

Aus dem Institut
für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. W. Solbach

**Vergleich von extrazellulären Proteinen Biofilm-positiver
Staphylococcus epidermidis Stämme mit ihren isogenen σ^B Mutanten
im Phänotyp, auf aktivitäts- und transkriptioneller Ebene**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Jan-Christoph Kneschke
aus Bremen

Lübeck 2011

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Johannes K.-M. Knobloch

2. Berichtstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Ulrike Seitzer

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2012

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.09.2012

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 EINLEITUNG	8
1.1 STAPHYLOKOKKEN.....	8
1.2 EPIDEMIOLOGIE KOAGULASE-NEGATIVER STAPHYLOKOKKEN	8
1.3 BIOFILMBILDUNG DURCH S. EPIDERMIDIS	9
1.3.1 Primäre Adhäsion von <i>S. epidermidis</i>	9
1.3.2 Die akkumulative Phase der Biofilmbildung	10
1.3.3 Regulation der Biofilmbildung bei <i>S. epidermidis</i>	11
1.4 GLOBALE REGULATOREN IN STAPHYLOKOKKEN	11
1.4.1 Sigmafaktoren	11
1.4.2 σ^B	12
1.4.3 Quorum sensing	13
1.4.4 SarA	14
1.5 EXTRAZELLULÄRE VIRULENZFAKTOREN IN STAPHYLOKOKKEN	14
1.5.1 Proteasen	14
1.5.2 Lipasen	15
1.6 VORRAUSSETZUNGEN FÜR DIESE ARBEIT	15
1.7 ZIEL DER ARBEIT	15
2 MATERIAL	16
2.1 GERÄTE	16
2.2 CHEMIKALIEN, PLASTIK- UND EINWEGARTIKEL	17
2.3 PUFFER UND LÖSUNGEN	18
2.4 FERTIGREAGENZIEEN	20
2.5 NÄHRMEDIEN	20
2.6 REAGENZIESETS FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARTVERFAHREN	21
2.7 OLIGONUKLEOTIDE	22
2.8 BAKTERIENSTÄMME	22
2.9 DATENBANKEN UND PROGRAMME	23
3 METHODEN	24
3.1 ANZUCHTBEDINGUNGEN	24
3.2 KULTURÜBERSTANDGEWINNUNG	24
3.3 PROBENAUFKONZENTRIERUNG	24
3.3.1 Ethanol Fällung	24
3.3.2 Trichloressigsäure Fällung	24

3.3.3	Centriprep Präparation	25
3.4	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	25
3.4.1	Methode nach Bradford	25
3.4.2	Methode nach Lowry	25
3.5	ZELLZAHLBESTIMMUNG	26
3.6	EINDIMENSIONALE SDS PAGE ELEKTROPHORESE	26
3.6.1	Elektrophorese mit Gelen aus Eigenherstellung	26
3.6.2	Criterion Fertiggele	27
3.7	ZWEIDIMENSIONALE SDS PAGE ELEKTROPHORESE	28
3.8	GELFÄRBUNGEN	29
3.8.1	SYPRO Orange	29
3.8.2	SYPRO Ruby	29
3.8.3	Silberfärbung	29
3.8.4	Coomassiefärbung	30
3.9	NATIV GELELEKTROPHORESE	30
3.10	MASSENSPEKTROSKOPIE	30
3.10.1	Probenaufbereitung	30
3.10.2	Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS)	31
3.10.3	MALDI-TOF Massenspektrometrie	32
3.11	DNA PRÄPARATION	32
3.12	RNA PRÄPARATION	32
3.13	TRANSKRIPTIONSANALYSE	33
3.14	POLYMERASEKETTENREAKTION	34
3.14.1	Long Range PCR	34
3.14.2	AccuPrime Taq DNA Polymerase System	35
3.15	AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE	35
3.16	PROTEASESCREENING AUF CASEIN-AGARPLATTEN	35
3.17	QUANTIFIZIERUNG DER PROTEASEAKTIVITÄT	36
3.18	QUANTIFIZIERUNG DER LIPASEAKTIVITÄT	36
4	ERGEBNISSE	37
4.1	DURCH σ^B NEGATIV REGULIERTE PROTEINE	37
4.1.1	Identifikation von negativ regulierten Proteinen	37
4.1.2	Identifizierung der Proteine mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie	39
4.1.3	Proteasescreening auf Casein-Agarplatten	43
4.1.4	Quantifizierung der extrazellulären Gesamtproteaseaktivität	44
4.1.5	Transkriptionsanalyse der Proteasen	45
4.1.6	Regulation der Proteasen durch <i>agr</i> und <i>sarA</i>	51
4.1.7	Charakterisierung der Proteasen mit Proteaseinhibitoren	53

4.2	DURCH σ^B DIFFERENTIELL REGULIERTE PROTEINE	56
4.2.1	Identifikation von differentiell regulierten Proteinen auf dem SDS PAGE	56
4.2.2	Identifizierung der im SDS PAGE gefundenen Proteine im MALDI-TOF	57
4.2.3	Quantifizierung der extrazellulären Lipaseaktivität	58
4.2.4	Identifizierung von lipolytischen Banden im nativen SDS PAGE.....	60
4.2.5	Transkriptionsanalyse der Lipasen.....	61
4.3	DURCH σ^B POSITIV REGULIERTE PROTEINE	64
4.3.1	Identifikation von herabregulierten Proteinen im SDS PAGE.....	64
4.3.2	Charakterisierung der im SDS PAGE identifizierten Proteine im MALDI-TOF.....	65
4.3.3	Charakterisierung der Repeats von Aap.....	69
4.3.4	Prozessierung von Aap.....	70
4.3.5	Schnittstellenanalyse des Aap.....	71
4.3.6	Transkriptionsanalyse von Aap.....	72
4.4	SEKRETOMANALYSE.....	74
4.4.1	2D-Gelelektrophorese des Kulturüberstandes.....	74
4.4.2	Charakterisierung der in der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit der Massenspektroskopie identifizierten Proteine.....	75
5	DISKUSSION.....	77
5.1	PROTEASEN.....	77
5.2	LIPASEN.....	86
5.3	AAP.....	90
5.4	IMMUNODOMINANT A.....	92
5.5	STAPHYLOCOCCAL SECRETORY ANTIGEN.....	94
5.6	MOONLIGHTING PROTEINE.....	95
5.6.1	Alkaline shock protein 23	97
5.6.2	Enolase.....	97
5.6.3	Alkylhydroperoxid Reduktase subunit C.....	99
5.6.4	Phosphocarrier Protein HPr	100
5.6.5	Dihydrolipoamid Dehydrogenase	101
5.6.6	Phosphoglycerat Kinase	102
6	ZUSAMMENFASSUNG	104
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	106
8	ANHANG.....	125
8.1	ALIGNMENT VON ECP UND SSPB VON S. AUREUS	125
8.2	ALIGNMENT VON ECP UND SCPA VON S. AUREUS	126
8.3	ALIGNMENT DER SERINPROTEASEN VON S. EPIDERMIDIS UND S. AUREUS	127

8.4	ALIGNMENT DER LIPASE SEL-2 UND DER LIPASE VON S. AUREUS.....	128
8.5	ALIGNMENT DER LIPASE SEL-1 UND DER LIPASE VON S. AUREUS.....	129
8.6	ZEICHNUNG ALLER GEFUNDENEN PEPTIDE VON AAP IN 1457	130
8.7	ALIGNMENT ALLER SSAA PROTEINE IM STAMM ATCC 12228.....	133
8.8	DOMÄNEN IN DEN SSAA PROTEINEN.....	134
8.9	ALIGNMENT VON SE1876 UND SA2097	135
8.10	ALIGNMENT VON VERSCHIEDENEN ENOLASEN	136
9	FORMELSAMMLUNG.....	138
10	DANKSAGUNG.....	139
11	LEBENS LAUF.....	140

Abkürzungsverzeichnis

Für die im Text verwendeten Gewichts-, Volumen- und Zeiteinheiten wurden die Bezeichnungen nach dem internationalen SI System verwendet und werden im Abkürzungsverzeichnis nicht gesondert angegeben. Alle Stoffe, die nach dem Periodensystem bezeichnet wurden, sind ebenfalls nicht weiter aufgeführt.

A ₅₇₀	Absorption bei 570 nm
BLAST	basic local alignment search tool
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propane sulfonate
DNA	<i>desoxiribonucleid acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
Ecp	<i>extracellular cystein protease</i> (extrazelluläre Cysteinprotease)
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
Esp	<i>extracellular serin protease</i> (extrazelluläre Serinprotease)
EtOH	Ethanol
kDa	Kilodalton
Kb	<i>kilobase</i> (Kilobase[n])
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	potentia Hydrogenii
PIA	<i>polysaccharide intercellular adhesin</i> (interzelluläres Polysaccharid-Adhäsion)
PS/A	<i>capsular polysaccharide adhesin</i> (kapsuläres Polysaccharidadhäsion)
qRT PCR	quantitative Realtime PCR
RT	Reverse Transkriptase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SepP1	extrazelluläre Metalloprotease
TCA	Trichloressigsäure
TCP	<i>tissue culture plate</i> (Zellkulturplatte)
Tris	Trihydroxyaminomethane
TIGR	The Institute of Genomic Research
U	<i>unit</i> (enzymatische Einheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
VE	voll entionisiert
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
TSB	<i>trypticase soy broth</i> (Trypton Soja Brühe)
TSBØ	TSB ohne Glucose

1 Einleitung

1.1 Staphylokokken

Staphylokokken sind ein wichtiger Bestandteil der natürlichen Haut- und Schleimhautflora bei Säugetieren. Sie sind 0,5 bis 1,5 µm groß und werden den grampositiven, haufenförmig wachsenden, fakultativ anaeroben, unbeweglichen Kokkenbakterien zugeordnet. Taxonomisch gehören die Staphylokokken zu den *Firmicutes* der Klasse I *Bacilli*, Ordnung *Bacillales*, in eine eigene Familie VIII den *Staphylococcaceae*³⁴. Anhand der Koagulasereaktion werden die typischerweise beim Menschen vorkommenden Staphylokokkenspezies in eine Koagulase-positive und eine Koagulase-negative Gruppe unterteilt¹⁷⁸. Der einzige Vertreter der humanpathogenen Koagulase-positiven Gruppe ist *Staphylococcus aureus*. Alle anderen Spezies werden der Koagulase-negativen Gruppe zugeordnet^{79, 194}. Zur häufig isolierten humanen Hautflora gehören 14 der bekannten Koagulase-negativen Spezies. Hohe Populationsdichten finden sich mit 10^3 - 10^6 CFU/cm² an den Ausführungsgängen von Talg- und Schweißdrüsen, dem Nasenvorhof sowie den Schleimhäuten von natürlichen Körperöffnungen^{79, 127}.

1.2 Epidemiologie Koagulase-negativer Staphylokokken

Koagulase-negative Staphylokokken galten lange Zeit als apathogene, kommensale Bakterien. Im Zuge des medizinischen Fortschritts wurden in den vergangenen Jahrzehnten verstärkt medizinische Fremdkörper implantiert. Gleichzeitig war eine stetige Zunahme Fremdkörper-assoziiierter Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken zu beobachten. Heute stellen Koagulase-negative Staphylokokken bei Fremdkörper-assoziiierter Bakteriämie die am häufigsten isolierten Erreger dar¹⁰. Am häufigsten bei Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken wird *S. epidermidis* isoliert, gefolgt von *S. lugdunensis*, *S. warneri* und *S. haemolyticus*^{19, 80, 141}.

Als Risikofaktoren für eine nosokomiale Infektion mit Koagulase-negativen Staphylokokken werden Immunsuppression, die intravenöse Applikation von Flüssigkeiten und die Implantation von Fremdkörpern und Kathetern angesehen¹⁹. Die häufigsten implantierten Fremdkörper sind intraperitoneale Dialysekatheter, Venenkatheter, künstliche Herzklappen, Liquorshunts, Endoprothesen, Sonden von Herzschrittmachern und Gefäßprothesen^{3, 19, 42, 78, 80, 160}.

Da *S. epidermidis* häufig Resistenzen gegen multiple Antibiotika besitzt, gestaltet sich die Therapie als schwierig. So besitzen ca. 80 % aller infektionsassoziierten Isolate eine Methicillinresistenz und Resistenzen gegen weitere Antibiotika^{3, 4, 50}. Die Bakterien sind als sogenannte Biofilme auf dem Fremdmaterial organisiert. In Biofilmen organisierte Zellen wiesen im Vergleich zu planktonischen Zellen eine 10 - 1000fach erhöhte Resistenz gegen Antibiotika auf^{43, 108}. Aufgrund dieser komplexen Organisation der Bakterien auf implantierten Fremdkörpern in Form von Biofilmen sind antibiotische Therapieversuche meist erfolglos, und nur die Entfernung des Fremdmaterials führt zur Kontrolle der Infektion¹⁶⁰.

1.3 Biofilmbildung durch *S. epidermidis*

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von infizierten Kathetern konnte *S. epidermidis* in einer amorphen Substanz in vielschichtigen Lagen beschrieben werden¹⁴⁰. Diese Lebensform als Biofilm zeigte sich als eine Barriere vor dem wirtseigenen Immunsystem^{63, 140} und vorteilhaft in der Konfrontation mit diversen Antibiotika. In Infektionsmodellen konnte ein Zusammenhang zwischen der Biofilmbildung und der Virulenz hergestellt werden¹⁶¹⁻¹⁶³. Erwartungsgemäß können signifikant häufiger Biofilm-positive Stämme von Fremdkörper-assoziierten Infektionen isoliert werden^{32, 35, 202}. Die Biofilmbildung läuft in zwei Phasen ab^{58, 99}. In der ersten Phase kommt es zu einer Adhäsion der Zellen an Polymeroberflächen bzw. an dort gebundene Bestandteile der extrazellulären Matrix. In der zweiten Phase kommt es zu einer Akkumulation und Proliferation der Zellen mit Ausbildung eines mehrlagigen Biofilms.

1.3.1 Primäre Adhäsion von *S. epidermidis*

Die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* an Polymeroberflächen ist von der Oberflächenbeschaffenheit, Ladung und Hydrophobizität der Polymer- und Bakterienoberfläche abhängig^{68, 98}. Die Zelle tritt anfangs durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Polymeroberfläche in Kontakt. Da Fremdmaterialien häufig von Plasmaproteinen, Thrombozyten oder extrazellulären Matrixproteinen, wie Fibronektin und Fibrinogen, bedeckt werden⁷⁹, existieren eine Reihe von Adhäsionsfaktoren zu diesen Oberflächen (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Adhäsionsfaktoren für die Biofilmbildung von *S. epidermidis*

Adhäsionsfaktor	Oberfläche	Referenz
Kapselpolysaccharid/Adhäsion (PS/A)	Silikonkatheter	122, 183
Staphylococcal surface protein (Ssp 1)	Polystyrol	182, 189
Autolysin (AtlE)	Polystyrol	61
Autolysin (Aae)	Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin	62
Fibrinogen-bindendes Protein (Fbe)	Fibrinogen	59, 126, 135, 136
Fibronectin-bindendes Protein (Embp)	Fibronectin	198
Lipase GehD	Kollagen	18

1.3.2 Die akkumulative Phase der Biofilmbildung

Die Akkumulation in mehrschichtigen Biofilmen setzt mechanisch stabile Zell-zu-Zell Verbindungen voraus. Mit Biofilm-negativen Transposonmutanten konnte die Bedeutung eines interzellulären Polysaccharidadhäsins PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) für die interzelluläre Adhäsion gezeigt werden¹⁰². PIA, ein lineares Homoglykan aus durchschnittlich 130 β -(1,6)-verknüpften N-Acetylglukosamin Einheiten, zeigte sich im Weiteren als eines der wichtigsten Faktoren für stabile Zell-zu-Zell Kontakte und die Biofilmbildung^{100, 101}.

Den PIA codierenden Genort konnten Heilmann *et al.* identifizieren. In Biofilm-negativen Transposonmutanten gelang ihnen die Wiederherstellung der Biofilmbildung mit einem Wildtyp DNA-Fragment enthaltenden Plasmid⁶⁰. Auf dem DNA-Fragment konnte ein Operon *ica* (*intercellular adhesin*) identifiziert werden, welches vier Gene *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* umfasst⁵⁴. Die Genprodukte des *icaADBC* Lokus synthetisieren PIA aus dem für die Zellwandsynthese essentiellen Baustein UDP-N-Acetylglukosamin⁵⁴. Die Proteine IcaA, IcaD und IcaC sind Membranproteine mit enzymatischer Aktivität. Sie wirken synergistisch auf die N-Acetylglukosaminoligomer Synthese⁵⁸. IcaB wird sezerniert und ist als Deacetylase für die abschließende Modifikation des Exopolysaccharids verantwortlich¹⁹³.

Neben dem PIA assoziierten Biofilm wird aktuell eine proteinabhängige Biofilmbildung diskutiert, die sich auf die Beobachtung von PIA und *icaADBC* negativen Stämmen, jedoch Biofilm-positiven Stämmen stützt^{139, 140, 157}. Es konnte ein Protein *accumulation associated protein* (Aap) identifiziert werden, welches sich als verantwortlich für diese proteinabhängige Biofilmbildung zeigte^{61, 156, 171}. Eine weitere Funktion als Zellwand Rezeptor für PIA wird ebenfalls für das Aap diskutiert^{8, 71, 99}.

1.3.3 Regulation der Biofilmbildung bei *Staphylococcus epidermidis*

Die Biofilmbildung in *S. epidermidis* erfolgt in Abhängigkeit zu verschiedenen Umweltbedingungen, wie die Zuckerkonzentration^{85, 148} und Osmolarität im Medium^{47, 83, 147, 148}, die Temperatur^{88, 148, 187}, die O₂-Spannung³³ sowie subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika^{47, 148} und Desinfektionsmitteln^{47, 84}. Aber auch spontane Phasenvariationen können zu einer Variation des Phänotyps durch spontane, reversible Integration des Insertionselements IS256 in das *ica* Operon führen^{89, 202, 203}.

Durch Transposonmutagenese mit *Tn917* konnten Biofilm-negative *S. epidermidis* Stämme generiert werden, die durch phänotypische Charakterisierung in Klasse I bis IV eingeteilt wurden¹⁰⁴. Klasse I Mutanten besitzen eine Insertion im *ica* Operon. Die Mutanten der Klasse II (M12) und IV (M17) zeigten Insertionselemente außerhalb des *ica* Operon in den Genen *biofilm accumulation regulator A* und *B* (*barAB*), die auf einen bisher unbekanntem Mechanismus einen regulativen Einfluss auf die Biofilmbildung besitzen⁸². Klasse III Mutanten besaßen eine Insertion in einem Gen mit großer Homologie zu *rsbU* des σ^B Operons bei *S. aureus*^{83, 87}. *RsbU* ist ein positiver Regulator der Aktivität von σ^B (siehe 1.4.2). Die Transkription des *ica* Operons kann über *rsbU* und σ^B reguliert werden. σ^B reprimiert durch einen noch unbekanntem Mechanismus den für das *ica* Operon negativen Regulator *icaR*, wodurch die Biofilmbildung induziert wird⁸⁶.

Als weitere Faktoren für die Regulation der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* stellte sich das globale Regulationssystem *accessory gene regulator* (*agr*) und der *staphylococcal accessory regulator* (*sarA*) heraus (siehe 1.4.3).

1.4 Globale Regulatoren in Staphylokokken

1.4.1 Sigmafaktoren

Bakterielle RNA Polymerasen bestehen aus fünf Untereinheiten (β , β' , $\alpha 2$, ω). Sie sind in der Lage, selbständig Gene zu transkribieren, Elongation und Termination durchzuführen. Für die Initiation der Transkription benötigt die RNA Polymerase eine sechste Untereinheit, die sich reversibel an den RNA Komplex anlegt und mit ihm einen Holoenzym-Komplex bildet. Dieser Holoenzym-Komplex ist in der Lage, Promotoren zu erkennen, an sie zu binden und die Transkription zu initiieren. Diese sechste variable Untereinheit der RNA Polymerase wird Sigmafaktor genannt. Sigmafaktoren können eine große Zahl von unterschiedlichen Genen regulieren. In *Bacillus subtilis* umfasste

das σ^B Regulon 127 Gene^{142, 146}. Mit Mikroarrays konnten bei *S. aureus* sogar 251 durch σ^B regulierte Gene beschrieben werden¹³. Sigmafaktoren stellen somit einen effektiven Mechanismus dar, viele Gene gleichzeitig zu regulieren. Häufig haben die regulierten Gene im Regulon sehr spezielle Aufgaben, wie die Sporulation¹⁴³ oder allgemeine Aufgaben, wie den Eintritt in die stationäre Wachstumsphase oder die Stressantwort⁷⁶.

Sigmafaktoren lassen sich in verschiedene Untergruppen unterteilen. Es werden die strukturell unterschiedlichen Gruppen σ^{70} und σ^{54} unterschieden. Die Gruppe der σ^{70} Sigmafaktoren lässt sich in vier weitere Untergruppen unterteilen: die primären Sigmafaktoren und drei Gruppen von alternativen Sigmafaktoren. Die primären Sigmafaktoren, wie σ^A von *Bacillus subtilis* und σ^{70} von *E. coli*, stellen *house keeping* Sigmafaktoren dar, die häufig die Transkription von essentiellen Genorten in exponentiell wachsenden Zellen regulieren. Die Gruppe der alternativen Sigmafaktoren lässt sich in folgende Gruppe unterteilen: 1.) der Stressantwort (wie σ^B , σ^S , σ^F), 2.) der sehr großen Gruppe der *extracytoplasmic function factors* (ECF), die Gene zum registrieren und reagieren auf Veränderungen der Membran, Periplasma und extrazellulärer Umgebung regulieren⁶⁵, und 3.) die Gruppe der σ^{28} , die häufig Gene für Flagellensynthese und Zellmotilität regulieren^{64, 114}.

Zu der Gruppe der σ^{54} Faktoren gehört nur eine Klasse der Sigmafaktoren, deren Funktion bis heute nicht klar abgegrenzt werden konnte, da sie eine große Spanne von verschiedenen Funktionen abdecken können.

1.4.2 σ^B

σ^B ist einer der am besten charakterisierten Sigmafaktoren. Er ist ein zentraler Regulator der Stressantwort in *Bacillus*, *Staphylococcus* und *Listeria*. Verschiedene Stressbedingungen, wie Hitze, hohe Osmolarität, Ethanol, pH Verschiebungen und oxidierende Substanzen, führen zu einer σ^B abhängigen Stressantwort^{12, 46, 56, 69, 186}. Bei jedem Bakterium besitzt σ^B jedoch eine etwas unterschiedliche Funktion.

Die Regulation von σ^B erfolgt bei allen σ^B enthaltenen Bakterien über eine Regulationskaskade. Nur die beiden Schlüsselproteine RsbV und RsbW sind bei allen Bakterien zu finden⁴⁵. In *S. aureus* besteht das σ^B Operon aus vier Genen, *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* und *sigB*. In Ruhe ist σ^B von einem Anti-Sigmafaktor RsbW gebunden und inaktiviert¹¹⁵. RsbV kann im nicht-phosphorylierten Zustand den Anti-Sigmafaktor

RsbW binden und damit inaktivieren. σ^B ist somit freigesetzt und kann an die RNA Polymerase binden. Die Aktivität von RsbV wird durch Dephosphorylierung von RsbU gesteuert⁵⁶. Gleichzeitig fungiert RsbW als spezifische Kinase für den Anti-Antisigmafaktor RsbV. In *S. epidermidis* konnten homologe Proteine zum σ^B Operon bei *S. aureus* identifiziert werden und analog bezeichnet werden^{83,86}.

In *S. aureus* ist σ^B an der Repression von vielen Exoenzymen und Toxinen und in einer positiven Regulation der Synthese von Kapselpolysacchariden und Adhäsinen beteiligt¹³. Eine Funktion des σ^B Operons bei *S. epidermidis* ist hingegen nur für die Biofilmbildung gesichert⁸⁶. Untersuchungen über die Regulation von weiteren extrazellulären Proteinen bei *S. epidermidis* existieren nur in einem *ica* negativen Stamm mit einer zusätzlichen natürlichen Mutation des *rsbU* Gens⁷⁷. Eine aussagekräftige Vergleichsstudie von Wildtyp zu Mutante ist in diesem Stamm nur sehr eingeschränkt möglich.

