmt, wobei als Basis ein Volumen von 100 µl diente. Es wurde eine Tributyrinlösung vorbereitet, in der 2,42 g Tris und 554 mg CaCl₂ in 200 ml VE-Wasser eingewogen wurden. In dieser Lösung wurde 0,08% Low melting point Agarose aufgekocht, 0,05% Tributyrin dazugegeben und in einem Glasgefäß 2 x 1,5 min mit einer Amplitude von 70% mit Ultraschall behandelt. Die Messung wurde gestartet, indem 2 ml der auf 40°C aufgewärmten Tributyrinlösung mit der zu messenden Probe vermischt wurde. Den Verlauf der Absorption wurde bei 37°C in einem Beckman Photometer bei 450 nm für 60 min verfolgt und minütlich dokumentiert. Um einen gleichmäßigen Abbau des Tributyrins in der Lösung zu gewährleisten, wurde die Probe alle 5 bis 10 Minuten mit einer Pipette gut durchgemischt.

3.2.14 Wachstumskurvenbestimmung der Stämme

Um das Wachstumsverhalten der unterschiedlichen Stämme zu dokumentieren, wurde eine Hauptkultur in BHI angelegt, die bei 37°C im Schüttelinkubator bei 150 U/min weiter zum Wachstum angeregt wurde. Stündlich wurde eine Probe zur

photometrischen Messung bei einer OD₅₇₀ entnommen. Diese Prozedur wurde 12 Stunden fortgeführt und nach 24 Stunden Wachstum der letzte Wert bestimmt.

3.2.15 Bestimmung der statistischen Signifikanz

Um zu bestimmen, ob zwei Meßreihen voneinander signifikant verschiedene Ergebnisse repräsentieren oder ob unterschiedliche Mittelwerte lediglich aufgrund der Zufallstreuung unterschiedliche Werte annehmen wurde der t-Test verwendet. Zur Lösung des Problems müssen die beiden Reihen Mittelwerte im Verhältnis zur Standardabweichung (die bei beiden Reihen als gleich vorausgesetzt wird) miteinander verglichen werden. Das Ziel des Vergleichs liegt in der Überprüfung, wie weit ein Mittelwert X_a von X_b entfernt ist, und als Maß hierfür dient die Größe t .

4 Ergebnisse

4.1 Beginn der δ -Hämolysinproduktion in drei *S. epidermidis*-Isolaten

Da regelmäßig spontane Mutationen des *agr*-Operons beobachtet werden (Vuong, 2006), wurden zunächst drei voneinander unabhängige klinische Isolate hinsichtlich ihrer *agr*-Aktivität geprüft, um geeignete Wildtypen für die Untersuchung der *agr*-Deletionsmutanten zu sichern. Es wurden der stark biofilmpositive Stamm 1457, der Oxacillin-sensible, stark Biofilm-bildende Stamm 8400 und der Oxacillin-resistente, schwach Biofilm-bildende Stamm 1057 untersucht. Als Maß für die *agr*-Aktivität wurde die Produktion des auf der Effektor RNA RNAlIIII kodierten δ -Toxins untersucht. Es wurde in einem Zeitraum von 4-22 Stunden Wachstum stündlich eine Probe der Kultur entnommen, die nach Aufbereitung auf Humanblutagar gegeben wurde. Die Zellzahl lag je nach Versuch zwischen 10^8 und 10^9 /ml. Bei allen der drei untersuchten Wildtypstämme konnte eine δ -Toxinproduktion beobachtet werden. Der Zeitpunkt des Auftretens der Hämolyse variierte je nach Versuch innerhalb eines Stammes um eine bis vier Stunden, so dass die Unterschiede zwischen den Stämmen in jedem Versuch einzeln beurteilt wurden. Eine Hämolyse auf Humanblutagar ließ der Überstand des Stammes 1057 bereits

nach 8 bis 10 Stunden erkennen (nach 8 Stunden 1x, nach 10 Stunden 4x). Jedoch ist anzumerken, dass zweimal der Versuch erst nach 10 Stunden Wachstum gestartet wurde und somit schon im ersten Probenüberstand eine vollständige Hämolyse zu erkennen war, jedoch zu vermuten ist, dass sie schon früher eingesetzt hat. Der Stamm 1457 zeigte erstmals einen Hämolysehof nach 11 bis 13 Stunden Zellwachstum (2x nach 11 Stunden, 2x nach 12 Stunden und 1x nach 13 Stunden). Der Stamm 8400 begann mit einer hämolytischen Aktivität ebenfalls nach 11 bis 13 Stunden Wachstum (1x nach 11 Stunden, 2x nach 12 Stunden und 2x nach 13 Stunden). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Stamm 1057 eine bis vier Stunden früher mit der δ -Hämolysinproduktion begann als die Stämme 1457 und 8400 (Abbildung 4).

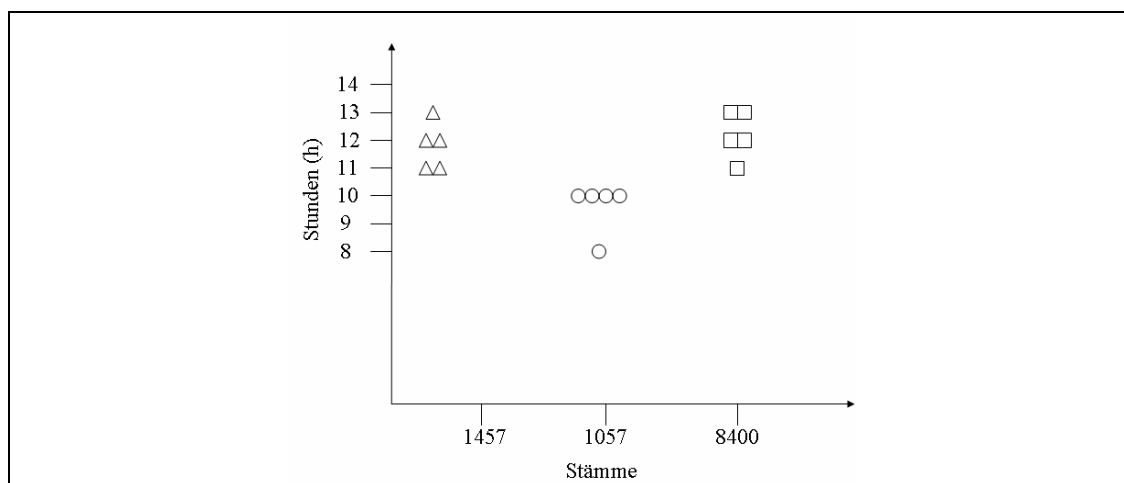


Abbildung 4 Vergleich des Zeitpunktes des Beginns der Expression an δ -Toxin. Es wurden *S. epidermidis*-Wildtypen 1457(Δ), 1057(o) und 8400 (\square) untersucht. Der Überstand der Bakterien wurde im Wasserbad aufgekocht und mit NaN_3 versetzt bevor 20 μl auf eine Humanblutagarplatte gegeben wurden. Die Ergebnisse entsprechen Werten aus fünf voneinander unabhängigen Versuchen.

4.2 Etablierung der Deletionsmutanten

Um das Ziel der Arbeit zu verfolgen, den Einfluss des *agr*-Systems auf die Expression von Virulenzfaktoren in *S. epidermidis* zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten des *agr*-Operons etabliert. Hierfür wurde uns die Mutante *S. epidermidis* CV2 (Vuong *et al.*, 1999) mit Deletion des *agr*-Operons durch die Arbeitsgruppe M. Otto (NIH, Hamilton, Montana, USA) zu Verfügung gestellt.

Die *agr*-Mutation sollte durch Phagentransduktion in den *S. epidermidis*-Wildtypstamm 1457, den Oxacillin-resistenten Stamm 1057 und den unabhängigen Oxacillin-sensiblen Stamm 8400 sowie in die entsprechenden in unserer Arbeitsgruppe etablierten Mutanten des σ^B -Operons, 1457*rsbU*, 1457*rsbUVW*, 1457*sigB*, 1057*rsbU*, 1057*rsbUVW*, 1057*sigB*, 8400*rsbU*, 8400*rsbUVW* und 8400*sigB*, transduziert werden. Für die Transduktion wurde der uns von Vibeke T. Rosdahl (Statens Serum Institute, Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellte Phage $\Phi 71$ verwendet. Für die Transduktion wurden Phagenlysate nach Propagierung von $\Phi 71$ auf dem Stamm CV2 mit einem Phagentiter von mindestens 10^8 /ml eingesetzt. In allen eingesetzten Wildtypen und Mutanten des σ^B -Operons konnten Spectinomycin-resistente Transduktanten identifiziert werden.

Um zu überprüfen, ob die Spectinomycinresistenz auf der Übertragung der Resistenzkassette in dem *agr*-Operon beruhte, wurde die Expression des auf der Effektor-RNA RNAIII kodierten δ -Toxins untersucht. Initial wurden zunächst je sechs potentielle Transduktanten pro Ausgangsstamm charakterisiert. Von den insgesamt 65 untersuchten Spectinomycin-resistenten Stämmen zeigten 30 in drei voneinander unabhängigen Experimenten eine fehlende Hämolyse auf Humanblutagar, während 35 Stämme mindestens einmal eine positive Hämolyse aufwiesen. Es konnte jedoch für alle genetischen Hintergründe mindestens eine Transduktante identifiziert werden, die dreimalig Hämolyse-negativ getestet wurde. Als interne Kontrolle wurden jeweils die Wildtypen 1457, 1057 und 8400 und die Einfachmutanten des σ^B -Operons (*rsbU*, *rsbUVW* und *sigB*) mit intaktem *agr*-System mitgeführt, die stets eine positive δ -Hämolysinproduktion zeigten.

Da regelmäßig spontane Mutationen des *agr*-Operons beobachtet werden (Vuong *et al.*, 2006), wurde zusätzlich in den potentiellen Transduktanten die erfolgreiche Transduktion mittels PCR des *agr*-Operons und anschließender Gelelektrophorese untersucht (Abbildung 5). Die Größe der Amplifikate entsprach der des Ausgangsstammes CV2 (Abbildung 5.A,B,C 2.Spur) mit einem *circa* 2,5 kb kleinerem Amplifikat im Vergleich zu den mituntersuchten Stämmen mit intaktem *agr*-Operon (Vuong *et al.*, 2000). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass alle Mutanten auf einer gezielten Inaktivierung des *agr*-Operons beruhten.

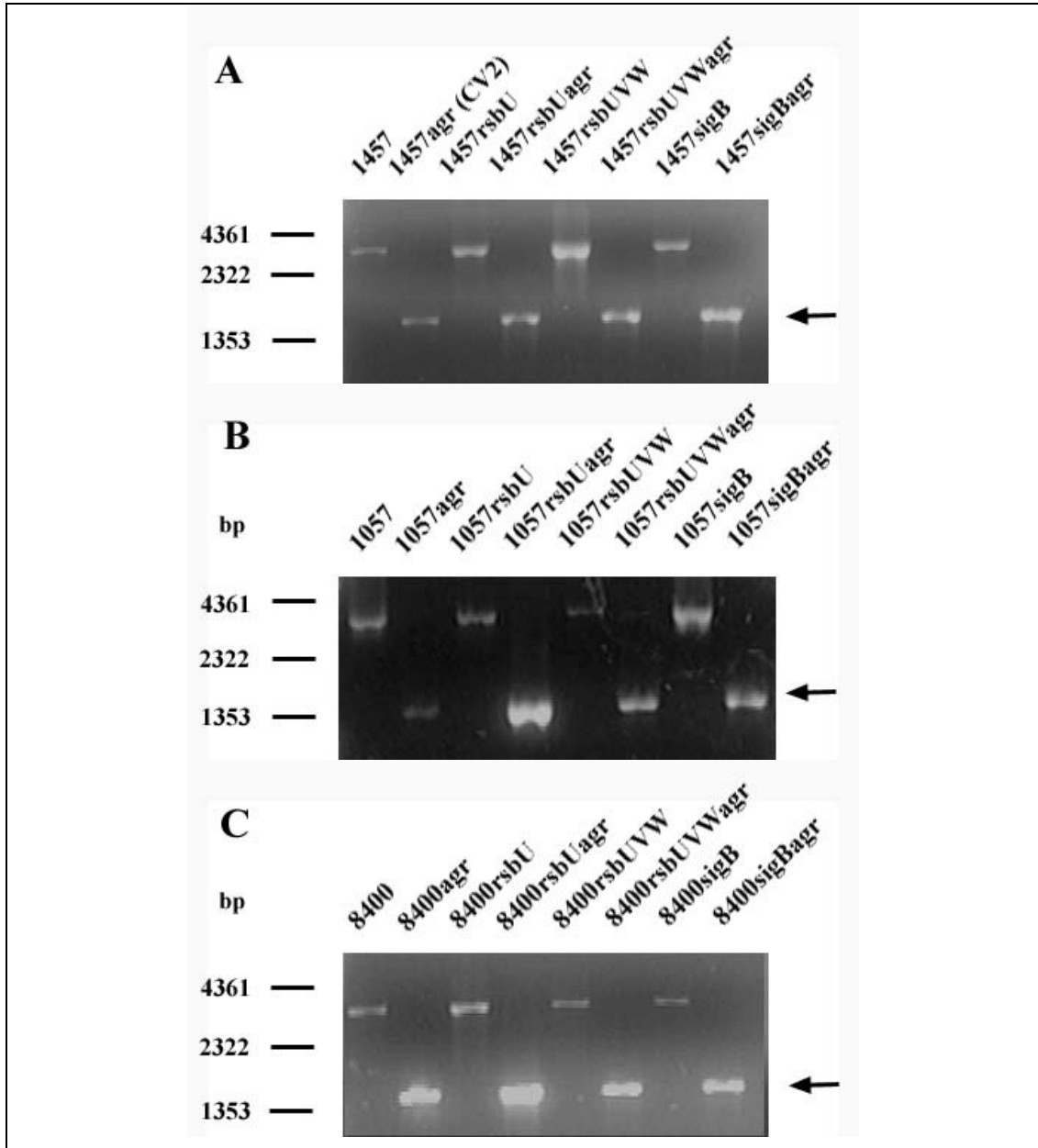


Abbildung 5 PCR zur Kontrolle der korrekten Transduktion. Dargestellt sind die Amplifikate der Empfängerstämme *S. epidermidis* 1457 (A) 1057 (B) 8400 (C) mit den jeweils zugehörigen Mutanten des σ^B -Operons im Vergleich mit denen der potentiellen Transduktanten. Die Größe der Amplifikate der Transduktanten entspricht mit circa 1,5 kb (\rightarrow) der zu erwartenden Größe bei korrekter Transduktion der Spectinomycinkassette. Die Größenangabe entspricht ausgewählten Fragmenten des als Größenstandard mitgeführten λ -DNS HindIII gespalten.

4.3 Phänotypische Charakterisierung der *agr*-Mutanten

4.3.1 Einfluss von *agr* auf das Wachstumsverhalten

4.3.1.1 Koloniewachstum

Um den möglichen Einfluss der erzeugten Mutation auf das Wachstum der *S. epidermidis*-Stämme zu untersuchen, wurde das Wachstum auf festen und in flüssigen Nährmedien untersucht.

Bei den Untersuchungen auf Blutagar wurden exemplarisch die Stämme 1457 und 8400 mit den entsprechenden Mutanten des σ^B -Operons und den *agr*-Doppelmutanten auf Schafblutagar untersucht und die Koloniegröße in mm jeweils nach 24 und 48 Stunden Inkubation im Brutschrank bestimmt (Abbildung 6).

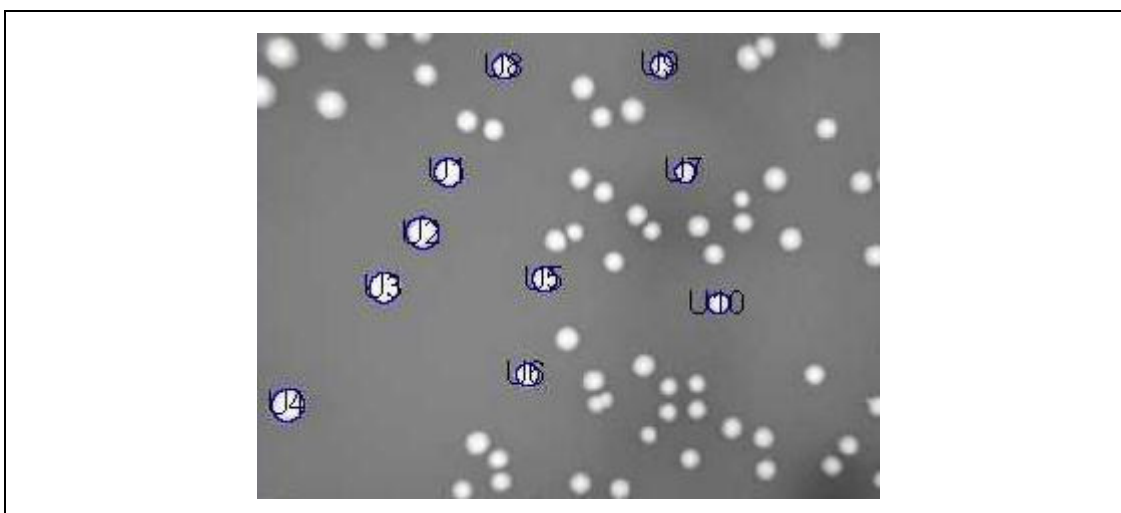


Abbildung 6 Koloniewachstum des Stammes *S. epidermidis* 1457rsbUVWagr nach 48 Stunden Wachstum auf Schafblutagar. Es wurden zehn möglichst einzelstehende Kolonien markiert (U1-U10) und daraus der mittlere Durchmesser bestimmt.

Es wurde in drei voneinander unabhängigen Versuchen der Durchmesser von zehn einzelstehenden Kolonien bestimmt, damit die Koloniegröße unter möglichst optimalen Wachstumsbedingungen detektiert werden konnte. Die beiden Wildtypen 1457 und 8400 erreichten nach 24 h und 48 h einen vergleichbaren Koloniedurchmesser (1457 1,1 mm; 2,3 mm beziehungsweise 8400 1,3 mm; 2,8 mm). Der Stamm 8400sigB mit einem durchschnittlichen Koloniedurchmesser

von 1,4 mm nach 24 Stunden Wachstum verglichen mit dem Wildtyp 8400 mit einem Durchmesser von 1,3 mm zeigte, dass sich bei Inaktivierung des σ^B -Operons das Wachstum nur in geringem Ausmaß ändert. Vergleicht man den Wildtypen 1457 mit einem durchschnittlichen Koloniedurchmesser von 2,3 mm und den Stamm 1457agr mit einem Durchmesser von 2,5 mm nach 48 Stunden Wachstum, so ist dies ein Beispiel dafür, dass bei den agr-Doppelmutanten tendenziell größere Koloniedurchmesser bestimmt wurden, die jedoch nach Berechnung mittels t-test (Kap. 3.2.15) keine statistische Signifikanz zeigten (Abbildung 7).

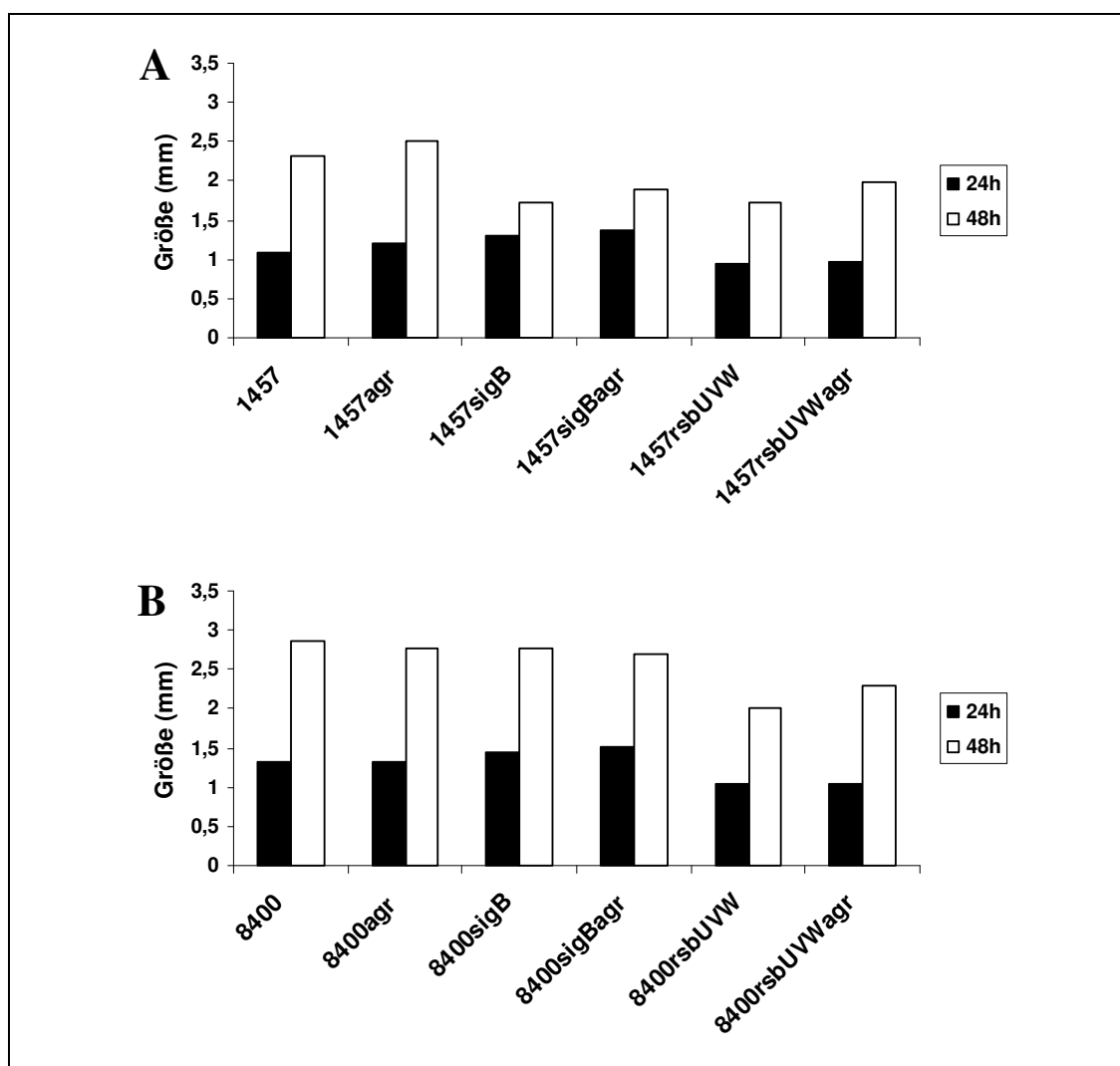


Abbildung 7 Koloniegrößenvergleich in mm der *S. epidermidis*-Stämme 1457, 1457sigB und 1457rsbUVW (A) und 8400, 8400sigB und 8400rsbUVW (B) mit den dazugehörigen agr-Mutanten. Es wurde nach 24 Stunden ■ und 48 Stunden □ Wachstum der Koloniedurchmesser in mm bestimmt. Als festes Nährmedium wurde Schafblutagar verwendet. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus drei Versuchen dar.