1.4.3 Quorum sensing

S. epidermidis besitzt zwei *quorum sensing* Systeme, *accessory gene regulator (agr)* und S-Ribosylhomocysteinylase (*luxS*). *Quorum sensing* Systeme passen die Regulation einer Vielzahl von Genen an die Zelldichte und Wachstumsphase an und stellen eine Art von Kommunikation einzelner Zellen untereinander dar. Als Informationsträger dienen hormonähnliche Moleküle (Autoinducer), die im Verlauf der Wachstumsphasen akkumulieren und für das *quorum sensing* verantwortlich sind. Das *agr* System besteht aus vier Genen (*agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*), die co-transkribiert werden, und einem Effektorgen RNAIII^{128, 138}. AgrD kodiert für die *autoinducing peptides (AIP)*, welche durch AgrB prozessiert und exportiert werden¹⁹¹. Das extrazelluläre AIP wird von dem Transmembranprotein AgrC gebunden, welches wiederum das Protein AgrA phosphoryliert oder dephosphoryliert. Das aktivierte AgrA ist in der Lage, an die Promotoren P2 und P3 von *agr* zu binden und die Transkription des Effektorproteins zu induzieren. RNAIII reguliert im Folgenden direkt oder über untergeordnete Genregulationssysteme, wie das zwei Komponenten System *saeRS*, auf Transkriptionsebene die Zielgene¹²⁸. Agr wird beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase aktiviert. Es reguliert negativ verschiedene zellwandgebundene Proteine und steigert die Expression von virulenzassoziierten Proteinen.

Das *quorum sensing* Systeme luxS ist für die Synthese von AI-2, einem Autoinducer Peptid, verantwortlich. Es ist direkt an der Regulation des *ica* Operons beteiligt und reguliert negativ auf Transkriptionsebene die Expression von PIA. Im Infektionsmodell konnte eine erhöhte Virulenz von luxS Mutanten beobachtet werden ¹⁹⁹.

1.4.4 SarA

SarA ist ein DNA bindender Faktor, der Gene direkt ansteuert oder über untergeordnete Transkriptionsfaktoren modelliert. Das *sarA* Operon besitzt drei Promotoren, wobei bei *S. epidermidis* der proximale Promoter P3 von σ^B abhängig und der zweite sich aufwärts befindende Promoter P2 von σ^A abhängig ist ⁴⁸. Durch die verschiedenen Promotoren ist es möglich, SarA in allen Wachstumsphasen zu exprimieren. In der exponentiellen Wachstumsphase dominiert eine Aktivierung über die Promotoren P1 und P2, wohingegen in der stationären Phase und während Stressbedingungen der Promoter P3 aktiviert wird ¹⁰⁹. SarA ist in der Lage, in einem *agr* abhängigen Regulationsweg über die Bindung an die *agr* Promotoren P2 und P3 virulenzassoziierte Proteine zu regulieren ^{29, 121}. Über einen *agr* unabhängigen Regulationsweg kann SarA direkt an Gene binden und Zellwandproteine und Exoproteine induzieren ³¹. Im Genom von *S. epidermidis* finden sich acht *sar* Homologe, die zur *winged-helix* Familie von regulatorischen DNA bindenden Proteinen gehören ⁵². Über die regulatorischen Funktionen der einzelnen *sar* Homologe ist noch wenig bekannt.

1.5 Extrazelluläre Virulenzfaktoren in Staphylokokken

1.5.1 Proteasen

Staphylokokken sezernieren eine Vielzahl von verschiedenen extrazellulären Proteasen. So konnten bei *S. aureus* bis heute bis zu 10 verschiedene extrazelluläre Proteasen identifiziert werden. Staphylokokkenproteasen werden für die Inhibition wirtseigener Proteaseinhibitions- und Immunantwortmechanismen durch Spaltung von natürlichen Proteaseinhibitoren, Immunglobulinen und Komplementfaktoren verantwortlich gemacht ^{5, 107, 145}. Gewebeerstörung mit Nährstoffgewinnung und darauf folgender Bakteriendissemination, unterstützt durch Modifikation der Bakterienoberfläche und Spaltung adhäsiver Proteine, werden ebenfalls zu den Aufgaben der extrazellulären Proteasen gerechnet ^{112, 113}.

1.5.2 Lipasen

Lipolytische und Esteraseaktivitäten sind häufig detektierte extrazelluläre, enzymatische Aktivitäten bei Staphylokokken. Die verantwortlichen Lipasen spielen eine Rolle im Lipidmetabolismus der Bakterien und übernehmen eine wichtige Funktion, wenn Lipide als die hauptsächliche Kohlenstoffquelle dienen⁵¹. Manche Lipasen scheinen eine kollagenbindende Eigenschaft zu besitzen und zur primären Adhäsion beizutragen¹⁸. Lipasen von Staphylokokken sind nicht nur in der Lage, Fettsäuren zu hydrolysieren, sondern können auch die Synthese von einigen Fettsäuren übernehmen.

1.6 Vorraussetzungen für diese Arbeit

In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. J. K.-M. Knobloch konnten zuvor Mutanten in den Stämmen 1457, 1057 und 8400 der Gene *sigB*, *rsbU*, *rsbV*, *rsbW*, *rsbUVW*, *rsbUVWsigB* durch homologen Genaustausch generiert werden. In vielfältigen Wachstumsbedingungen wurde die Biofilmbildung und die Transkription einzelner Gene untersucht^{72, 86}. Auch die Antibiotikaresistenz wurde in den generierten Mutanten untersucht⁸¹. Zu Beginn dieser Arbeit waren einzelne durch σ^B regulierte Proteine im Kulturüberstand der Mutanten noch unbekannt.

1.7 Ziel der Arbeit

Das σ^B Regulon in *S. epidermidis* ist nur unvollständig untersucht und verstanden. In der vorliegenden Studie sollten Untersuchungen der extrazellulären Proteine zu einem besseren Verständnis der Funktion von σ^B und der regulierten Proteine beitragen. Hierzu sollten ein- und zweidimensionale SDS PAGE Auftrennungen des Kulturüberstandes und Proteincharakterisierungen mittels massenspektroskopischen Analysen durchgeführt werden. Die σ^B Regulation der beobachteten Proteine sollte im Weiteren in Transkriptionsanalysen bestätigt werden und eventuelle enzymatische Regulationen durch Aktivitätstest belegt werden.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Laborgerät	Hersteller
Biofuge pico Tischzentrifuge	Heraeus-Christ, Osterode, Deutschland
Brutschrank 5050E	
Megafuge 1.0 R Kühlzentrifuge	
Megafuge 3.0 R Kühlzentrifuge	
Vakuumschrank Kelvitron T	
DU 530 Photometer	Beckmann, München, Deutschland
L5-50B Ultrazentrifuge	
TL 100 Ultrazentrifuge	
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Primus 96 Thermocycler	MWG Biotech, München, Deutschland
Gelkammern	
ChemiDoc XRS Geldokumentationssystem	BioRad, München, Deutschland
SDS Gelkammern	
iCycler iQ Thermocycler	
PowerPac 3000 Power Supply	
Smart Spec Plus Spectrophotometer	
Gel Dryer Model 543	
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co., USA
Lab-Shaker Schüttelinkubator	B. Braun, Melsungen, Deutschland
GFL1083 Schüttelwasserbad	AD Krauth, Hamburg, Deutschland
PC4400 Waage	Mettler Waagen GmbH, Gießen, Deutschland
Feinwaage BP 301 S	Sartorius, Mechatronics, Göttingen
GelCam Photodokumentationssystem	Phase, Lübeck, Deutschland
Branson Sonifier 250-D	Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
ELISA Processor II Spectrophotometer	Behring, Marburg, Deutschland
FastPrep FP120	Bio 101, Carlsbad, USA
Digital-pH-Meter 646	Knick, Berlin, Deutschland
Gelkammern	Kreutz Laborgeräte, Hamburg, Deutschland
Massenspektrometer REFLEX IV	Bruker, Bremen, Deutschland
Massenspektrometer Micromass Q-TOF 2	Waters, Manchester, England
CH Kühlaggregat	Thermo HAAKE GmbH, Karlsruhe, Deutschland
F3 Kühlaggregat Steuereinheit	

2.2 Chemikalien, Plastik- und Einwegartikel

Plastik- und Einwegartikel stammen, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner (Nürtingen) und Becton Dickenson (Heidelberg).

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2 M NaOH	Merck, Darmstadt
95 %iges Ethanol	
96 %ige Essigsäure	
Aceton	
Acetonitril	
α -Cyano-4-Hydroxymizsäure	
β -Mercaptoethanol	
Borsäure	
Bromphenolblau	
CaCl ₂	
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	
EDTA	
Ficoll	
Glycerin	
Glycin	
Harnstoff	
HCl	
Isobutanol	
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	
KCl	
Methanol	
NaCl	
Tris	
Trifluoressigsäure	
Xylen Cyanol FF	
1,5 % Bacto Agar	Difco, Detroit
12,5 % (w/v) Ammoniumsulfamat	Fluka, Schweiz
0,1 % Rinderserumalbumin-Lösung	Sigma Chemical Co., St. Louis
Bio-Lyte 3/10 Ampholytes	
Casein	
Dithiothreitol (DTT)	
Iodoacetamid	
Antibiotikaplättchen	Boehringer, Mannheim

3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonat (CHAPS)	Roche, Basel
Glycin	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	
Serdolite MB-1	
Trihydroxyaminomethan (Tris)	
SeaKem ME Agarose 50015	Biozym, Hess. Oldendorf
Trichloressigsäure (TCA)	Fa. Roth, Karlsruhe

2.3 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in VE Wasser angesetzt.

EDTA-Stammlösung:

0,5 M Na-EDTA 96,06 g/l
auf pH 7,5 eingestellt

PBS:

NaCl 140 mM
Na₂HPO₄ 9 mM
KCl 2 mM
KH₂PO₄ 1 mM
auf pH 7,4 eingestellt

TBE-Puffer:

Tris 90 mM
Borsäure 90 mM
EDTA 2,5 mM
auf pH 8,0 eingestellt

Tris Puffer pH 8,8:

Tris 1,5 mM
auf pH 8,8 eingestellt

Tris Puffer pH 6,8:

Tris 0,5 mM
Auf pH 6,8 eingestellt

SDS Stammlösung:

Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 % (w/v)
Tris-Glycin Laufpuffer:
Tris 25 mM
Glycin 192 mM
SDS 0,1 % (w/v)

TCA Lösung:

Trichloressigsäure (TCA)	20 % (w/v)
Aceton	50 % (w/v)
Dithiotreitol (DTT)	20 mM

Waschlösung:

Aceton	80 % (w/v)
Dithiotreitol (DTT)	20 mM

2D Probenpuffer:

Harnstoff	8 M
CHAPS	4 % (w/v)
Dithiotreitol (DTT)	50 mM
Bio-Lyte 3/10 Ampholytes	0,2 % (w/v)

Der Harnstoff wurde in einer entsprechenden Menge in deionisiertem Wasser gelöst und mit 1 g Serdolite MB-1 auf 100 ml Lösung für 10 min zur Deionisierung geschüttelt und filtriert. Anschließend wurde der Harnstoff zur Pufferherstellung weiterverwendet.

Resolving Gel Buffer:

Tris	1,5 mM
SDS	0,4 % (w/v)

Die Lösung wurde auf 50 mL aufgefüllt und auf den pH 8,8 eingestellt.

Equilibrationbuffer:

Harnstoff	6 M
Glycerin	30 % (w/v)
SDS	2 % (w/v)
Resolving Gel Buffer	3,34 ml

auf 100 mL aufgefüllt.

Equilibrationbuffer I:

Equilibrationbuffer	
DTT	40 mg

Equilibrationbuffer II:

Equilibrationbuffer	
Iodoacetamid	160 mg

Laemmli Probenpuffer:

Tris-HCl, pH 6,8	62,5 mM
Glycerin	20 % (w/v)
SDS	2 % (w/v)
β -Mercaptoethanol	5 % (w/v)

Fixierlösung:

Essigsäure	7 % (w/v)
Methanol	10 % (w/v)

nativ Probenpuffer:

Tris-HCl, pH 6,8	62,5 mM
------------------	---------

Glycerol	20 % (w/v)
SDS	2 % (w/v)

Agarosegelprobenpuffer:

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylen Cyanol FF	0,25 % (w/v)
Ficoll	15 % (w/v)

Tributyrynlösung:

Tris	1,21 g
CaCl ₂	277 mg
VE Wasser	100 ml

Der pH wurde mit HCl auf pH 8 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde 0,08 % *low melting point* Agarose in der Lösung aufgekocht und 0,5 % Tributyrin hinzugegeben. Der Ansatz wurde nun in einem Glasgefäß 2 mal 1,5 min mit 70 % Amplitude mit Ultraschall behandelt.

Matrixlösung:

gesättigte Lösung von α -Cyano-4-Hydroxymzimtsäure in Acetonitril	30 % (w/v)
Trifluoressigsäure	0,1% (w/v)

2.4 Fertigreagenzien

MOPS Laufpuffer	BioRad
Precision Plus Protein Standards, Dual Color	BioRad
Standards for SYPRO Orange Stain Broad Range	BioRad
Renaturing Buffer	Invitrogen
Develloping Buffer	Invitrogen
iQ SYBR Green Supermix	BioRad

2.5 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden in VE Wasser angesetzt und durch Erhitzen (15 min, 121 °C, 3,0 bar) in einem Dampfautoklaven sterilisiert. Zur Verfestigung von Flüssigmedien wurde, wenn nicht anders angegeben, 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) hinzugegeben. Die verwendeten Grundsubstanzen und fertigen Trockenmedien wurden, sofern nicht gesondert angegeben, von den Firmen Becton Dickinson (Cockeysville, Md, USA), Difco oder Oxoid (Basingstoke, England) bezogen.

Blut-Agar:

Columbia-Agar	42,0 g/l
Bacto-Agar	1,0 g/l
Glukose	2,2 g/l

Schafsblut 72 ml/l
auf pH 7,0 eingestellt

BHI:

Brain Heart Infusion Broth 30 g/l

Einfriermedium:

Bacto-Pepton 100 ml 1,5 % (w/v)

Glycerin 87 % 60 ml

Die Bestandteile wurden getrennt autoklaviert und anschließend zusammengefügt.

Trypton Soja Brühe (TSB):

TSB (Becton Dickinson) 30 g/l
auf pH 7,3 eingestellt

TSB ohne Glukose (TSBØ):

Trypton 17,0 g/l
Soja Pepton 3,0 g/l
NaCl 5,0 g/l
K₂HPO₄ 2,5 g/l

auf pH 7,3 eingestellt

Casein-Agarplattenansatz für 100 ml:

Bacto-Agar 1,5 g
TSB 3 g
CaCl₂ 73,5 mg
Cystein 12,1 mg
VE Wasser 50 ml

In einem weiteren Gefäß wurde 1 g Casein in 50 ml VE Wasser gelöst und der pH mit NaOH zwischen 8 und 10 eingestellt. Die Lösung wurde in der Dampftruhe für 15 min behandelt. Anschließend wurden beide Lösungen vermischt und weiterverarbeitet.

Tributylin-Agarplattenansatz für 100ml:

Tris 1,21 g
CaCl₂ 277 mg
VE Wasser 100 ml

Der pH wurde mit HCl auf 8 eingestellt und 1,5 g Bacto-Agar hinzugegeben. Nach dem Autoklavieren wurden 0,5 ml Tributyrinlösung hinzugegeben und die Lösung zweimal 1,5 min mit 70 % Amplitude mit Ultraschall behandelt.

2.6 Reagenziensets für molekularbiologische Standardverfahren

Die angegebenen Reagenziensets wurden von den Firmen Bio 101 (Carlsbad, CA, USA), BioRad (München, Deutschland), Calbiochem (Darmstadt, Deutschland), Finnzym (Espoo, Finnland), Invitrogen (Carlsbad, USA), Molecular Probes (Eugen, USA), Roche (Basel, Schweiz) und Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen.

DNA-Extraktion aus Zellen: QIAamp DNA Mini Kit

RNA-Extraktion aus Zellen:	RNAeasy Bacteria Kit
Reverse Transcription:	iScript cDNA Synthesis Kit
PCR Amplifikat aufkonzentrieren:	QIAquick PCR purification Kit
Polymerasekettenreaktion (PCR):	AccuPrime Taq DNA Polymerase System Long Range PCR
Protease Quantifizierung:	Protease Assay Kit
Proteinkonzentration bestimmen:	BioRad Protein Assay RC DC Protein Assay
Färbung:	Silver Stain Plus SYPRO Orange Stain Broad Range SYPRO Ruby

2.7 Oligonukleotide

Tabelle 2.3: *Verwendete Oligonuklotide für die quantitative RT-PCR*

Bezeichnung	Sequenz
<i>asp23real2.for</i>	TCCAACCTTCTACAGATACGCC
<i>asp23real3.rev</i>	AAAATTGCAGGTATTGCAGC
<i>gyrB-real1.for</i>	CTGACAATGGCCGTGGTATTC
<i>gyrB-real1.rev</i>	GAAGATCCAACACCGTGAAGAC
<i>SE0185-real1.for</i>	CCGAGTTCACGAAGCCAATG
<i>SE0185-real2.rev</i>	TGTTCTGCCATAACGCTTGTG
<i>SE2219-real1.for</i>	ACCTGGTGTAGGCGGAGATG
<i>SE2219-real2.rev</i>	GCTGCTTTGTTTCGGAATACCT
<i>SE1543-real1.for</i>	TTCCTCGCCACCAATATAGAC
<i>SE1543-real1.rev</i>	GTCACCAAACGAACATAATCAAC
<i>SE0184-real1.for</i>	CGATGTTGCTTTGTGGTTGGAAG
<i>SE0184-real1.rev</i>	CAATAGTGCTCACGCCGACTC
<i>sarA-real1.for</i>	AAAAACGTAATGAACACGATG
<i>sarA-real1.rev</i>	TGTGATACGGTTGTTTACTCG
<i>RNAIII-real1.for</i>	ATTAGTGAGTTGTTGAGCCATC
<i>RNAIII-real1.rev</i>	TGAGTCCAAGGAACTACAGC

2.8 Bakterienstämme

Tabelle 2.4: *Verwendete Bakterienstämme*

Stamm	Bemerkung	Referenzen
Wildtypstämme		
<i>S. epidermidis</i> 1457	Stark Biofilm-positives Isolat von einem infizierten zentralvenösen Katheter	100, 105
<i>S. epidermidis</i> 8400	Biofilm-positives Blutkulturisolat	105
<i>S. epidermidis</i> 1057	Biofilm-positives Isolat von einem infizierten zentralvenösen Katheter	124

Stamm	Bemerkung	Referenzen
<i>S. epidermidis</i> Deletionsmutanten (homologer Genaustausch)		
1457 <i>rsbU</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion des Gens <i>rsbU</i>	86
1457 <i>rsbV</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion des Gens <i>rsbV</i>	86
1457 <i>rsbW</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion des Gens <i>rsbW</i>	86
1457 <i>sigB</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion des Gens <i>sigB</i>	86
1457 <i>rsbUVW</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion der Gene <i>rsbU</i> , <i>rsbV</i> und <i>rsbW</i>	86
1457 <i>rsbUVWsigB</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion der Gene <i>rsbU</i> , <i>rsbV</i> , <i>rsbW</i> und <i>sigB</i>	86
8400 <i>rsbU</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbU</i> in <i>S. epidermidis</i> 8400	86
8400 <i>rsbV</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbV</i> in <i>S. epidermidis</i> 8400	86
8400 <i>rsbW</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbW</i> in <i>S. epidermidis</i> 8400	86
8400 <i>sigB</i>	Transduktante von 1457 <i>sigB</i> in <i>S. epidermidis</i> 8400	86
8400 <i>rsbUVW</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbUVW</i> in <i>S. epidermidis</i> 8400	86
8400 <i>rsbUVWsigB</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbUVWsigB</i> in <i>S. epidermidis</i> 8400	86
1057 <i>rsbU</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbU</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057	81
1057 <i>rsbV</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbV</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057	81
1057 <i>rsbW</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbW</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057	81
1057 <i>sigB</i>	Transduktante von 1457 <i>sigB</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057	81
1057 <i>rsbUVW</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbUVW</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057	81
1057 <i>rsbUVWsigB</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbUVWsigB</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057	81

2.9 Datenbanken und Programme

DNA Sequenzen wurden mit den Programmen HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources; EMBL, Heidelberg) oder Vector NTI (InforMax, Oxford, UK) bearbeitet und analysiert. Für Homologiesuchen wurden die Sequenzen mittels BLAST und BLASTp^{2, 110} mit den Datenbanken des European Molecular Biology Laboratory (EMBL, www.embl.de), des National Centers for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) verglichen. Graphiken der Alignements wurden mit Hilfe von Vector NTI erstellt. Primersequenzen für die quantitative RT-PCR wurden mit dem Programm Beacon Designer 2 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, Ca, USA) generiert. Die 1D und 2D SDS Gele wurden mit Quantity One und PDQuest (BioRad, München, Deutschland) aufgenommen und ausgewertet. Peptide Mass Fingerprint Suchen wurden auf der Homepage von Matrix Science mit dem MASCOT Algorithmus durchgeführt (www.matrixscience.com).

3 Methoden

3.1 Anzuchtbedingungen

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte auf Blutagarplatten bei 37 °C in einem Brutschrank oder bei Flüssigkulturen in einem Schüttelinkubator mit 200 Upm. Die langfristige Lagerung erfolgte in 500 µl Einfriermedium bei -80 °C.

3.2 Kulturüberstandgewinnung

Zur Gewinnung des Proteinüberstandes der Bakterienkultur wurde eine Kolonie von einer Blutagarplatte in 3 ml TSBØ suspendiert und 4 bis 5 h bei 37 °C und 200 Upm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl dieser Vorkultur in 10 ml TSB in einer 9 cm Petrischale (Nunc) folgte eine 7 bis 24 h Inkubation bei 37 °C. Die gewonnene Hauptkultur wurde in Falcontubes überführt und 2 mal 30 min bei 4 °C und 6238 x g zentrifugiert. Sollte später noch eine Zellzahlbestimmung erfolgen, so wurde vor dem Zentrifugieren mit einem sterilen Zellschaber der Biofilm vollständig vom Boden der Petrischale gelöst und mit in das Falcontube überführt.

3.3 Probenaufkonzentrierung

3.3.1 Ethanol Fällung

Der zellfreie Kulturüberstand wurde im Volumenverhältnis 1:1 mit eiskaltem Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine 30 min bei 4 °C und 6238 x g pelletiert und das gewonnene Pellet im Vakuumschrank bei 35 °C 30 bis 45 min getrocknet. Das getrocknete Pellet konnte nun direkt in der gewünschten Menge an SDS PAGE Laemmli Probenpuffer oder H₂O aufgenommen werden.

3.3.2 Trichloressigsäure Fällung

Der zellfreie Kulturüberstand wurde im Volumenverhältnis 2:1 mit kalter TCA Lösung vermischt und 1 h bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die Probe gut geschüttelt und über Nacht bei 4 °C gefällt. Die so behandelten Proteine konnten nun 30 min bei 4 °C und 6238 x g zentrifugiert werden. Das Pellet wurde 2 mal in jeweils 1 ml -20 °C kalter Waschlösung resuspendiert und anschließend 15 min bei 4 °C und 6238 x g erneut zentrifugiert. Mit einer Pasteurpipette wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, und das gewaschene Pellet in einem Vakuumschrank bei 35 °C 30 bis 45 min lang

getrocknet. Um die Proteine möglichst quantitativ wieder in Lösung zu bekommen, wurde das getrocknete Pellet im Probenpuffer homogenisiert, 1 h im Schüttelwasserbad bei 25 °C und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch 15 min Ultrazentrifugation bei 40000 Upm (ca. 86553 x g) und 8 °C entfernt.

3.3.3 Centriprep Präparation

Um Proteine für Enzymaktivitätsmessungen ohne Aktivitätsverlust aufzukonzentrieren, wurde eine Probenkonzentrierung mit dem Filtersystem Centriprep YM-10 (Millipore, USA) durchgeführt. Das Filtersystem wurde mit 10 ml dest. H₂O gewaschen und mit Kulturüberstand aus insgesamt zwei 9 cm Zellkulturschalen beladen und 45 min bei 4 °C und 2889 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, der Kulturüberstand nachgefüllt und erneut zentrifugiert. Dies wurde solange wiederholt, bis das Ausgangsvolumen von 20 ml auf ca. 0,5 ml konzentriert war. Es wurde somit um den Faktor 1:40 aufkonzentriert. Um sicherzustellen, dass die Vergleichsstämme um den gleichen Faktor aufkonzentriert sind, wurde das Gewicht der zu vergleichenden Proben auf einer Feinwaage bestimmt und mit H₂O aufeinander angeglichen.

3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.4.1 Methode nach Bradford

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung diente das BioRad Protein Assay Kit, welches nach Herstellerangaben benutzt wurde. Es wurde eine geeignete Standardkurve aus *bovine serum albumin* (BSA, BioRad) hergestellt und 6 µl von der zu messenden Probe mit H₂O auf ein Volumen von 1,6 ml aufgefüllt. Zu dieser Verdünnung wurden nun 400 µl des konzentrierten Bradford Reagenzes hinzugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde bei 595 nm in einem Photometer gemessen (Beckmann, BioRad).

3.4.2 Methode nach Lowry

Um Proteinkonzentrationen von Proben, die bereits in Probenpuffer aufgenommen waren, zu bestimmen, wurde das RC DC Protein Assay Kit (BioRad) nach Herstellerangaben benutzt. Es wurde eine geeignete Standardkurve mit *bovine serum albumin* (BSA) hergestellt. Anschließend wurden 5 µl der zu messenden Probe auf 25 µl mit dem benutzten Probenpuffer aufgefüllt. Nun wurde die Probe mit 125 µl des Reagenz I 1 min inkubiert, anschließend wurde 125 µl Reagenz II hinzugegeben und

5 min bei 16.100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, und erneut 125 µl Reagenz I und 40 µl Reagenz II zugegeben. Die zentrifugierte Probe wurde im Vakuumschrank bei 30 °C getrocknet. Es wurde das Reagenz A' aus 5 µl DC Reagenz S und 250 µl DC Reagenz A hergestellt, und die Probe vollständig in diesem Reagenz A' gelöst. Die Probe wurde mit 1 ml Reagenz B vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde bei 750 nm in einem Photometer gemessen.

3.5 Zellzahlbestimmung

Um verschiedene Bakterienstämme qualitativ und quantitativ in ihrem Sekretom miteinander vergleichen zu können, ist es nötig, diesen Vergleich zellzahladaptiert durchzuführen, um die stammspezifischen Unterschiede pro Zelle untersuchen zu können. Hierzu muss von jeder Probe des Versuches die ihr zu Grunde liegende Zellzahl bestimmt werden. Beim Ernten der Hauptkultur (siehe 3.2) wurde der Biofilm vollständig mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Petrischale gelöst und mit in das Falcontube überführt. Die abzentrifugierten Zellen wurden in 2 ml sterilem PBS aufgenommen und 10 s mit Ultraschall 30% Amplitude behandelt. Die Zellsuspension wurde 1:10.000 verdünnt und in einer 1:10 Verdünnungsreihe auf TSB Agarplatten im dreifachen Ansatz aufgetropft. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C konnten in der geeigneten Verdünnungsstufe die einzeln stehenden Kolonien gezählt und aus den dreifach Ansätzen der Mittelwert gebildet werden. Anhand der so bestimmten Zellzahl konnten zu vergleichende Proben ins Verhältnis gesetzt werden und Proteinkonzentrationen in den verschiedenen Versuchen zellzahladaptiert eingestellt werden.

3.6 Eindimensionale SDS PAGE Elektrophorese

3.6.1 Elektrophorese mit Gelen aus Eigenherstellung

Die SDS PAGE Gele wurden nach Angabe des Herstellers mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen nach folgender Zusammensetzungen gegossen:

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Gele aus Eigenherstellung

	Trenngel			Sammelgel
	15%	12%	7,50%	4%
Angaben in ml:				
Acrylamid	25	20	12,5	1,3
Aqua dest.	11,5	16,75	24,25	6,1
1,5 M Tris-HCL, pH 8,8	12,5	12,5	12,5	
0,5 M Tris-HCL, pH 6,8				2,5
10 % (w/v) SDS	0,5	0,5	0,5	0,1
10 % Ammoniumpersulfat	0,25	0,25	0,25	0,05
TEMED	0,025	0,025	0,025	0,01

Die Glasplatten, passend für die Protein II xi Cell (Gel Größe 16 x 16 cm), wurden mit Ethanol gereinigt und in den Halterungen mit 1,5 mm Spacern zusammengesetzt. Die frisch angesetzte Lösung für das Trenngel wurde mit einer Glaspipette blasenfrei zwischen die Glasplatten pipettiert und mit 300 μ Isobutanol bedeckt. Nach ca. 1 h wurde das Isobutanol abgegossen und das Gel mit H₂O gespült. Auf das gewaschene Trenngel wurde nun der Ansatz für das Sammelgel pipettiert und je nach Bedarf 15 x 1,5 mm oder 10 x 1,5 mm Taschenkämme eingesetzt. Nach einer Aushärtungszeit von 1 h war das Gel gebrauchsfertig. Die Proben wurden mindestens im Verhältnis 1:4 in SDS Laemmli Probenpuffer⁹² verdünnt. Anschließend wurden die Proben für 4 min auf 95 °C erhitzt und in die Geltaschen pipettiert. Abhängig, mit welcher Färbetechnik das Gel später gefärbt werden sollte, wurden unterschiedliche Größenstandards auf das Gel mit aufgetragen. Für Silber- oder Coomassi-Färbungen wurde der Precision Plus Protein Standards, Dual Color (BioRad) Größenstandard verwendet. Sollte das Gel später mit SYPRO Orange gefärbt werden, wurde der SYPRO Orange Stain Broad Range (BioRad) Größenstandard verwendet. Die beladenen SDS PAGE Gele wurden in Tris-Glycin Puffer für ca. 1,5 h mit einer konstanten Stromstärke von 25 mA gefahren. Sobald die Proteine das Trenngel erreicht hatten, wurde der Strom auf konstant 35 mA eingestellt, und mit diesen Einstellungen das Gel zu Ende gefahren. Das SDS PAGE Gel konnte sodann aus den Glasplatten herausgelöst, gewaschen und gefärbt werden.

3.6.2 Criterion Fertiggele

Die Proben wurden wie beschrieben kultiviert und geerntet (siehe 3.2). Anschließend Ethanol gefällt (siehe 3.3.1), in 100 μ l H₂O aufgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 3.4.1). Anhand der gemessenen Proteinkonzentration wurden 25 bis

32 µg der Proben mit H₂O auf ein Volumen von 35 µl eingestellt und mit 2,5 µl XT Reducing Agent und 12,5 µl XT Sample Buffer (BioRad) versetzt. Die so aufbereiteten Proben wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Es wurden dieselben Größenstandards wie bei der Elektrophorese mit Gelen aus Eigenherstellung verwendet. Die Gele wurden in MOPS Puffer mit einer konstanten Spannung von 200 V gefahren. Anschließend wurde das Gel gewaschen und gefärbt.

3.7 Zweidimensionale SDS PAGE Elektrophorese

Zur 2D-Gelelektrophorese wurden die Kulturüberstände mit einer TCA Fällung aufkonzentriert (siehe 3.3.2) und in 200 µl Harnstoffprobenpuffer aufgenommen. Die präparativen Gele wurden mit 250 bis 300 µg beladen. Die Beladung der Gele erfolgte zellzahladaptiert (siehe 3.5). Sollten nach der Elektrophorese Proteinproben mittels Massenspektroskopie analysiert werden, so wurden für einen Versuch 3 bzw. 5 getrennte Gele pro Stamm gefahren. Die Proteinprobe wurde in ein Eppendorfcup überführt und mit Harnstoffprobenpuffer auf ein Volumen von 185 µl eingestellt. Die so vorbereiteten Proben konnten nun durch *in-gel active* Rehydration auf IPG Streifen beladen und isoelektrisch fokussiert werden. Hierzu wurden die Proben in die Fokussierhalterung der Protean IEF cell pipettiert, und mit Pinzetten die IPG Streifen mit dem gewünschten pH Intervall vorsichtig auf die Probe gelegt. Anschließend wurden die IPG Streifen für 16 h bei 20 °C und 50 V rehydriert. Nach ca. 45 bis 60 min wurden die IPG Streifen mit 2 ml Mineralöl beschichtet, um ein Eintrocknen zu verhindern. Im Anschluss wurden die Streifen mit folgendem Programm fokussiert.

200 V für 1 h
500 V für 1 h
1000 V für 1 h
Gradient von 1000 V bis 8000 V in 30 min
8000 V für x h, Zeit ist abhängig vom gewählten pH Intervall:
pH 3-6 für 4,5 h
pH 3-10 L für 3 h
500 V für 1 h

Sobald die 8000 V erreicht worden waren, wurden mit H₂O befeuchtete Filterpapierstreifen zwischen die IPG Streifen und den Elektroden gelegt. Die Fokussierzeit auf der 8000 V Stufe ist davon abhängig, über wie viele pH Stufen die Probe fokussiert werden soll. Je kleiner der zu fokussierende pH Bereich ist desto länger muss die Fokussierzeit gewählt werden. Für die benutzten IPG Streifen mit einem pH Bereich von 3-6 und 3-10 wurden Fokussierzeiten von 4,5 h bzw. 3 h

evaluiert. Nach Abschluss der Fokussierung wurden die IPG Streifen aus der Fokussierhalterung entnommen, auf einem Filterpapier von Mineralöl befreit und mit der Gelseite nach oben in ein Rehydration/Equilibrationstray gelegt. Die IPG Streifen wurden nun jeweils 20 min mit der Equilibrationslösung I und II inkubiert, anschließend mit dem für die Gelelektrophorese benutzten Laufpuffer abgespült und mit Overlay Agarose in den vorgesehenen Bereich der SDS Gele (Criterion, BioRad) eingegossen. Die SDS PAGE Gele wurden mit einer konstanten Spannung von 200 V gefahren. Die fertigen Gele wurden abschließend mit SYPRO Ruby gefärbt (siehe 3.8.2).

3.8 Gelfärbungen

3.8.1 SYPRO Orange

Die fertigen Gele wurden nach der Elektrophorese für einige Minuten mit H₂O gespült und in sauberen Kunststoffgefäßen gelagert. Das Fertigkonzentrat wurde nach Herstellerangaben im Verhältnis 1:5000 mit 7,5 % Essigsäure verdünnt. Zur Färbung von Criterion Fertiggelelen wurden 50 ml Lösung angesetzt, 16 x 16 cm Gele aus Eigenherstellung wurden in 200 ml Lösung gefärbt. Die Färbegefäße wurden mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt und über Nacht auf einem Kipptisch gelagert. Nach Abschluss der Färbung wurden die Gele kurz mit 7,5 % Essigsäure gewaschen und in der Geldokumentationskammer Chemidoc XRS abfotografiert.

3.8.2 SYPRO Ruby

Die fertigen 2D SDS PAGE Gele wurden in sauberen Kunststoffgefäßen gelagert und 30 min in der Fixierlösung (siehe 2.3) fixiert. Anschließend wurden die Criterion Fertiggele in 50 mL SYPRO Ruby Reagenz über Nacht auf einem Kipptisch mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt gefärbt. Nach Abschluss der Färbung wurden die Gele in der Geldokumentationskammer Chemidoc XRS abfotografiert. Zeigte sich bei den Aufnahmen eine störende Färbung des Hintergrundes, wurden die Gele zusätzlich 30 min in einer 7 % Essigsäure Lösung zur Entfärbung des Hintergrundes gewaschen.

3.8.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde mit dem Silver Stain Plus Kit (BioRad) nach Anleitung durchgeführt. Die fertigen Gele wurden gründlich in H₂O gewaschen und in sauberen Gefäßen gelagert. Anschließend wurden die Gele in einer Lösung mit 50 % Methanol, 10 % Essigsäure und 10 % Fixative Enhancer Concentrate für 20 min fixiert. Die so fixierten Gele wurden 2 mal 10 min in H₂O gewaschen und für ungefähr 20 min, je nach

der gewünschten Farbintensität, in der nach Herstellerangaben angesetzten Färbelösung inkubiert. Wurde die gewünschte Färbintensität erreicht, wurde der Färbvorgang mit einer 5 %igen Essigsäurelösung gestoppt und die Gele anschließend ausgewertet.

3.8.4 Coomassiefärbung

Die fertigen Gele wurden gründlich in H₂O gewaschen und in sauberen Färbegefäßen gelagert. Anschließend wurden die Gele vollständig mit Färbelösung bedeckt und auf einem Kipptisch für 1 h inkubiert. Die Färbelösung wurde abgegossen und die Gele in H₂O entfärbt, bis die gewünschte Farbintensität erreicht war. Die gefärbten Gele wurden in Folie eingeschweißt oder auf Filterpapier mit dem Geldryer getrocknet.

3.9 Nativ Gelelektrophorese

Um die lipolytische Aktivität einzelner Banden darzustellen, wurden native SDS PAGE Gele gefahren und auf Tributyrin-Agarplatten inkubiert. Hierzu wurden 12 % SDS PAGE Gele nach Herstellerangaben gegossen (siehe 3.6.1) und die Überstände mit einer Centriprep Präparation aufbereitet (siehe 3.3.3). Die zellzahladaptierten Proben wurden im Verhältnis 1:2 in nativ Probenpuffer aufgenommen und für 5 min auf 35 °C erwärmt. Die Elektrophorese wurde mit einem konstanten Strom von 25 mA für das Sammelgel und mit 35 mA für das Trenngel durchgeführt. Das Gel wurde anschließend in H₂O gewaschen und für mindestens 1 h bis über Nacht im Renaturing Buffer (Invitrogen) inkubiert. Darauf folgte ein 30 min Waschschrift mit dem Developing Buffer (Invitrogen). Das so vorbereitete Gel konnte nun auf ca. 2 mm dicke Tributyrin-Agarplatten (siehe 2.5) gelegt werden. Mit einem angefeuchteten Filterpapier bedeckt wurden die Tributyrin-Agarplatten 4 bis 8 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.10 Massenspektroskopie

3.10.1 Probenaufbereitung

Die zu analysierenden Proteinbanden wurden mit Acetonitril (ACN) bedeckt und für 15 min auf einem Vortex inkubiert. Anschließend wurden die Gelstücke mit einem 100 mM Waschpuffer aus Ammoniumhydrogencarbonat zur Rehydrierung des Gels bedeckt und 10 min auf einem Vortex geschüttelt. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und der Überstand verworfen. Es folgte eine Inkubation in 10 mM DTT für 50 min bei 57 °C mit einem erneuten Waschschrift mit ACN.

Anschließend folgte ein Waschschrift mit 55 mM Iodoacetamid für 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit erneut zweimaligem Waschen abwechselnd mit ACN für 15 min und mit Waschpuffer für 10 min, sowie abschließend noch einmal mit ACN für 15 min. Mit einer 5 min Vakuumzentrifugation wurde der Überstand entfernt.

Im Weiteren wurden die Gelstücke in einer 8 ng/μl Trypsinlösung in einem 50 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer bei 4 °C für 45 min quellen gelassen. Die Gelstücke wurden mit einer 50 mM Ammoniumhydrogencarbonatpufferlösung gewaschen, der Überstand verworfen, erneut mit Waschlösung überschichtet und die geschlossenen Reaktionsgefäße zum vollständigen Verdau der Proteine über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Abschließend erfolgte die zweimalige Extraktion mit einem Lösungsgemisch aus 5 % Methansäure und 65 % ACN für 20 min und für 15 min mit H₂O. Nach einem abschließenden Extraktionsschritt mit 100 % ACN wurden alle Überstände vereinigt.

Die vereinigten Überstände wurden 4 - 5 h im Vakuum eingedampft. Um die getrockneten Proben wieder in Lösung zu bringen, wurden diese mit 10 μl eines wässrigen Lösungsgemisches aus 5 % Methanol und 5 % Methansäure für 15 min auf einem Vortex inkubiert.

3.10.2 Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS)

Für jede Probe wurde eine vergoldete Glaskapillare mit 10 μl einer Lösung aus 65 % Methanol und 5 % Methansäure gespült. Hiernach wurde eine ZipTip - Spitze (Millipore) mit einer Lösung aus 65 % Methanol und 5 % Methansäure und anschließend mit einer Lösung, bestehend aus 5 % Methanol und 5 % Methansäure, äquilibriert. Die Proben wurden durch mehrfaches auf- und abpipettieren an der äquilibrierten ZipTip - Spitze gebunden und anschließend mit der Lösung aus 5 % Methanol und 5 % Methansäure gewaschen. Mit 10 μl einer 65 % Methanol und 5 % Methansäure Lösung wurden die Proben wieder aus der ZipTip – Spitze eluiert und mit einem Gelloadertip in die Glaskapillare überführt.

Die so beladene Glaskapillare wurde in die Ionenquelle des Massenspektrometers eingespannt. Die durch kollisionsinduzierte Fragmentierung der Peptide erhaltenen MS/MS-Spektren wurden anhand des Mascot MS/MS-Ionen-Suchalgorithmuses (Matrix Sciences, London, GB) ausgewertet.

3.10.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Für die Aufnahme von Laserdesorptionsmassenspektren (MALDI-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization with Time of Flight Detector) wurde die Extraktion der Proben aus dem Gel und deren Probenvorbereitung wie unter 3.10.1 beschrieben durchgeführt. 0,5 µl (5 %) der Probe wurden mit 0,5 µl Matrixlösung vermischt und auf ein MALDI-Target aufgetragen. Die Messungen wurden mit dem MALDI Massenspektrometer REFLEX IV (Bruker, Bremen, BRD) durchgeführt. Die ermittelten Daten, der sogenannte Peptide Mass Fingerprint des untersuchten Proteins, wurden anhand des Mascot MS/MS-Ionen-Suchalgorithmusses (Matrix Sciences, London, GB) zur Datenbankrecherche verwendet.

3.11 DNA Präparation

Für die Präparation chromosomaler DNA wurde das QIAamp DNA Mini Kit verwendet. Die Stämme wurden über Nacht in 2 ml BHI für 16 bis 20 h bei 37 °C kultiviert. 500 µl der Kultur wurden durch Zentrifugation (10 min, 16.000 Upm, Raumtemperatur) geerntet, und das Pellet anschließend in 180 µl ATL Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 5 µl Lysostaphin (1 500 U/ml) wurde die Zellsuspension für 30 min bei 37 °C inkubiert. Eine weitere Stunde wurde die Probe nach Zugabe von 20 µg Proteinkinase K bei 56 °C inkubiert. Die Probe wurde anschließend mit 200 µl AL Buffer versetzt, für 15 s gevortext und 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol wurde die Probe erneut für 15 s gevortext und in der Spin Column 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Auf die Spincolumn wurden 500 µl AW1 Lösung gegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit der AW2 Lösung wiederholt, und die Säule für 3 min bei 20 000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, und die Säule mit 200 µl AE Puffer für 1,5 min inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 6000 x g wurde das Eluat erneut auf die Säule pipettiert, für 1 min inkubiert und für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Die DNA Präparation wurde auf einem Agarosegel kontrolliert und anschließend die DNA bei 4 °C gelagert.

3.12 RNA Präparation

Aus einer Übernachtskultur in TSBØ wurden 100 µl in 10 ml TSB verimpft und in einer 9 cm Zellkulturschale bei 37 °C kultiviert. Jeweils nach 7 und 24 h wurden die Platten auf Eis gekühlt, die Zellen mit einem sterilen Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst und gemeinsam mit dem Medium in ein 50 ml Falcon-Röhrchen auf Eis

überführt. Die Zellen wurden durch 5 min Zentrifugation bei 4 °C und 4332 x g geerntet, und der Mediumüberstand sorgfältig entfernt. Die Peletts von Stämmen mit einem Biofilm-positiven Phänotyp wurden mit 1,5 ml eiskaltem, sterilem PBS überschichtet, Biofilm-negative Stämme wurden mit 2,3 ml eiskaltem, sterilem PBS überschichtet. Zur Auftrennung größerer Zellverbände wurden die Zellen mit Ultraschall auf Eis behandelt (10 s, Microtip, 70 % Amplitude). Je 1,5 ml der Zellsuspension wurde zur Stabilisierung der RNA zu 3 ml RNAeasy Lösung (Qiagen) gegeben und für mindestens 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 10 min bei Raumtemperatur und 6238 x g pelletiert. Zur Entfernung der extrazellulären Matrix wurden die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert und auf Eis zweimalig, mit einem zwischengeschalteten Waschschrift (10 ml PBS), mit Ultraschall behandelt (3 x 30 s mit jeweils 30 s Pause). Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur und 6238 x g pelletiert und der Überstand verworfen.

Die Zellen wurden in 180 µl TE Puffer resuspendiert, mit 20 µl Lysostaphinstamm-
lösung (1.500 U/ml) versetzt und für 10 min bei 37 °C unter Schütteln auf einem Heiz-
block inkubiert. Der Probe wurde 700 µl RLT Puffer mit Mercaptoethanol (1 ml RLT
Puffer versetzt mit 10 µl Mercaptoethanol) zugegeben und für 15 s auf einem Vortex
inkubiert. Der Ansatz wurde in ein 2 ml Lysing MatrixB Röhrchen überführt und
dreimalig für je 20 s bei maximaler Geschwindigkeit in einem FastPrep FP120 Gerät
homogenisiert. Das Lysing MatrixB Röhrchen wurde anschließend für 2 min bei Raum-
temperatur und 16.000 x g zentrifugiert, und der Überstand in ein neues
Eppendorfröhrchen überführt. Der Probe wurde 470 µl Ethanol absolut zugegeben,
gründlich gemischt, auf eine RNeasy Spinsäule gegeben und für 15 s bei Raum-
temperatur und 8.000 x g, zentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit 700 µl Puffer RW1
und zweimal mit je 500 µl Puffer RPE gewaschen. Die RNA wurde mit 50 µl RNase
freiem Wasser von der Säule eluiert, und die Menge der Gesamt-RNA durch Messung
der Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt.

3.13 Transkriptionsanalyse

Zur Entfernung von DNA Kontaminationen in den RNA Präparationen wurden vor der
quantitativen RT-PCR 4 µg Gesamt-RNA mit 4 U DNase in 20 µl Endvolumen für
45 min bei 37 °C inkubiert. Der DNase Verdau wurde 1:10 verdünnt und 5 µl dieser
Verdünnung für die Erststrangsynthese mit den iScript cDNA Synthese Reagenzien
nach Herstellerangaben eingesetzt. Hierzu wurden 1 µl iScript Reverse Transkriptase,

4 µl iScript Reaction Mix, 10 µl Nuklease freies Wasser und 5 µl Template versetzt. Der Ansatz wurde in einem Thermocycler mit folgendem Programm behandelt: 5 min mit 25 °C, 45 min mit 42 °C, 5 min mit 85 °C, 4 °C. Das Endvolumen von 20 µl der cDNA Reaktion wurde nochmals 1:4 verdünnt, und jeweils 2 µl dieser Lösung als Template für die quantitative RT-PCR eingesetzt. Zu dem Template wurden 12,5 µl iQ SYBR Green Supermix, 8,5 µl H₂O und jeweils 1 µl des *forward* und *reverse* Primers hinzugegeben. Die quantitative RT-PCR wurde in einem iCycler iQ Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 95 °C für 3 min; 35 × [94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 30 s], anschließend 4 °C zur Lagerung. Alle quantitativen RT-PCR Analysen wurden jeweils im Dreifachansatz mit drei unabhängigen RNA Präparationen durchgeführt. Die relativen transkriptionellen Unterschiede innerhalb eines Experimentes wurden mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode mit *gyrB* als Referenzgen berechnet⁹⁵ (siehe 9). Zusätzlich wurden die basalen Transkriptionsdaten berechnet. Hierzu wurden die gemessenen Transkriptionsniveaus der Stämme 1057, 8400 und ihrer Mutanten gegen die Stämme 1457 und 1457*sigB* als Referenzstamm verrechnet.

3.14 Polymerasekettenreaktion

3.14.1 Long Range PCR

Das *aap* Gen der Stämme 1457 und 1047 wurde mit der Long Range PCR vervielfältigt. Hierzu wurde nach folgendem Schema der Ansatz vorbereitet:

Tabelle 3.1 Pipettierschema der Long Range PCR

Master Mix 1:		Master Mix 2:	
H ₂ O	18 µl	H ₂ O	19,25 µl
dNTP	2 µl	Puffer 3	5 µl
Primer for	1,5 µl	Poly mix	0,75 µl
Primer rev	1,5 µl		

In jeden Ansatz wurden 2 µl Template eingesetzt.

Der Master Mix 1 und 2 wurden miteinander vermischt und in einem Thermocycler mit folgendem Programm weiterverarbeitet: 94 °C für 2 min, 10 x [94 °C für 15 s, 58 °C für 30 s, 68 °C für 5 min], dann 20 x [94 °C für 15 s, 58 °C für 30 s, 68 °C für 5 min, +20 s] 68 °C für 7 min, 4 °C. Die Proben wurden daraufhin mit dem QIAquick PCR Purification Kit umgepuffert. Hierzu wurde die Probe in 5 Volumen PB Puffer verdünnt und in einer QIAquick colum für 1 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, die

Säule mit 750 µl PE Puffer beladen und erneut 1 min zentrifugiert. Die zentrifugierte Säule wurde in ein frisches Eppendorfcup gestellt, mit 30 µl H₂O beladen und für 1 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden 5 µl dieser aufgereinigten DNA auf einem 0,75 % Agarosegel aufgetrennt.