4.3.1.2 Wachstum in Schüttelkulturen

Der Wachstumsverlauf der *agr*-Mutante im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen wurde mittels Wachstumskurven der Bakterienstämme auf der Basis von Schüttelkulturen untersucht. Innerhalb der ersten 11 Stunden wurde stündlich die Absorption gemessen und nach 24 Stunden Wachstum der OD₆₀₀-Endwert bestimmt. Als Medium wurde BHI-Brühe verwendet. Untersucht wurden die drei *S. epidermidis*-Wildtypstämme 1457, 1057 und 8400, die Einzelmutanten des σ^B -Operons (*rsbU*, *rsbUVW* und *sigB*) und die jeweiligen *agr*-Mutanten. Für die untersuchten Wildtypen konnte weder im Wachstumsverlauf noch in der Endkonzentration nach 24 Stunden Wachstum (OD₆₀₀: 1457 7,59; 1057 6,13; 8400 7,57) ein Unterschied beobachtet werden (Abbildung 8; Tabelle 4.1).

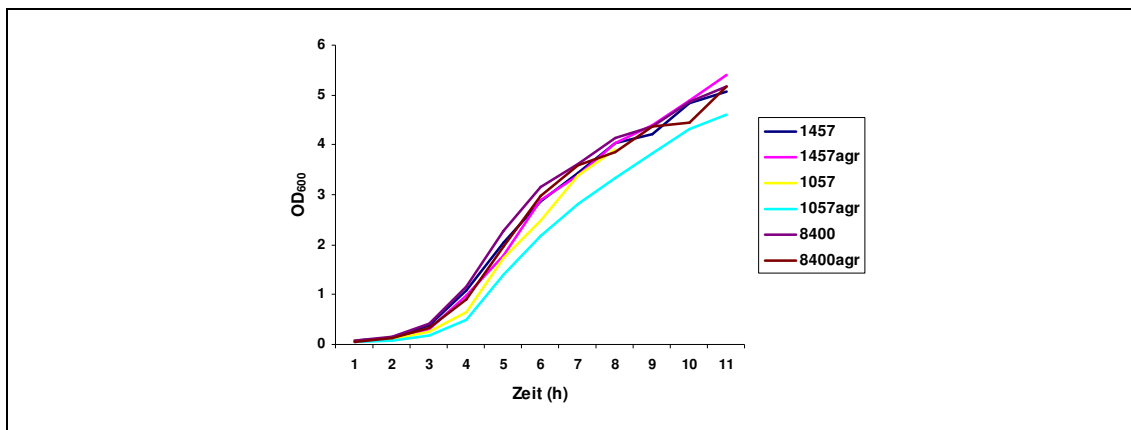


Abbildung 8 Wachstumskurven der *S. epidermidis*-Wildtypen 1457, 1057 und 8400 und entsprechende *agr*-Mutanten im Vergleich. Gemessen wurde bei einer OD₆₀₀ über 11 Stunden. Als Medium wurde BHI-Brühe verwendet. Die dargestellten Kurven bestehen aus Mittelwerten aus drei Versuchen.

Betrachtet man die Einzelmutanten des σ^B -Operons, so zeigte der Stamm 8400*sigB* im Vergleich zum Wildtyp lediglich eine leicht erniedrigten Zelldichte nach 24 Stunden (8400*sigB* 6,53; 8400 7,57). Diese Tendenz konnte auch für die Stämme 1457*sigB* und 1057*sigB* im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen gezeigt werden (Tabelle 4.1). Die *rsbU*-Mutanten fielen ebenfalls durch geringere 24 h-Werte auf, jedoch ohne, dass sich hierfür eine statistische Signifikanz errechnen ließe. Während die *rsbU*- und *sigB*-Mutanten einen dem Wildtyp entsprechenden Wachstumsverlauf zeigten, fiel auf, dass die Stämme 8400*rsbUVW* und 1457*rsbUVW* ein verzögertes Wachstum in der exponentiellen Phase zeigten (Abbildung 9). Die Zelldichte des Stammes 1057*rsbUVW* zeigte, dass das Wachstum

der *rsbUVW*-Mutanten nach 24 Stunden dem des Wildtyps entspricht beziehungsweise im Fall der Stämme 1457 und 8400 etwas größer ist (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 *OD₆₀₀-Werte der Wachstumskurven nach 24 Stunden Wachstum in Schüttelkultur.*

	WT	<i>agr</i>	<i>rsbU</i>	<i>rsbUagr</i>	<i>rsbUVW</i>	<i>rsbUVWagr</i>	<i>sigB</i>	<i>sigBagr</i>
1457	7,59	8,5	6,81	7,93	8,1	8,36	7,16	7,78
1057	6,13	6,11	5,82	6,96	6,02	6,87	5,04	6,7
8400	7,57	7,64	6,58	8,01	8,16	8,43	6,53	7,86

Vergleicht man die Stämme 1457, 1457*rsbU*, 1457*sigB* (Abbildung 10), 1057, 1057*rsbU*, 1057*rsbUVW*, 1057*sigB* (Abbildung 11) und 8400, 8400*rsbU*, 8400*sigB* (Abbildung 12) mit den jeweiligen *agr*-Mutanten, so kann im Wachstumskurvenverlauf kein Unterschied festgestellt werden. Die *agr*-Mutante des Stammes 1457*rsbUVW* sowie die *agr*-Mutante des Stammes 8400*rsbUVW* wachsen etwas schneller als der Wildtyp 1457 beziehungsweise 8400 in der exponentiellen Phase. Bei der Betrachtung der Zelldichte nach 24stündigem Wachstum fiel auf, dass die *agr*-Inaktivierung aller Stämme (außer des Stammes 1057*agr*) zu höheren Werten der Zelldichte führte. Berechnet man die statistische Signifikanz mittels t-test, so zeigte sich, dass vor dem genetischen Hintergrund 1457 der Wildtyp und die *rsbU*-Mutante statistisch relevante kleinere OD-Werte nach 24 h Wachstum erreichten als die entsprechenden *agr*-Mutanten. Der Deletionsstamm 1057*rsbUVWagr* erreichte einen statistisch signifikant höheren OD₆₀₀-Wert (p=0,0009) nach 24 h Wachstum. Innerhalb des genetischen Hintergrundes 8400 zeigten die *rsbU*- und *sigB*-Mutante einen statistisch signifikanten Unterschied zu den entsprechenden *agr*-Mutanten (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2 *Ergebnisse der Berechnung der statistischen Signifikanz mittels t-test der OD₆₀₀-Werte der Wachstumskurven nach 24 Stunden. Die Werte der Wildtypen (Wt) wurden den der korrespondierenden agr-Mutanten gegenübergestellt. Dargestellt sind Wahrscheinlichkeitswerte p=x. Statistisch signifikante größere Werte der agr-Mutanten sind fett gedruckt.*

	Wt	<i>rsbU</i>	<i>rsbUVW</i>	<i>sigB</i>
1457	0,029	0,021	0,32	0,067
1057	0,19	0,45	0,0009	0,28
8400	0,42	0,03	0,213	0,0045

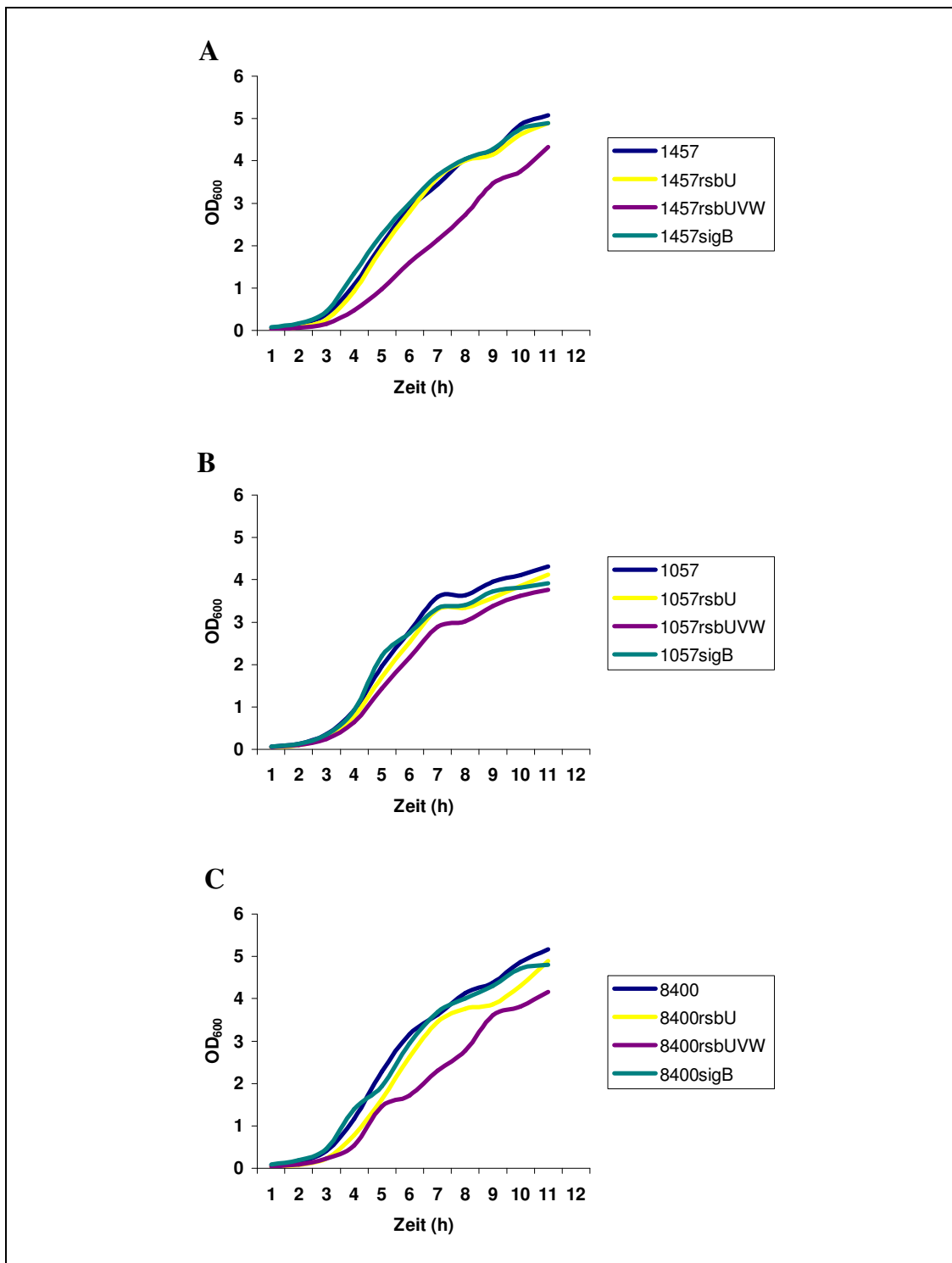


Abbildung 9 Wachstum der *S. epidermidis*-Wildtypstämme in Flüssigkultur. Es wurden die Stämme 1457 (A), 1057 (B), 8400 (C) und die Einzelmutanten des σ^B -Operons (*rsbU*, *rsbUVW*, *sigB*) in BHI-Medium im Verlauf von 12 Stunden untersucht. Die Absorption wurde bei einer OD₆₀₀ gemessen. Dargestellt sind Mittelwertkurven, die sich aus drei Experimenten ergeben.

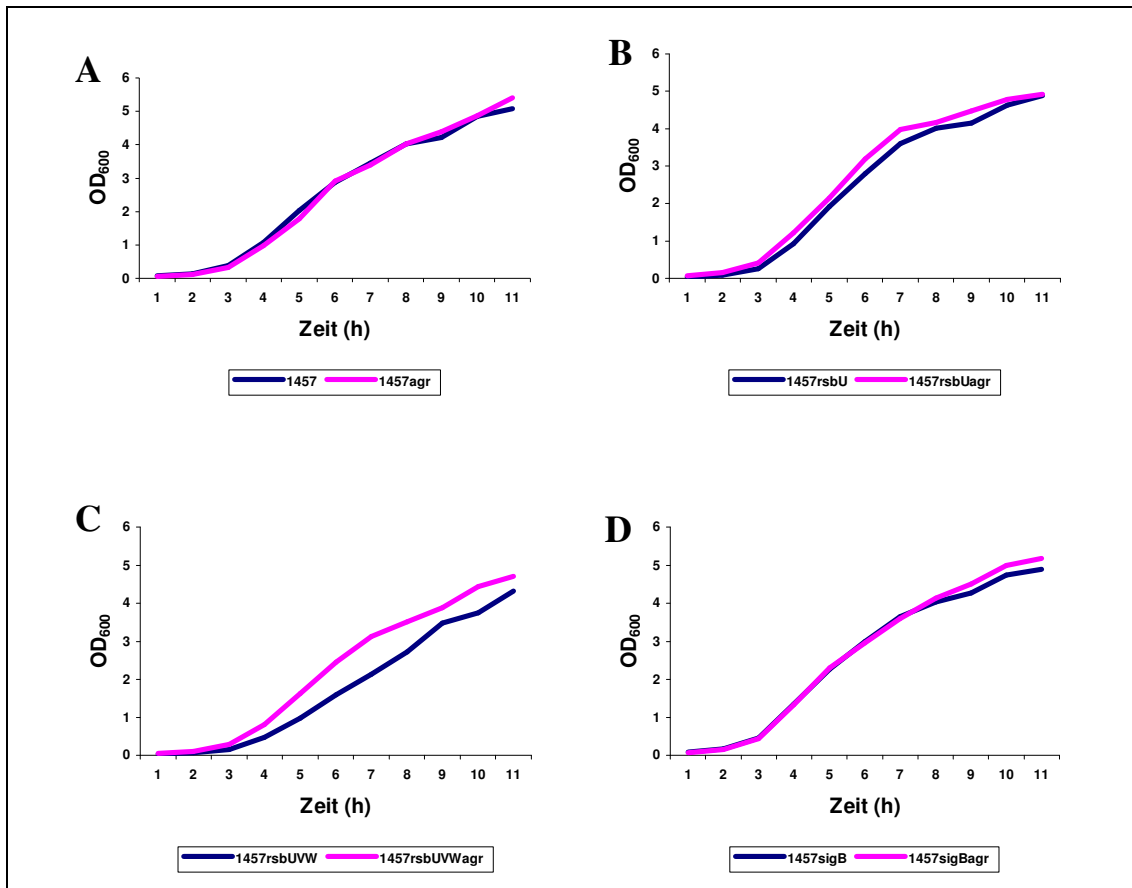


Abbildung 10 Einzelvergleich der Wachstumskurven. Es sind die *S. epidermidis*-Stämme 1457 und 1457agr (A), 1457rsbU und 1457rsbUagr (B), 1457rsbUVW und 1457rsbUVWagr (C) und 1457sigB und 1457sigBagr (D) dargestellt. Als Medium wurde BHI verwendet. Gezeigt sind Mittelwertkurven, die sich aus drei Experimenten ergeben.

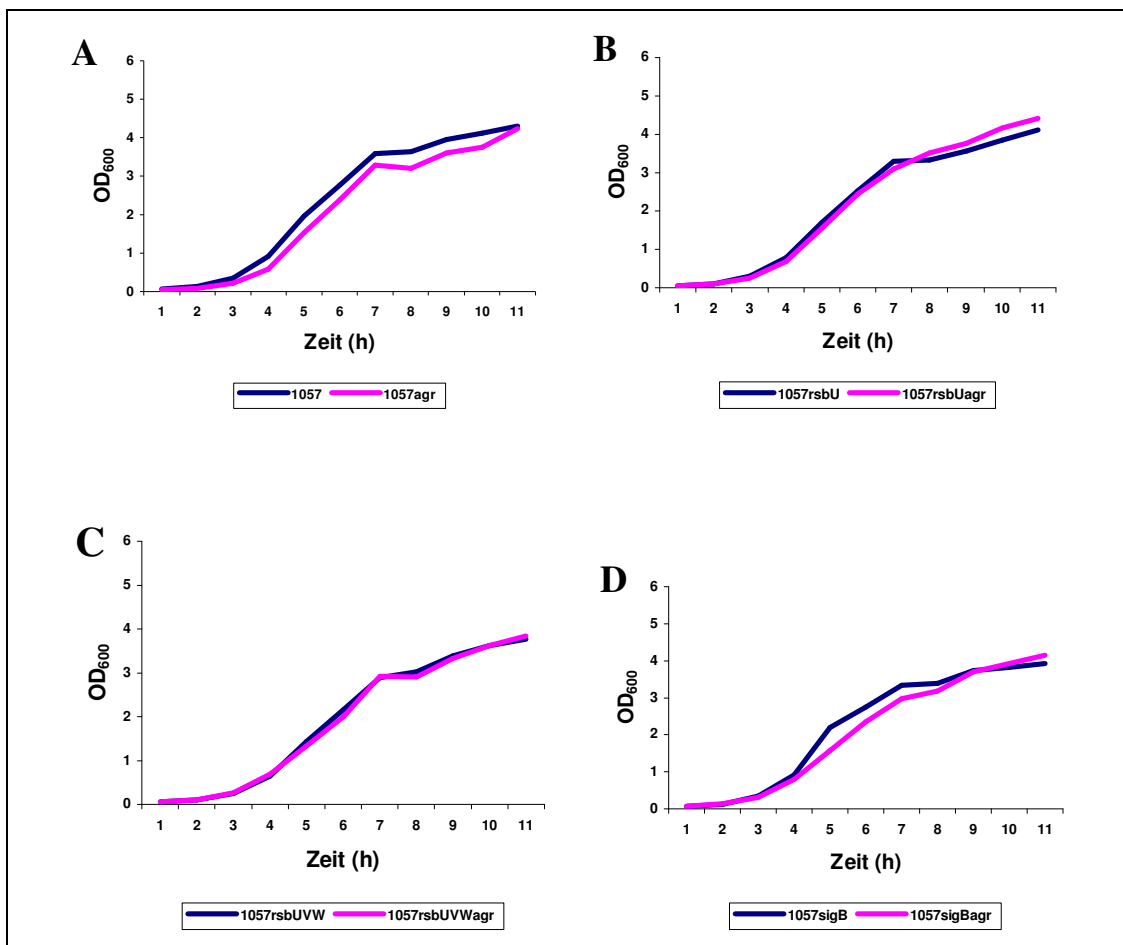


Abbildung 11 Einzelvergleich der Wachstumskurven. Es sind die *S. epidermidis*-Stämme 1057 und 1057agr (A), 1057rsbU und 1057rsbUagr (B) 1057rsbUVW und 1057rsbUVWagr (C) und 1057sigB und 1057sigBagr (D) dargestellt. Als Medium wurde BHI verwendet. Gezeigt sind Mittelwertkurven, die sich aus drei Experimenten ergeben.

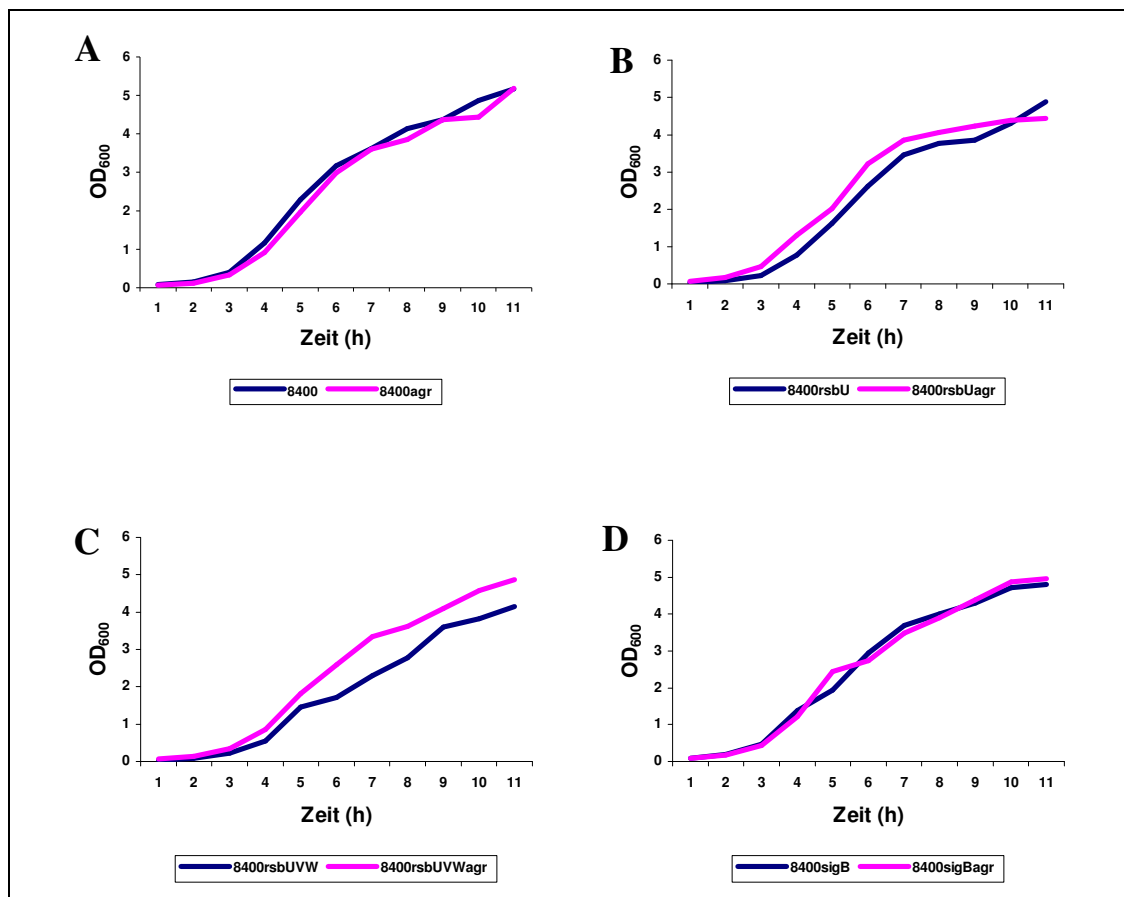


Abbildung 12 Einzelvergleich der Wachstumskurven. Es sind die *S. epidermidis*-Stämme 8400 und 8400agr (A), 8400rsbU und 8400rsbUagr (B) 8400rsbUVW und 8400rsbUVWagr (C) und 8400sigB und 8400sigBagr (D) dargestellt. Als Medium wurde BHI verwendet. Gezeigt sind Mittelwertkurven, die sich aus drei Experimenten ergeben.

4.3.2 Regulation von Virulenzfaktoren durch *agr*

4.3.2.1 Einfluss von *agr* auf die Biofilmbildung

Nachdem gezeigt wurde, dass das *agr*-Operon keinen bedeutenden Einfluss auf das Wachstum hat, wurden semiquantitative Biofilmtests durchgeführt, um den Einfluss der generierten Deletionsmutanten auf die Biofilmbildung zu untersuchen. Der Adhärenztest zur semiquantitativen Bestimmung der Biofilmbildung an Plastikoberflächen (Mack, 1992) wurde hierfür mit allen untersuchten Stämmen durchgeführt. Hierbei fungierte der Wildtyp des Stammes 1457 als Positiv- und der Stamm 1457sigB als Negativkontrolle. Die Wildtypen zeigten in der Biofilmbildung den Unterschied, dass der Stamm 1457 mit einer durchschnittlichen A_{570} von 2 und der Stamm 8400 mit einer durchschnittlichen A_{570} von 1,8 einen stärkeren Biofilm als der Stamm 1057 (A_{570} 1,4) ausbildeten (Abbildung 13). Ist das σ^B -Operon

komplett inaktiviert, kommt es in allen Stämmen zu einem massiven Rückgang der Biofilmproduktion. Der Stamm 8400*sigB* resultiert in einem biofilmnegativen Phänotyp. Schaltet man den Aktivator von σ^B *rsbU* aus, so kann man ebenfalls eine stark erniedrigte Biofilmbildung der Mutanten im Vergleich zu den Wildtypen erkennen (8400*rsbU* A₅₇₀ 0,1). Wird die regulative Kaskade *rsbUVW* inaktiviert, entspricht die Biofilmproduktion der der Wildtypen, beziehungsweise kann im Stamm 8400*rsbUVW* sogar etwas gesteigert werden (1457*rsbUVW* A₅₇₀ 1,9; 8400*rsbUVW* A₅₇₀ 1,9; Abbildung 13). Die Analyse der *agr*-Mutanten ergab im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen und σ^B -Einfachmutanten einen ähnlichen Expressionstyp in der Biofilmproduktion. In einigen *agr*-Mutanten konnte eine gesteigerte Biofilmbildung im Vergleich zu den Wildtypen beziehungsweise den σ^B -Einfachmutanten nachgewiesen werden. Eine im Vergleich zum Wildtyp statistisch signifikant erhöhte Biofilmbildung von $p < 0,05$ wurde mittels t-Test (Kap. 3.2.15) für den Stamm 1457*rsbUagr* bestimmt. Für den Stamm 1057*agr* wurde eine hohe Signifikanz von $p < 0,01$ im Vergleich zu dem Stamm 1057 berechnet. Eine Tendenz $p < 0,1$ in Hinblick auf eine statistisch erhöhte Biofilmbildung zeigten die Stämme 8400*rsbUagr*, 8400*rsbUVWagr*, 8400*sigBagr* und 1057*sigBagr* im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen.

Tabelle 4.3 Ergebnisse der Berechnung der statistischen Signifikanz der Biofilmbildung mittels t-test. Es wurden die *agr*-Mutanten mit den jeweiligen Wildtypen beziehungsweise den *sigB*-Einfachmutanten verglichen. Es gingen Werte von vier Biofilmversuchen ein. Dargestellt sind Wahrscheinlichkeitswerte $p=x$.

	WT	<i>rsbU</i>	<i>rsbUVW</i>	<i>sigB</i>
1457	0,234	0,013	0,319	0,251
1057	0,003	0,109	0,179	0,091
8400	0,309	0,061	0,052	0,055

Eine Induktion der Biofilmbildung durch Ethanol konnte für die drei untersuchten *S. epidermidis*-Wildtypstämme und den σ^B -Deletionsmutanten bereits in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden und ist hier nur exemplarisch dargestellt (Knobloch *et al.*, 2004). Es wurden die *rsbU*- und *sigB*-Mutanten der Stämme 1457, 1057 und 8400 mit den korrespondierenden *agr*-Mutanten untersucht. Als Nährmedium wurde

TSB_{BBL} supplementiert mit 2 % Ethanol verwendet. Die Ethanolinduktion der Biofilmbildung konnte auch für die *agr*-Mutanten gezeigt werden und ist der Induktion der Wildtypen vergleichbar. Es konnte eine signifikante Verstärkung der Biofilmexpression in den Stämmen 1457*sigB*, 8400*sigB* und 8400*sigBagr* gezeigt werden. Eine Tendenz zur statistischen Signifikanz konnte in den Stämmen 1457*rsbUagr* und 1457*sigBagr* gezeigt werden (Abbildung 14).

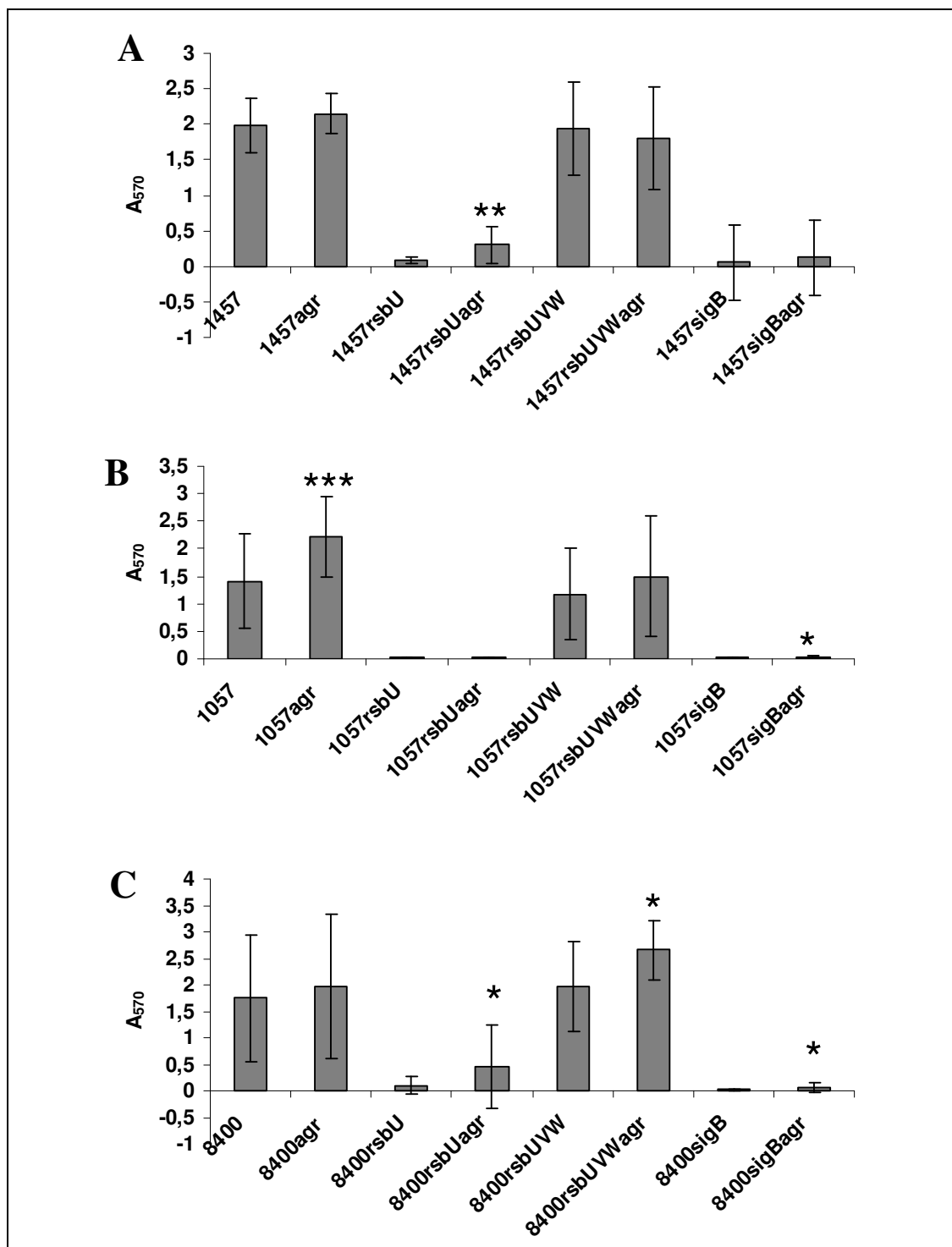


Abbildung 13 Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457 (A), *S. epidermidis* 1057 (B) und *S. epidermidis* 8400 (C) mit den zugehörigen σ^B -Deletionsmutanten und *agr*-Doppelmutanten. Die jeweilige Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Es wurde als Nährmedium TSB_{BBL} verwendet. Der Unterschied zwischen *agr*-Mutante und Nicht-*agr*-Mutante wurde mittels *t*-Test errechnet. Statistische Signifikanz von $p < 0,05$ (**), $p < 0,01$ (***) und eine Tendenz $p < 0,1$ (*).

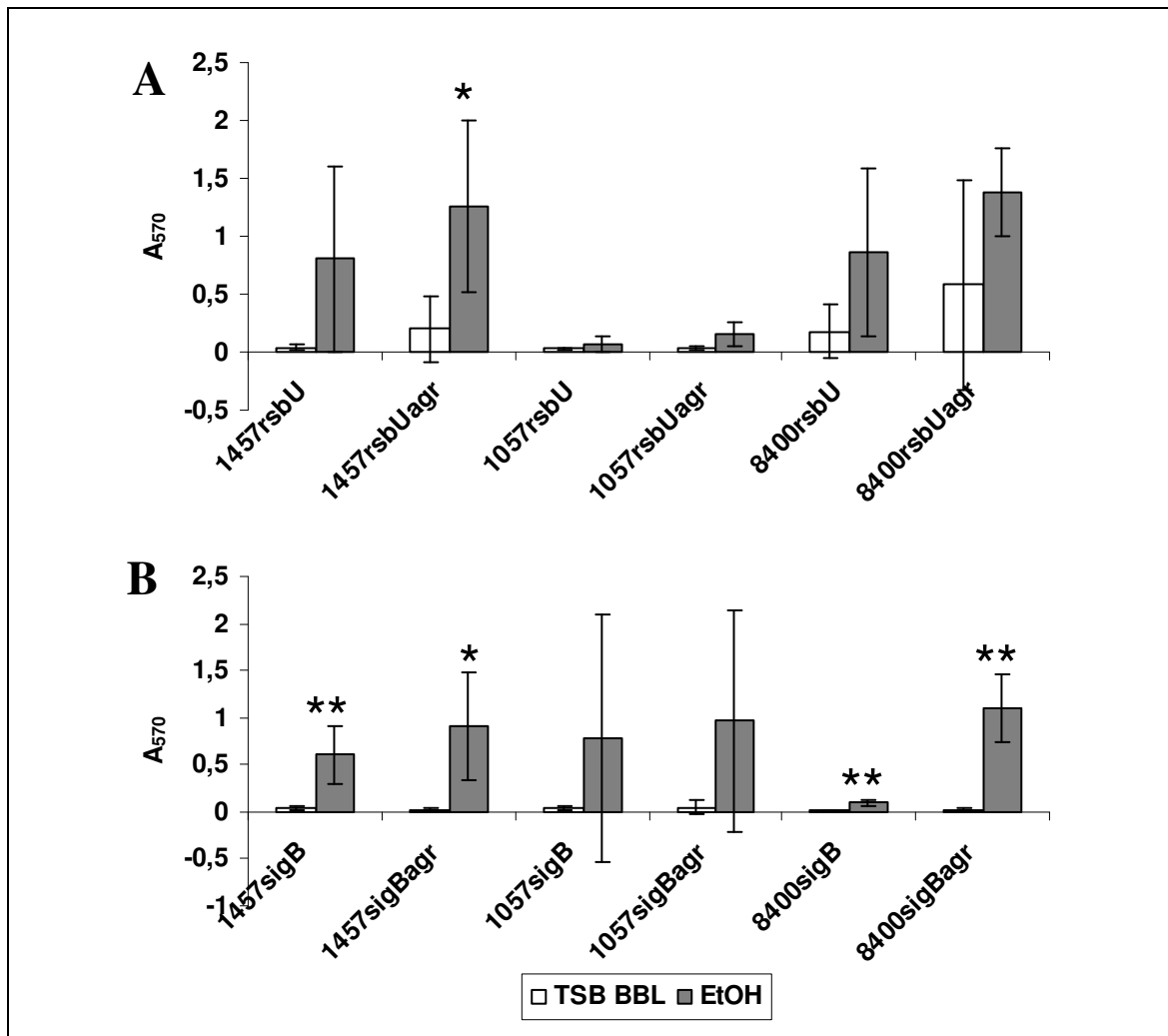


Abbildung 14 Biofilmbildung von *S. epidermidis*-Stämmen 1457, 1057 und 8400 vor dem genetischen Hintergrund der *rsbU*-Mutante (A) und der *sigB*-Mutante (B) mit entsprechenden *agr*-Mutanten. Es wurden als Nährmedien TSB_{BBL} (\square) und TSB_{BBL} supplementiert mit 2% Ethanol (\blacksquare) verwendet. Die jeweiligen Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Einzelwerte dar. Die Absorption wurde bei 570 nm gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von drei repräsentativen Experimenten gezeigt. Statistische Signifikanz $p < 0,1$ (*), $p < 0,05$ (**).

4.3.2.2 Einfluss von *agr* auf extrazelluläre Proteasen

In *Staphylococcus aureus* werden viele Virulenzfaktoren durch das *agr*-System reguliert (Novick *et al.*, 1993; Peng *et al.*, 1988) und da insbesondere Exoproteine eine wichtige Rolle innerhalb Staphylokokken-assoziiierter Infektionen spielen (Goguen *et al.*, 1995; Götz *et al.*, 1998), wurde die Proteaseaktivität der etablierten *agr*-Deletionsmutanten untersucht. Mit Casein versetzter TSB-Agar wurde nach Kultivierung der Bakterienstämme mit HCl versetzt und durch eine Denaturierung des

Caseins eine Trübung des Agars hervorgerufen. Vergleicht man die drei untersuchten Wildtypstämme untereinander, so zeigte lediglich der Stamm 8400 im nativen Assay eine denaturierte Proteolysezone und damit eine deutliche Proteaseaktivität. Die Wildtypen der Stämme 1457 und 1057 ließen keine Veränderung des umgebenden Agars erkennen (Abbildung 15). Der denaturierte Agar zeigte eine Lysezone um den aufgetropften Ansatz der Stämme 1457 und 1057 (Abbildung 16). Eine *sigB*-Inaktivierung zeigte im Stamm 8400 eine denaturierte Proteolysezone, vergleichbar mit dem des Wildtypstammes, wobei zusätzlich noch eine hydrolysierende Komponente zu beobachten war. Die Stämme 1457 und 1057 zeigten nach *sigB*-Inaktivierung ebenfalls eine Proteaseaktivität. Bei dem Stamm 1457*sigB* war ein hydrolysierender Anteil der Proteaseaktivität prominent, der Stamm 1057*sigB* zeigte vor allem eine denaturierende Enzymaktivität (Abbildung 16). Wird nur der Aktivator von σ^B *rsbU* inaktiviert, so zeigte sich in allen untersuchten Stämmen eine denaturierende Proteolysezone nach Kultivierung der Bakterien. Die Proteolysezone war phänotypisch der der *sigB*-Mutante vergleichbar (Abbildung 17A,B,C). Die *rsbUVW*-Mutanten der Stämme 1457, 1057 und 8400 zeigten keine Aktivität auf dem Proteaseassay (Abbildung 17A,B,C). Bei Inaktivität des *agr*-Operons konnte in allen Stämmen gezeigt werden, dass weder auf dem nativen Proteaseassay noch auch auf dem denaturierten Agar eine Proteaseaktivität zu erkennen war (Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17).