3.14.2 AccuPrime Taq DNA Polymerase System

Zur Vervielfältigung des *aap* Gens im Stamm 8400 wurde das AccuPrime Taq DNA Polymerase System verwendet. Das Long Range PCR System zeigte sich bei Vorversuchen als ungeeignet beim Stamm 8400. Hierzu wurde für eine 50 µl Reaktion folgender Ansatz angesetzt: 5 µl Puffer II, 1,5 µl Primer *for*, 1,5 µl Primer *rev*, 1 µl Taq Polymerase, 37 µl H₂O, 5 µl Template. In einem Thermocycler wurde der Ansatz mit folgendem Programm weiterverarbeitet: 94 °C für 2 min, 35 x [94 °C für 30 s, 60 °C für 30 s, 68 °C für 6 min], 68 °C für 7 min, 4 °C. Drei Tubes dieser Probe wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit umgepuffert und in einem Tube wieder aufgenommen. 20 µl dieses aufkonzentrierten Amplifikates wurden auf einem 0,75 % Agarosegel aufgetrennt.

3.15 Agarosegel-Elektrophorese

Die hochreine Agarose wurde in 100 ml 0,5 x TBE Puffer aufgeköcht, abgekühlt und mit 3 µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Die flüssige Agarose wurde in einen Gelträger gegossen und verfestigt. Der Gelträger wurde sodann in die mit 0,5 x TBE Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer überführt, die Proben mit 4 µl Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen gegeben. Wurde die Probe mit dem Aufreinigungskit QIAquick PCR Purification umgepuffert, musste die Probe zuvor mit 4 µl Puffer H versetzt werden. Als Größenstandard wurde λ-DNA*Hind*III gespalten (Roche) mitgeführt. Durch Anlegen einer Spannung von 20 bis 120 V wurde die zu analysierende DNA aufgetrennt und in einer UV-Dokumentationskammer fotografiert.

3.16 Proteasescreening auf Casein-Agarplatten

Der Casein-Agar wurde ca. 3 mm dick in 9 cm Ø Petrischalen gegossen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die zu untersuchenden Stämme wurden in einer TSBØ Vorkultur für 4 h kultiviert. Anschließend wurden 5 bzw. 10 µl der Vorkultur auf die Casein-Agarplatten aufgetropft. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und in der Geldokumentationskammer fotografiert. Zur besseren

Darstellung der lysierenden Proteasen wurde das Casein im Agar mit einer 10 % Essigsäurelösung denaturiert. In die Casein-Agarplatten konnten verschiedene Proteaseinhibitoren eingegossen werden. Es wurden 0,2 mM EDTA und 0,8 mM E64 als Proteaseinhibitoren in den Casein-Agarplatten Tests verwendet.

3.17 Quantifizierung der Proteaseaktivität

Eine quantitative Proteaseaktivitätsbestimmung wurde mit dem Protease Assay Kit (Calbiochem) nach Anleitung durchgeführt. Die Kulturüberstände wurden mit einer Centriprep Präparation (siehe 3.3.3) aufkonzentriert. Die Probenvolumina wurden gegen die Mutation mit Inaktivierung von σ^B zellzahladaptiert bestimmt und mit H₂O auf 100 μ l aufgefüllt. Die so eingestellten Proben wurden mit 50 μ l FTP-Casein und 50 μ l Inkubation Puffer vermischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 500 μ l von einer 5 %igen TCA Lösung gestoppt, für 30 min inkubiert und anschließend für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und mit 600 μ l Assay Buffer versetzt. Die Absorption wurde bei 492 nm in einem Photometer gemessen.

3.18 Quantifizierung der Lipaseaktivität

Zur Lipasequantifizierung wurden die Kulturüberstände mit einer Centriprep Präparation aufkonzentriert (siehe 3.2, 3.3.3.) Die eingesetzten Probenvolumina wurden zellzahladaptiert gegen die Mutation mit Inaktivierung von σ^B eingestellt. Zur Messung wurden 2 ml einer auf 40 °C vorgewärmten Tributyrinlösung mit 100 μ l der zu messenden Probe vermischt. Der Verlauf der Absorption wurde bei 37 °C in einem Beckman Photometer bei 450 nm für 60 min verfolgt und dokumentiert. Um einen gleichmäßigen Abbau des Tributyrins in der Lösung zu gewährleisten, wurde alle 5 bis 10 min die Probe gut durchgemischt. Zur Auswertung wurde aus der erhaltenen Datenreihe die Halbwertszeit des Tributyrins berechnet.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, den regulativen Einfluss des alternativen Sigmafaktors σ^B in *Staphylococcus epidermidis* auf extrazelluläre Proteine zu untersuchen. Hierzu sollte die Expression extrazellulärer Proteine in den Wildtypstämmen *S. epidermidis* 1457, 1057 und 8400 mit den isogenen Mutanten 1457sigB, 1057sigB und 8400sigB verglichen werden. Die σ^B abhängige Regulation einzelner Proteine sollte anschließend mittels Transkriptionsanalyse bestätigt werden. Im Folgenden werden positiv, differentiell und negativ regulierte Proteine im extrazellulären Raum unterschieden.

4.1 Durch σ^B negativ regulierte Proteine

4.1.1 Identifikation von negativ regulierten Proteinen

Zur Identifikation von durch σ^B negativ regulierten, extrazellulären Proteinen wurden die Proteine im Kulturüberstand der *S. epidermidis* Stämme 1457, 1057 und 8400 sowie deren isogenen Mutanten 1457sigB, 1057sigB und 8400sigB mittels einer Elektrophorese mit 15 % SDS PAGE Gelen (siehe 3.6.1) aufgetrennt. Auf den gefärbten SDS Gel konnten in den Mutanten überexprimierte Proteine vornehmlich in dem Größenbereich von 20 bis 40 kDa identifiziert werden. Bei den Mutanten 1457sigB und 1057sigB zeigten sich mehrere Banden (ca. 38 kDa, ca. 26 kDa, ca. 20 kDa und ca. 18 kDa), welche im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypstämmen deutlich stärker exprimiert wurden (Abbildung 4.1). In dem Stamm 8400sigB, sowie dem dazugehörigen Stamm 8400 konnten keine vergleichbaren Banden in diesen Größenbereichen gefunden werden. Bei den Mutanten 1057sigB und 8400sigB zeigte sich eine im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypstämmen stärker exprimierte Bande mit einer Größe von ca. 29 kDa. Eine vergleichbare Bande konnte im Hintergrund von *S. epidermidis* 1457 nicht identifiziert werden. Des Weiteren zeigte sich bei dem Stamm 1057sigB eine weitere im Vergleich zum Wildtyp überexprimierte Bande von ca. 27 kDa, welche weder im Hintergrund von 1457 noch 8400 detektiert werden konnte (Abbildung 4.1).

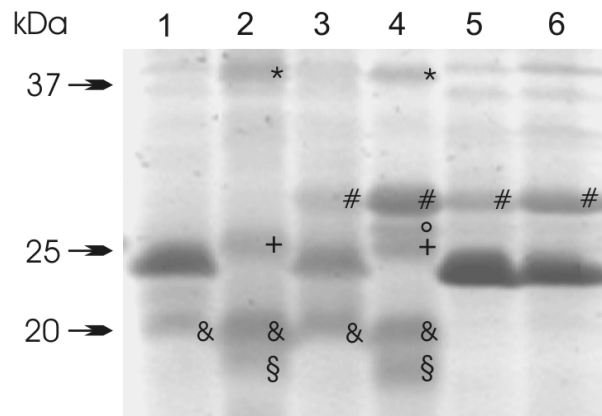


Abbildung 4.1: Durch σ^B negativ regulierte Proteine.

SDS-PAGE (15 %ig) von Proteinen aus dem Kulturüberstand der Stämme 1457 (Spur 1), 1457*sigB* (Spur 2), 1057 (Spur 3), 1057*sigB* (Spur 4), 8400 (Spur 5) und 8400*sigB* (Spur 6). Im Hintergrund von 1457 und 1057 zeigten sich in den σ^B Mutanten stärker exprimierte Proteine in den Größenbereichen von 38 (*), 26 (+), 20 (&) und 18 (§) kDa. Im Hintergrund von 1057 und 8400 zeigten sich in den σ^B Mutanten stärker exprimierte Proteine im Größenbereich von 29 (#) kDa. Im Hintergrund von 1057*sigB* zeigte sich zusätzlich eine stärker exprimierte Bande im Größenbereich von 27 (°) kDa. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Experiment dar.

Interessanterweise zeigten sich für einige Proteinbanden in der SDS Gelelektrophorese mit 7,5 %igen Gelen veränderte Laufeigenschaften. Die in 15 %igen Gelen mit einer Größe von ca. 27 und ca. 26 kDa bestimmten Banden in den Stämmen 1057, 8400 und den isogenen σ^B Mutanten zeigten nun eine relative Größe von ca. 23 und ca. 21 kDa (Abbildung 4.2). Die beobachteten Laufunterschiede waren in mehreren unabhängigen Experimenten reproduzierbar. Innerhalb einer Versuchsreihe mit gleichen Acrylamidkonzentrationen waren die bestimmten Größen jedoch konsistent. Das Ausmaß der zu beobachtenden Expression dieser Proteine wies keine SDS Gel abhängige Variation auf.

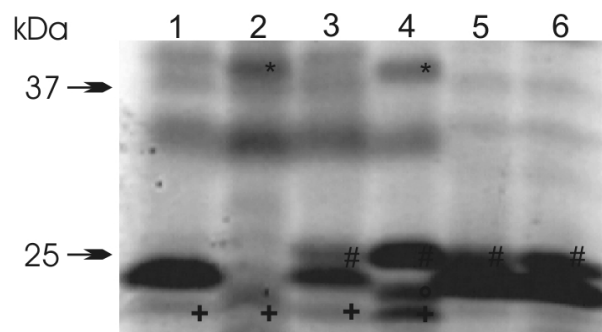


Abbildung 4.2: Laufunterschiede bei niedriger Acrylamidkonzentration.

SDS-PAGE (7,5 %ig) von Proteinen aus dem Kulturüberstand der Stämme 1457 (Spur 1), 1457*sigB* (Spur 2), 1057 (Spur 3), 1057*sigB* (Spur 4), 8400 (Spur 5) und 8400*sigB* (Spur 6). Im Vergleich zum SDS PAGE mit 15% (Abbildung 4.1) finden sich im Hintergrund 1457 und 1057 ein 21 (+) kDa und ein 23 (°) kDa großes Protein. Die Proteine bei 38 (*) und 29 (#) sind hingegen von identischer Größe. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Experiment dar.

4.1.2 Identifizierung der Proteine mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Um die im SDS PAGE als σ^B abhängig stärker exprimierte Proteine bereits bekannten Proteinen zuordnen zu können, wurden die einzelnen Banden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht. Die erhaltenen Massen einzelner Proteinfragmente wurden mit Hilfe des MASCOT Algorithmus mit den in der NCBI Datenbank hinterlegten Proteinsequenzen abgeglichen. Ein Score von >75 galt als ein signifikantes ($p < 0.05$) Ergebnis für ein zu identifizierendes Protein. Für die Identifizierung wurden repräsentative Banden der einzelnen als putativ σ^B regulierten Proteine eingesetzt.

Bei der Analyse konnten vier Proteinbanden mit einer Größe von 38 kDa, 29 kDa, 27 kDa und 26 kDa eindeutig identifiziert werden (Abbildung 4.3). Die Analysen der Banden bei 18 und 20 kDa (in Abbildung 4.1 die Banden § und &) ergaben keine eindeutigen Zuordnungen.

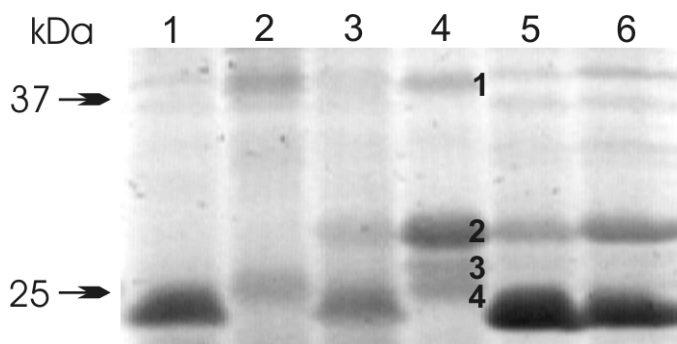


Abbildung 4.3: Repräsentative Banden, die im MALDI TOF analysiert wurden.

Es wurden repräsentative Banden der durch σ^B negativ regulierten Banden ausgewählt und im MALDI TOF untersucht. 1 entspricht der 38 kDa Bande, 2 der 29 kDa, 3 der 27 kDa und 4 der 26 Bande.

Für die untersuchte Bande Nr. 1 mit einer Größe von ca. 38 kDa (Abbildung 4.3), konnten insgesamt 10 von 15 registrierten Massen charakterisiert werden, welche eindeutig einem im Genom von *S. epidermidis* RP62A kodierten Protein zugeordnet werden konnten. Hierdurch konnte dieses Protein der extrazellulären Cysteinprotease Ecp (SERP2390 / SE0184, Accession Number AAW53223 / NP_763739) mit einem Score von 137 zugeordnet werden. Gleichzeitig ergaben die identifizierten Massen eine Zuordnung zu der von Dubin *et al.* annotierten prozessierten Cysteinprotease (Accession Number CAC22343)⁴⁰ mit einem Score von 70 (Abbildung 4.4).

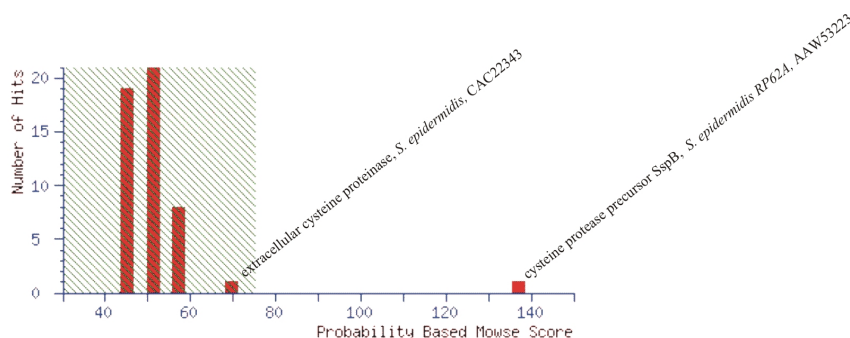


Abbildung 4.4: Identifikation der 38 kDa Bande.

Die mittels MALDI-TOF ermittelten Peptidmassen wurden mittels des MASCOT Algorithmus mit den in der NCBI Datenbank hinterlegten Proteinsequenzen abgeglichen. Dargestellt ist das Ergebnis der Datenbankabfrage. Die Ergebnisse mit Homologie zu Proteinen von *S. epidermidis* und signifikanten Resultaten sind mit Proteinbezeichnung, Bakterienstamm und Accession Number beschriftet.

Für die untersuchte Bande Nr. 2 mit einer Größe von ca. 29 kDa (Abbildung 4.3), konnten insgesamt 8 von 16 registrierten Massen einem im Genom von *S. epidermidis* RP62A kodiertem Protein zugeordnet werden. Hierdurch konnte die Bande der extrazellulären Serinprotease Esp (SERP1397 / SE1543, Accession Number AAW54738/ NP_765098) mit einem Score von 82 zugeordnet werden (Abbildung 4.5). Gleichzeitig ergaben die identifizierten Massen eine Zuordnung zu der von Ohara-Nemoto *et al.* annotierten Serinprotease (Accession Number BAC24763) ¹²⁹ mit einem Score von ebenfalls 82. Mit einem Score von 174 und 14 zugeordneten von 16 registrierten Massen wurde eine Kombination der extrazellulären Serinprotease Esp (Accession Number AAW54738) und eine *NAD-dependent epimerase* von *Tenacibaculum sp.* MED152 (Accession Number ZP_0105333) identifiziert. Die *NAD-dependent epimerase* konnte zudem signifikant als einzelnes Protein mit einem Score von 76 gematcht werden. Die theoretische Masse der *NAD-dependent epimerase* betrug 35.533 Da. Eine Homologiesuche mit BLASTp zeigte eine 46% Homologie zu einem *UDP-glucose 4-epimerase related protein* von *S. epidermidis* (Accession Number NP_763872), welches jedoch nicht im Mascot-Algorithmus gefunden werden konnte. Die Bande besteht wahrscheinlich aus mehreren einzelnen Proteinen, wobei nur die Serinprotease in dieser Bande als gesichert angesehen werden kann. Das *UDP-glucose 4-epimerase related protein* als Homolog der *NAD-dependent epimerase* kann nicht sicher aufgrund der fehlenden signifikanten Fingerprints als Protein in dieser Bande festgestellt werden. Des Weiteren ergaben sich nicht signifikante Zuordnungen zu der von Dubin *et al.* annotierten, prozessierten Serinprotease (Accession Number

CAC27157)⁴⁰ mit einem Score von 72 und einer Serinprotease von *Staphylococcus sp.* AJ (Accession Number AAV73805) mit einem Score von 73.

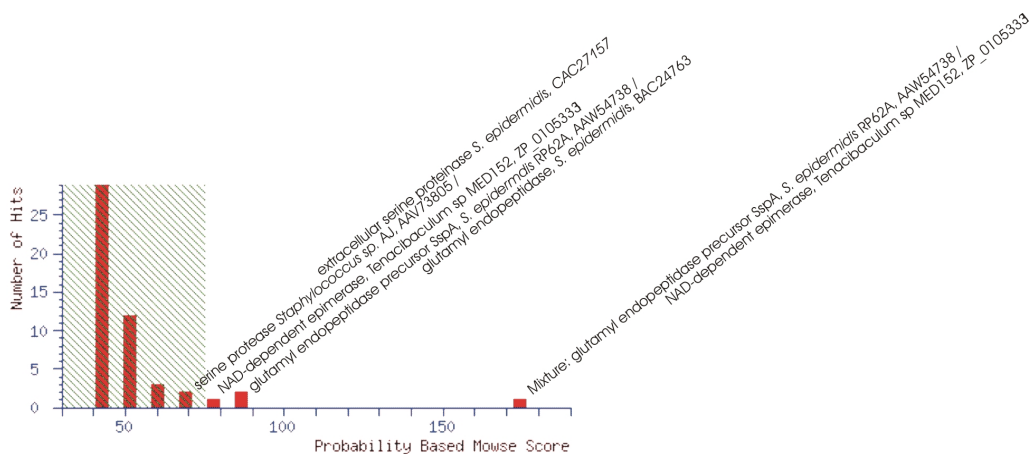


Abbildung 4.5: Identifikation der 29 kDa Bande.

Die mittels MALDI-TOF ermittelten Peptidmassen wurden mittels des MASCOT Algorithmus mit den in der NCBI Datenbank hinterlegten Proteinsequenzen abgeglichen. Dargestellt ist das Ergebnis der Datenbankabfrage. Die Ergebnisse mit Homologie zu Proteinen von *S. epidermidis* und signifikanten Resultaten sind mit Proteinbezeichnung, Bakterienstamm und Accession Number beschriftet.

Für die untersuchte Bande Nr. 3 mit einer Größe von ca. 27 kDa (Abbildung 4.3), konnten insgesamt 6 von 13 registrierten Massen einem im Genom von *S. epidermidis* RP62A kodiertem Protein zugeordnet werden. Die extrazelluläre Serinprotease Esp (SERP1397 / SE1543, Accession Number AAW54738 / NP_765098) konnte mit einem Score von 86 und die von Ohara-Nemoto *et al.* annotierte Serinprotease (Accession Number BAC24763)¹²⁹ mit einem Score von ebenfalls 86 (Abbildung 4.6) dem Protein zugeordnet werden. Mit einem Score von 161 und 11 gematchten von 13 registrierten Massen wurde ein Kombination der extrazellulären Serinprotease Esp (Accession Number AAW54738) mit einer *Succinyl-CoA ligase, alpha subunit* von *Saccharophagus degradans 2-40* (Accession Number YP_527541) identifiziert. Die theoretische Masse der *Succinyl-CoA ligase, alpha subunit* betrug 33 617 Da. Des Weiteren ergaben sich Zuordnungen zu der von Dubin *et al.* annotierten, prozessierten Serinprotease (Accession Number CAC27157)⁴⁰ mit einem Score von 74 und einer Serinprotease von *Staphylococcus sp.* AJ (Accession Number AAV73805) mit einem Score von 74.

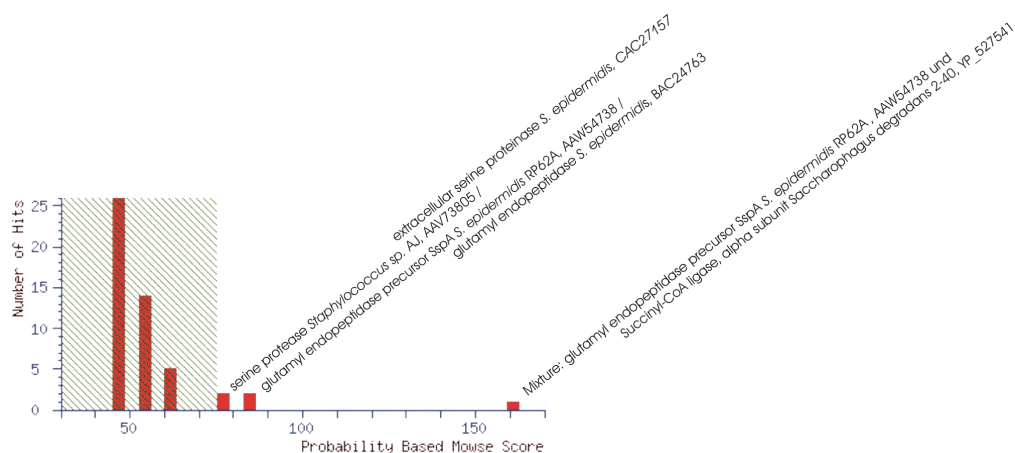


Abbildung 4.6: Identifikation der 29 kDa Bande.

Die mittels MALDI-TOF ermittelten Peptidmassen wurden mittels des MASCOT Algorithmus mit den in der NCBI Datenbank hinterlegten Proteinsequenzen abgeglichen. Dargestellt ist das Ergebnis der Datenbankabfrage. Die Ergebnisse mit Homologie zu Proteinen von *S. epidermidis* und signifikanten Resultaten sind mit Proteinbezeichnung, Bakterienstamm und Accession Number beschriftet.

Für die untersuchte Bande Nr. 4 mit einer Größe von ca. 27 kDa (Abbildung 4.3), konnten insgesamt 8 von 28 registrierten Massen einem im Genom von *S. epidermidis* RP62A kodierten Protein zugeordnet werden. Hierdurch konnte die extrazelluläre Serinprotease Esp (SERP1397 / SE1543, Accession Number AAW54738) mit einem Score von 93 und die von Ohara-Nemoto *et al.* annotierte Serinprotease (Accession Number BAC24763) ¹²⁹ mit einem Score von ebenfalls 93 (Abbildung 4.7) identifiziert werden. Gleichzeitig ergaben sich Zuordnungen zu der von Dubin *et al.* annotierten, prozessierten Serinprotease (Accession Number CAC27157) ⁴⁰ mit einem Score von 87 und einer Serinprotease von *Staphylococcus sp. AJ* (Accession Number AAV73805) mit einem Score von 87.

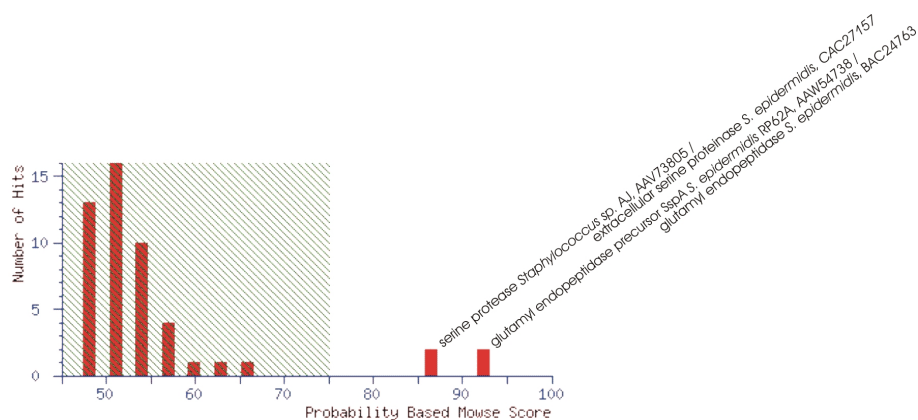


Abbildung 4.7: Identifikation der 29 kDa Bande.

Die mittels MALDI-TOF ermittelten Peptidmassen wurden mittels des MASCOT Algorithmus mit den in der NCBI Datenbank hinterlegten Proteinsequenzen abgeglichen. Dargestellt ist das Ergebnis der Datenbankabfrage. Die Ergebnisse mit Homologie zu Proteinen von *S. epidermidis* und signifikanten Resultaten sind mit Proteinbezeichnung, Bakterienstamm und Accession Number beschriftet.

Die extrazellulären Protease von *S. epidermidis* werden sehr heterogen in der Literatur bezeichnet. In dieser Arbeit wurde sich an der Nomenklatur der extrazellulären Proteasen von Dubin³⁹ orientiert. Die Serinprotease (SERP1397 / SE15443) wird als Esp, die Cysteinprotease (SERP2390 / SE0184) als Ecp benannt.