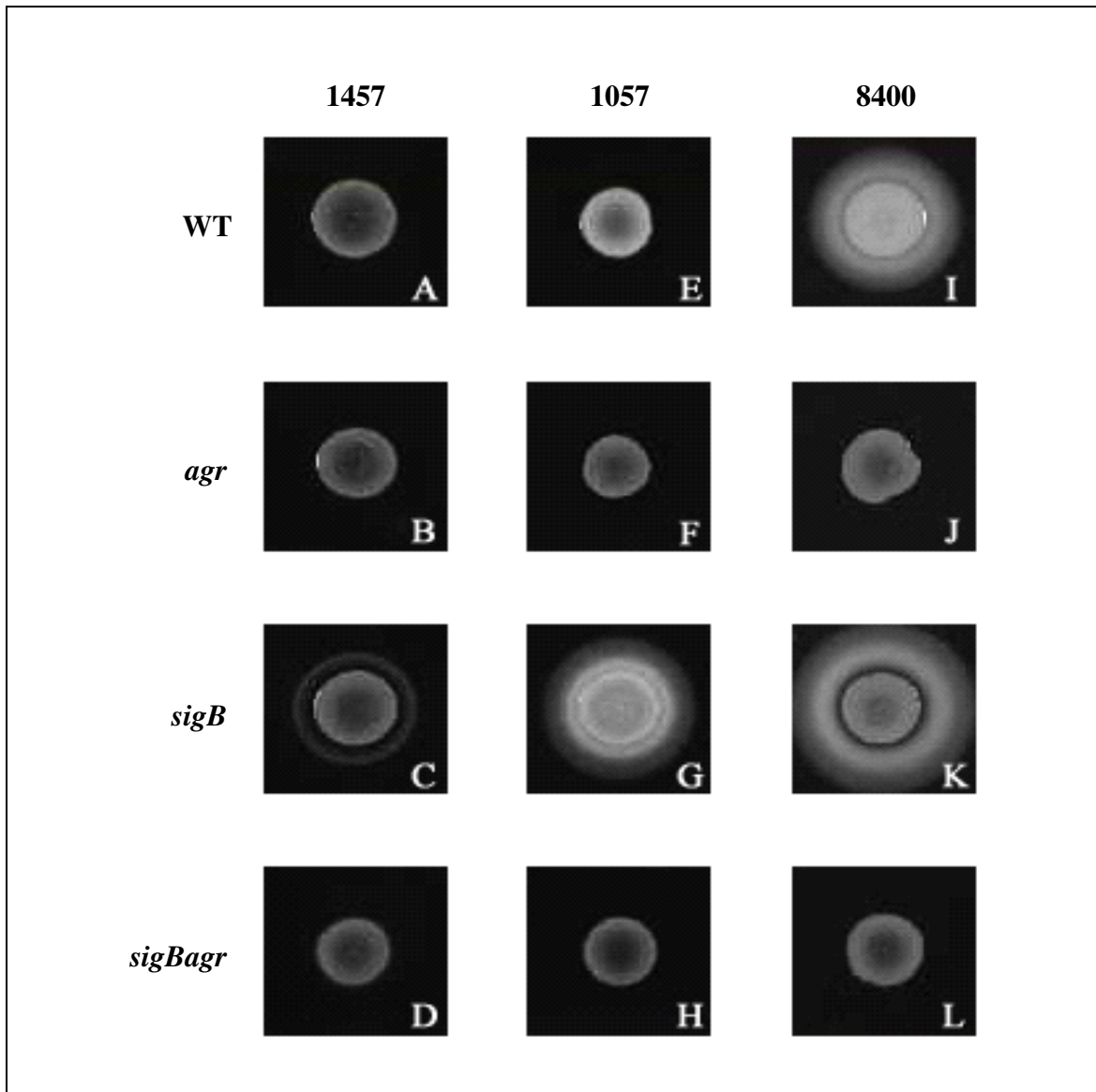


Abbildung 15 Proteaseassay der *S. epidermidis*-Stämme 1457, 1057 und 8400. Verglichen wurden hier die Wildtypen (A,E,I), die σ^B -Einzelmutanten (C,G,K) und die entsprechenden *agr*-Mutanten (B,F,J/D,H,L).

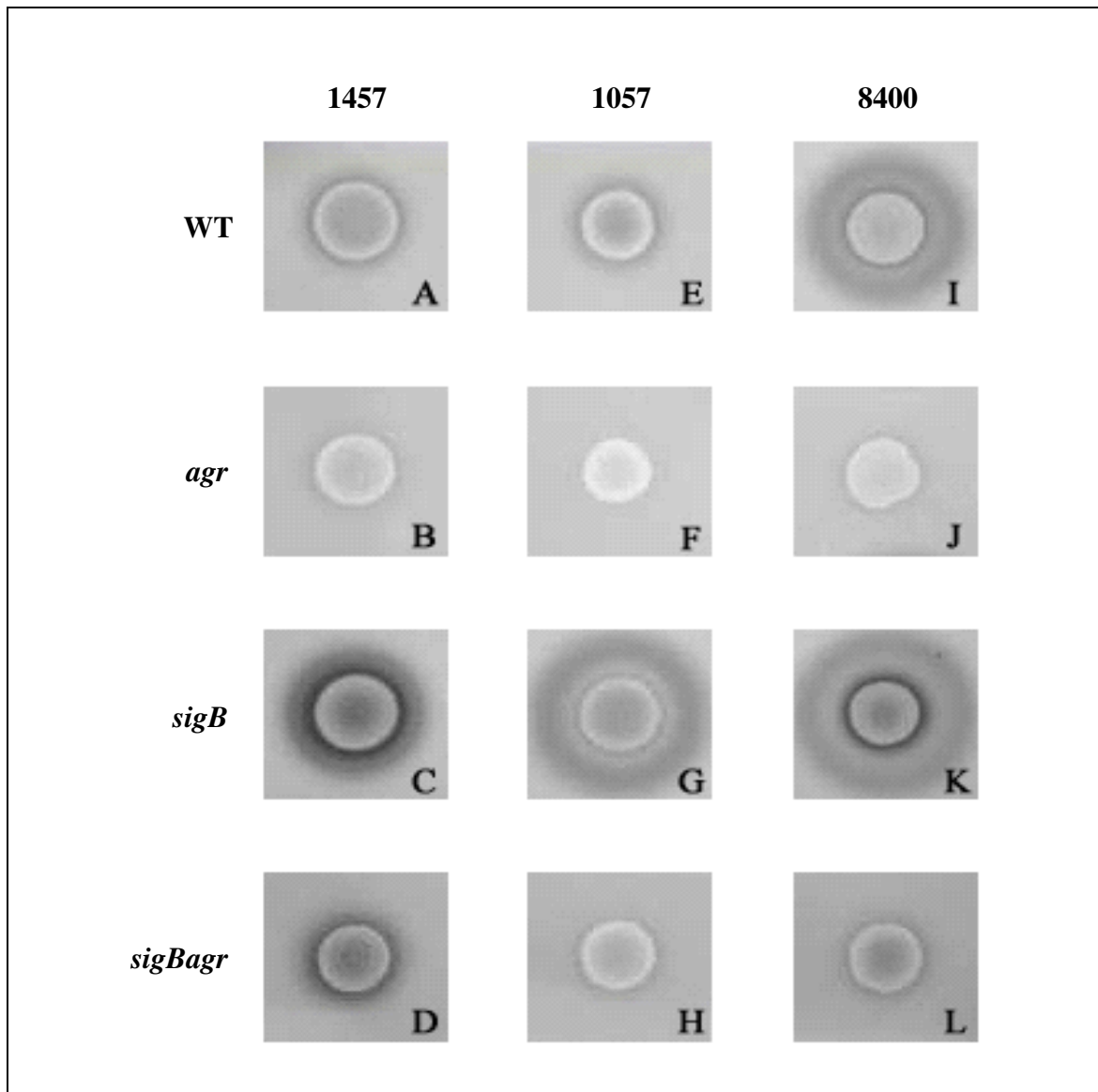


Abbildung 16 Proteaseassay nach Denaturierung mit 1 M HCl der *S. epidermidis*-Stämme 1457 (A-D), 1057 (E-H) und 8400 (I-L). Es wurden hier der Wildtyp (A,E,I) mit der entsprechenden *agr*-Mutante (B,F,J) und die *sigB*-Mutante (C,G,K) mit der *sigBagr*-Doppelmutante (D,H,L) verglichen.

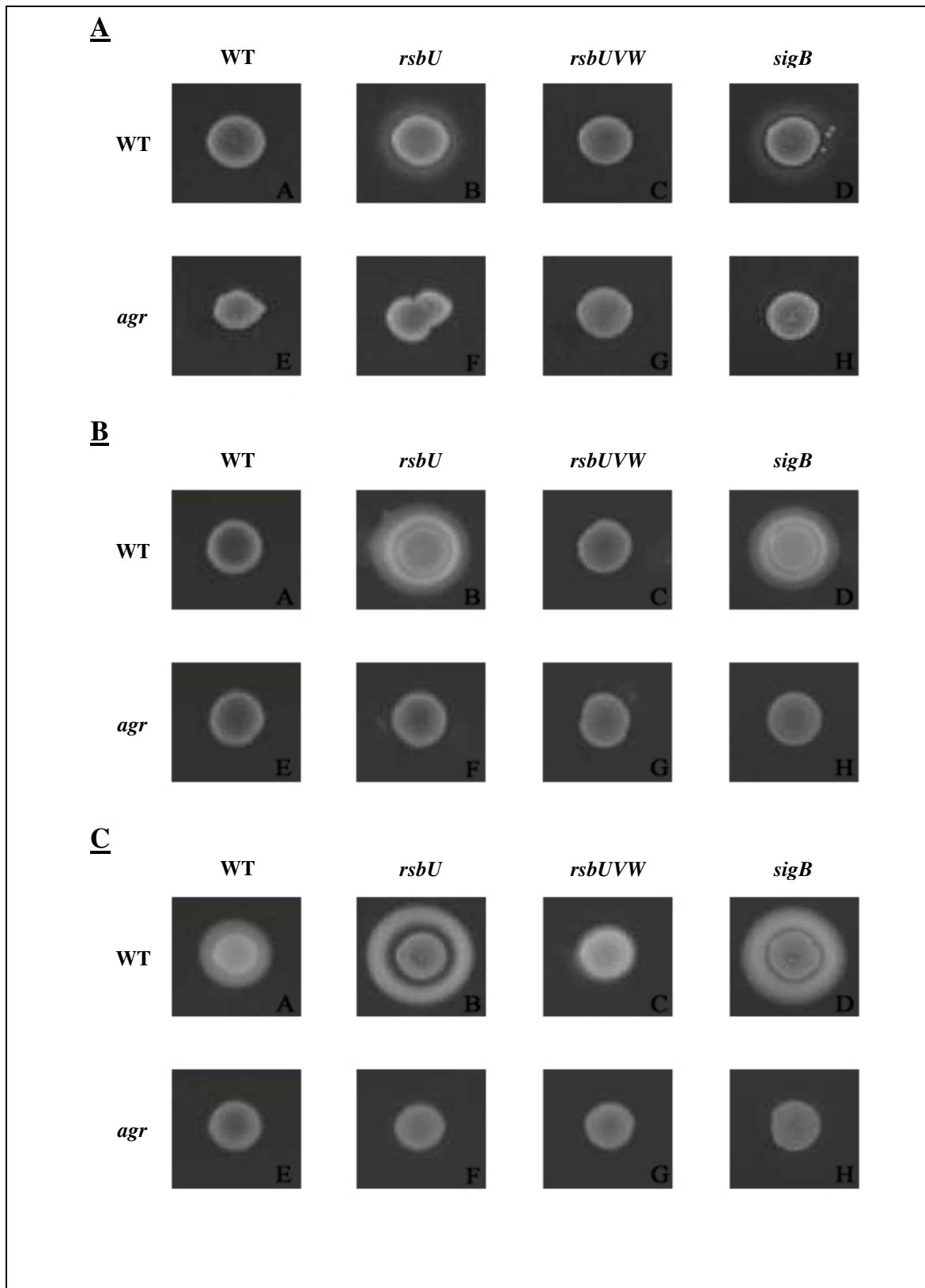


Abbildung 17 Proteaseassay der *S. epidermidis*-Stämme 1457 (**A**), 1057 (**B**) und 8400 (**C**). Verglichen wurden hier die Wildtypen (**A-D**), die σ^B -Einzelmutanten (**B-D**) und die entsprechenden *agr*-Doppelmutanten (**E-H**).

4.3.2.3 Einfluss von *agr* auf extrazelluläre Lipasen

4.3.2.3.1 Lipaseassay

Um den Einfluss der generierten Deletion des *agr*-Operons hinsichtlich einer weiteren Exoproteinaktivität zu untersuchen, wurde die Lipaseaktivität mittels eines Agarassays untersucht. Von allen untersuchten Wildtypstämmen zeigte nur der Stamm 8400 eine schmale Lysezone in dem Lipaseassay (Abbildung 18). Bei Inaktivierung von *sigB* zeigte der Stamm 8400 eine stärkere Lyseaktivität als der Wildtyp. Wird nur die *rsbU*-Komponente des Stammes 8400 inaktiviert, ist ebenfalls eine stärkere Lyseaktivität im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Die *rsbUVW*-Mutante des Stammes 8400 zeigte keine Lysezone. Die 1457*sigB*- und die 1457*rsbU*-Mutante zeigten im Gegensatz zu dem korrespondierenden Wildtyp eine Lysezone auf dem Lipaseagar. Die 1457*rsbUVW*-Mutante ließ keine Lysezone erkennen. Für die *sigB*-Einzelmutanten des Stammes 1057 war keine Enzymaktivität auf dem Lipaseagar zu erkennen (Abbildung 18).

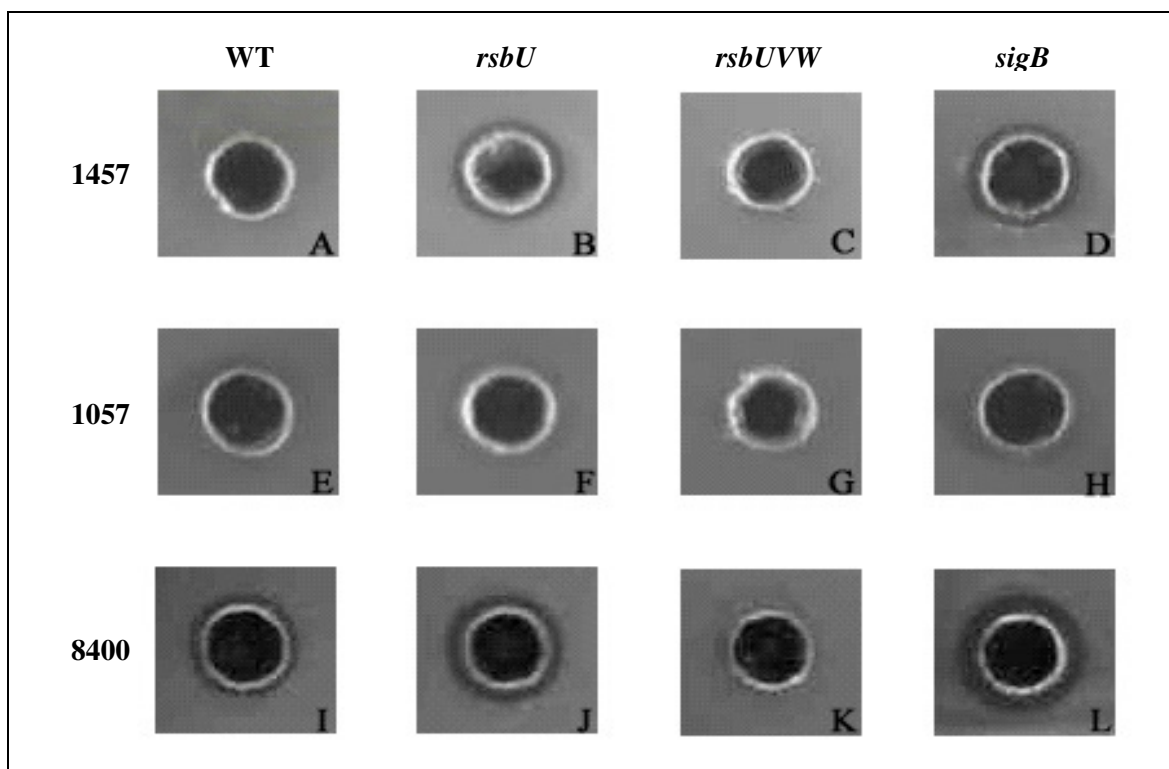


Abbildung 18 Lipaseassay der *S. epidermidis*-Stämme 1457 (A-D), 1057 (E-H), 8400 (I-L) und Einzelmutanten des σ^B -Operons: *rsbU* (B,F,J), *rsbUVW* (C,G,K) und *sigB* (D,H,L). Die Stämme 1457*rsbU*, 1457*sigB*, 8400*rsbU* und 8400*sigB* zeigten eine Lipaseaktivität. Der Stamm 8400*sigB* wies die größte Lipaseaktivität auf.

Nachdem alle Wildtypen und *sigB*-Einzelmutanten hinsichtlich ihrer Lipaseaktivität getestet wurden, sollten ausgewählte Stämme mit *agr*-Inaktivität bezüglich ihres Verhaltens auf Lipaseagar getestet werden. Es wurden die *agr*-Mutanten der Wildtypstämme 1457, 1057 und 8400 und den entsprechenden *sigB*-Einzelmutanten untersucht. Eine Lipaseaktivität war in keinem der Stämme mit *agr*-Inaktivierung zu erkennen (Abbildung 19).

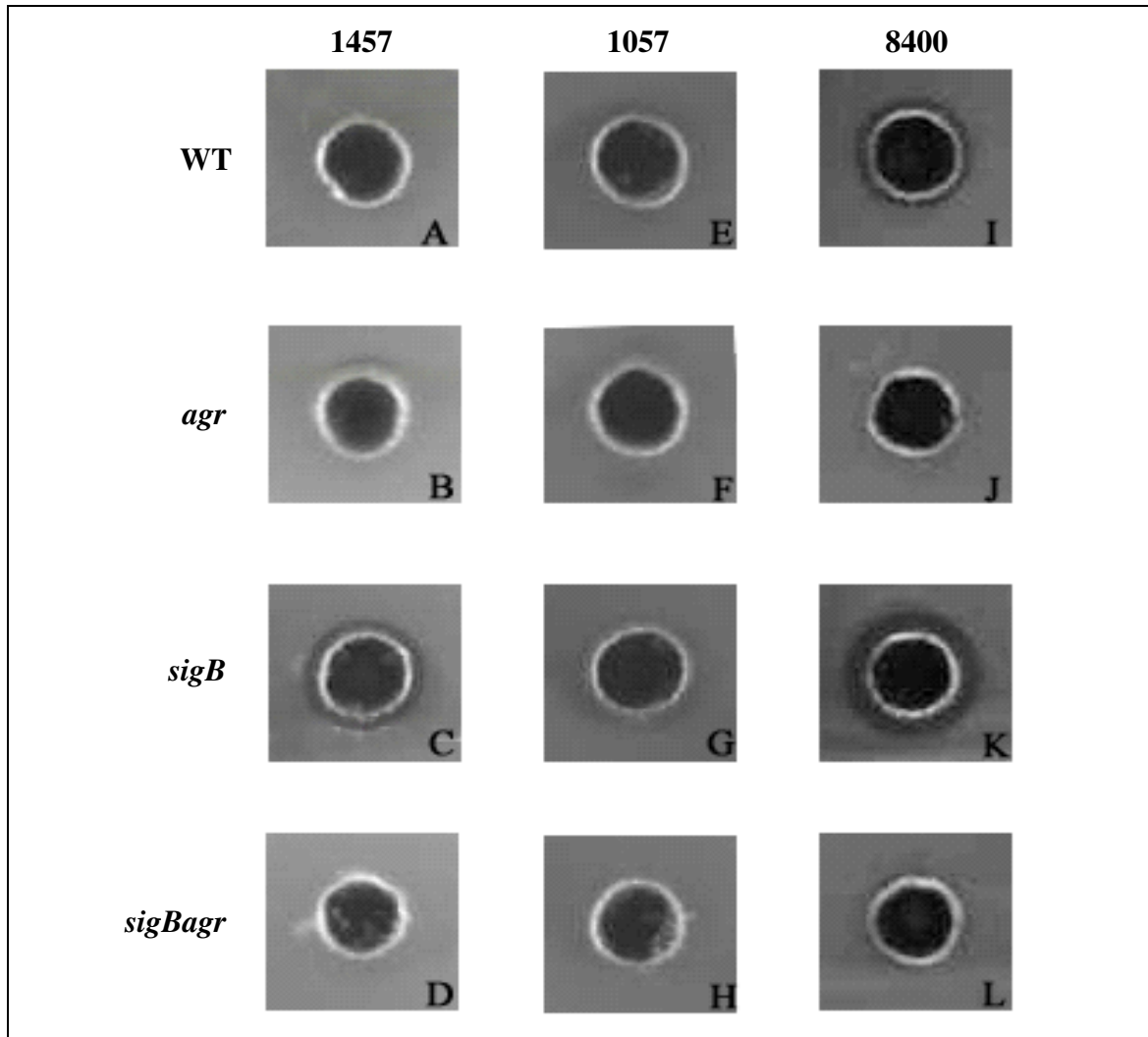


Abbildung 19 Lipaseassay der *S. epidermidis*-Stämme 1457 (A-D), 1057 (E-H), 8400 (I-L), *agr*-Mutanten der Wildtypen (B,F,J) und *sigB*-Einzelmutanten (C,G,K) mit entsprechenden *agr*-Doppelmutanten (D,H,L). Der Stamm 8400*sigB* zeigte die stärkste Lipaseaktivität.

4.3.2.3.2 Tributyrinabbau

Um die beobachteten phänotypischen Veränderungen in Bezug auf die Lipaseaktivität der *agr*-Mutanten verifizieren zu können, wurde anhand der Kulturüberstände der

Stämme 1457, 1057 und 8400 jeweils für den Wildtyp, die *sigB*-Mutante und die entsprechenden *agr*-Mutanten der Abbau von Tributyrin bestimmt. Der Tributyrinabbau wurde über 60 min untersucht und die Absorption kontinuierlich gemessen. Der Überstand wurde zum Zweck der Enzymmessung zunächst aufgereinigt und konzentriert, bevor er zu der mit Tributyrin versetzten Lösung gegeben wurde. Der Stamm 8400 zeigte in diesem Versuch einen schnelleren Abbau an Tributyrin, also eine stärkere Lipaseaktivität, als die anderen Wildtypen (Abbildung 20). Die 8400*sigB*-Mutante ließ einen schnelleren Abbau an Tributyrin erkennen als der Wildtyp. Während der Überstand der *sigB*-Mutante bereits nach 15 min den vollständigen Abbau des Tributyrins nachwies, war dies bei dem Wildtyp erst nach 29 min zu erkennen. Der Wildtypstamm 1457 setzte das Tributyrin geringfügig schneller um als die korrespondierende *sigB*-Mutante, es konnte im Überstand des Wildtyps nach 35 min keine Veränderung der Steigung mehr nachgewiesen werden, bei dem Stamm 1457*sigB* erst nach 40 min. Auch der Wildtyp 1057 zeigte einen schnelleren Abbau des Tributyrins als die jeweilige *sigB*-Mutante. Während der Ansatz des Wildtyps keine weitere Veränderung der Steigung nach 33 min zeigte, wies die *sigB*-Mutante dies erst nach 37 min auf. Der Vergleich der Abbaugeschwindigkeit der Wildtypen mit den korrespondierenden *agr*-Mutanten ergab keinen signifikanten Unterschied im Tributyrinabbau (Abbildung 20). Berechnet man die Steigung des Tributyrinabbaus zwischen 5 und 14 Minuten, zeigt sich ein etwas schnellerer Abbau der 1457*agr*-Mutante und der 8400*agr*-Mutante gegenüber dem Wildtyp und ein etwas langsamerer Abbau des Stammes 1057*agr* gegenüber dem jeweiligen Wildtyp (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4 Steigung des Tributyrinabbaus der jeweiligen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zwischen 5 und 14 Minuten.

	1457	1057	8400
<i>sigB</i>-Mutante	↓	↓	↑
<i>agr</i>-Mutante	↑	↓	↑
<i>sigBagr</i>-Mutante	↓	↑	↑

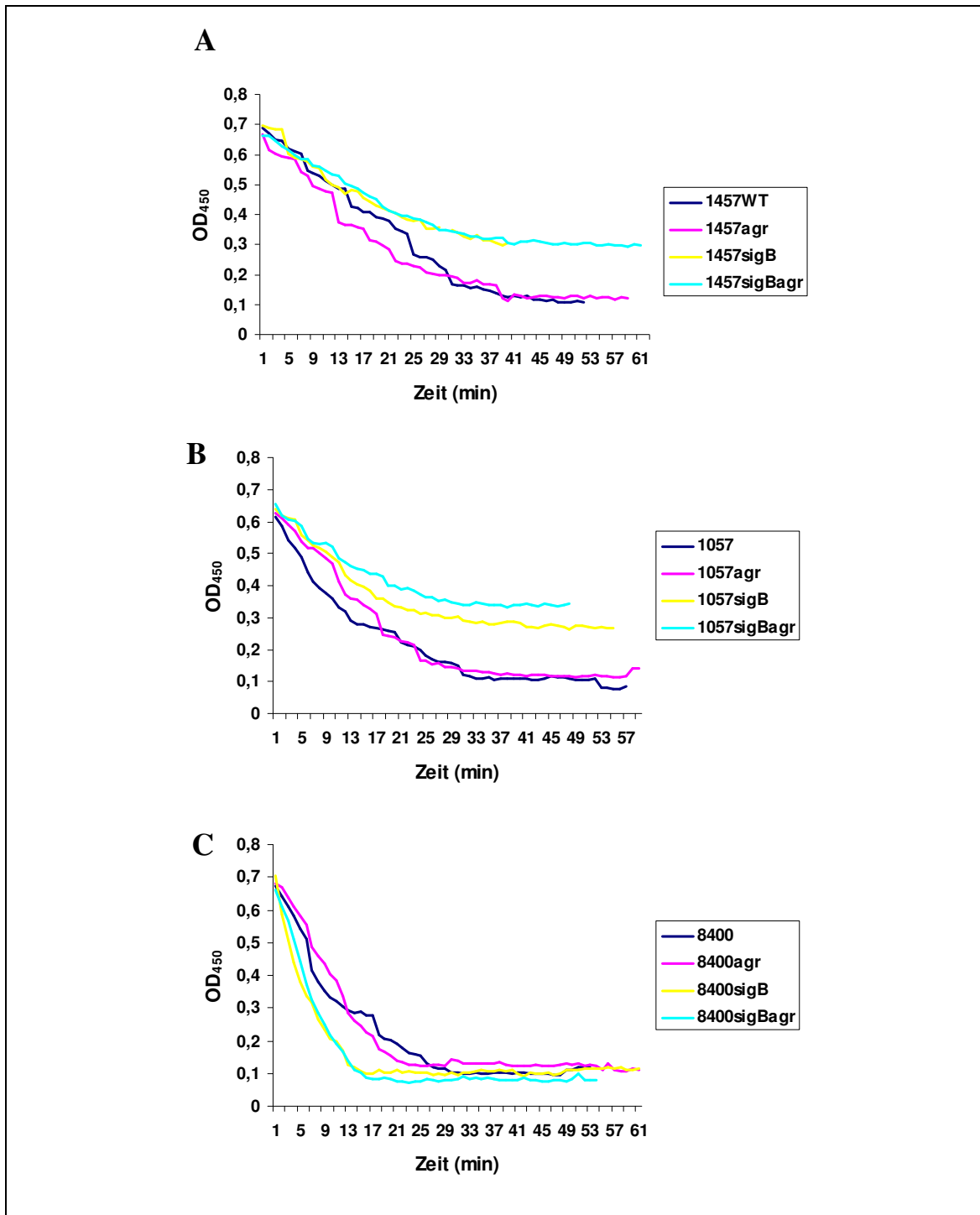


Abbildung 20 Abbau an Tributyrin im Verlauf einer Stunde. Untersucht wurden die drei *S. epidermidis*-Stämme 1457 (A), 1057 (B) und 8400 (C), deren Einzelmutanten sigB und den entsprechenden agr-Mutanten. Nach der Zugabe von 0,05 % Tributyrin erfolgte minütlich eine Probenentnahme zur Absorptionsbestimmung bei 450 nm. Zur Darstellung der Kurven sind Mittelwerte aus drei Versuchen verwendet worden.

5 Diskussion

Staphylococcus epidermidis spielt im Rahmen von Fremdkörper-assoziierten Infektionen eine bedeutende Rolle (Banerjee *et al.*, 1991; Wisplinghoff *et al.*, 2003). Da *S. epidermidis* die Fähigkeit zur Bildung mehrlagiger Biofilme auf Polymeroberflächen besitzt, macht ihn dieses Charakteristikum zum am häufigsten isolierten Erreger innerhalb der Sepsis im Krankenhaus. Allein in Deutschland muss jährlich mit bis zu 100 000 Fremdkörper-assoziierten Infektionen gerechnet werden (Mack *et al.*, 2004). Aufgrund der außerordentlichen Resistenz gegenüber einer Therapie mit Antibiotika, kommt es in einer Mehrzahl der Fälle erst nach der Entfernung des Fremdmaterials zu einem endgültigen Therapieerfolg (Götz and Peters, 2000; Younger *et al.*, 1987).

Obwohl die immense Bedeutung von *S. epidermidis* als wichtiger humanpathogener Keim bekannt ist, wurde die Identifizierung der Virulenzfaktoren und der Mechanismus ihrer Regulation noch nicht so hinreichend wie in *Staphylococcus aureus* untersucht (Vuong *et al.*, 1999). Das *agr*-System gilt in *S. aureus* als verantwortlich für die Wachstumsphasen-abhängige Regulation einer Vielzahl an Toxinen und Virulenzfaktoren (Ji *et al.*, 1997; Morfeldt *et al.*, 1996). Die Arbeitsgruppe Vuong *et al.* hat erstmals 1998 das *agr*-System in *S. epidermidis* identifiziert und die Strukturähnlichkeit des *agr*-Lokus in *S. epidermidis* und *S. aureus* gezeigt (Vuong *et al.*, 1999). Um eine vergleichbare Rolle des *agr*-Systems in *S. epidermidis* nachzuweisen, etablierten Vuong *et al.* eine *agr*-Deletionsmutante (CV2), die eine Erhöhung der Expression an Oberflächenproteinen wie beispielsweise Autolysinen und eine geringere Expression an Exoproteinen wie Lipasen und Proteasen zeigte (Vuong *et al.*, 1999).

5.1 Generierung der Mutanten und Nachweis korrekter Transduktion

Vorherige Experimente unserer Arbeitsgruppe ergaben Hinweise, dass der zentrale Regulator *agr* durch den alternativen Sigmafaktor σ^B beeinflusst wird (Kneschke, unpubliziert). Um die Frage zu klären, welchen Einfluss *agr*-regulierte Faktoren innerhalb des σ^B -Regulons haben, sollten definierte σ^B -Einzel- und *agr*-Doppelmutanten von den drei klonal unabhängigen *S. epidermidis*-Isolaten 1457, 1057 und 8400 untersucht werden. Die σ^B -Einzelmutanten *rsbU*, *rsbUVW* und *sigB*

wurden bereits in unserer Arbeitsgruppe etabliert. In dieser Arbeit wurden *agr*-Mutanten der *S. epidermidis*-Wildtypen 1057 und 8400 und den Einfachmutanten des σ^B -Operons der Stämme 1457, 1057 und 8400, *rsbU*, *rsbUVW* und *sigB* generiert. Um eine Spontanmutation innerhalb des *agr*-Operons auszuschließen, wurden vorher die Wildtypstämme hinsichtlich ihrer *agr*-Aktivität überprüft, indem die Expression des auf der Effektor-RNA RNAlII kodierten δ -Toxins untersucht wurde (Abbildung 4). Es konnte gezeigt werden, dass der Oxacillin-resistente Stamm 1057 eine stärkere *agr*-Aktivität als die Stämme 1457 und 8400 besitzt, da die δ -Toxinproduktion bereits bis zu vier Stunden früher detektiert wurde. Für die Stämme 1457 und 8400 hingegen konnte bei einem Beginn der δ -Toxinproduktion nach 11 bis 13 Stunden eine vergleichbare *agr*-Aktivität gezeigt werden. Nachdem eine *agr*-Aktivität in allen Isolaten nachgewiesen wurde, konnten sie als geeignete Stämme für die Deletionsmutanten fungieren. Für die Etablierung der Mutanten wurde der von Vuong generierte *agr*-Deletionsstamm *S. epidermidis* 1457*agr* (CV2) benutzt. Mittels Phagentransduktion konnte die *agr*-Mutation in die klinischen *S. epidermidis*-Isolate 1057 und 8400 sowie in die entsprechenden Mutanten des σ^B -Operons 1457*rsbU*, 1457*rsbUVW*, 1457*sigB*, 1057*rsbU*, 1057*rsbUVW*, 1057*sigB*, 8400*rsbU*, 8400*rsbUVW* und 8400*sigB* transduziert werden. Es konnten in allen eingesetzten Wildtypen und Mutanten des σ^B -Operons Spectinomycin-resistente Mutanten identifiziert werden. Die weitere Überprüfung der Transduktanten auf das von der Effektor-RNA kodierte δ -Toxin ließ darauf schließen, dass die Spectinomycinresistenz auf der Übertragung der Resistenzkassette im *agr*-Operon beruhte. Danach wurde die erfolgreiche Transduktion mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese bewiesen. Alle Mutanten beruhten auf einer gezielten Inaktivierung des *agr*-Operons, da sie wie erwartet als ein *circa* 2,5 kb kleineres Amplifikat im Vergleich zu den mitgeführten Stämmen mit intaktem *agr*-Operon imponierten (Abbildung 5). In unserem Institut wurde zusätzlich eine Pulsfeldgelelektrophorese mit allen Stämmen durchgeführt, die ein vergleichbares Bild der *agr*-Mutanten zeigten. Die Amplifikate zeigten die zu erwartende Größe der Mutanten ohne *agr*-Fragment.

Nach Etablierung der *agr*-Mutanten wurde das Wachstum der Stämme auf festen sowie in flüssigen Medien untersucht um Artefakte durch unterschiedliches Wachstum auszuschließen. Die Größe der Kolonien der Wildtypen 1457 und 8400 auf festem Agar

zeigte keinen Wachstumsunterschied. Die Inaktivierung des σ^B -Operons führte zu einer geringen Veränderung der Koloniegröße in beiden untersuchten Stämmen. Nach 48 h Wachstum erreichten die *sigB*-Mutanten eine leicht geringere Koloniegröße im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen, die jedoch ohne statistische Signifikanz war. Bei den *agr*-Doppelmutanten wurden tendenziell leicht größere, jedoch nicht statistisch signifikant erhöhte, Koloniedurchmesser im Vergleich zum Wildtyp bestimmt (Abbildung 7). Inaktiviert man den elementaren Stressregulator σ^B und/oder den globalen Regulator *agr* in *S. epidermidis*, kommt es zu keinem bedeutenden Wachstumsunterschied auf Agarplatten. Somit konnte gezeigt werden, dass Veränderungen der *agr*-Mutante zum jeweiligen Wildtyp im Phänotyp nicht auf einem unterschiedlichen Wachstumsverhalten auf festen Medien beruhen.

Vergleicht man das Wachstum der Wildtypen 1457, 1057 und 8400 in Schüttelkulturen, ist in den ersten 11 Stunden im Wachstumsverlauf kein Unterschied zu erkennen (Abbildung 8). Die Zelldichte der Wildtypstämme nach 24 Stunden Wachstum zeigte ebenfalls keinen eindeutigen Unterschied (Tabelle 4.1). Bei Inaktivität des alternativen σ^B -Faktors und des Aktivators von σ^B RsbU wurde ein mit den Wildtypstämmen vergleichbarer Wachstumsverlauf in den ersten 11 Stunden beobachtet. Die Zelldichte nach 24 Stunden Wachstum lag in den σ^B - und *rsbU*-Mutanten jedoch stets unterhalb der Werte der korrespondierenden Wildtypen. Bei den Mutanten mit Deletion von *rsbUVW* der Stämme 1457 und 8400 konnte man eine Wachstumsverzögerung in der exponentiellen Phase beobachten (Abbildung 9A,C). Die Zelldichte des Stammes 1057*rsbUVW* zeigte ebenfalls eine Tendenz zum langsamerem Wachstum in den ersten 11 Stunden (Abbildung 9B). Die Zelldichte nach 24 Stunden zeigte jedoch, dass die *rsbUVW*-Mutanten das Wachstum der Wildtypen wieder aufholten beziehungsweise sogar eine höhere Zelldichte erreichten (Tabelle 4.1). Da in den *rsbUVW*-Mutanten σ^B verstärkt exprimiert wird und diese Stämme eine Wachstumsverzögerung gegenüber den Wildtypen zeigten, ist vermutlich eine σ^B -Überexpression für das langsamere Wachstum verantwortlich ist. Durch kontinuierliche Überexpression werden Gene angeschaltet, die nicht gebraucht werden. Es kommt also zu einem unökonomischen Energieverbrauch in den Stämmen mit σ^B -Überexpression.

Vergleicht man die Stämme mit *agr*-Inaktivierung mit den Wildtypstämmen und *sigB*-Einzelmutanten, so war im Wachstumsverlauf während der exponentiellen Phase kein Unterschied zu erkennen (Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12). Nach 24 Stunden Wachstum zeigten die *agr*-Mutanten der Stämme 1457, 1457*rsbU*, 1457*rsbUVW*, 1057*rsbU*, 1057*rsbUVW*, 1057*sigB*, 8400, 8400*rsbU*, 8400*rsbUVW* und 8400*sigB* im Vergleich zu ihren Wildtypen und korrespondierenden *sigB*-Mutanten eine höhere Zelldichte (Tabelle 4.1). Der Unterschied der Zelldichte nach 24 Stunden der *agr*-Mutanten der Stämme 1457, 1457*rsbU*, 8400*rsbU*, 8400*sigB* und 1057*rsbUVW* zu den Wildtypstämmen war statistisch signifikant. Die *agr*-Inaktivierung zeigte erst einen Unterschied zu den entsprechenden Wildtypen in der späten Wachstumsphase. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass bei Deletion des *agr*-Operons die Funktion des *Quorum sensing*-Systems, Autoinduktoren zu bilden und damit die Populationsdichte zu regulieren, nicht mehr ausgeführt werden kann. Bei einer hohen Zelldichte wird durch eine Aktivierung von *agr* eine Anpassung an die äußeren Gegebenheiten erlangt. Der kontrollierte Übergang in die stationäre Phase ist in den *agr*-Mutanten gestört. Im Stamm *S. aureus* PC 6911 konnte ebenfalls ein erhöhtes Wachstum in einer *agr*-Deletionsmutante gezeigt werden (Lindsey and Foster, 1999). Die Arbeitsgruppe Wright zeigte, dass in einem Abszessmodell eine frühe *agr*-Aktivität für ein anhaltendes Überleben der Bakterien hinderlich ist (Wright III *et al.*, 2005a). Dieses Ergebnis korreliert mit dem Nachweis, dass der Stamm 1057 geringe Werte für die Zelldichte nach 24 Stunden erlangt, da hier eine frühe *agr*-Aktivität nachgewiesen wurde (Abbildung 4).

Das Ergebnis der Wachstumsversuche ist essentiell für weitere Beobachtungen bezüglich der Regulation durch *agr*. Dadurch ist gewährleistet, dass bei phänotypischen Unterschieden in Kulturen, die innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase untersucht werden, eine Unabhängigkeit von der Zellzahl besteht. Bei Kulturen aus der stationären Phase muss jedoch berücksichtigt werden, dass ein Unterschied aufgrund einer erhöhten Zellzahl der *agr*-Mutanten zustande kommen könnte.

5.2 *agr* und Biofilmbildung

Das *Quorum sensing*-System spielt in mehreren Phasen der Biofilmentstehung in grampositiven und gramnegativen Bakterien eine große Rolle (Yarwood and Schlievert, 2003). In dieser Arbeit wurden alle Stämme hinsichtlich ihres Verhaltens Biofilm zu bilden untersucht. Die Wildtypstämme 1457 und 8400 bildeten in der semiquantitativen Bestimmung einen stärkeren Biofilm aus als der Stamm 1057 (Abbildung 13). Bei Inaktivierung des σ^B -Operons kam es zu einem massiven Rückgang der Biofilmproduktion in allen Stämmen. Ist der σ^B -Aktivator RsbU inaktiv, konnte ein den *sigB*-Mutanten entsprechendes phänotypisches Bild mit einem Rückgang der Biofilmproduktion im Vergleich zu den Wildtypen beobachtet werden (Abbildung 13). Dies ist dadurch zu erklären, dass RsbU über σ^B die PIA-Synthese aktiviert (Knobloch *et al.*, 2001). Die Biofilmproduktion in den *rsbUVW*-Mutanten war auf dem Niveau der korrespondierenden Wildtypen. Eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant stärkere Biofilmbildung zeigten die Stämme 1057*agr* und 1457*rsbUagr*, eine tendenziell gesteigerte Biofilmbildung zeigten die Stämme 8400*rsbUagr*, 8400*rsbUVWagr*, 8400*sigBagr* und 1057*sigBagr* (Tabelle 4.3). Generell konnte gezeigt werden, dass bei Inaktivität des globalen Regulators *agr* eine Biofilmbildung möglich ist, die sogar in einigen Stämmen stärker als die der Wildtypen war (Abbildung 13). Die Stärke der Biofilmveränderung durch die *agr*-Deletion variierte innerhalb der *sigB*-Einzelmutanten. Die Veränderung der Biofilmbildung im Stamm 1057*agr* war statistisch signifikant. Dass hier ein Unterschied besonders deutlich gemacht werden konnte, hängt vermutlich mit der Eigenschaft des Wildtyps zusammen, von Natur aus ein eher schwach positiver Biofilmbildner zu sein. *agr* ist für die Ablösung aus dem Zellverband des Biofilms verantwortlich und damit für eine weitere Ausbreitung der Infektion essentiell. Für den Stamm 1057 konnte anhand der Messung der δ -Toxinproduktion die stärkste *agr*-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 4). Eine *agr*-Deletionsmutante dieses Stammes zeigt dementsprechend auch eine größere Veränderung, da der Wildtypstamm 1057 vermutlich für eine stärkere *agr*-abhängige Ablösung der Zellen vom Zellverband verantwortlich ist. Interessanterweise war in den Stämmen 1457*rsbUagr* und 8400*rsbUagr* eine statistisch gesteigerte beziehungsweise tendenziell gesteigerte Biofilmbildung zu erkennen. Eventuell kann ein Effekt von *agr*

hier deutlich gemacht, da die Adhäsion in den *rsbU*-Einzelmutanten geringer ausgeprägt ist. Die gesteigerte Biofilmbildung der *agr*-Mutanten zeigen, dass *agr*-abhängige Mechanismen existieren, die eine verstärkte Biofilmbildung zulassen. Da *agr* nach erfolgreicher PIA-vermittelter Akkumulation für die Abtrennung der Zellen aus dem Zellverband verantwortlich ist, kommt es in den *agr*-Mutanten zu einer stärkeren Produktion von Biofilm. Damit stimmt eine Veröffentlichung von Vuong 2000 überein, in der die *agr*-Mutante CV2 bereits einen dickeren Biofilm als der Wildtyp produzierte (Vuong *et al.*, 2000). Dies wurde durch die fehlende Produktion von *Phenol soluble modulines* (PSM) erklärt. Die *agr*-abhängige Produktion dieser amphipatisch wirkenden Peptide begünstigt das Ablösen der Zellen aus dem Biofilm. *S. aureus* und *S. epidermidis* besitzen eine Gruppe der PSM, die das RNAIII-kodierte δ -Toxin *hld* enthält, welches in den *agr*-Mutanten nachweislich nicht mehr produziert wird. Eine weitere Erklärung für die verstärkte Biofilmproduktion in den *agr*-Mutanten könnte darin liegen, dass das durch das *agr*-System regulierte Oberflächenprotein Autolysin AtIE, welches die Anlagerung an abiotisches Material steigert, in den Mutanten hochreguliert ist (Vuong *et al.*, 2000; Vuong *et al.*, 2003). Die für die Akkumulationsphase essentielle Produktion von PIA wird nicht durch *agr* reguliert (Vuong *et al.*, 2000).