4.1.3 Proteasescreening auf Casein-Agarplatten

Im SDS PAGE konnte eine σ^B vermittelte verstärkte Expression von extrazellulären Proteasen im Kulturüberstand von *S. epidermidis* beobachtet werden. Im Folgenden sollte die Auswirkung der Expression auf den proteolytischen Phänotyp untersucht werden. Es wurde ein Casein-Agarplatten Test (siehe 3.16) etabliert, mit dem es möglich war, die Proteaseaktivität von Wildtyp und Mutante des σ^B Operons zu visualisieren.

Der Stamm 1457 zeigte eine sehr geringe Proteaseaktivität. Nur auf der denaturierten Agarplatte konnte eine geringe lysierende Aktivität detektiert werden. Der Stamm 1057 wies eine gering höhere Proteaseaktivität im Vergleich zum Stamm 1457 auf. Der Stamm 8400 besaß von allen untersuchten Stämmen im Casein-Agarplatten Test die höchste Proteaseaktivität und zeigte eine gut detektierbare proteolytische Aktivität.

Die Mutanten aller drei genetischen Hintergründe zeigten eine deutlich gesteigerte Proteaseaktivität. Bei allen drei Stämmen ließen sich auf der nativen als auch auf der denaturierten Platte keine Aktivitätsabstufungen vornehmen.

Bei der *rsbW*-Mutante konnte im Stamm 1457 nur auf der denaturierten Platte ein feiner Ring einer lysierenden Protease beobachtet werden, der schwächer im Vergleich zum Wildtyp ausfiel. Die *rsbUVW*-Mutante erreichte nahezu das Aktivitätsniveau des Wildtyps. Eine Differenzierung zwischen Wildtyp und *rsbUVW*-Mutante ließ sich nicht sicher durchführen, da die Aktivitäten beider Stämme sehr gering waren. Auch im Stamm 1057 zeigte die *rsbW*-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp niedrigere Proteaseaktivität. Selbst auf der denaturierten Casein-Agarplatte konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Die *rsbUVW*-Mutante zeigte ebenfalls keine detektierbare Aktivitäten. Die *rsbW*-Mutante des Stammes 8400 zeigte wie die Vergleichsstämme eine deutlich im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Proteaseaktivität, wobei der Stamm *rsbUVW* eine leicht höhere Aktivität aufwies, die jedoch nicht an die des Wildtyps heranreichte.

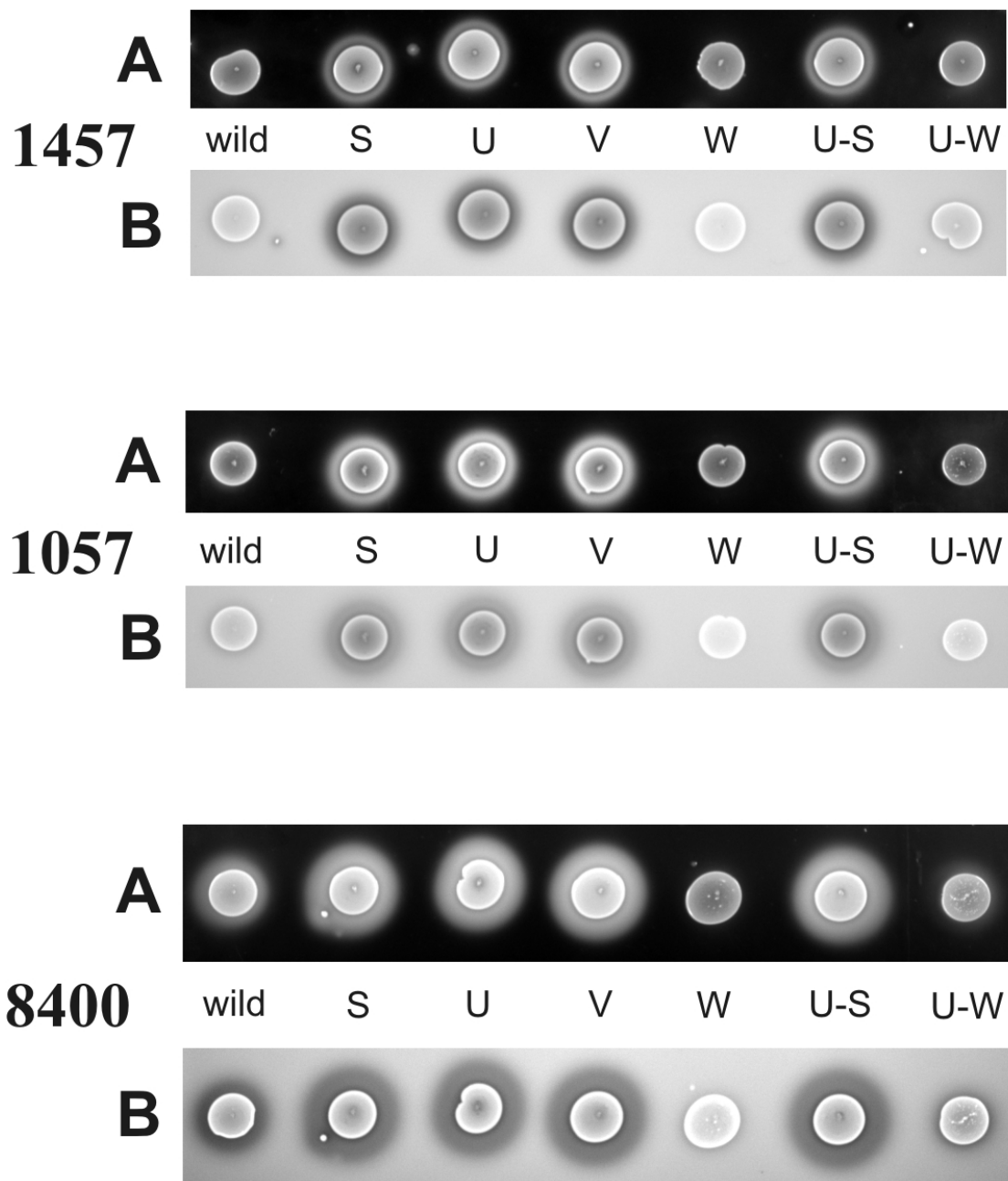


Abbildung 4.8: Proteasescreening auf Casein-Agarplatten.

Kulturüberstände wurden auf Casein-Agarplatten getropft und über Nacht inkubiert (A). Anschließend wurden die Casein-Agarplatten mit 10 %iger Essigsäure denaturiert (B). wild entspricht dem Wildtyp, S der *sigB* Mutante, U der *rsbU*, V der *rsbV*, W der *rsbW*, U-S der *rsbUVWsigB* und U-W der *rsbUVW* Mutante. Die Abbildung stellt repräsentative Experimente dar.

4.1.4 Quantifizierung der extrazellulären Gesamtproteaseaktivität

Im Casein-Agarplatten Test konnten qualitative Unterschiede in der Proteaseaktivität unter den Stämmen beobachtet werden. Eine Quantifizierung der Proteaseaktivität ließ

der Casein-Agarplatten Test jedoch nicht zu. Es war von Interesse, diesen Unterschied zu quantifizieren und neben dem qualitativen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante auch einen Vergleich der stammspezifischen Gesamtproteaseaktivität zu erhalten.

Bei allen untersuchten Stämmen besaßen die σ^B Mutanten eine mindestens doppelt so hohe Gesamtproteaseaktivität wie ihre entsprechenden Wildtypen (Abbildung 4.9). Die beiden Wildtypen 1457 und 8400 wurden mit einer vergleichbaren Proteaseaktivität gemessen. Die Mutante des Stammes 1457 zeigte jedoch eine erhebliche σ^B vermittelte Steigerung der Proteaseaktivität. Die Mutante 1457sigB besaß eine fast 3-fach höhere Aktivität zu ihrem Wildtyp, wobei sich die Proteaseaktivität des Stammes 8400sigB im Vergleich zu ihrem Wildtyp lediglich verdoppelte. Der Stamm 1057 besaß von allen gemessenen Stämmen die höchste proteolytische Aktivität. Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante wiesen eine bis zu doppelt so hohe Gesamtaktivität im Vergleich zu den Vergleichsstämmen auf.

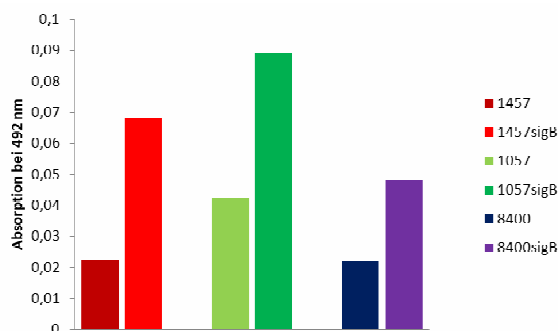


Abbildung 4.9: Quantifizierung der extrazellulären gesamt Proteaseaktivität.

Die extrazelluläre Gesamtproteaseaktivität wurde im zellfreien Kulturüberstand in einem Proteaseassay zellzahladaptiert gemessen. Es ist der Mittelwert von drei repräsentativen Messungen dargestellt.

4.1.5 Transkriptionsanalyse der Proteasen

Durch die durchgeführten Untersuchungen konnte eine σ^B abhängige Proteaseexpression im Kulturüberstand von *S. epidermidis* gezeigt werden. Im Folgenden sollte die σ^B vermittelte Expression auf Transkriptionsebene mittels einer quantitativen RT-PCR nachvollzogen werden.

Im Genom der sequenzierten *S. epidermidis* Stämme wurde eine dritte Protease beschrieben⁵⁷. Diese Protease gehört zur Gruppe der Metalloproteasen und tritt ebenfalls, wie die beiden identifizierten Proteasen, im Kulturüberstand auf¹⁸¹. Die Metalloprotease (SepP1, Accession Number CAA49579) wurde in die Transkriptions-

analyse miteinbezogen, um ein vollständiges Bild der Regulation der extrazellulären Proteasen zu erhalten.

Es wurden RNA Präparationen nach 7 h (exponentielle Wachstumsphase) und 24 h (stationäre Wachstumsphase) Inkubation der Hauptkultur durchgeführt (3.12). Als positiv Kontrolle wurde jeweils das *alkaline shock protein 23* (*asp23*) mitgeführt, für welches eine σ^B abhängige Transkription gesichert ist (Abbildung 4.10) ⁸⁶.

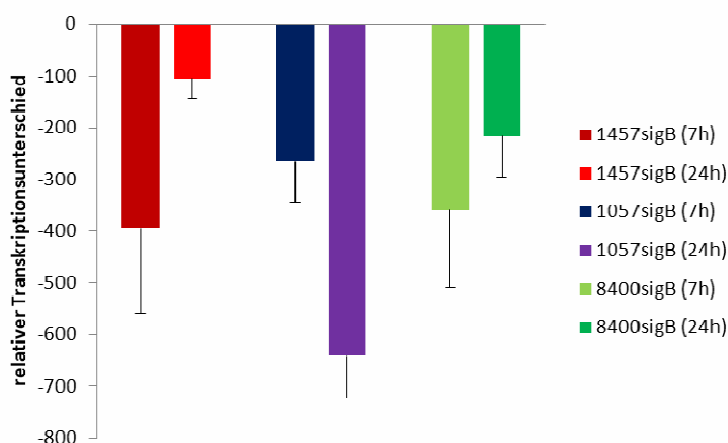


Abbildung 4.10: Transkriptionsanalyse von *asp23*

asp23 (Accession Number NP_765328.1) diente in den durchgeführten Transkriptionsanalysen als positiv Kontrolle. Dargestellt ist die Transkription von *asp23* in den Stämmen 1457*sigB*, 1057*sigB* und 8400*sigB* im Verhältnis zum Wildtyp in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Der Transkriptionsunterschied wurde jeweils im dreifach Ansatz im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode berechnet. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Experimenten mit dem jeweiligen Standardfehler.

Bei dem Stamm 1457*sigB* wurde die Protease Ecp zu beiden Erntezeitpunkten im Vergleich zum Wildtyp stärker transkribiert. In der exponentiellen Wachstumsphase konnte eine 9,7-fache, in der stationären Wachstumsphase eine 35,7-fache stärkere Transkription gemessen werden. Die Protease Esp wies in der stationären Phase eine 5,7-fache stärkere Transkription auf, in der exponentiellen Wachstumsphase konnte nur eine nicht signifikante schwächere Transkription der Protease Esp beobachtet werden. Die Protease SepP1 zeigte in der stationären Wachstumsphase eine ähnliche Transkription wie die Protease Esp mit einer 6,8-fachen stärkeren Transkription. In der exponentiellen Wachstumsphase zeigte sich eine 4,2-fache höhere Transkription (Abbildung 4.11).

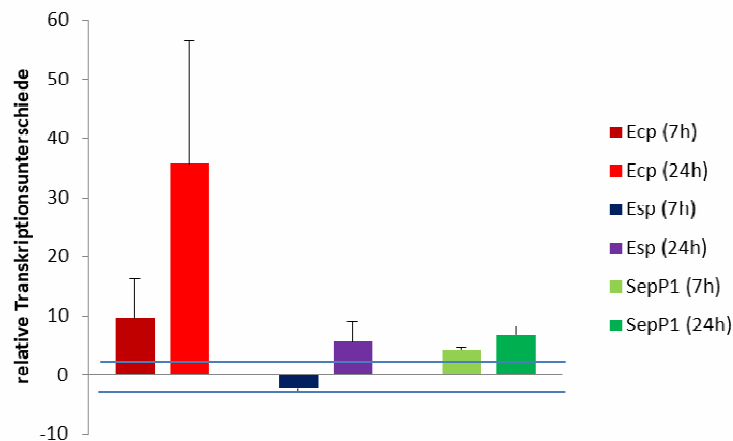


Abbildung 4.11: Transkriptionsanalyse der extrazellulären Proteasen im Stamm 1457

Dargestellt ist die σ^B abhängige Transkription aller extrazellulären Proteasen im Stamm 1457 *sigB* im Verhältnis zum Wildtyp in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Der Transkriptionsunterschied wurde jeweils im dreifach Ansatz im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode berechnet. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Experimenten mit dem jeweiligen Standardfehler. Die blauen Linien markieren den 2,5-fachen Unterschied als Grenzwert für eine signifikante Veränderung.

Der Stamm 1057 *sigB* wies bei beiden Proteasen, Ecp und Esp, eine sehr ähnliche Regulation auf. Beide Proteasen zeigten in der stationären Wachstumsphase eine verstärkte Transkription im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase. In der stationären Wachstumsphase wurde die Protease Ecp 17,4-fach, die Protease Esp 9-fach stärker transkribiert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde nur eine 2,7-fache bei der Ecp Protease und eine 6,4-fache stärkere Transkription bei der Esp Protease gemessen. Die Metalloprotease besaß keine Wachstumsphasen abhängige Regulation und wurde in beiden Phasen ca. 9-fach stärker transkribiert (Abbildung 4.12).

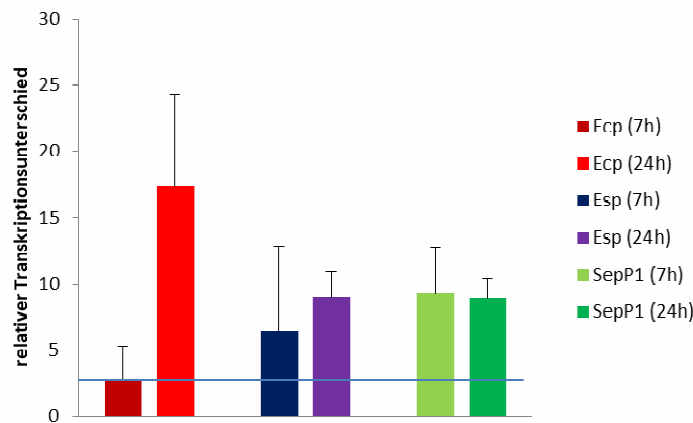


Abbildung 4.12: Transkriptionsanalyse der extrazellulären Proteasen im Stamm 1057

Dargestellt ist die σ^B abhängige Transkription aller extrazellulären Proteasen im Stamm 1057*sigB* im Verhältnis zum Wildtyp in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Der Transkriptionsunterschied wurde jeweils im dreifach Ansatz im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode berechnet. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Experimenten mit dem jeweiligen Standardfehler. Die blaue Linie markiert den 2,5-fachen Unterschied als Grenzwert für eine signifikante Veränderung.

Bei dem Stamm 8400*sigB* konnten keine signifikanten Transkriptionsunterschiede der Ecp und Esp Protease in der exponentiellen Wachstumsphase gemessen werden. In der stationären Wachstumsphase konnten beide Proteasen mit einer 10,7 (Ecp) bzw. 19- (Esp) fachen stärkeren Transkription gemessen werden. Die SepP1 Protease konnte in der stationären Wachstumsphase mit einer starken 30,4-fachen und in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer 6,4-fachen stärkeren Transkription gemessen werden.

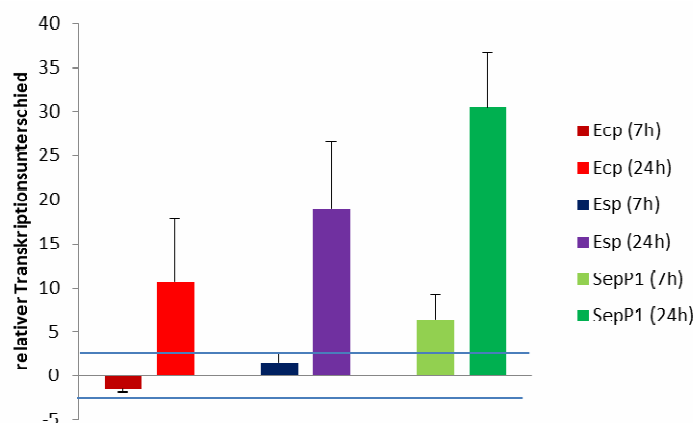


Abbildung 4.13: Transkriptionsanalyse der extrazellulären Proteasen im Stamm 8400

Dargestellt ist die σ^B abhängige Transkription aller extrazellulären Proteasen im Stamm 8400*sigB* im Verhältnis zum Wildtyp in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Der Transkriptionsunterschied wurde jeweils im dreifach Ansatz im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode berechnet. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Experimenten mit dem jeweiligen Standardfehler. Die blauen Linien markieren den 2,5-fachen Unterschied als Grenzwert für eine signifikante Veränderung.

Die Transkriptionsanalysen lassen nur eine stammspezifische Betrachtung der Regulationen zu. Ein stammübergreifender Vergleich der Genregulationen der untersuchten Proteasen ist nicht zulässig. Um die Transkriptionsniveaus der Proteine stammübergreifend analysieren zu können, wurden die relativen Transkriptionsunterschiede zwischen den genetischen Hintergründen berechnet (siehe 3.13). Die Transkriptionsdaten der Stämme 1057 und 8400 wurden jeweils ins Verhältnis zum genetischen Hintergrund von 1457 gesetzt. Die σ^B Mutanten wurden analog in die Berechnungen mit einbezogen. Hierbei stellten sich erhebliche Transkriptionsunterschiede zwischen den einzelnen Stämmen heraus.

Sowohl der Stamm 1057*sigB* als auch der Stamm 8400*sigB* wiesen deutliche Unterschiede in der basalen Transkription der Protease Esp im Vergleich zu 1457*sigB* auf (Abbildung 4.14). Der Stamm 8400*sigB* besaß eine 225,3-fach stärkere Transkription in der stationären Wachstumsphase, 1057*sigB* eine 781,3-fache Regulation im Vergleich zu 1457*sigB*. Die berechneten basalen Transkriptionen in der exponentiellen Wachstumsphase ergaben nicht so deutliche Transkriptionsunterschiede. Der Stamm 8400*sigB* zeigte eine 14,5-fach, 1057*sigB* eine 432-fach stärkere Transkription im Vergleich zu dem Referenzstamm 1457*sigB*. In den genetischen Hintergründen 1057 und 8400 konnten ebenfalls höhere Transkriptionen im Vergleich zum Referenzstamm 1457 gemessen werden. In der stationären Wachstumsphase besaß 1057 eine 355,4-fache, 8400 eine 83,4-fache höhere Transkription. In der exponentiellen Wachstumsphase konnte noch eine 5-fach höhere Transkription im Stamm 8400, im Stamm 1057 eine 31,6-fach höhere Transkription berechnet werden.

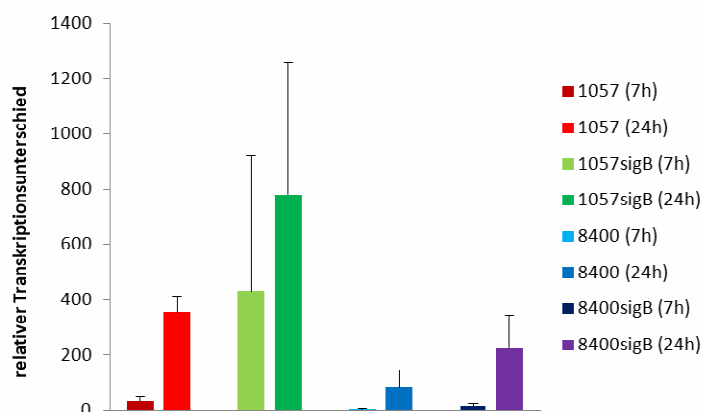


Abbildung 4.14: Basale Transkription von Esp

Die Transkriptionsrate von Esp der Stämme 1057, 8400 und den entsprechenden σ^B Mutanten wurde ins Verhältnis der Transkriptionsrate von 1457 und 1457*sigB* gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert des berechneten relativen Transkriptionsunterschieds von drei im dreifach Ansatz durchgeführten Experimenten in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase.

Die basalen Transkriptionsdaten der Protease Ecp zeigten ähnlich deutliche Transkriptionsunterschiede der untersuchten Stämme (Abbildung 4.15). Der Stamm 1057 zeigte in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase eine 43,7 bzw. 13,9-fach höhere Transkription im Vergleich zum Referenzstamm 1457. Bei dem Stamm 1057*sigB* konnte in allen Wachstumsphasen eine ca. 9-fach höhere Transkription im Vergleich zum Stamm 1457*sigB* berechnet werden. Der Stamm 8400*sigB* zeigte im Gegensatz zu 1057*sigB* eine 35 bzw. 118,3-fache niedrigere Transkription in den beobachteten Wachstumsphasen. Auch bei dem Stamm 8400 konnte im Vergleich zum Referenzstamm 1457 eine 32-fache schwächere Transkription in der stationären Wachstumsphase und ein nicht signifikanter Transkriptionsunterschied in der exponentiellen Wachstumsphase berechnet werden.

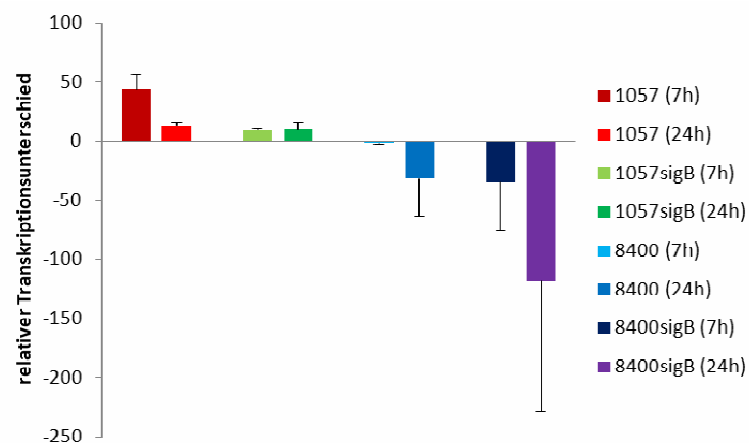


Abbildung 4.15: Basale Transkription von Ecp

Die Transkriptionsrate von Ecp der Stämme 1057, 8400 und den entsprechenden σ^B Mutanten wurde ins Verhältnis der Transkriptionsrate von 1457 und 1457*sigB* gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert und Standardfehler des berechneten relativen Transkriptionsunterschieds von drei im dreifach Ansatz durchgeführten Experimenten in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase.

Die Protease SepP1 zeigte bei den Berechnungen der basalen Transkriptionen nur geringfügige Transkriptionsunterschiede in den genetischen Hintergründen (Abbildung 4.16). Die Berechnungen ergaben einen bis zu 5-fachen Transkriptionsunterschied. Nur der Stamm 8400*sigB* ergab eine 13,8-fache höhere Transkriptionsrate im Vergleich zu 1457*sigB*. Das Transkriptionsniveau der Metalloprotease war bei allen drei Stämmen vergleichbar.

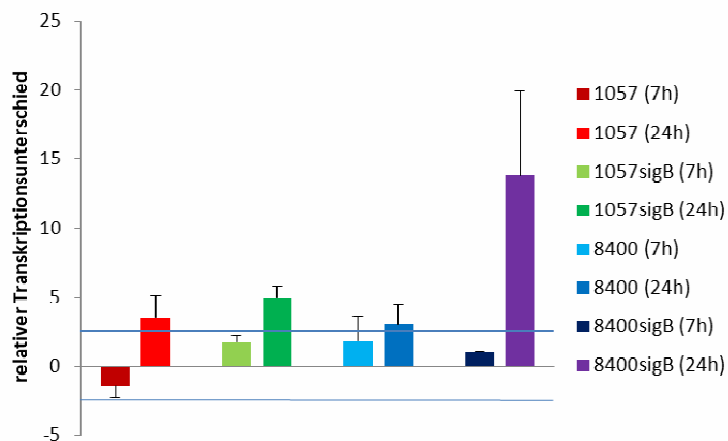


Abbildung 4.16: Basale Transkription von SepP1

Die Transkriptionsrate von SepP1 der Stämme 1057, 8400 und den entsprechenden σ^B Mutanten wurde ins Verhältnis der Transkriptionsrate von 1457 und 1457sigB gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert des berechneten relativen Transkriptionsunterschieds von drei im dreifach Ansatz durchgeführten Experimenten in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Die blauen Linien markieren den 2,5-fachen Unterschied als Grenzwert für eine signifikante Veränderung.

4.1.6 Regulation der Proteasen durch *agr* und *sarA*

Als untergeordnete Regulatoren von σ^B werden *agr* und *sarA* in der Literatur diskutiert (siehe 1.4). Besonders in der Regulation von extrazellulären Proteasen scheinen diese Regulatoren eine wichtige Rolle zu spielen. Vuong *et al.*¹⁹² konnten eine *agr* abhängige Regulation von extrazellulären Proteasen in *S. epidermidis* zeigen. Die genauen Regulationsmechanismen sind jedoch noch weitgehend ungeklärt.

Zur Klärung eines möglichen Zusammenhangs der Regulation von extrazellulären Proteinen durch σ^B über die Regulatoren *sarA* und *agr* wurden Transkriptionsanalysen für *sarA* und RNA III, dem Effektorprotein des *agr* Operons, durchgeführt.

In der Transkriptionsanalyse zeigte sich eine ca. 3-fach schwächere Transkription von *sarA* in der exponentiellen Wachstumsphase bei allen drei untersuchten σ^B Mutanten. In der stationären Wachstumsphase konnten keine signifikanten Transkriptionsunterschiede gemessen werden. Das RNA III Transkript wurde bei dem Stamm 1457sigB und 8400sigB mit einer 3 bzw. 4,6-fach signifikant stärkeren Transkription in der stationären Wachstumsphase gemessen. Die Messungen in der exponentiellen Phase ergaben hingegen keine signifikanten Ergebnisse. Im Stamm 1057sigB konnte die Transkription von RNA III zu keiner Wachstumsphase signifikant gemessen werden (Abbildung 4.17).

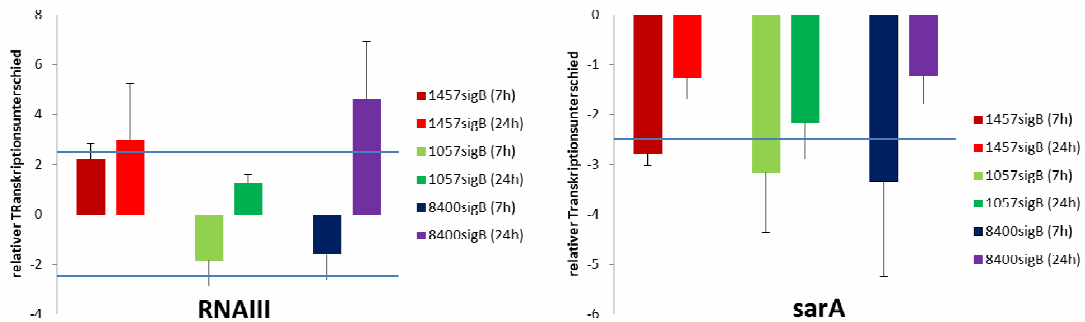


Abbildung 4.17: Transkriptionsanalyse von RNAIII und *sarA*

Dargestellt ist die Transkription von *RNAIII* und *sarA* in den Stämmen *1457sigB*, *1057sigB* und *8400sigB* im Verhältnis zum Wildtyp in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Der Transkriptionsunterschied wurde jeweils im dreifach Ansatz im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode berechnet. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Experimenten mit dem jeweiligen Standardfehler. Die blauen Linien markieren den 2,5-fachen Unterschied als Grenzwert für eine signifikante Veränderung.

Die basalen Transkriptionsanalysen von *agr* und *sarA* zeigten große Unterschiede in den Transkriptionsniveaus der globalen Regulatoren in den verschiedenen genetischen Hintergründen. Der Stamm 1057 zeigte eine 138,3-fach stärkere Transkription von *agr* in der exponentiellen Wachstumsphase als der Bezugsstamm 1457. Nach 24 h war ein 11,9-facher Transkriptionsunterschied zu messen. Auch die Mutante *1057sigB* zeigte eine deutlich stärkere Transkription von *agr* als *1457sigB*. So zeigte sich eine 31,4 bzw. 10,8-fach stärkere Transkription nach 7 und 24 h. Die Stämme 8400 und *8400sigB* zeigten im Vergleich zu den Bezugsstämmen 1457 und *1457sigB* nur geringfügige Abweichungen in der basalen Transkriptionsrate nach 7 und 24 h (Abbildung 4.18).

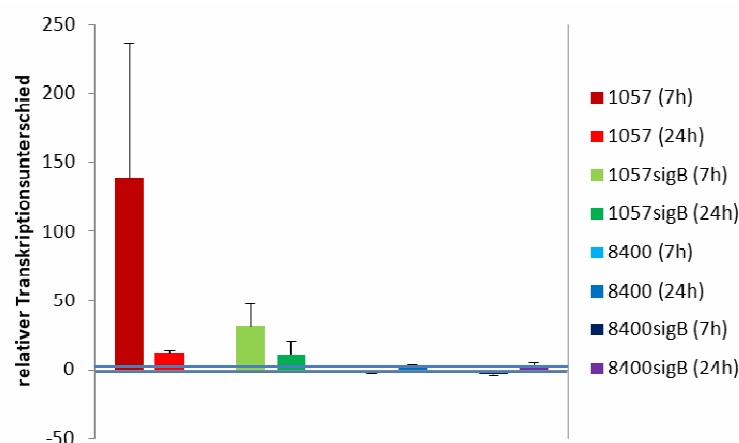


Abbildung 4.18: Basale Transkription von *agr*/RNAIII

Die Transkriptionsrate von *agr* der Stämme 1057, 8400 und den entsprechenden σ^B Mutanten wurde ins Verhältnis der Transkriptionsrate von 1457 und *1457sigB* gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert des berechneten relativen Transkriptionsunterschieds von drei im dreifach Ansatz durchgeführten Experimenten in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Die blauen Linien markieren den 2,5-fachen Unterschied als Grenzwert für eine signifikante Veränderung.

Die basalen Transkriptionsanalysen des globalen Regulators SarA zeigten keine großen Abweichungen in den verschiedenen genetischen Hintergründen. Die Stämme 1057 und 1057*sigB* zeigten grenzwertig signifikante stärkere Transkriptionen des Gens *sarA* nach 7 h und 24 h im Vergleich zu den Referenzstämmen 1457 und 1457*sigB*. Bei den Stämmen 8400 und 8400*sigB* konnten hingegen keine signifikanten Abweichungen der Transkriptionsrate zu den Stämmen 1457, 1457*sigB* festgestellt werden.

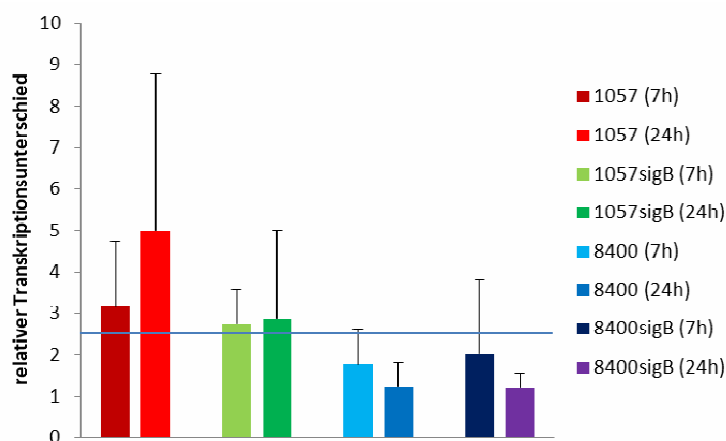


Abbildung 4.19: Basale Transkription von *sarA*

Die Transkriptionsrate von *sarA* der Stämme 1057, 8400 und den entsprechenden σ^B Mutanten wurde ins Verhältnis der Transkriptionsrate von 1457 und 1457*sigB* gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert des berechneten relativen Transkriptionsunterschieds von drei im dreifach Ansatz durchgeführten Experimenten in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Die blauen Linien markieren den 2,5-fachen Unterschied als Grenzwert für eine signifikante Veränderung.

4.1.7 Charakterisierung der Proteasen mit Proteaseinhibitoren

In der Transkriptionsanalyse der extrazellulären Proteasen (siehe 4.1.5) konnten variierende stammspezifische Transkriptionsniveaus der einzelnen Proteasen beobachtet werden. Durch Zusatz von Proteaseinhibitoren in den Casein-Agarplatten Tests sollten durch die Blockade einzelner Proteasen Rückschlüsse auf das Auftreten von einzelnen Proteasen im Überstand gezogen werden.

Auf der Casein-Agarplatte ohne Proteaseinhibitoren zeigte der Stamm 1457 eine sehr geringe Proteaseaktivität. Es konnte auf der nativen Platte nur ein sehr feiner, denaturierender Ring abgegrenzt werden, der auf der denaturierten Platte von einem kräftigen lysierenden Ring von der Kolonie abgegrenzt wurde. Der Stamm 1057 besaß eine deutlich stärker detektierbare Proteaseaktivität. Die Mutante zeigte einen breiten denaturierenden Ring, der zur Kolonie von einem feinen lysierenden Ring abgegrenzt war. Der Stamm 8400 zeigte schon im Wildtyp auf der nativen Casein-Agarplatte eine

gut detektierbare, aus einem denaturierenden Ring bestehende Proteaseaktivität. Die Mutante zeigte einen breiten denaturierenden Ring, der ähnlich wie beim Stamm 1457*sigB* durch einen kräftigen lysierenden Ring von der Bakterienkultur getrennt wurde. Bei genauerer Betrachtung konnte zwischen dem denaturierenden und dem lysierenden Ring ein sehr feiner Ring einer lysierenden Protease ausgemacht werden (Abbildung 4.20 A).

Nach der Zugabe von 0,8 mM E64 in die Casein-Agarplatten wurde ein sehr ähnliches Proteasemuster, wie bei den Platten ohne Proteaseinhibitoren, beobachtet. Bei genauerer Betrachtung der Proteasemuster fiel jedoch eine Veränderung der lysierenden Proteasen auf. Besonders beim Stamm 1057*sigB* konnte auf der denaturierten Platte keine lysierende Proteaseaktivität mehr detektiert werden. Auch bei den Stämmen 1457*sigB* und 8400*sigB* konnte eine reduzierte lysierende Proteaseaktivität festgestellt werden. Die Aktivität der denaturierenden Proteasen schien hingegen durch den Zusatz von E64 nicht beeinflusst zu werden (Abbildung 4.20 B).

Wurden 0,2 mM EDTA in die Casein-Agarplatten hinzugegeben, so konnte in keinem Wildtyp, sowohl auf der nativen als auch auf der denaturierten Platte, eine Proteaseaktivität mehr detektiert werden. Auch die Mutanten zeigten eine stark reduzierte Proteaseaktivität, wobei im Stamm 8400*sigB* auf beiden Platten keine Proteaseaktivität mehr abgegrenzt werden konnte. Lediglich auf der denaturierten Platte konnte ein schmaler, unscharfer, lysierender Saum detektiert werden. Die Stämme 1457*sigB* und 1057*sigB* besaßen nur noch einen schmalen denaturierenden Ring, der auf der denaturierten Platte durch einen sehr schwachen, schmalen, lysierenden Ring von der Bakterienkultur getrennt war (Abbildung 4.20 C).

Zusammenfassend: Der Zusatz von 0,2 mM EDTA führte zu einer fast vollständigen Hemmung der Proteaseaktivität. Lediglich eine Proteasebande konnte bei den Stämmen 1457*sigB* und 1057*sigB* noch detektiert werden. Der Zusatz von 0,8 mM E64 führte zu einer ausschließlichen Hemmung der lysierenden Proteasen.

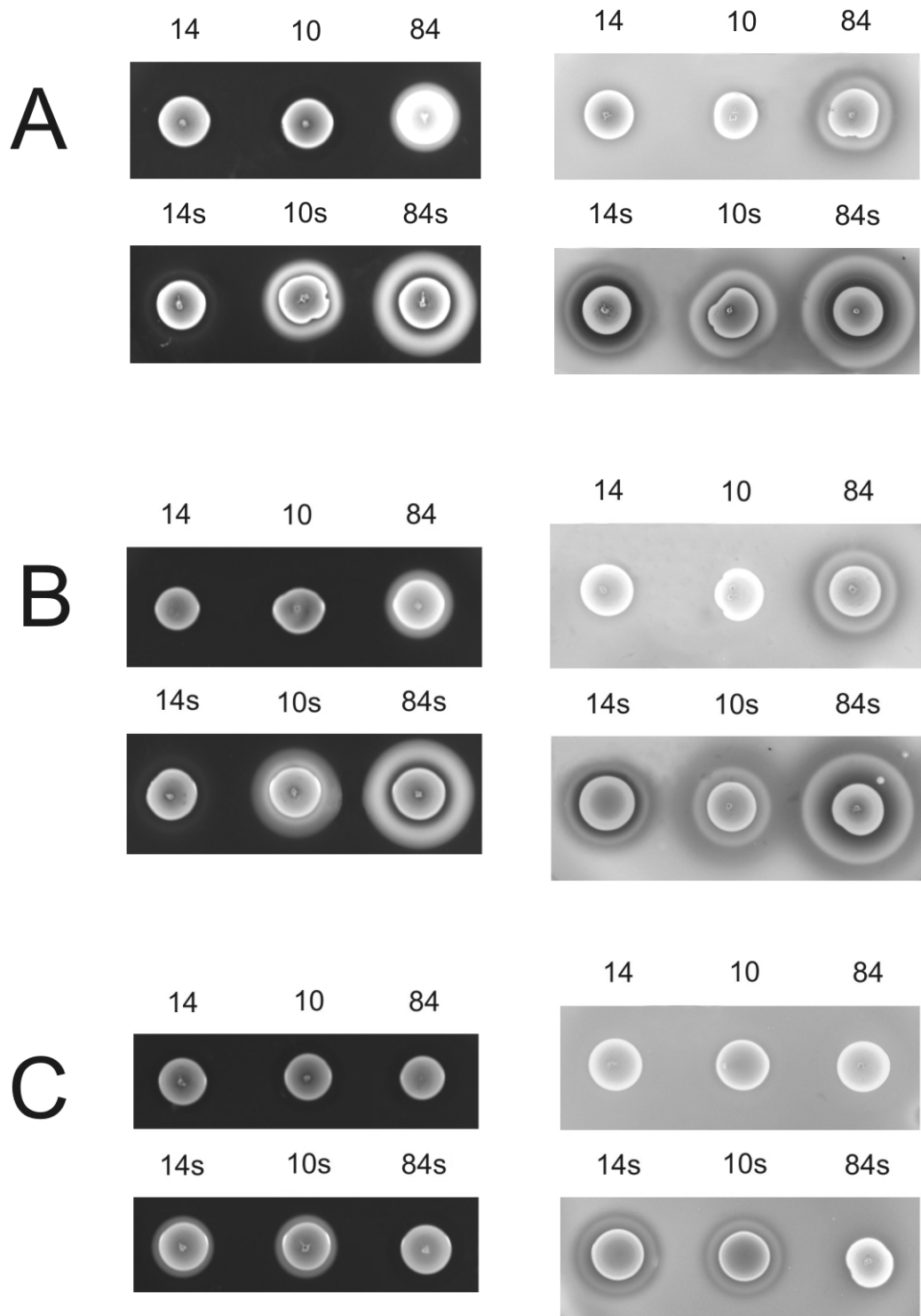


Abbildung 4.20: Kulturüberstände auf Casein-Agarplatten mit Proteaseinhibitoren.

In Casein-Agarplatten wurden Proteaseinhibitoren eingegossen und die untersuchten Wildtypen mit ihren isogenetischen σ^B Mutanten auf den Platten kultiviert (linke Spalte). Anschließend wurden die Platten mit 10 % iger Essigsäure denaturiert (rechte Spalte) und erneut ausgewertet A: ohne Proteaseinhibitor, B: mit E64, C: mit EDTA. 14: 1457, 14s: 1457sigB, 10: 1057, 10s: 1057sigB, 84: 8400, 84s: 8400sigB. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Versuch.

4.2 Durch σ^B differentiell regulierte Proteine

Neben den hochregulierten Proteinen konnten im Kulturüberstand von *S. epidermidis* σ^B differentiell regulierte Proteine gefunden werden.

4.2.1 Identifikation von differentiell regulierten Proteinen auf dem SDS PAGE

Die Ethanol gefällten Kulturüberstände der Stämme 1457, 1057 und 8400 und ihren entsprechenden σ^B Mutanten wurden auf einem 7,5%-igen SDS PAGE aufgetrennt und ausgewertet.

Bei 100 kDa fiel eine Bande auf, welche eine unterschiedlich starke Expression in den drei verschiedenen Stämmen besaßen. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte 1457*sigB* eine leicht höhere Expression. Bei dem Stamm 8400*sigB* konnte eine deutlich stärkere Expression der Bande im Vergleich zu seinem Wildtyp beobachtet werden. Beide Banden, bei 8400 und 8400*sigB*, zeigten dabei schon eine basal höhere Expression als bei allen anderen Stämmen beobachtet. Auf gleicher Höhe konnte nur bei 1057 eine entsprechende Bande identifiziert werden. 1057*sigB* besaß keine entsprechende Bande im Größenbereich von 100 kDa (Abbildung 4.21).

Der Stamm 8400 besaß etwas unter der bereits beschriebenen Bande bei 90 kDa eine zweite ähnlich stark ausgeprägt Bande. Auf gleicher Höhe bei den Vergleichsstämmen zeigte sich ein differentielles Bild. Die Mutante 8400*sigB* zeigte bei 90 kDa eine herabregulierte Bande. Im Stamm 1057 konnte nur schwache Bande bei 90 kDa abgegrenzt werden. Bei der isogenen Mutante ließ sich auf gleicher Höhe keine Bande identifizieren. Die Stämme 1457 und 1457*sigB* wiesen keine korrelierenden Banden auf (Abbildung 4.21).

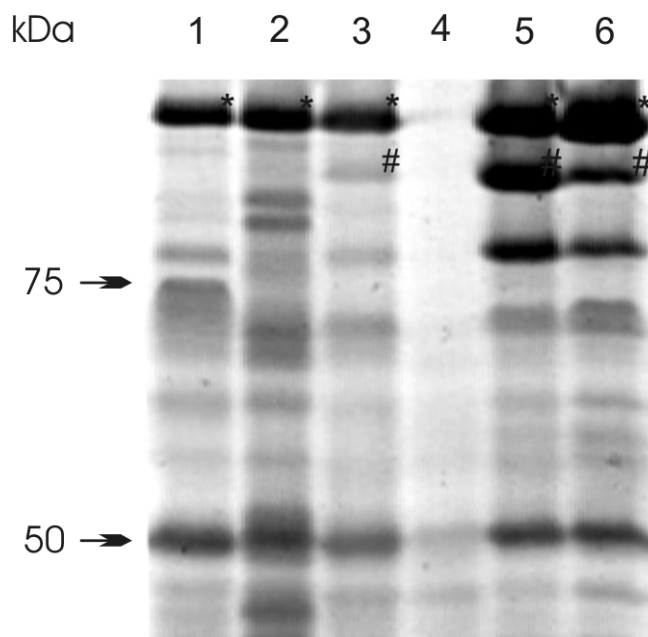


Abbildung 4.21: Durch σ^B differenziell regulierte Proteine.

SDS-PAGE (15 % ig) von Proteinen aus dem Kulturüberstand der Stämme 1457 (Spur 1), 1457*sigB* (Spur 2), 1057 (Spur 3), 1057*sigB* (Spur 4), 8400 (Spur 5) und 8400*sigB* (Spur 6). Im Hintergrund von 1457 und 8400 zeigte sich in den σ^B Mutanten ein überexprimiertes Protein im Größenbereich von 100 (*) kDa. Bei 1057 stellt sich hingegen eine gegensätzliche Regulation des Proteins bei 100 (*) kDa mit einer höheren Expression im Wildtyp dar. Im Hintergrund von 1057 und 8400 zeigten sich in den Wildtypen stärker exprimierte Proteine im Größenbereich von 90 (#) kDa. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Experiment dar.

4.2.2 Identifizierung der im SDS PAGE gefundenen Proteine im MALDI-TOF

Die beschriebenen Banden wurden im Massenspektrometer untersucht und bekannten Proteinen zugeordnet. Die Identifizierung der Proteine wurde mit einer MALDI-TOF oder ESI-MS/MS Massenspektroskopie durchgeführt. Bei der Analyse der Proben konnten folgende Proteine bestimmt werden: In der Bande von 100 kDa konnte im ESI-MS/MS in dem Stamm 1457 eine Glycerol Ester Hydrolase (SE0185 / SERP0018) mit einem Score von 22 bestimmt werden. Da das detektierte Peptid jedoch in einer lipasenspezifischen Domäne lag, wurden noch weitere Lipasen mit dem gleichen Score identifiziert. Das Protein konnte somit nicht eindeutig von verwandten Lipasen abgegrenzt werden. Eine genauere Differenzierung war mit dem ESI-MS/MS nicht möglich.

Für die untersuchte Bande mit einer Größe von ca. 90 kDa (Abbildung 4.21), konnten insgesamt 12 von 26 registrierten Massen einem im Genom von *S. epidermidis* RP62A kodierten Protein zugeordnet werden. Hierdurch konnte die Bande der extrazellulären Glycerol Ester Hydrolase (SERP2388, Accession Number AAW53417) mit einem Score von 93 zugeordnet werden (Abbildung 4.22). Gleichzeitig ergaben die

identifizierten Massen eine Zuordnung zu der im Genom von *S. epidermidis* ATCC 12228 annotierten Glycerol Ester Hydrolase (SE2403 Accession Number AAO06046) mit einem Score von ebenfalls 93. Des Weiteren ergab sich eine Zuordnung zu der Esterase von *Lactobacillus casei* (Accession Number AAP02960) mit einem Score von 81.

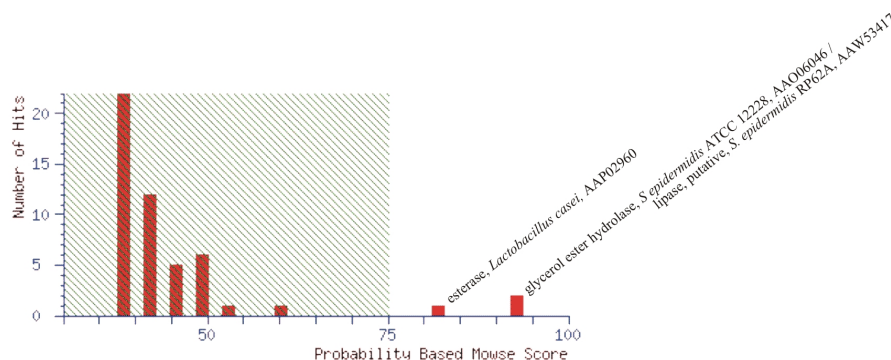


Abbildung 4.22: Identifikation der 90 kDa Bande.

Die mittels MALDI-TOF ermittelten Peptidmassen wurden mittels des MASCOT Algorithmus mit den in der NCBI Datenbank hinterlegten Proteinsequenzen abgeglichen. Dargestellt ist das Ergebnis der Datenbankabfrage. Die Ergebnisse mit Homologie zu Proteinen von *S. epidermidis* und signifikanten Resultaten sind mit Proteinbezeichnung, Bakterienstamm und Accession Number beschriftet.

Die Bezeichnungen der verschiedenen Lipasen variieren in den verschiedenen Publikationen. Aus Gründen der Verständlichkeit wurde sich an die Bezeichnung von Rosenstein and Götz¹⁵⁹ orientiert. Die Glycerol Ester Hydrolase SERP2388 aus der 90 kDa Bande wird im Folgenden SEL-1 benannt. Die Glycerol Ester Hydrolase (SE0185 / SERP0018) aus der 100 kDa Bande wird im Folgenden SEL-2 benannt.