Da die Transkription von *icaR*, welches einen negativen Einfluss auf *icaADBC* ausübt, negativ durch σ^B und Ethanol reguliert wird (Knobloch *et al.*, 2001; Mack *et al.*, 2006b), wurde in dieser Arbeit geprüft, ob eine Induktion der Biofilmbildung durch Ethanol in den *agr*-Deletionsmutanten ebenfalls auftritt. Erwartungsgemäß zeigten die *agr*-Deletionsmutanten einen den *sigB*- und *rsbU*-Einfachmutanten vergleichbaren Phänotyp, nachdem das Medium mit Ethanol supplementiert wurde. Es konnte eine signifikante Verstärkung der Biofilmexpression in den Stämmen 1457*sigB*, 8400*sigB* und 8400*sigBagr* gezeigt werden. Eine Tendenz zur stärkeren Biofilmbildung konnte in den Stämmen 1457*rsbUagr* und 1457*sigBagr* gezeigt werden. Dies lässt darauf schließen, dass *agr* in der ethanolabhängigen Regulation von *icaADBC* keine Rolle spielt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *agr* verantwortlich für die Ablösung der Zellen im Biofilm ist und dadurch eine verstärkte Biofilmbildung in den *agr*-Mutanten beobachtet werden konnte. Innerhalb der unterschiedlichen genetischen Hintergründe

gibt es entsprechend der *agr*-Aktivität Unterschiede in der Ausprägung der gesteigerten Biofilmbildung. Ein möglicher Therapieansatz im Bereich des *agr*-Operons sollte das Phänomen der gesteigerten Biofilmbildung berücksichtigen, da bei Funktionsverlust ein dickerer Biofilm resultiert, der die Wirksamkeit von Antibiotika weiter herabsetzt.

5.3 Einfluss von *agr* auf extrazelluläre Proteasen

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der alternative σ^B -Faktor verantwortlich für eine Hochregulation der Proteasen in *S. epidermidis* ist. Die Arbeitsgruppe Vuong hat bereits 1999 den Einfluss des *agr*-Systems in *S. epidermidis* auf die Synthese von Proteasen untersucht. Mittels Gelelektrophorese und SDS-PAGE wurde in der Arbeit von Vuong eine niedrigere Ausbeute an Exoproteinen und eine Erhöhung der Oberflächen-assoziierten Proteine in der *agr*-Mutante festgestellt. Eine Verringerung der Proteaseaktivität der *agr*-Mutanten konnte durch einen Agarassay gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde sich ebenfalls eingehend mit dem Einfluss von *agr* und dem globalen Stressregulator σ^B auf Exoproteine beschäftigt, da sie neben der Biofilmbildung eine wichtige Rolle für die Virulenz von *S. epidermidis* spielen (Bergés *et al.*, 1991; Christensen, 1993). Es sollte geklärt werden, welchen Anteil *agr* in der Regulation der Proteaseaktivität übernimmt. Es wurde hierfür ein Agarassay zur Detektion von Proteasen durchgeführt. Bei den untersuchten Wildtypen zeigte lediglich der Stamm 8400 eine denaturierende Proteolysezone auf dem Proteaseagar und damit eine Proteaseaktivität (Abbildung 15). Die Wildtypstämme 1457 und 1057 zeigten keine Veränderung des Agars. Der Stamm 8400*sigB* zeigte eine äußere denaturierende und eine innere hydrolysierende Proteolysezone. In dem Stamm 1457*sigB* war ebenfalls eine hydrolysierende Proteolysezone zu erkennen. Der Stamm 1057*sigB* zeigte eine denaturierende Proteolysezone auf dem Proteaseagar (Abbildung 15). Wird nur der Aktivator von σ^B *rsbU* inaktiviert, so zeigte sich in allen untersuchten Stämmen eine denaturierende Proteolysezone nach Kultivierung der Bakterien. Die Proteolysezone war phänotypisch der der entsprechenden *sigB*-Mutante vergleichbar (Abbildung 17A,B,C). Die *rsbUVW*-Mutanten der Stämme 1457, 1057 und 8400 zeigten keine Aktivität auf dem Proteaseassay (Abbildung 17A,B,C). In keiner der *agr*-Mutanten konnte eine Enzymaktivität auf dem Proteaseagar nachgewiesen werden (Abbildung 17). Die Ausprägung der Proteaseaktivität war in den untersuchten

Stämmen unterschiedlich, wobei die stärkste Aktivität im Stamm 8400 nachgewiesen werden konnte. Die Regulation der Proteasen durch σ^B und *agr* konnte jedoch in jedem der Stämme in gleicher Weise dargestellt werden. Der Stressregulator σ^B hemmt die Proteaseaktivität, da bei Inaktivierung des positiven Regulators von σ^B *rsbU* und in den σ^B -Mutanten selbst im Gegensatz zum Wildtyp eine Proteaseaktivität zu erkennen war. Diese Proteaseaktivität ist *agr*-abhängig, da nachweislich bei *agr*-Deletion in den *rsbU* und *sigB*-Mutanten die Proteaseaktivität auf Wildtypniveau herunterreguliert wird. Die Beobachtungen des Proteaseassays zeigen, dass σ^B einen negativen Einfluss auf die Proteasen ausübt. Die Inaktivität von *agr* löst diese Regulation wieder auf. Daraus lässt sich ableiten, dass *agr* als zwischengeschaltetes Element im Rahmen der Proteaseregulation fungiert.

Arvidson gelang es drei Proteasen in *S. aureus* zu isolieren und die Proteasemuster der einzelnen Proteasen auf Caseinagar zu beschreiben (Arvidson, 1973b; Arvidson, 1973c). Durch die sehr hohe Homologie zu den Proteasen in *S. epidermidis* ist es möglich, die Präzipitationszonen im Caseinagar den in *S. epidermidis* existierenden Proteasen zuzuordnen. Wir vermuten, dass es sich in dieser Arbeit bei der Protease, die am stärksten hydrolysierend wirkt, um die Metalloprotease handelt (am stärksten exprimiert in den Stämmen 8400*rsbU*, 8400*sigB*), und dass es sich im Stamm 8400 bei der klaren weißen Präzipitation ohne Lysezone um die Aktivität einer Serinprotease handelt. Die Ausprägung von Cysteinproteasen auf Agar wurde mit einer sehr schwachen Präzipitation und einer Lysezone charakterisiert (Arvidson, 1973a), in dieser Arbeit am stärksten in dem Stamm 1457*sigB* exprimiert. Um eine eindeutige Zuordnung der entsprechenden Proteasen zu gewährleisten, müssten die Proteasen mithilfe weiterer Verfahren näher charakterisiert werden.

Kies *et al.* konnten zeigen, dass die σ^B -Mutante des Stammes *S. epidermidis* Tü3298 eine geringere Aktivität an Lipasen und eine höhere Ausbeute an einer 25 kDa großen extrazellulären Protease zeigt (Tabelle 5.1), die von der Größe einer Serinprotease entspricht (Kies *et al.*, 2001). An dieser Arbeit ist jedoch zu kritisieren, dass nur ein genetischer Hintergrund untersucht wurde und somit eine mögliche Varianz in der Expression der Proteasen und Lipasen nicht ausgeschlossen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb drei voneinander unabhängige genetische

Hintergründe untersucht. Darüber hinaus wurde später bei dem in der Arbeitsgruppe Kies *et al.* verwendeten Stamm Tü3298 eine Mutation im Gen *rsbU* nachgewiesen, welches notwendig für eine funktionsfähige Regulationskaskade für σ^B ist. Somit ist eine eindeutige Aussage über die Funktion von σ^B in der Regulation der extrazellulären Proteasen in dieser Studie nicht sicher möglich. Eine andere Arbeit zeigt, dass bei *S. aureus* in drei unterschiedlichen Stämmen eine erhöhte Aktivität an Proteasen in drei klinischen Isolaten mit Defekten in der σ^B -Regulationskaskade nachgewiesen wurde (Tabelle 5.1) (Karlsson-Kanth *et al.*, 2006). Shaw untersuchte in *S. aureus* die drei auch in *S. epidermidis* existierenden Proteasen SspA, eine Serinprotease; SspB, eine Cysteinprotease und Aur, eine Metalloprotease. Alle drei wurden positiv durch *agr* reguliert, was auch die Mutanten in dieser Arbeit zeigten. Des Weiteren wurde eine Reprimierung durch *sarA* festgestellt (Shaw *et al.*, 2004). Das σ^B -Operon unterdrückte die Transkription der Metalloprotease und der Codierungsregion der Cysteinprotease, was auch eine in der vorliegenden Arbeit gezeigte Hochregulation der oben genannten Proteasen in der σ^B -Mutante erklären könnte. Die bisherigen Veröffentlichungen zum Thema Einfluss der *sigB*-Mutante auf Proteasen wurden größtenteils in *S. aureus* durchgeführt, in dieser Arbeit ist es uns gelungen, die Regulation in *S. epidermidis* in drei unabhängigen Isolaten zu zeigen.

Tabelle 5.1 Einfluss der *sigB*-Mutante auf Proteasen und Lipasen in verschiedenen Veröffentlichungen.

	Karlsson-Kanth <i>et al.</i>, 2006 <i>S. aureus</i> 1)KS26 2)Wood46 3)V8	Kullik <i>et al.</i>, 1998 <i>S. aureus</i> 1)8325 2)COL 3)Newman	Kies <i>et al.</i>, 2001 <i>S. epidermidis</i> Tü3298	Diese Arbeit <i>S. epidermidis</i> 1)1457 2)1057 3)8400
Proteasen	1) ↑ 2) ↑ 3) ↑	/	↑	1) ↑ 2) ↑ 3) ↑
Lipasen	/	1) ↑ 2) ↑ 3) ↑	↓	A) 1) ↓ 2) ↓ 3) ↑ B) 1) ↑ 2) n 3) ↑
Testverfahren	Komplementierungsversuche	Agarassay/Hydrolyse von p-Nitrophenyl-Caprylat	Zymographie	A) Tributyrinabbau B) Lipaseagar

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des globalen Stressregulators σ^B und des *agr*-Systems auf die extrazellulären Proteasen untersucht. Die Agarassays zeigten eine deutliche Aktivitätssteigerung der Proteasen in den σ^B -Mutanten und eine Reprimierung der Proteasen unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze in den *agr*-Mutanten. Da alternative Sigmafaktoren direkt nur eine positive Regulation ausüben können, setzt die negative Regulation der Proteasen einen zwischen geschalteten Regulator voraus. Zu den am genauesten charakterisierten Regulatoren in *S. aureus* gehören bisher *agr* und *sarA* (Cheung *et al.*, 1992; Morfeldt *et al.*, 1988; Peng *et al.*, 1988; Recsei *et al.*, 1986). Bei *S. aureus* zeigte sich eine negative Regulation von extrazellulären Proteasen durch *sarA* und eine positive Regulation durch *agr* (Arvidson and Tegmark, 2001; Chan and Foster, 1998; Said-Salim *et al.*, 2003; Vojtov *et al.*, 2002). Bischoff *et al.* konnten zeigen, dass in drei unterschiedlichen *S. aureus*-Stämmen mit funktionsfähiger σ^B -Regulationskaskade die *agr*-Expression durch σ^B negativ beeinflusst wird und dass dieser Mechanismus unabhängig von *sar* ist (Bischoff *et al.*, 2001). SarA ist ein DNA-bindender Faktor, der Gene direkt oder über untergeordnete Transkriptionsfaktoren ansteuern kann. SarA ist in der Lage das *ssp*-Operon von *S. aureus*, aber auch andere Proteasen wie Aur und ScpB direkt ohne Modulation von *agr* und dessen Transkriptionsprodukt RNAIII zu steuern (Novick *et al.*, 1995). Darüber hinaus konnte eine positive Regulation auf die Transkription von RNAIII durch die Bindung von SarA an das *agr*-Operon gezeigt werden (Bischoff *et al.*, 2001; Cheung *et al.*, 1997; Morfeldt *et al.*, 1996). Da man aus Untersuchungen in *S. aureus* weiß, dass SarA eine wichtige Funktion innerhalb der Regulation verschiedener Virulenzfaktoren hat, sollte auch in *S. epidermidis* der Einfluss von SarA auf *agr* untersucht werden. Zudem wurden in *S. aureus* noch eine Reihe weiterer Faktoren untersucht, die unterschiedliche Gene in der Regulation von Virulenzfaktoren beeinflussen. Daher ist zu vermuten, dass die Regulation der Virulenzfaktoren ein komplexes Netzwerk ist, welches noch weiter zu untersuchen ist, um es genauer zu verstehen.

5.4 Einfluss von *agr* auf extrazelluläre Lipasen

In *Staphylococcus aureus* werden viele Virulenzfaktoren durch das *agr*-System reguliert und neben Proteasen spielen wahrscheinlich auch Lipasen eine wichtige Rolle innerhalb Staphylokokken-assoziiierter Infektionen.

Zur Detektion der Lipaseaktivität der etablierten *agr*-Mutanten wurde zum einen ein Lipaseagarassay untersucht und zum anderen der Abbau einer kurzkettigen Fettsäure, dem Tributyrin, gemessen. Vergleicht man die untersuchten Wildtypstämme, so zeigte nur der Stamm 8400 eine schmale Lysezone in dem Lipaseassay (Abbildung 18). Im Tributyrinabbau konnte in jedem Wildtypstamm eine Lipaseaktivität detektiert werden. Übereinstimmend mit dem Agarassay konnte man im Stamm 8400 die größte Aktivität nachweisen (Abbildung 20). In dem Stamm 8400*sigB* konnte eine stärkere Lipaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp in beiden untersuchten Testverfahren beobachtet werden. Wird nur die *rsbU*-Komponente des Stammes 8400 inaktiviert, konnte ebenfalls eine im Vergleich zum Wildtyp leicht ausgedehntere Lysezone im Agarassay beobachtet werden. Der Stamm 8400*rsbUVW* zeigte hier keine Lipaseaktivität. Bei Inaktivität von *sigB* und *rsbU* konnte im Stamm 1457 eine Lysezone beobachtet werden. Die lipolytische Aktivität im Stamm 1457*sigB* ist im Agarassay höher verglichen mit dem Wildtyp. Im Tributyrinabbauversuch hingegen zeigte der Wildtypstamm eine höhere Aktivität als die *sigB*-Mutante. Unterschiede in den beiden Tests sind dadurch zu erklären, dass der Agarplattentest nicht lipasespezifisch ist und auch Esteraseaktivitäten zu einem positiven Testergebnis führen können (Brockerhoff and Jensen, 1974; Farrell *et al.*, 1990). Der Tributyrinabbau hingegen hat sich nach Smeltzer *et al.* als lipasespezifisch herausgestellt (Smeltzer *et al.*, 1992). Der Stamm 1457*rsbUVW* zeigte im Agarassay keine nachweisbare Lipaseaktivität. Der Wildtyp 1057 und die korrespondierenden *sigB*-Einzelmutanten zeigten in dem Lipaseagar keine Lysezone (Abbildung 18). Im Tributyrinabbau zeigte der Wildtypstamm 1057 einen schnelleren Abbau an Tributyrin als die korrespondierende *sigB*-Mutante. Betrachtet man die Ergebnisse des Agarassays, so könnte in den Stämmen 8400 und 1457 eine negative Regulation der Lipasen im Kulturüberstand durch σ^B vermutet werden. Der Stamm 1057 zeigte ein geringes lipolytisches Aktivitätsniveau im Agarassay, welches nicht zu detektieren war. Da der alternative Sigmafaktor direkt nur eine positive Regulation ausüben kann, muss auch in der Regulationskaskade der Lipasen ein weiteres Element zwischengeschaltet sein. Im Tributyrinabbau kann die Vermutung der negativen Regulation durch σ^B jedoch nur im Stamm 8400 nachvollzogen werden. Die Regulation der Lipasen durch σ^B scheint in unterschiedlichen genetischen Hintergründen unterschiedlich ausgeprägt zu sein. In dem

lipasespezifischen Test, dem Tributyrinabbau, zeigten die *sigB*-Mutanten der Stämme 1457 und 1057 niedrigere Expressionsniveaus als die korrespondierenden Wildtypen. Dies könnte dadurch erklärt sein, dass in den Stämmen 1457*sigB* und 1057*sigB*, in denen im Proteaseassay eine größere Proteaseaktivität als in den Wildtypen gezeigt werden konnte, ein durch Proteasen geförderter Lipaseabbau stattfindet und deshalb im Tributyrinabbau niedrigere Aktivitätsniveaus bei den *sigB*-Mutanten gemessen wurden.

Die *agr*-Mutanten aller untersuchten Wildtypstämme zeigten keine Lysezone auf dem Lipaseagar. In den Wildtypstämmen, in denen eine Lipaseaktivität nachgewiesen wurde, wird nach *agr*-Deletion diese Aktivität wieder auf Wildtypniveau herunterreguliert, in dem Stamm 8400*agr* sogar unterhalb des Wildtypniveaus. Im Lipaseassay konnte gezeigt werden, dass neben Proteasen auch Lipasen negativ durch σ^B reguliert werden und dass *agr* diesen Effekt wieder umkehren kann. Jedoch muss man auch hier berücksichtigen, dass neben Lipaseaktivitäten auch Esteraseaktivitäten im Agarassay detektiert werden. Vergleicht man die Abbaugeschwindigkeiten des Tributyrins der Wildtypen mit denen der korrespondierenden *agr*-Mutanten, zeigt sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 20). Ein etwas schnellerer Abbau an Tributyrin ist bei den Stämmen 1457*agr* und 8400*agr* im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen zu erkennen. Ein etwas langsamerer Abbau des Tributyrins zeigte die *agr*-Mutante des Stammes 1057 im Vergleich zum Wildtyp (Tabelle 4.4). Der Widerspruch der Ergebnisse auf dem Lipaseagar und im Tributyrinabbau lässt sich mithilfe der Wachstumsversuche erklären. Die Stämme 1457*agr* und 8400*agr* erreichten in der stationären Phase eine höhere Zelldichte als die Wildtypen. Somit ist eine stärkere lipolytische Aktivität nicht in Unabhängigkeit zur Zellzahl bewiesen. Übereinstimmend damit zeigte der Stamm 1057*agr*, der als einziger eine niedrigere Zelldichte als der korrespondierende Wildtyp erreichte, eine geringere lipolytische Aktivität im Tributyrinabbau.

Die Ergebnisse des Tributyrinabbaus stimmen nur teilweise mit den aus dem Lipaseassay resultierenden Ergebnissen überein. Ein Erklärungsansatz für die Heterogenität der Lipaseaktivität der *agr*-Mutanten untereinander wäre, neben einer Variabilität der Regulation innerhalb unterschiedlicher genetischer Hintergründe, die Detektion verschiedener Lipasen. Zudem wird in dem Lipaseagar auch die Aktivität von Esterasen bestimmt.

Interessanterweise zeigte im Tributyrinabbau der Stamm 8400*sigB* im Gegensatz zu den Stämmen 1457*sigB* und 1057*sigB* eine erhöhte lipolytische Aktivität. Dies könnte auf die übermäßige Produktion der Metalloprotease zurückzuführen sein, die nach Vuong *et al.* für die Prozessierung der Lipasen in die reife Form zuständig ist (Vuong *et al.*, 1999). In *S. aureus* wurden Prozessierungsstudien der Lipasen mit Proteaseinhibitoren durchgeführt (Rollof and Normark, 1992). Die Zugabe von Phosphoramidon, ein Metalloproteaseinhibitor, führte zu einer fehlenden Prozessierung der Proform. Die Zugabe eines Cysteinproteaseinhibitors in die wachsende Kultur inhibierte ebenfalls die Prozessierung der Proform. Bei Zugabe eines Serinproteaseinhibitors konnte keine Akkumulation der unprozessierten Lipase beobachtet werden. Neuere Studien haben gezeigt, dass bei *S. aureus* die Proteasen durch gegenseitige Aktivierung prozessiert werden (Shaw *et al.*, 2004). Eine Deaktivierung der Metalloprotease führt zu einer nachfolgenden Deaktivierung der Serin- und Cysteinprotease. Die Prozessierung der Lipase wird unter der Berücksichtigung neuer Erkenntnisse über *S. aureus* hauptsächlich über die Cysteinprotease durchgeführt. Aktivitätsmessungen unserer Arbeitsgruppe zeigten eine stark reduzierte Aktivität der Cysteinprotease und eine unklare Aktivität der Serinprotease im Stamm 8400 (Kneschke, unpubliziert). Das Lipolysemuster zeigte einen Aktivitätsanstieg in dem Stamm 8400*sigB*. Dies zeigt, dass in *S. epidermidis* die Cysteinprotease für die Degradation der reifen Lipase zuständig sein könnte, so dass in dem Stamm mit niedriger Cysteinproteaseaktivität eine hohe Lipaseaktivität gemessen werden kann. Der Anstieg der Lipaseaktivität im Stamm 8400*agr* könnte ebenfalls durch eine geringere Cysteinproteaseaktivität und damit einer verminderte Degradation der reifen Lipase erklärt sein. Die niedrigere lipolytische Aktivität des Stammes 1057*sigB* ist auch damit zu erklären, dass die Proteasen in dieser Mutante hochreguliert werden und eine vollständige Degradierung der aktiven Form der Lipase stattfindet. Die Ergebnisse des Stammes 1457*sigB* belegen die Daten zusätzlich. Der Stamm 1457*sigB* zeigt bei einer hohen Proteaseaktivität eine niedrige lipolytische Aktivität als der Wildtyp. In *S. aureus* wird eine der beiden existierenden Cysteinproteasen Serinproteasen-abhängig aktiviert (Shaw *et al.*, 2004), welches auch in *S. epidermidis* denkbar wäre. Da in dem Stamm 1057*sigB* die Serinprotease eine höhere Aktivität als im korrespondierendem Wildtyp aufweist (Kneschke, unpubliziert), sinkt die Aktivität der reifen Lipase an, da vermutlich wieder mehr Degradierung der

reifen Lipaseform stattfindet. Die Aktivierung der Cysteinprotease durch die Serinprotease könnte *agr*-abhängig stattfinden, welches eine Erklärung für eine höhere lipolytische Aktivität in den Stämmen 1457*agr* und 8400*agr* sein könnte. σ^B könnte auch innerhalb dieses regulativen Schrittes einen negativen Einfluss auf *agr* ausüben. Dazu würde das Ergebnis passen, dass in den Stämmen 1457*sigB* und 1057*sigB* eine niedrigere lipolytische Aktivität im Vergleich zu den Wildtypen gemessen wurde. Da im Wildtypstamm 8400 eine Serinproteaseaktivität noch ungeklärt ist, kann die Regulation anhand des Stammes 8400*sigB* nicht nachvollzogen werden. Um diese Vermutung der Regulation beweisen zu können, bedarf es zum einen eine Abklärung der Aktivierung der unterschiedlichen Proteasen untereinander innerhalb *S. epidermidis*. Des Weiteren sollten die unterschiedlichen Lipasen eine Berücksichtigung finden. Dadurch dass unterschiedliche Arbeitsgruppen verschiedene Testverfahren zur Überprüfung der Regulation extrazellulärer Lipasen in Staphylokokken benutzt haben, sind die Ergebnisse kaum zu vergleichen und ein standardisiertes Messverfahren wäre wünschenswert, um die Regulation genauer zu verstehen (Rosenstein and Götz, 2000).

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass *agr* in drei unabhängigen klinischen Isolaten im Bezug auf die Proteaseexpression unter einem negativen Einfluss von σ^B steht und das *agr*-System somit eine wichtige Aufgabe in der Regulation der Proteasen übernimmt. In Bezug auf die Regulation der Lipaseaktivität konnte gezeigt werden, dass ein Überschuss an Proteasen eine Degradierung an Lipasen verursacht. Die Rolle von *agr* konnte hier nicht eindeutig geklärt werden. Innerhalb unterschiedlicher genetischer Hintergründe gab es Unterschiede im Bereich der Regulation der Lipaseaktivität. Es kann vermutet werden, dass unterschiedliche genetische Hintergründe unterschiedliche Präferenzen in der Expression von Proteasen haben und dass deshalb keine einheitliche Regulation gezeigt werden konnte. Das Verständnis des hoch komplexen Netzwerkes der Exoproteinregulation in *S. epidermidis* ist noch nicht vollkommen und bedarf weiterer Studien, in denen auch weitere regulatorische Elemente wie beispielsweise SarA einbezogen werden. Über σ^B aktiviert SarA *agr* und beeinflusst in *S. aureus* hierdurch zum Teil die Exoproteinsynthese (Fluckiger *et al.*, 1998). Ob dieser Regulationsmechanismus ebenfalls in *S. epidermidis* eine Rolle spielt, bleibt zu untersuchen. SarA gehört darüber hinaus zu den essentiellen positiven Regulatoren der Biofilmbildung (Tormo *et al.*,

2005). Dies wurde anhand einer Herunterregulation des *icaADBC*-Operons und einer daraus resultierenden geringeren PIA-Ausbeute der *sarA*-Mutante gezeigt. Der Erklärungsansatz hierfür ist auch für diese Arbeit äußerst interessant, da nach Meinung der Arbeitsgruppe Tormo den Abbau der Ica-Proteine und somit den Rückgang der PIA-Synthese ein Überschuss an Exoproteinen verursacht. Da nach den Ergebnissen dieser Arbeit *agr* für eine größere Aktivität an Proteasen verantwortlich ist, könnte das *agr-Quorum sensing*-System eventuell doch ursächlich an einer erhöhten Biofilmbildung beteiligt sein, die unabhängig von AtlE und δ -Toxin ist. Unterstützen würde diese These, dass die Stämme, bei denen eine große Proteaseaktivität detektiert werden konnte (*1457rsbU*, *1057sigB*, *8400rsbU*, *8400sigB*) auch eine statistisch relevante geringere Biofilmausbeute zeigten.

Zu beachten ist, dass diese Versuche *in vitro* unter für Bakterien möglichst optimalen Bedingungen durchgeführt worden sind. Um die Relevanz eines Therapieansatzes im Bereich des *Quorum sensing*-Systems zu erfassen, ist es notwendig, die Rolle der *agr*-Aktivität innerhalb von Infektionen *in vivo* näher zu betrachten. Yarwood untersuchte 2002 beispielsweise die Expression des *agr*-Systems in Kaninchen-Serum *in vitro* und *in vivo* in einem *staphylococcal toxic shock syndrome*-Kaninchenmodell (Yarwood *et al.*, 2002). Die RNA-II und RNA-III-Expression, Maß für die Aktivität des *agr*-Systems war in dem Kaninchenserum *in vitro* signifikant geringer als in dem Serum des Infektionsmodells *in vivo*.

6 Zusammenfassung

Staphylococcus epidermidis gehört zur physiologischen Haut- und Schleimhautflora des Menschen. In den vergangenen Jahren wurde er als einer der häufigsten Erreger nosokomial erworbener Fremdkörper-assoziiertes Infektionen isoliert. *Quorum sensing*-Systeme erwiesen sich als wichtige Regulatoren der Virulenz und Biofilmbildung in vielen Bakterien. In *S. epidermidis* wurde der Einfluss des *agr-Quorum sensing*-Systems noch nicht hinreichend anhand mehrerer unabhängiger Stämme untersucht. Vor Beginn dieser Arbeit konnte bei einzelnen *S. epidermidis*-Stämmen ein positiver Einfluss von *agr* auf die Bildung von Virulenzfaktoren wie extrazelluläre Lipasen und Proteasen beobachtet werden. In dieser Arbeit sollte vor allem dieses Phänomen in drei unterschiedlichen klinischen Isolaten überprüft werden und darüber hinaus der Einfluss des σ^B -Operons auf den zentralen Regulator *agr* innerhalb der Aktivität von Virulenzfaktoren untersucht werden, da Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe Hinweise auf eine Beeinflussung des zentralen Regulators *agr* durch σ^B ergaben (Kneschke, unpubliziert). Für die Beurteilung des Einflusses des *agr-Quorum sensing*-Systems auf die Virulenzfaktoren von *S. epidermidis* und um die Frage zu klären, inwiefern ein Zusammenhang der Regulation zwischen dem alternativen Sigmafaktor σ^B und dem *agr*-System besteht, wurden in dieser Arbeit unter Zuhilfenahme der *agr*-Mutante des Stammes 1457 (CV2) *agr*-Mutanten der *S. epidermidis*-Wildtypen 1057 und 8400 und der entsprechenden Einfachmutanten des σ^B -Operons *rsbU*, *rsbUVW* und *sigB* generiert und mittels Gelelektrophorese und fehlendem δ -Toxinnachweis bewiesen, dass es sich um *agr*-Mutanten handelt. Es konnte gezeigt werden, dass *agr* stammesunabhängig einen negativen Einfluss auf die Biofilmbildung ausübt, da *agr* für die Abtrennung der Zellen aus dem Zellverband des Biofilms verantwortlich ist. Des Weiteren konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass in drei unabhängigen, klinischen *S. epidermidis*-Isolaten *agr* wachstumsunabhängig in Bezug auf die Proteaseaktivität unter einem negativen Einfluss von σ^B steht und *agr* somit als zwischengeschaltetes Element im Rahmen der Proteaseaktivität fungiert. Bezüglich der Lipaseaktivität konnte kein sicherer Regulationsmechanismus eruiert werden, da die Ergebnisse des Agarassays mit dem des Tributyrinabbaus nicht vollständig übereinstimmend waren. Die Ergebnisse des Agarassays von zwei der

untersuchten Stämme deuteten jedoch auf eine vergleichbare Art der Regulation wie im Rahmen der Proteaseaktivität hin. Die heterogene Ausprägung in Bezug auf die Lipaseaktivität der unterschiedlichen *agr*-Mutanten lässt vermuten, dass stammpezifische Faktoren existieren, die die σ^B -abhängige Regulation verändern können. Für eine weiterführende Klärung der Regulation der Lipasen in *S. epidermidis* sollte ein standardisiertes Verfahren gewählt werden, in dem die unterschiedlichen Lipasen eine Berücksichtigung finden. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten erlauben es, das bestehende Modell der Aktivierung wichtiger Virulenzfaktoren wie Proteasen und Lipasen in wichtigen Punkten zu erweitern. Es bedarf jedoch zur Vervollständigung des komplexen Netzwerkes weiterer Untersuchungen unter Einbeziehung weiterer globaler Regulatoren, um das Verständnis der Aktivierung von extrazellulären Virulenzfaktoren in *S. epidermidis* zu präzisieren.

7 Literaturverzeichnis

Abdelnour,A., Arvidson,S., Bremell,T., Ryden,C., and Tarkowski,A. (1993) The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun* **61**: 3879-3885.

Alper,S., Dufour,A., Garsin,D.A., Duncan,L., and Losick,R. (1996) Role of adenosine nucleotides in the regulation of a stress-response transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **260**: 165-177.

Arciola,C.R., Baldassarri,L., and Montanaro,L. (2001) Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* **39**: 2151-2156.

Arremark,G.I., and Telander,B. (1978) *Staphylococcus saprophyticus*: a frequent cause of acute urinary tract infection among female outpatients. *J Infect Dis* **138**: 791-797.

Arvidson,S. (1973a) Hydrolysis of casein by three extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*, strain V8. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* **81**: 538-544.

Arvidson,S. (1973b) Hydrolysis of casein by three extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*, strain V8. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* **81**: 538-544.

Arvidson,S. (1973c) Studies on extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. II. Isolation and characterization of an EDTA-sensitive protease. *Biochim Biophys Acta* **302**: 149-157.

Arvidson,S., and Tegmark,K. (2001) Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **291**: 159-170.

Baddour,L.M., Barker,L.P., Christensen,G.D., Parisi,J.T., and Simpson,W.A. (1990) Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* in infection of transvenous endocardial pacemaker electrodes. *J Clin Microbiol* **28**: 676-679.

Baddour,L.M., Smalley,D.L., Hill,M.M., and Christensen,G.D. (1988) Proposed virulence factors among coagulase-negative *staphylococci* isolated from two healthy populations. *Can J Microbiol* **34**: 901-905.

Bandow,J.E., Brotz,H., and Hecker,M. (2002) *Bacillus subtilis* tolerance of moderate concentrations of rifampin involves the sigma(B)-dependent general and multiple stress response. *J Bacteriol* **184**: 459-467.

Banerjee,S.N., Emori,T.G., Culver,D.H., Gaynes,R.P., Jarvis,W.R., Horan,T. *et al.* (1991) Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United

States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med* **91**: 89.

Bartsch,K. Adhäsion von *S. epidermidis* an Oberflächen. Charakterisierung einer Biofilm-negativen Mutante. 2001.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Bassler (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **2**: 587.

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

Bayston,R., and Penny,S.R. (1989) Excessive production of mucoid substance in *Staphylococcus SIIA*: a possible factor in colonisation of Holter shunts. *Dev Med Child Neurol* **14**: 25-28.

Benson,A.K., and Haldenwang,W.G. (1992) Characterization of a regulatory network that controls sigma B expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**: 749-757.

Benson,A.K., and Haldenwang,W.G. (1993) *Bacillus subtilis* sigma B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2330-2334.

Bergés,A., Gutiérrez-Cebollada,J., Garcés,J.M., and Pallás,O. (1991) Sepsis caused by *Staphylococcus epidermidis* with meningeal, articular and skin involvement in a female patient addicted to parenteral drugs. *Enferm Infec Microbiol Clin* **9**: 383-384.

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

Bjoorklind,A., and Jornvall,H. (1974) Substrate specificity of three different extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. *Biochim Biophys Acta* **370**: 524-529.

Bowden,M.G., Visai,L., Longshaw,M., Holland,K.T., .Speziale,P., and Hook,M. (2002) Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen-binding adhesin? *J Biol Chem*.

Brockerhoff,H., and Jensen,R. (1974) Lipolytic Enzymes. *Academic Press, NY*.

Brody,M.S., Vijay,K., and Price,C.W. (2001) Catalytic function of an alpha/beta hydrolase is required for energy stress activation of the sigma(B) transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 6422-6428.

- Bykowska,K., Ludwicka,A., Wegrzynowicz,Z., Lopaciuk,S., and Kopec,M. (1985) Anticoagulant properties of extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Thromb Haemost* **54**: 853-856.
- Carmona,C., and Gray,G.L. (1987) Nucleotide sequence of the serine protease gene of *Staphylococcus aureus*, strain V8. *Nucleic Acids Res* **15**.
- Chan,P.F., and Foster,S.J. (1998) Role of SarA in virulence determinant production and environmental signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **180**: 6232-6241.
- Cheung,A.L., Bayer,M.G., and Heinrichs,J.H. (1997) sar Genetic determinants necessary for transcription of RNAII and RNAIII in the agr locus of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **179**: 3936-3971.
- Cheung,A.L., Koomey,J.M., Butler,C.A., Projan,S.J., and Fischetti,V.A. (1992) Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6462-6466.
- Christensen,G.D., Baldassari,L., and Simpson,W.A. (1994) Colonisation of medical devices by coagulase-negative staphylococci Washington D.C.: pp. 45-78.
- Christensen,G.D. (1993) The 'sticky' problem of *Staphylococcus epidermidis* sepsis. *Hosp Pract (Off Ed)* **28**: 36.
- Chugh,T.D., Burns,G.J., Shuhaiber,H.J., and Bahr,G.M. (1990) Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to fibrin-platelet clots in vitro mediated by lipoteichoic acid. *Infect Immun* **58**: 315-319.
- Conlon,K.M., Humphreys,H., and O'Gara,J.P. (2002a) Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* **216**: 171-177.
- Conlon,K.M., Humphreys,H., and O'Gara,J.P. (2002b) IcaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **184**: 4400-4408.
- Conlon,K.M., Humphreys,H., and O'Gara,J.P. (2004) Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology* **186**: 6208-6219.
- Costerton,J.W., Stewart, P.S., and Greenberg,E.P. (1999) Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Costerton,J.W., Veeh,R., Shirtliff,M., Pasmore,M., Post,C., and Ehrlich,G. (2003) The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* **112**: 1466-1477.

- Cramton,S.E., Ulrich,M., Gotz,F., and Doring,G. (2001) Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **69**: 4079-4085.
- Cucarella,C., Solano,C., Valle,J., Amorena,B., Lasa,I., and Penades,J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**: 2888-2896.
- Davies,D.G., Parsek,M.R., Pearson,J.P., Iglewski,B.H., Costerton,J.W., and Greenberg,E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-298.
- Devriese,L.A., Vancanneyt,M., Bäle,M., Vaneechoutte,M., De,G.E., Snauwaert,C. *et al.* (2005) *Staphylococcus pseudointermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 1569-1573.
- Dobinsky,S., Kiel,K., Rohde,H., Bartsch,K., Knobloch,J.K., Horstkotte,M.A., and Mack,D. (2003) Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for an additional factor for polysaccharide intercellular adhesion synthesis. *J Bacteriol* **185**: 2886.
- Donlan,R.M., and Costerton,J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167-193.
- Drapeau,G.R. (1978) Role of metalloprotease in activation of the precursor of staphylococcal protease. *J Bacteriol* **136**: 607-613.
- Dubin,G., Chmiel,D., Mak,P., Rakwalska,M., Rzychon,M., and Dubin,A. (2001) Molecular cloning and biochemical characterisation of proteases from *Staphylococcus epidermidis*. *Biol Chem* **382**: 1575-1582.
- Dubin,G. (2002) Extracellular proteases of *Staphylococcus* spp. *Biol Chem* **383**: 1075-1086.
- Dubin,G. (2003) Defense against own arms: staphylococcal cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol* **50**: 715-724.
- Dufour,A., and Haldenwang,W.G. (1994) Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J Bacteriol* **176**: 1813-1820.
- Espersen,F., Wilkinson,B.J., Gahrn-Hansen,B., Thamdrup Rosdahl,V., Clemmensen, and I. (1990) Attachment of *staphylococci* to silicone catheters in vitro. *Apmis* **98**: 471-478.
- Eymann,C., and Hecker,M. (2001) Induction of sigmaB-dependent general stress genes by amino acid starvation in a spo0H mutant of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **199**: 221-227.

Farrell,A.M., Foster,T.J., and Holland,K.T. (1993) Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. *J Gen Microbiol* **139**: 267-277.

Farrell,A.M., Holland,K.T., and Foster,T. (1990) Cloning and expression of the lipase gene of *Staphylococcus epidermidis* in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. R.P.Novick (ed). VCH Publishers, pp. 451-454.

Fitzpatrick,F., Humphreys,H., Smyth,E., Kennedy,C.A., and O'Gara,J.P. (2002) Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect* **52**: 212-218.

Fluckiger,U., Wolz,C., and Cheung,A.L. (1998) Characterization of a *sar* homolog of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **66**: 2871-2878.

Galdbart,J.O., Allignet,J., Tung,H.S., Ryden,C., and El Solh,N. (2000) Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J Infect Dis* **182**: 351-355.

Garrity,G. (2005) Bergey's Manual of systematic bacteriology.

Gerke,C., Kraft,A., Sussmuth,R., Schweitzer,O., and Gotz,F. (1998) Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* **273**: 18586-18593.

Giachino,P., Engelmann,S., and Bischoff,M. (2001) SigmaB activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**: 1843-1852.

Gillaspy,A.F., Hickmon,S.G., Skinner,R.A., Thomas,J.R., Nelson,C.L., and Smeltzer,M.S. (1995) Role regulator of the accessory gene (*agr*) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Infect Immun* **63**: 3373-3380.

Goguen,J.D., Hoe,N.P., and Subrahmanyam,Y.V. (1995) Proteases and bacterial virulence: a view from the trenches. *Infect Agents Dis* **4**: 47-54.

Gottesman,S. (1984) Bacterial regulation: global regulatory networks. *Annu Rev Genet* **18**: 415-441.

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

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

Götz,F., Verheij,H.M., and Rosenstein,R. (1998) Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. *Biochemical properties*.

- Haldenwang, W.G., and Losick, R. (1979) A modified RNA polymerase transcribes a cloned gene under sporulation control in *Bacillus subtilis*. *Nature* **282**: 256-260.
- Haldenwang, W.G., and Losick, R. (1980) Novel RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 7000-7004.
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., and Gotz, F. (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* **20**: 1083-1091.
- Hermann, M., Vaudaux, P.E., Pittet, D., Auckenthaler, R., Lew, P.D., Schmacher-Perdreau, F. *et al.* (1988) Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* **158**: 701.
- Hof, H., and Dörries, R.L. (2000) Spezielle Bakteriologie. In Duale Reihe, Mikrobiologie. Hof, H., and Dörries, R.L. (eds). Thieme, p. 275.
- Hogt, A.H., Dankert, J., Hulstaert, C.E., and Feijen, J. (1986) Cell surface characteristics of coagulase-negative *staphylococci* and their adherence to fluorinated poly(ethylenpropylene). *Infect Immun* **51**: 294-301.
- Hussain, M., Herrmann, M., von, E.C., Perdreau-Remington, F., and Peters, G. (1997) A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* **65**: 519-524.
- Janzon, L.A.S. (1990) The role of the delta-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* **9**: 1391-1399.
- Ji, G., Beavins, R., and Novick, R.P. (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**: 2027-2030.
- Ji, G., Beavis, R.C., and Novick, R.P. (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 12055-12059.
- Karlsson-Kanth, A., Tegmark-Wisell, K., Arvidson, S., and Oscarsson, J. (2006) Natural human isolates of *Staphylococcus aureus* selected for high production of proteases and alpha-hemolysin are sigmaB deficient. *Int J Med Microbiol* **296**: 229-236.
- Kies, S., Otto, M., and Götz, F. (2001) Identification of the *sigB* Operon in *Staphylococcus epidermidis*: Construction and Characterization of a *sigB* Deletion Mutant. *Infection and Immunity* **69**: 7933-7936.
- Kloos, W.E., Ballard, J.A., Webster, J.A., Hubner, A.T., Couto, I., Sloan, G.L. *et al.* (1997) Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their

potential as a reservoir of methicillin-resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 313-323.