4.2.3 Quantifizierung der extrazellulären Lipaseaktivität

In den durchgeführten SDS PAGE ergaben sich Hinweise für eine σ^B beeinflusste extrazelluläre Lipasenexpression. Um diese Anhaltspunkte genauer zu untersuchen, wurde ein photometrischer Tributyrin Test zur Quantifizierung etabliert. Mit diesem Test ist es möglich, die lipolytische Aktivität einer Probe anhand seiner Fähigkeit, eine definierte Menge an Tributyrin umzusetzen, zu verfolgen und über die Zeit graphisch darzustellen (siehe 3.18). Um die Messungen besser untereinander vergleichen zu können, wurden zur Auswertung aus den Messreihen die Halbwertszeiten der Proben berechnet.

Der Stamm 1457*sigB* zeigte eine Halbwertszeit von 13,67 min gemittelt von 3 unabhängigen Versuchen. Der entsprechende Wildtyp 1457 zeigte eine mehr als doppelt

so lange Halbwertszeit von 37,67 min. Die Mutante besitzt somit eine fast doppelt so hohe Aktivität wie ihr Wildtyp (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.1: Quantifizierung der gesamt lipolytischen Aktivität im Stamm 1457

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert der Halbwertszeiten
1457	40 min	34 min	39 min	37,67 min
1457sigB	14 min	13 min	14 min	13,67 min

Bei den Stämmen 1057 und 1057sigB konnte eine entgegengesetzte Regulation der lipolytischen Aktivität im Vergleich zu 1457 und 1457sigB beobachtet werden. Der Wildtyp zeigte eine Halbwertszeit des Tributyrins von 11 Minuten. Die Mutante hingegen benötigte 30,33 Minuten. Im Gegensatz zu dem Stamm 1457 besitzt der Wildtyp 1057 eine nahe zu dreifach höher lipolytisch Aktivität wie seine Mutante (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.2: Quantifizierung der gesamt lipolytischen Aktivität im Stamm 1057

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert der Halbwertszeiten
1057	11 min	11 min	11 min	11 min
1057sigB	29 min	31 min	31 min	30,33 min

Die Mutante 8400sigB zeigte eine Halbwertszeit von 5,67 Minuten, wobei bei dem Wildtyp 8400 eine Halbwertszeit von 12 Minuten bestimmt werden konnte. Die Mutante 8400sigB wies ebenfalls wie 1457sigB eine mehr als doppelt so hohe Aktivität wie ihr Wildtyp auf (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.3: Quantifizierung der gesamt lipolytischen Aktivität im Stamm 8400

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert der Halbwertszeiten
8400	14 min	10 min	12 min	12 min
8400sigB	5 min	5 min	7 min	5,67 min

Wie sich bei den phänotypischen Beobachtungen schon angedeutet hatte, besaß der Stamm 8400 und 8400sigB von allen untersuchten Stämmen die höchste gesamt lipolytische Aktivität. Interessanterweise konnte eine deutliche lipolytische Aktivität im Kulturüberstand von 1057sigB gemessen werden, obwohl kein phänotypisches Korrelat für eine extrazelluläre lipolytische Aktivität im SDS PAGE charakterisiert werden

konnte. Weitere bisher unbekannte lipolytische aktive Proteine im Kulturüberstand sind so wahrscheinlich.

4.2.4 Identifizierung von lipolytischen Banden im nativen SDS PAGE

Um den gesamten Kulturüberstand nach lipolytischen Banden untersuchen zu können, wurde ein natives SDS PAGE etabliert, mit dem der gesamte Kulturüberstand nach lipolytischen Banden untersucht werden konnte (siehe 3.9).

Auf der Tributyrin-Agarplatte bestätigten sich die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen. Die beiden Banden bei 100 und 90 kDa zeigten deutliche Lysezonen auf der Tributyrin-Agarplatte. Es zeigten sich eine ganze Reihe von weiteren lipolytisch aktiven Banden zwischen 100 und 45 kDa (Abbildung 4.23). Jeder Stamm wies dabei sein eigenes Lysemuster auf.

Bei dem Vergleich zwischen σ^B Mutante und Wildtyp der untersuchten Stämme konnten einige Unterschiede aufgezeigt werden. 1457*sigB* wies im Gegensatz zum Wildtyp 1457 bei 45 kDa eine zusätzliche breite Lysezone auf. Eine ganz ähnliche Konfiguration ließ sich beim Stamm 8400 beobachten, wo nur der Stamm 8400*sigB* bei 45 kDa eine breite intensive Lysezone zeigte. Im Stamm 8400*sigB* konnte des Weiteren noch eine zusätzliche Bande bei ca. 75 kDa aufgezeigt werden. Die beiden Banden bei 100 und 90 kDa zeigten bei der Mutante 8400*sigB* eine wesentlich höhere Aktivität als im Wildtyp (Abbildung 4.23). Die Aktivitätsverteilung unter diesen beiden Banden steht dabei im Gegensatz zu den Beobachtungen im denaturierten SDS PAGE, wo eine stärkere Bande von 90 kDa im Wildtyp beobachtet werden konnte (Abbildung 4.21). Wird das SDS Gel, welches zur Anfertigung der Aktivitätsnachweise auf der Tributyrin-Agarplatte benutzt wurde, gefärbt und ausgewertet, so kann man auch auf ihm eine höhere Expression der 90 kDa Bande bei der Mutante feststellen (Daten nicht gezeigt).

Im Vergleich Wildtyp zu Mutante konnten bei 1057 ebenfalls einige Unterschiede gezeigt werden. Die Bande bei 100 kDa fehlte in der Mutante vollständig, wobei die Bande bei 45 kD etwas kleiner und mit einer höheren Aktivität als beim Wildtyp erschien.

Bei fast allen Stämmen konnten zwischen den beschriebenen, klar abzugrenzenden Banden ein bis zwei unscharfe Banden entdeckt werden, die jedoch nicht scharf abzugrenzen waren und eine sehr geringe Aktivität aufwiesen. Zusätzlich waren diese

Banden bei den Stämmen 1457*sigB*, und 1057 durch einen diffusen Schmier verwischt (Abbildung 4.23).

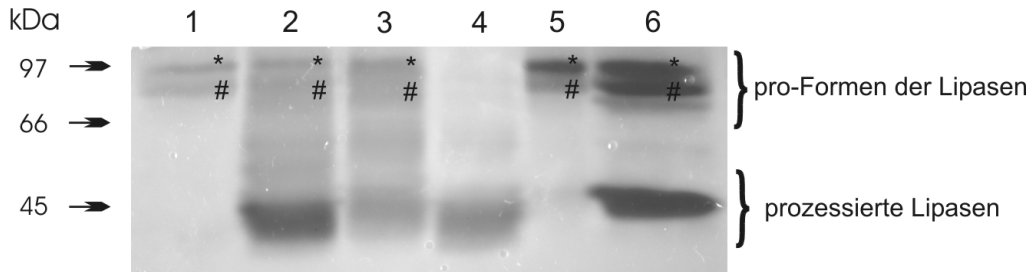


Abbildung 4.23: Identifizierung von lipolytischen Banden im nativ SDS PAGE.

Die Kulturüberstände wurden mit einer nativen SDS PAGE aufgetrennt: 1457 (Spur 1), 1457*sigB* (Spur2), 1057 (Spur3), 1057*sigB* (Spur4), 8400 (Spur 5) und 8400*sigB* (Spur 6) und auf einer Tributyrin Platte inkubiert. Nach Inkubation wurden lipolytische Banden auf der Tributyrin Platte sichtbar. * entspricht der 100 kDa Bande, # entspricht der 90 kDa Bande. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Experiment dar.

4.2.5 Transkriptionsanalyse der Lipasen

Die in der Massenspektroskopie charakterisierten Lipasen wurden in Transkriptionsanalysen mit der quantitativen RT PCR untersucht. Die Transkriptionsanalysen der Lipase SEL-1 bei den verschiedenen Stämmen ergaben sehr ähnliche Ergebnisse. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde bei allen untersuchten Stämmen ein nicht signifikanter Unterschied der Transkription der SEL-1 Lipase bei den σ^B Mutanten gemessen. In der stationären Phase hingegen konnte eine ca. 3 bis 5-fache stärkere Transkription der Lipase gemessen werden (Abbildung 4.24).

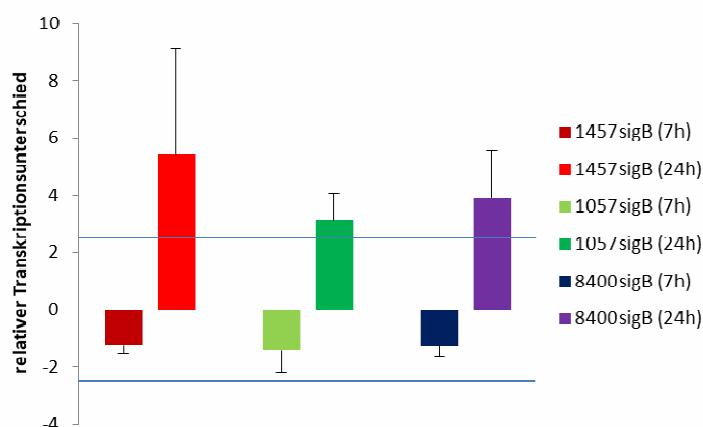


Abbildung 4.24: Transkriptionsanalyse der Lipase SEL-1

Dargestellt ist die σ^B abhängige Transkription von SEL-1 in den Stämmen 1457*sigB*, 1057*sigB* und 8400*sigB* im Verhältnis zum Wildtyp in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Der Transkriptionsunterschied wurde jeweils im dreifach Ansatz im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode berechnet. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Experimenten mit dem jeweiligen Standardfehler. Die blauen Linien markieren den 2,5-fachen Unterschied als Grenzwert für eine signifikante Veränderung.

Die Transkriptionsanalysen der Lipase SEL-2 ergaben ein differentielleres Bild der Regulation. Der Stamm 1057*sigB* besaß eine sehr ähnliche Regulation wie schon bei der Lipase SEL-1 beobachtet, mit einem nicht signifikanten Transkriptionsunterschied nach 7 h und einer 6,8-fachen stärkeren Transkription nach 24 h. Bei den Stämmen 1457*sigB* und 8400*sigB* wurde schon nach 7 h eine 4,1 bzw. 5,2-fache stärkere Transkription beobachtet, die nach 24 h auf eine 6,8 bzw. 6,5-fache Transkriptionsrate anstieg (Abbildung 4.25).

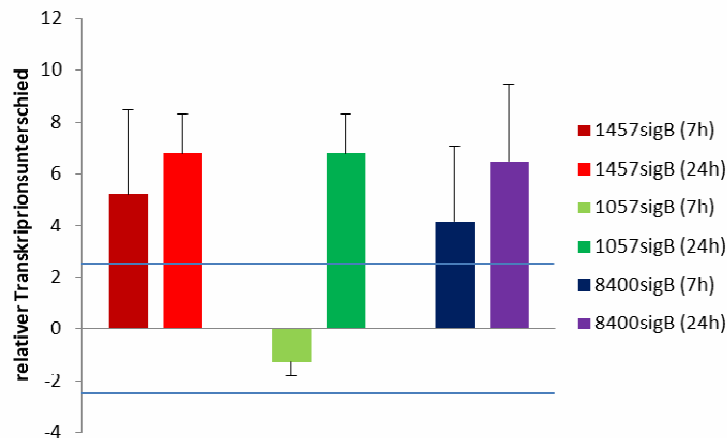


Abbildung 4.25: Transkriptionsanalyse der Lipase SEL-2

Dargestellt ist die σ^B abhängige Transkription von SEL-2 in den Stämmen 1457*sigB*, 1057*sigB* und 8400*sigB* im Verhältnis zum Wildtyp in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Der Transkriptionsunterschied wurde jeweils im dreifach Ansatz im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode berechnet. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Experimenten mit dem jeweiligen Standardfehler. Die blauen Linien markieren den 2,5-fachen Unterschied als Grenzwert für eine signifikante Veränderung.

Um einen stammübergreifenden Vergleich der Transkriptionsraten zu ermöglichen, wurden die relativen Transkriptionsunterschiede berechnet, indem die Transkriptionsdaten der Stämme 1057, 8400 und der isogenen σ^B Mutanten ins Verhältnis zu den Stämmen 1457 und 1457*sigB* gesetzt wurden.

Die basalen Transkriptionsdaten der Lipase SEL-1 zeigten bei den Stämmen 1057 und 1057*sigB* vergleichbare Regulationen. Beide Stämme zeigten in der exponentiellen Wachstumsphase im Verhältnis zu 1457 und 1457*sigB* einen 6,3 bzw. 7,4-fachen Transkriptionsunterschied und nach 24 h in der stationären Phase einen etwas schwächeren um den Faktor 4.

Die Stämme 8400 und 8400*sigB* besaßen im Bezug auf die Stämme 1457 und 1457*sigB* nach 7 h eine ca. 5-fach stärkere Transkription, die nach 24 h bis auf eine 22,9 bzw. 17,2-fache stärkere Transkription anstieg. Sie besaßen somit besonders in der

stationären Wachstumsphase eine signifikant höhere Transkription der Lipase SEL-1 im Vergleich zu allen anderen Vergleichsstämmen (Abbildung 4.26).

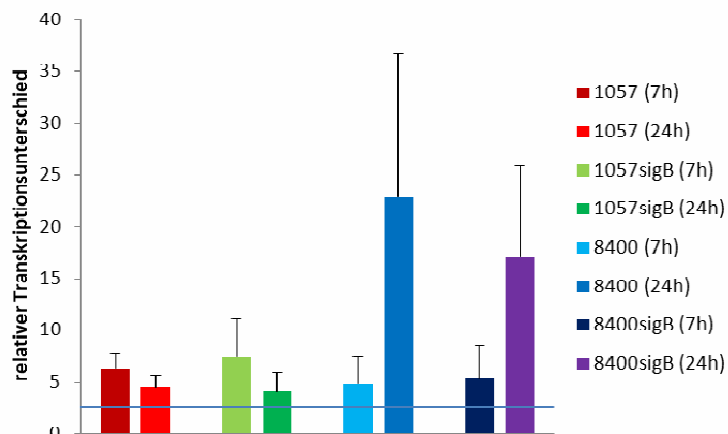


Abbildung 4.26: Basale Transkription von SEL-1

Die Transkriptionsrate von SEL-1 der Stämme 1057, 8400 und den entsprechenden σ^B Mutanten wurde ins Verhältnis der Transkriptionsrate von 1457 und 1457sigB gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert des berechneten relativen Transkriptionsunterschieds von drei im dreifach Ansatz durchgeführten Experimenten in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Die blaue Linie markiert den 2,5-fachen Unterschied als Grenzwert für eine signifikante Veränderung.

Die basalen Transkriptionsdaten der Lipase SEL-2 ergaben ein uneinheitliches Bild der transkriptionellen Regulation. Der Wildtyp 1057 wurde in Bezug auf 1457 nach 7 h 23,7-fach stärker transkribiert, wobei die entsprechende Mutante nur eine ca. 5-fach stärkere Transkription aufwies. In der stationären Wachstumsphase nach 24 h ergaben die Berechnungen der relativen Transkriptionsunterschiede keine signifikanten Werte. Die Gegenüberstellung der Stämme 8400 und 1457 zeigte nach 7 h eine 12,9-fach und nach 24 h eine 9,3-fach höhere Transkription der Lipase SEL-2 von 8400. Bei der Mutante 8400sigB wurde zu beiden Erntezeitpunkten eine 5,9 bzw. 8,6-fache stärkere Transkription im Bezug auf 1457sigB berechnet. Der Stamm 8400 und seine isogenetische σ^B Mutante wiesen somit sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase eine deutlich höhere Transkriptionsrate im Vergleich zu den Vergleichsstämmen 1457 und 1457sigB auf (Abbildung 4.27).

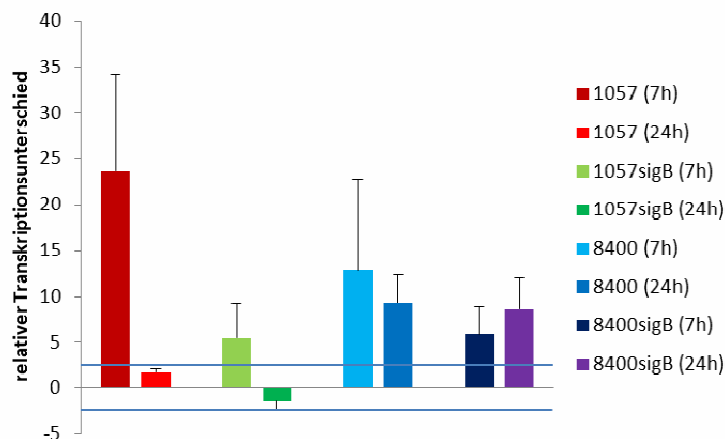


Abbildung 4.27: Basale Transkription von SEL-2

Die Transkriptionsrate von SEL-2 der Stämme 1057, 8400 und den entsprechenden σ^B Mutanten wurde ins Verhältnis der Transkriptionsrate von 1457 und 1457*sigB* gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert des berechneten relativen Transkriptionsunterschieds von drei im dreifach Ansatz durchgeführten Experimenten in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Die blauen Linien markieren den 2,5-fachen Unterschied als Grenzwert für eine signifikante Veränderung.

4.3 Durch σ^B positiv regulierte Proteine

In den bisherigen Untersuchungen konnten durch σ^B negativ und differentiell regulierte Proteine identifiziert werden. Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich auf die Charakterisierung von Proteinen, die von σ^B positiv reguliert wurden.

4.3.1 Identifikation von herabregulierten Proteinen im SDS PAGE

Bei der Auswertung der SDS PAGE fielen bei allen untersuchten Stämmen, besonders im Bereich zwischen 180 und 230 kDa, Banden auf, die jeweils im Wildtyp verstärkt exprimiert wurden. Beim Stamm 1457 konnten zwei Banden bei 180 und 210 kDa identifiziert werden, welche nicht bzw. deutlich reduziert bei der Mutante sezerniert wurden (Abbildung 4.28).

Bei dem Stamm 1057 konnte in diesem Größenbereich nur eine vergleichbare Bande identifiziert werden. Bei 200 kDa besaß der Stamm 1057 eine Bande, die etwas schwächer auf gleicher Höhe bei der Mutante 1057*sigB* auftrat.

Bei der Betrachtung des Stammes 8400 und 8400*sigB* zeigte sich eine Konfiguration der Banden, wie sie bei 1457 und 1457*sigB* beobachtet werden konnte. Beide Stämme besaßen im Größenbereich von 180 bis 230 kDa zwei Banden. Bei 230 kDa besaß der Stamm 8400 eine Bande, die sich mit verminderter Intensität bei seiner σ^B Mutante darstellte. Etwas unterhalb bei 210 kDa, konnte bei beiden Stämmen eine Bande auf gleicher Höhe mit vergleichbarer Intensität abgegrenzt werden (Abbildung 4.28).

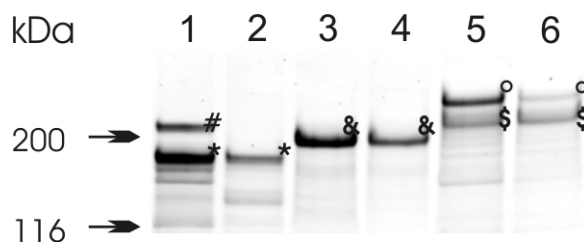


Abbildung 4.28: Durch σ^B positiv regulierte Proteine.

SDS-PAGE (4-12 % ig) von Proteinen aus dem Kulturüberstand der Stämme 1457 (Spur 1), 1457*sigB* (Spur2), 1057 (Spur3), 1057*sigB* (Spur4), 8400 (Spur 5) und 8400*sigB* (Spur 6). Im Größenbereich von 180 bis 230 kDa zeigten sich Banden, die im Vergleich zu den isogenetischen σ^B Mutanten in den Wildtypen stärker exprimiert waren. In den Wildtypen zeigten sich stärker exprimierte Banden mit einer Größe von 210 (#) und 180 (*) kDa im Stamm 1457, von 200 (&) kDa im Stamm 1057 und von 230 (°) und 210 (\$) kDa im Stamm 8400. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Experiment dar.

4.3.2 Charakterisierung der im SDS PAGE identifizierten Proteine im MALDI-TOF

Eine repräsentative Auswahl, der im SDS PAGE identifizierten durch σ^B positiv regulierten Proteine wurde im MALDI-TOF näher charakterisiert und eine Zuordnung zu bekannten Proteinen durchgeführt. Bei der Analyse konnten vier Proteinbanden mit einer Größe von 1. 210 kDa, 2. 180 kDa, 3. 180 kDa und 4. 230 kDa eindeutig identifiziert werden (Abbildung 4.29).

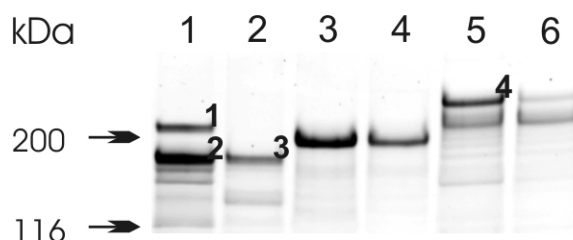


Abbildung 4.29: Repräsentative im MALDI TOF analysierte Banden.

Es wurden repräsentative durch σ^B verstärkt exprimierte Banden ausgewählt und im MALDI TOF untersucht. 1 entspricht der 210 kDa Bande und 2 der 180 kDa im Stamm 1457, 3 der 180 kDa im Stamm 1467*sigB* und 4 der 230 Bande im Stamm 8400.

Für die untersuchte Bande Nr. 1 mit einer Größe von ca. 210 kDa (Abbildung 4.29), konnten insgesamt 10 von 15 registrierten Massen einem im Genom von *S. epidermidis* ATCC 12228 kodierte Protein zugeordnet werden. Hierdurch konnte die Bande dem Aap (Accession Number AAO03772) mit einem Score von 104 zugeordnet werden (Abbildung 4.30). Gleichzeitig ergaben die identifizierten Massen Zuordnungen zu dem von Rohde *et al.* annotierten Aap (Accession Number AAQ83698)¹⁵⁶ mit einem Score von 87 und dem von Hussain *et al.* annotierten N-Terminale ca. 70 kDa großen Fragment vom Aap aus dem Stamm *S. epidermidis* RP62A (Accession Number

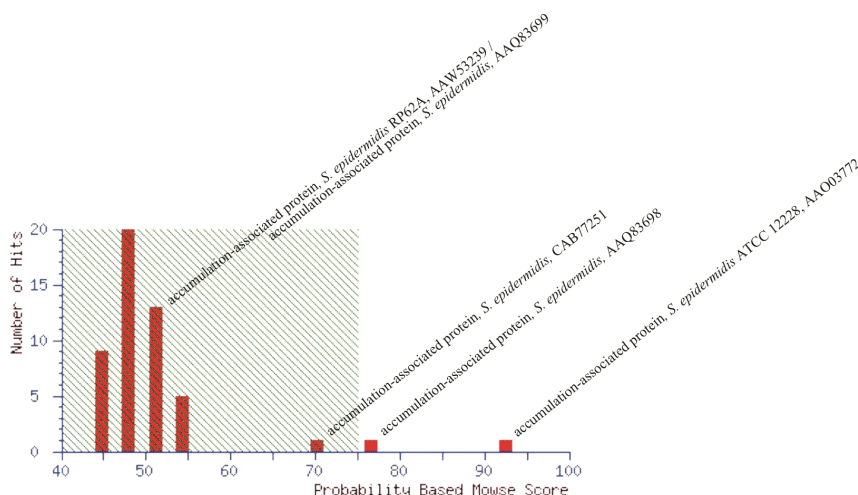


Abbildung 4.31: Identifikation der 180 kDa Bande Nr. 2.

Die mittels MALDI-TOF ermittelten Peptidmassen wurden mittels des MASCOT Algorithmus mit den in der NCBI Datenbank hinterlegten Proteinsequenzen abgeglichen. Dargestellt ist das Ergebnis der Datenbankabfrage. Die Ergebnisse mit Homologie zu Proteinen von *S. epidermidis* und signifikanten Resultaten sind mit Proteinbezeichnung, Bakterienstamm und Accession Number beschriftet.

Bei der massenspektroskopischen Untersuchung der Bande Nr. 3 mit einer Größe von ca. 180 kDa (Abbildung 4.29), konnten insgesamt 8 von 12 registrierten Massen einem Protein im Genom von *S. epidermidis* ATCC 12228 zugeordnet werden. Durch die Datenbanksuche konnte ein Aap (Accession Number AAO03772) mit einem Score von 78 identifiziert werden (Abbildung 4.32). Mit einem nicht signifikantem Score konnte das von Rohde *et al.* annotierte Aap (Accession Number AAQ83698)¹⁵⁶ mit einem Score von 62 identifiziert werden. Auch das von Hussain *et al.* annotierte N-Terminale ca. 70 kDa große Fragment vom Aap aus dem Stamm *S. epidermidis* RP62A (Accession Number CAB77251) und das unprozessierte Aap von dem Stamm *S. epidermidis* RP62A (Accession Number AAW53239)⁵⁷ konnten mit nicht signifikanten Scores von 55 und 39 identifiziert werden (Abbildung 4.32).