Kloos, W.E., George, C.G., Olgiate, J.S., Van Pelt, L., McKinnon, M.L., Zimmer, B.L. *et al.* (1998) *Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus subsp. nov.*, a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 799-812.

Knobloch, J.K. Molekulare Charakterisierung von Transposoninsertionsstellen biofilmbegleitender und mukoid-negativer *Staphylococcus epidermidis* Transposonmutanten. 1999. Fachbereich Medizin, Universität Hamburg.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Knobloch, J.K., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Mack, D. (2002) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **191**: 101-106.

Knobloch, J.K.M. Expression von Virulenzfaktoren in *Staphylococcus epidermidis*: Regulationsmechanismen der Biofilmbildung und Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen. 2005. Fachbereich Medizin, Universität Hamburg.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Knobloch, J.K.M., Bartsch, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.H., and Mack, D. (2001) Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: Differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of Bacteriology* **183**: 2624-2633.

Knobloch, J.K.M., Jäger, S., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Mack, D. (2004) RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via alternative sigma factor σ^B by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infection and Immunity* **72**: 3838-3848.

Knobloch, J.K.M., Nedlmann, M., Kiel, K., Bartsch, K., Horstkotte, M.A., Dobinsky, S. *et al.* (2003) Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: Characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. *Applied And Environmental Microbiology* **69**: 5812-5818.

Koenig, R.L., Ray, J.L., Maleki, S.J., Smeltzer, M.S., and Hurlburt, B.K. (2004) *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAIII-agr regulatory region. *J Bacteriol* **186**: 7549-7555.

Kong, K.-F., Vuong, C., and Otto, M. (2006) *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm and infection. *International Journal of Medical Microbiology* **296**: 133-139.

König,D.P., Perdreau-Remington,F., Rutt,J., Stossberger,P., Hilgers,R.D., and Plum,G. (1998) Slime production of *Staphylococcus epidermidis*: increased bacterial adherence and accululation onto pure titanium. *Acta Orthop Scand*: 523.

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

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

Lambert,L.H., Cox,T., Mitchell,K., Rossello-Mora,R.A., Del Cueto,C., Dodge,D.E. *et al.* (1998) *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 511-518.

Lee,C.Y., and Iandolo,J.J. (1986) Lysogenic conversion of staphylococcal lipase is caused by insertion of the bacteriophage L54a genome into the lipase structural gene. *J Bacteriol* **166**: 385-391.

Lindsey,J.A., and Foster,S.J. (1999) Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability in response to environmental conditions in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* **262**: 323-331.

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

Mack,D. (1999) Molekulare Mechanismen der Biofilm-Entstehung von *Staphylococcus epidermidis*. *Chemotherapie Journal* **8**: 166-176.

Mack,D., Becker,P., Chatterjee,I., Dobinsky,S., Knobloch,J.K., Peters,G. *et al.* (2004) Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *International Journal of Medical Microbiology* **294**: 203-212.

Mack,D., Davies,A.P., Harris,L.G., Rohde,H., Horstkotte,M.A., and Knobloch,J.K.M. (2006a) Microbial interactions in *Staphylococcal epidermidis* biofilms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*: 9-17.

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

Mack,D., Nedelmann,M., Krokotsch,A., Schwarzkopf,A., Heesemann,J., and Laufs,R. (1994) Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus*

- epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* **62**: 3244-3253.
- Mack,D., Rohde,H., Dobinsky,S., Riedewald,J., Nedelmann,M., Knobloch,J.K. *et al.* (2000) Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun* **68**: 3799-3807.
- Mack,D., Rohde,H., Harris,L.G., Davies,A.P., Horstkotte,M.A., and Knobloch,J.K.M. (2006b) Biofilm formation in medical device-related infection. *The International Journal of Artificial Organs* **29**: 343-359.
- Mack,D., Sabottke,A., Dobinsky,S., Rohde,H., Horstkotte,M.A., and Knobloch,J.K.M. (2001) Differential Expression of methicillin resistance by different biofilm-negative *Staphylococcus epidermidis* transposon mutant classes. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **46**: 178-183.
- Mack,D., Siemssen,N., and Laufs,R. (1992) Paralell induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun* **60**: 2048-2057.
- Marrie,T.J., Nelligan,J., and Costerton,J.W. (1982) A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* **66**: 1339-1341.
- Massimi,I., Park,E., Rice,K., Muller-Esterl,W., Sauder,D., and McGavin,M.J. (2002) Identification of a novel maturation mechanism and restricted substrate specificity for the SspB cysteine protease of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **277**: 41770-41777.
- Mckenney,D., Hubner,J., Muller,E., Wang,Y., Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (1998) The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect Immun* **66**: 4711-4720.
- Mehlin,C., Headley,C.M., and Klebanoff,S.J. (1999) An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *J Exp Med* **189**: 907-918.
- Miyazaki,E., Chen,J.M., Ko,C., and Bishai,W.R. (1999) The *Staphylococcus aureus* *rsbW* (orf159) gene encodes an anti-sigma factor of *SigB*. *J Bacteriol* **181**: 2846-2851.
- Morfeldt,E., Taylor,D., von Gabain,A., and Arvidson,S. (1995) Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense. *EMBO J* **14**: 4569-4577.

- Morfeldt,E., Janzon,L., Arvidson,S., and Lofdahl,S. (1988) Cloning of a chromosomal locus (*exp*) which regulates the expression of several exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* **211**: 435-440.
- Morfeldt,E., Tegmark,K., and Arvidson,S. (1996) Transcriptional control of the *agr* dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **21**: 1227-1237.
- Mount,D.W. (1980) The genetics of protein degradation in bacteria. *Annu Rev Genet* **14**: 279-319.
- Muller,E., Hubner,J., Gutierrez,N., Takeda,S., Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (1993) Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. *Infect Immun* **61**: 551-558.
- Muller,E., Takeda,S., Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (1991) Blood proteins do not promote adherence of coagulase-negative *staphylococci* to biomaterials. *Infect Immun* **59**: 3323-3326.
- Nedelmann,M., Sabottke,A., Laufs,R., and Mack,D. (1998) Generalized transduction for genetic linkage analysis and transfer of transposon insertions in different *Staphylococcus epidermidis* strains. *Zentralbl Bakteriologie* **287**: 85-92.
- Nickerson,N.N., Prasad,L., Jacob,L., Delbare,L.T., and McGavin,M.J. (2007) Activation of the SspA serine protease zymogen of *Staphylococcus aureus* proceeds through unique variations of a trypsinogen-like mechanism, and is dependent on both autocatalytic and metalloprotease-specific processing. *J Biol Chem*.
- Novick,R.P., Projan,S.J., Kornblum,J., Ross,H.F., Ji,G., Kreiswirth,B. *et al.* (1995) The *agr* P2 operon: an autolytic sensory transduction system in *S. aureus*. *Mol Gen Genet* **248**: 446-458.
- Novick,R.P., Ross,H.P., Projan,S.J., Kornblum,J., Kreiswirth,B., and Moghazeh,S. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *The EMBO Journal* **12**: 3967-3975.
- Otto,M., Süßmuth,R., Jung,G., and Götz,F. (1998) Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis agr* system. *Federation of European Biochemical Societies Letters*: 89-94.
- O'Toole,G., Kaplan,H.B., and Kolter,R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**: 49-79.
- Palma,M., and Cheung,A.L. (2001) sigma(B) activity in *Staphylococcus aureus* is controlled by RsbU and an additional factor(s) during bacterial growth. *Infect Immun* **69**: 7858-7865.

- Pantueck,R., Sedlacek,I., Petras,P., Koukalova,D., Svec,P., Stetina,V. *et al.* (2005) *Staphylococcus simiae* sp. nov., isolated from South America squirrel monkeys. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 1953-1958.
- Pascual,A., Fler,A., Westerdaal,N.A., and Verhöf,J. (1986) Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to Teflon catheters in vitro. *Eur J Clin Microbiol* **55**: 518-522.
- Peng,H.L., Novick,R.P., Kreiswirth,B., Kornblum,J., and Schlievert,P. (1988) Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **170**: 4365-4372.
- Peters,G., Locci,R., and Pulverer,G. (1981) Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* **173**: 293-299.
- Prigent-Combaret,C., Vidal,O., Dorel,C., and Lejeune,P. (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 5993-6002.
- Probst,A.J., Hertel,C., Richter,L., Wassill,L., Ludwig,W., and Hammes,W.P. (1998) *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer und Fischer 1982) subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 651-658.
- Rachid,S., Ohlsen,K., Witte,W., Hacker,J., and Ziebuhr,W. (2000) Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 3357-3363.
- Recsei,P., Kreiswirth,B., O'Reilly,M., Schlievert,P., Gruss,A., and Novick,R.P. (1986) Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Mol Gen Genet* **202**: 58-61.
- Reed,S.B., Wesson,C.A., Lion,L.F., Trumble,W.R., Schlievert,P.M., Bohad,G.-A., and Bayles,K.W. (2001) Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon. *Infect Immun* **69**: 1521-1527.
- Rice,K., Peralta,R., BAST,D., de Azavedo,J., and McGavin,M.J. (2001) Description of *staphylococcus* serine protease (*ssp*) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of *sspA*-encoded serine protease. *Infect Immun* **69**: 159-169.
- Rohde,H., Burdelski,C., Bartsch,K., Hussain,M., Buck,F., Horstkotte,M.A. *et al.* (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular Microbiology* **55**: 1883-1895.

- Rohde,H., Kalitzky,M., Kroger,N., Scherpe,S., Horstkotte,M.A., Knobloch,J.K. *et al.* (2004) Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* **42**: 5614-5619.
- Rollof,J., and Normark,S. (1992) In vivo processing of *Staphylococcus aureus* lipase. *J Bacteriol* **174**: 1844-1847.
- Rosenstein,R., and Götz,F. (2000) Staphylococcal lipases: Biochemical and molecular characterization. *Biochimie* **82**: 1005-1014.
- Rzychon,M., Sabat,A., Kosowska,K., Potempa,J., and Dubin,A. (2003) Staphostatins: an expanding new group of proteinase inhibitors with a unique specificity for the regulation of staphopains, *Staphylococcus spp.* cysteine proteinases. *Mol Microbiol* **49**: 1051-1066.
- Sabat,A., Kosowska,K., Poulsen,K., Sekowska,A., van Den,B.B., Travis,J., and Potempa,J. (2000) Two allelic forms of the aureolysin gene (*aur*) within *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **68**: 973-976.
- Said-Salim,B., Dunman,P.M., McAleese,F.M., Macapagal,D., Murphy,E., McNamara,P.J. *et al.* (2003) Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol* **185**: 610-619.
- Sauer,K., Camper,A.K., Ehrlich,G.D., Costerton,J.W., and Davies,D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**: 1140-1154.
- Schwarzkopf,A., Karch,H., Schmidt,H., Lenz,W., and Heesemann,J. (1993) Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping factor-negative, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **31**: 2281-2285.
- Shaw,J.H., and Clewell,D.B. (1985) Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* **164**: 782-796.
- Shaw,L., Golonka,E., Potempa,J., and Foster,S.J. (2004) The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **150**: 217-228.
- Smeltzer,M.S., Hart,M.E., and Iandolo,J.J. (1992) Quantitative spectrophotometric assay for staphylococcal lipase. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2815-2819.
- Spergser,J., Wieser,M., Taubel,M.R.-M.R.A., Rosengarten,R., and Busse,H.J. (2003) *Staphylococcus nepalensis sp.*, isolated from goats of the Himalaya region. *Int J Syst Bacteriol* **53**: 2007-2011.

- Stoodley,P., Sauer,K., Davies,D.G., and Costerton,J.W. (2002) Biofilm as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187-209.
- Takashi,T., Satoh,I., and Kikuchi,N. (1999) Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 725-728.
- Talon,R., Dublet,N., Montel,M.C., and Cantonnet,M. (1995) Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. *Curr Microbiol* **30**: 11-16.
- Tenover,F.C., and Gaynes,R. The epidemiology of *Staphylococcus* infections. 414-421. 2000. ASM Press Washington D.C. Gram-Positive Pathogens. Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., and Rood J.I.
- Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- Teufel,P., and Götz,F. (1993) Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **175**: 4218-4224.
- Timmerman,C.P., Fleer,A., Besnier,J.M., De Graaf.,L., Cremers,F., and Verhoef,J. (1991) Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun* **59**: 4192.
- Tojo,M., Yamashita,N., Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (1988) Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **157**: 722.
- Tormo,M.A., Marti,M., Valle,J., Manna,A.C., Cheung,A.L., Lasa,I., and Penades,J.R. (2005) SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J Bacteriol* **187**: 2348-2356.
- Trulzsch,K., Rindler,H., Trcek, J., Bader,L., Wilhelm,U., and Heesemann,J. (2002) *Staphylococcus pettenkoferi*, a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* **43**: 175-182.
- Ubeda,C., Tormo,M.A., Cucarella,C., Trotonda,P., Foster,T.J., Lasa,I., and Penades,J.R. (2003) Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* **49**: 193-210.
- Van Wamel,W.J., Vandenbroucke-Grauls,C.M., Verhoef,J., and Fluit,A.C. (1998) The effect of culture conditions on the in-vitro adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* **47**: 705-709.
- Vaudaux,P., Pittet,D., Haerberli,A., Huggler,E., Nydegger,U.E., Lew,D.P., and Waldvogel,F.A. (1989) Host factors selectively increase staphylococcal

- adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J Infect Dis* **160**: 875.
- Veenestra,G.J., Cremers,F.F., van Dijk,H., and Fleer,A. (1996) Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **178**: 541.
- Vernozy-Rozand,C., Mazuy,C., Meugnier,H., Bes,M., Lasne,Y., Fiedler,F. *et al.* (2000) *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 4**: 1521-1527.
- Vijay,K., Brody,M.S., Fredlund,E., and Price,C.W. (2000) A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the sigmaB transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **35**: 180-188.
- Voelker,U., Voelker,A., and Haldenwang,W.G. (1996) Reactivation of the *Bacillus subtilis* anti-sigma B antagonist, RsbV, by stress- or starvation-induced phosphatase activities. *J Bacteriol* **178**: 5456-5463.
- Voelker,U., Voelker,A., Maul,B., Hecker,M., Dufour,A., and Haldenwang,W.G. (1995) Separate mechanisms activate sigma B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J Bacteriol* **177**: 3771-3780.
- Vojtov,N., Ross,H.F., and Novick,R.P. (2002) Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10102-10107.
- Vuong,C., Gerke,C., Somerville,G.A., Fischer,E.R., and Otto,M. (2003) Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases* **188**: 706-718.
- Vuong,C., Götz,F., and Otto,M. (1999) Construction and characterization of an agr deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity* **68**: 1048-1053.
- Vuong,C., Kocianova,S., Voyich,J.M., Yao,Y., Fischer,E.R., DeLeo,F.R., and Otto,M. (2004) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* **279**: 54881-54886.
- Vuong,C., Kocianova,S., Yao,Y., Carmody,A.B., and Otto,M. (2006) Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. *The Journal of Infectious Diseases* **190**: 1498-1505.
- Vuong,C., Saenz,H.L., Otto,M., and Götz,F. (2000) Impact of the agr Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases* **182**: 1688-1693.

- Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., and Greenberg, E.P. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**: 860-864.
- Whiteley, M., Lee, K.M., and Greenberg, E.P. (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13909.
- Wilkinson, R.J. (1997) *Biology* New York: Churchill Livingstone, pp. 1-38.
- Wisplinghoff, H., Rosato, A.E., Enright, M.C., Noto, M., Craig, W., and Archer, G.L. (2003) Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3574-3579.
- Wright III, J.S., Jin, R., and Novick, R.P. (2005) Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1691-1696.
- Wu, S., de, L.H., and Tomasz, A. (1996) Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. *J Bacteriol* **178**: 6036-6042.
- Xu, L., Li, H., Vuong, C., Vadyvaloo, V., Wang, J., Yao, Y. *et al.* (2006) Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity* **74**: 488-496.
- Yang, X., Kang, C.M., Brody, M.S., and Price, C.W. (1996) Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Dev* **10**: 2265-2275.
- Yao, Y., Sturdevant, D.E., and Otto, M. (2005) Genome-wide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis* **191**: 289-298.
- Yao, Y., Vuong, C., Kocianova, S., Villaruz, E., Lai, Y., Sturdevant, D.E., and Otto, M. (2006) Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* accessory-gene regulator response: Quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defense. *The Journal of Infectious Diseases* **193**: 841-848.
- Yarwood, J.M., Bartels, D.J., Volper, E.M., and Greenberg, E.P. (2004) Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* **186**: 1838-1850.
- Yarwood, J.M., McCormick, J.K., Paustian, M.L., Kapur, V., and Schlievert, P.M. (2002) Repression of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator in serum and in vivo. *J Bacteriol* **184**: 1095-1101.

- Yarwood, J.M., and Schlievert, P.M. (2003) Quorum sensing in Staphylococcal infections. *The Journal of Clinical Investigation* **112**: 1620-1625.
- Younger, J.J., Christensen, G.D., Bartley, D.L., Simmons, J.C., and Barrett, F.F. (1987) Coagulase-negative *staphylococci* isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal to clinical outcome. *J Infect Dis* **156**: 554.
- Youngman, P.J., Perkins, J.B., and Losick, R. (1983) Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn917. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 2305-2309.
- Ziebuhr, W., Heilmann, C., Gotz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E., and Hacker, J. (1997) Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* **65**: 890-896.
- Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lossner, I., Gotz, F., and Hacker, J. (1999) A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* **32**: 345-356.

8 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. R. Laufs und Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. J. K.-M. Knobloch danke ich für die Überlassung des Themas. Hervorheben möchte ich seine unermüdliche Unterstützung bei allen Schritten, die für die Fertigstellung dieser Arbeit notwendig waren.

Ich bedanke mich bei Stefanie Scherpe, Krankenhaushygiene Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, für die Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese.

Des Weiteren danke ich Inke und Melanie Sterzik für die Hilfestellung bei der einen oder anderen Abbildung.

Ich danke Gesche Kroll, Stephanie Frankenberger, Holger Rohde, Julia von Freyberg-Rohde, Gefion Franke, Christoph Burdelski, Manuel Wolters, Kim Wegert, Ulrike Wendt, Jan Wietz, Jan Kneschke, Thea Pfanzelt und Chia-Jung Wang für ihre stete Unterstützung in- und außerhalb des Labors.

Nina Schewe und Juliane Simon sei für das Korrekturlesen gedankt.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und Philip Pehle.

9 Lebenslauf

Name Sandra Schewe
Adresse Rilkehof 4, 38440 Wolfsburg
Telefon, Mobil 05361/6015364, 0176/22668696
Email Sandra.Schewe@web.de
Geburtsdatum 24.03.1982
Geburtsort Neumünster
Familienstand ledig

Ausbildung:

2001 Holstenschule Neumünster, Abitur
 2001-2008 Medizinische Fakultät, Universität Hamburg
 2002 Pflegedienstpraktikum, Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster
 2003 Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
 2004 Famulaturen:
 Allgemeinchirurgie, Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster
 Anästhesie, Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster
 Gynäkologie/Geburtshilfe, Karolinska Institut Stockholm, Schweden
 Pädiatrie, Kinderarztpraxis, Hamburg
 2005 Wahlfach Pädiatrie, Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Hamburg
 2007 Praktisches Jahr:
 Chirurgie, Kantonsspital Liestal, Schweiz
 Pädiatrie, Universitätsklinik Eppendorf, Hamburg
 Innere Medizin, Israelitisches Krankenhaus, Hamburg
 2008 Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung; mündlich: „sehr gut“, schriftlich: „gut“

Tätigkeiten:

2004 Beginn der Dissertation „Wechselwirkung des *agr*-Quorum sensing Systems mit dem Regulon des alternativen Sigmafaktors σ^B im Rahmen der Regulation von Virulenzfaktoren in *Staphylococcus epidermidis*“ am Institut für Mikrobiologie, Universität Hamburg
 2006 Studentische Hilfskraft im Modellstudiengang für Medizin (6 Monate)
 2008 Beginn der Assistenzarztzeit in der Pädiatrie, Klinikum Wolfsburg

Praktische Erfahrungen:

- 2006 Kurs „Medical English“ (2 Semester), Universität Hamburg
- 2006 Allgemeiner Chirurgischer Sonographiekurs, Zentrum für Operative Medizin, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
- 2007 Pädiatrischer Echosonographiekurs, Universitäres Herzzentrum Hamburg

Persönliche Details:

- Sprachen Englisch (fortgeschritten), Französisch, Schwedisch (Grundkenntnisse)
- EDV Word, Excel

Wolfsburg, den 22.April 2009

Sandra Schewe

Erklärung

Ich versichere, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebene Quellen oder Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite der benutzten Quelle kenntlich gemacht habe und dass ich die Dissertation bisher keinem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um die Zulassung zur Promotion beworben habe.