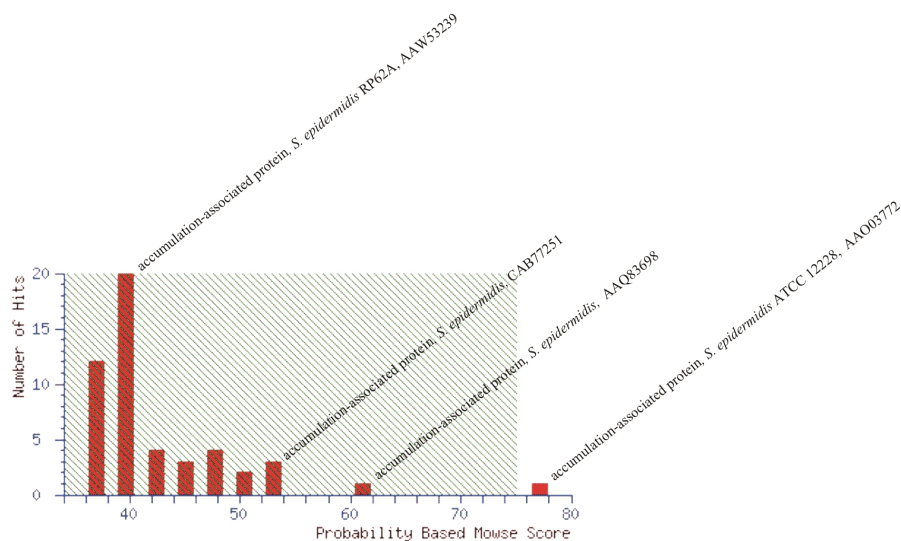


Abbildung 4.32: Identifikation der 180 kDa Bande Nr. 3.

Die mittels MALDI-TOF ermittelten Peptidmassen wurden mittels des MASCOT Algorithmus mit den in der NCBI Datenbank hinterlegten Proteinsequenzen abgeglichen. Dargestellt ist das Ergebnis der Datenbankabfrage. Die Ergebnisse mit Homologien zu Proteinen von *S. epidermidis* und signifikanten Resultaten sind mit Proteinbezeichnung, Bakterienstamm und Accession Number beschriftet.

Die massenspektroskopische Untersuchung der Bande Nr. 4 mit einer Größe von ca. 230 kDa (Abbildung 4.29) ergab kein signifikantes Ergebnis. Bei genauerer Betrachtung der Untersuchungsergebnisse konnten vier der ersten fünf nicht signifikant gematchten Proteine als *accumulation associated protein* Varianten identifiziert werden. So konnten insgesamt 7 von 11 registrierten Massen dem von Hussain *et al.* annotierten N-Terminalen ca. 70 kDa großen Fragment vom *accumulation associated protein* aus dem Stamm *S. epidermidis* RP62A (Accession Number CAB77251) mit einem Score von 65 zugeordnet werden. Des Weiteren konnte die Datenbanksuche ein *accumulation associated protein* (Aap, Accession Number AAO03772) mit einem nicht signifikanten Score von 62, das von Rohde *et al.* annotierte *accumulation associated protein* (Accession Number AAQ83698)¹⁵⁶ mit einem nicht signifikanten Score von 60 und das unprozessierte *accumulation associated protein* von dem Stamm *S. epidermidis* RP62A (Accession Number AAW53239)⁵⁷ mit einem nicht signifikanten Scores von 55 identifizieren (Abbildung 4.33).

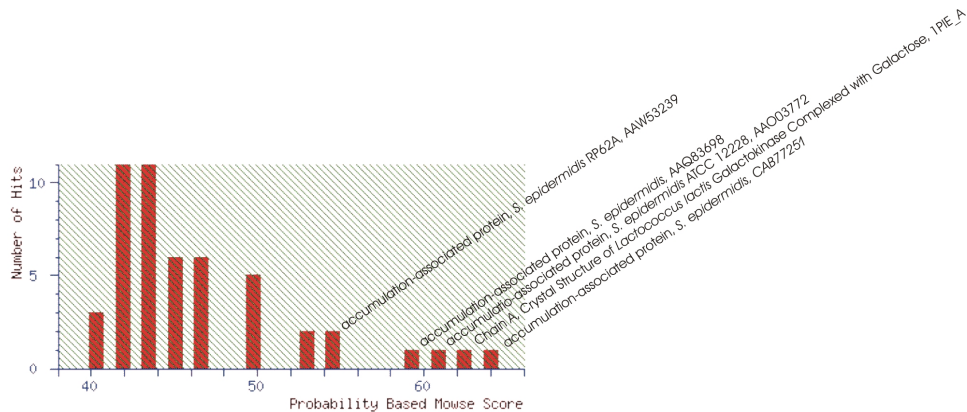


Abbildung 4.33: Identifikation der 230 kDa Bande Nr. 4.

Die mittels MALDI-TOF ermittelten Peptidmassen wurden mittels des MASCOT Algorithmus mit den in der NCBI Datenbank hinterlegten Proteinsequenzen abgeglichen. Dargestellt ist das Ergebnis der Datenbankabfrage. Die Ergebnisse mit Homologie zu Proteinen von *S. epidermidis* und signifikanten Resultaten sind mit Proteinbezeichnung, Bakterienstamm und Accession Number beschriftet.

4.3.3 Charakterisierung der Repeats von Aap

In dem *accumulation associated protein*, Aap, befinden sich Abschnitte, in denen sich eine individuelle Anzahl von Repeats befinden. Die im SDS PAGE beobachteten Größenunterschiede der Aap Proteine der verschiedenen Stämme (siehe 4.3.1) könnten auf einer unterschiedlichen Anzahl dieser Repeats beruhen. Um die unterschiedliche Anzahl von Repeats in den *aap* Genen nachzuweisen, wurde der variable Anteil des Gens, in dem die Repeats liegen, mittels PCR amplifiziert.

Auf dem Agarosegel konnten drei unterschiedlich große Amplifikate des variablen Anteils des Aap Proteins beobachtet werden. 1457 besaß mit dem kleinsten variablen Abschnitt des Proteins die wenigsten Repeats und damit das kleinste Aap Protein. 8400 besaß mit dem größten variablen Abschnitt des Proteins die meisten Repeats und damit äquivalent das größte Aap Protein (Abbildung 4.34). Die beobachtete Größe des variablen Anteils des Aap Proteins in der PCR korreliert mit der im SDS PAGE identifizierten Größe der Aap Proteine.

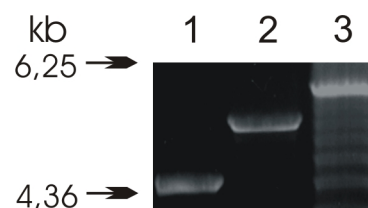


Abbildung 4.34: PCR der Aap Repeats.

Der variable Anteil des Aap Proteins wurde in einer PCR amplifiziert und auf einem Agarosegel aufgetragen. In der Spur 1 wurde das Amplifikat von dem Stamm 1457, in der Spur 2 von dem Stamm 1057 in der Spur 3 von dem Stamm 8400 aufgetragen. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Experiment dar.

4.3.4 Prozessierung von Aap

In der Untersuchung des Kulturüberstandes des Stammes 1457 im SDS PAGE konnte das Aap Protein in zwei verschiedenen Banden, mit den Größen 180 und 210 kDa, identifiziert werden. Diese Beobachtung weist auf eine extrazelluläre Prozessierung des Aap Proteins im Kulturüberstand hin. Um die Prozessierung des Aap genauer zu untersuchen, wurden zweidimensionale SDS PAGE des Stammes 1457 und 1457*sigB* angefertigt (siehe 3.7). Auf den Gelen von 1457 konnten drei Proteine in dem Größenbereich des Aap identifiziert werden (Abbildung 4.35). Im MALDI-TOF konnten zwei Proteine charakterisiert und dem Aap zugeordnet werden. Das größere Protein mit 210 kDa konnte mit einem Score von 101 identifiziert werden. Das kleinere Protein konnte nur mit einer sehr hoch eingestellten Fehlertoleranz (ppm) nicht signifikant gefunden werden. Analysen des Massenspektrums zeigten eine sehr hohe Ähnlichkeit mit dem Massenspektrum des größeren Proteins von 210 kDa. Die gewonnen Massenspektren zeigten sich jedoch etwas gegeneinander versetzt. Dies ist mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auf einen Kalibrationsfehler des Massenspektrometers bei der Messung des Proteins von 180 kDa zurückzuführen. Da aus der eindimensionalen SDS PAGE schon bekannt war, dass es sich bei diesem Protein um das Aap handeln muss, wurde das Massenspektrum zu Kontrollzwecken per Hand nachkalibriert. Hierzu wurden die Differenzen der einzelnen identifizierten Peptide der beiden Proteine von 210 und 180 kDa berechnet. Der Mittelwert der Differenzen wurde nun zu allen Peptiden des Proteins von 180 kDa addiert. Die nachkalibrierten Peptide wurden mit unterschiedlichen Fehlertoleranzen mit dem Mascot Algorithmus in der NCBI Datenbank gesucht. Mit einer eingestellten Fehlertoleranz von 110 ppm konnte das Aap mit einem Score von 65 gefunden werden. Zur Kontrolle wurde eine Suche mit einer sehr hoch eingestellten Fehlertoleranz (ppm) von 400 ppm durchgeführt, welche ebenfalls das Aap mit einem Score von 76 identifizierte.

Der isoelektrische Punkt konnte für das 210 kDa Protein auf ca. pH 4,4 und für das 180 kDa Protein auf ca. pH 4,7 bestimmt werden. Die zweidimensionalen Gele von 1457*sigB* zeigten zwei Proteine, wobei das größere der beiden von Größe und pH dem Aap von 180 kDa im Stamm 1457 entsprach. Es besaß eine Größe von 180 kDa und einen pH von ca. 4,7. Das Aap von 210 kDa war nicht mehr auf dem Gel von 1457*sigB* zu identifizieren (Abbildung 4.35).

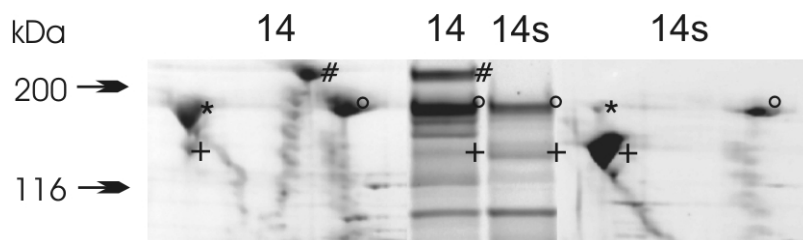


Abbildung 4.35: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Aap im Stamm 1457 und 1457sigB.

Die Kulturüberstände von 1457 (14) und 1457sigB (14s) wurden in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt und im Größenbereich zwischen 100 und 220 kDa einer äquivalenten eindimensionalen Gelelektrophorese gegenüber gestellt. # entspricht dem Aap von 210 kDa, ° entspricht dem Aap von 180 kDa, * markiert ein nicht identifiziertes Protein von 180 kDa und + markiert ein ebenfalls nicht identifiziertes Protein von 140 kDa. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis dar.

4.3.5 Schnittstellenanalyse des Aap

Alle bei der massenspektrometrischen Analyse der größeren Aap Bande von 1457 gefundenen Peptide wurden in die Proteinsequenz des Aap eingezeichnet (siehe 8.6). Es zeigte sich, dass die ersten beiden N-Terminalen Peptide im Stamm ATCC 12228 innerhalb der ersten 127 Aminosäuren direkt hinter dem Signalpeptid lagen (Position 72 aa und 127 aa beim Stamm ATCC 12228). Zum Vergleich wurden ebenfalls die Peptide aus der massenspektrometrischen Analyse des kleineren Proteins von 180 kDa miteingetragen. Die Peptidmassen mussten aufgrund eines Kalibrationsfehler bei der Messung von Hand korrigiert werden. Hierzu wurde die Differenz von ähnlichen Peptiden aus der massenspektrometrischen Analyse der größeren Bande von 210 kDa berechnet. Der Mittelwert (526 ppm) wurde mit den Massen aus dem Massenspektrum der kleinen Bande von 180 kDa verrechnet. Mit den so korrigierten Peptidmassen konnte das Aap mit einem nicht signifikant Score mit dem Mascot Algorithmus gefunden werden. Der Score dieser Untersuchung ist aufgrund des Kalibrationsfehlers und den anschließenden Berechnungen nicht verwertbar. Durch massenspektrometrische Untersuchungen im eindimensionalen SDS PAGE konnte die kleinere Bande von 180 kDa zuvor jedoch schon eindeutig als Aap bestimmt werden.

Die graphische Analyse der Peptide des kleineren Aap ergab (siehe 8.6), dass kein Peptid, selbst mit sehr hoch eingestellter Fehlertoleranz (ppm) unter Berücksichtigung des Kalibrationsfehlers, hinter der Signalsequenz gefunden werden konnte.

Tabelle 4.4: Vergleich der bei der Massenspektroskopischen Analyse des Aap

Die erhaltenen Massen aus den MALDI TOF Analyse vom Aap wurden unter Berücksichtigung des Kalibrationsfehlers aufgelistet. Die im kleineren Aap von 180 kDa fehlenden Massen hinter dem Signalpeptid sind hervorgehoben.

Aap 180 kDa	Aap 210 kDa
1049.31	1049.61
	1248.06
1262.22	1262.61
1317.21	1317.62
1388.16	
1400.34	1400.75
	1420.69
1744.31	1744.84
1772.30	
	1784.83
	<u>1801.86</u>
1871.40	1871.97
	<u>1881.85</u>
1899.33	1899.93
2069.32	2070.03
2079.35	2080.00
2125.33	2126.02
3145.30	

4.3.6 Transkriptionsanalyse von Aap

Es wurden Transkriptionsanalysen mittels quantitativer RT PCR des *aap* Gens durchgeführt. Bei der Transkriptionsanalyse konnte eine signifikante ca. 3-fach schwächere Tanskription des *aap* Gens bei den Stämmen 1457*sigB* und 8400*sigB* gemessen werden. In der stationären Phase konnte im Stamm 8400*sigB* ein nicht signifikanter Transkriptionsunterschied registriert werden. Der Stamm 1457*sigB* hingegen zeigte eine grenzwertig signifikante 2,5-fache schwächere Transkription (Abbildung 4.36).

Das *aap* Gen bei dem Stamm 1057*sigB* zeigte eine ähnliche Regulation wie bei dem Stamm 1457*sigB*, konnte jedoch nur in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer 2,5-fachen schwächeren Transkription signifikanten gemessen werden (Abbildung 4.36).

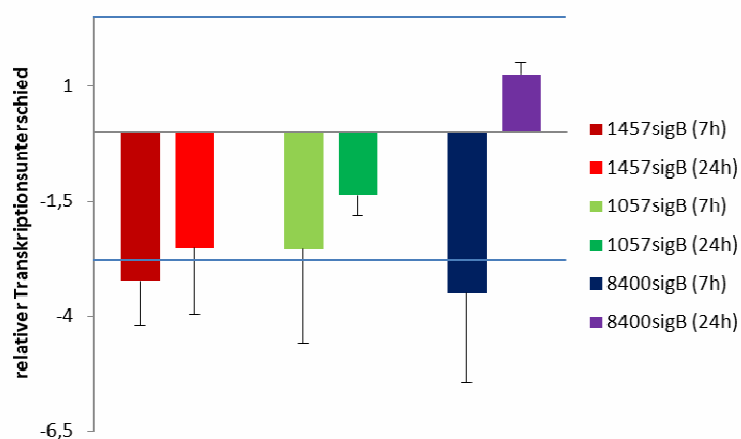


Abbildung 4.36: Transkriptionsanalyse von *aap*

Dargestellt ist die σ^B abhängige Transkription von *aap* in den Stämmen 1457*sigB*, 1057*sigB* und 8400*sigB* im Verhältnis zum Wildtyp in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Der Transkriptionsunterschied wurde jeweils im dreifach Ansatz im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode berechnet. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Experimenten mit dem jeweiligen Standardfehler. Die blauen Linien markieren den 2,5-fachen Unterschied als Grenzwert für eine signifikante Veränderung.

Ergänzend zur Transkriptionsanalyse wurden die relativen Transkriptionsunterschiede mit 1457 und 1457*sigB* als Referenzstämmen berechnet. In der basalen Transkription zeigten sich erhebliche stammübergreifende Unterschiede in der *aap* Transkription. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde in den Stämmen 1057 und 1057*sigB* eine ca. 77-fach höhere Transkriptionsrate des *aap* Gens im Vergleich zu den Stämmen 1457 und 1457*sigB* berechnet. Auch in der stationären Phase betrug der Transkriptionsunterschied einen Faktor von 13,9 bzw. 42.

Bei der Berechnung der basalen Transkriptionsdaten der Stämme 8400 und 8400*sigB* im Bezug zu 1457 und 1457*sigB* konnte, wie schon zuvor bei den Stämmen 1057 und 1057*sigB*, in der exponentiellen Wachstumsphase eine erheblich höhere Transkriptionsrate mit einem Faktor von 45 bzw. 49 bestimmt werden. In der stationären Wachstumsphase konnte beim Stamm 8400 ein 25,5-facher Transkriptionsunterschied errechnet werden. Bei dem Stamm 8400*sigB* stieg die Transkription bis auf das 59,3-fache an (Abbildung 4.37).

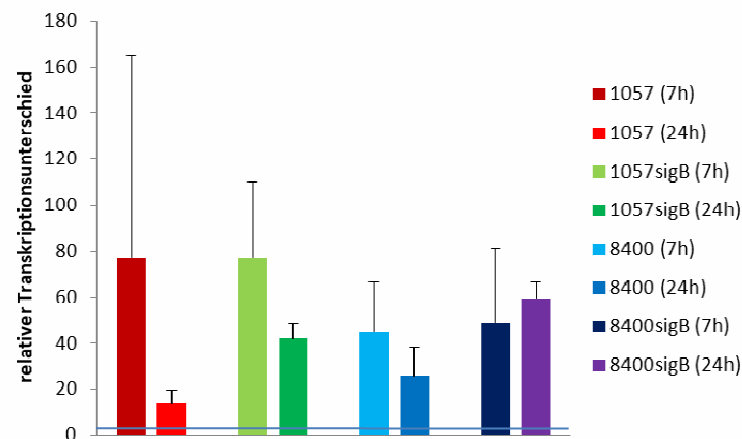


Abbildung 4.37: Basale Transkription von *aap*

Die Transkriptionsrate von *sarA* der Stämme 1057, 8400 und den entsprechenden σ^B Mutanten wurde ins Verhältnis der Transkriptionsrate von 1457 und 1457*sigB* gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert des berechneten relativen Transkriptionsunterschieds von drei im dreifach Ansatz durchgeführten Experimenten in der exponentiellen (7 h) und stationären (24 h) Wachstumsphase. Die blaue Linie markiert den 2,5-fachen Unterschied als Grenzwert für eine signifikante Veränderung.

4.4 Sekretomanalyse

4.4.1 2D-Gelelektrophorese des Kulturüberstandes

Bei der Auswertung der zu identifizierenden Proteine konnten bei dem Stamm 1457 bis zu 109 reproduzierbare Spots bestimmt werden. Sehr schwache Spots wurden in die Auswertung dabei nicht mit einbezogen. In der Mutante 1457*sigB* konnten hingegen nur 74 reproduzierbare Spots identifiziert werden. Die Mutante besaß somit deutlich weniger Proteine im Kulturüberstand als ihr Wildtyp. Bei der vergleichenden Auswertung der 2D Gele konnten 41 verschiedene Spots übereinstimmend in beiden Stämmen identifiziert werden. Einige Proteine wurden aus den Gelen ausgestochen und mit der Massenspektroskopie charakterisiert und schon bekannten Proteinen zugeordnet (Abbildung 4.38).

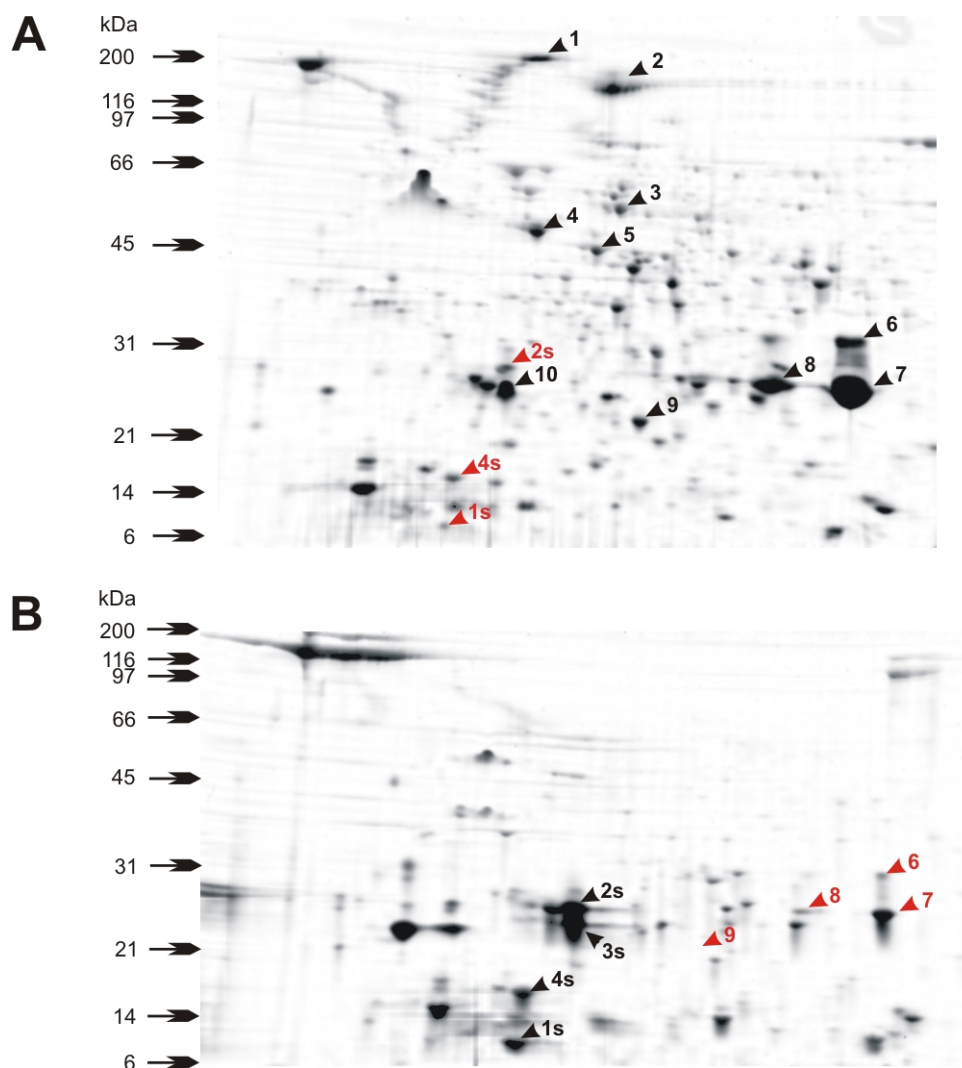


Abbildung 4.38: Zweidimensionale Auftrennung des Sekretoms.

Die extrazellulären Proteine von 1457 (A) und 1457*sigB* (B) wurden in der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt. Einzelne Proteinspots wurden in der Massenspektroskopie analysiert und bekannten Proteinen zugeordnet (Tabelle 4.7). Die identifizierten Proteine wurden mit schwarzen Pfeilen markiert und durchnummeriert. Mit roten Pfeilen sind Proteinspots markiert, die äquivalenten Spots im Vergleichsstamm entsprechen. Die Gele sind repräsentative Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen, die jeweils im fünffachen Ansatz durchgeführt wurden.

4.4.2 Charakterisierung der in der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit der Massenspektroskopie identifizierten Proteine

Aus dem Master Match-Set bei der Software gestützten Auswertung wurden einige Proteine ausgewählt und in der Massenspektroskopie mit MALDI-TOF oder QTOF analysiert. Einige Proteine konnten dabei gleich in mehreren Spots identifiziert werden (Tabelle 4.7).

Die identifizierten Proteine wurden mit Hilfe des Programms PSORTb Version 2.0.4⁵³ auf ihre Lokalisation in der Zelle untersucht. Das Aap wurde als einziges Protein mit

zwei Transmembranhelices (TMH) als ein Zellwandprotein identifiziert. Gleichzeitig konnte eine Signalsequenz und ein charakteristisches LPXTG Motiv gefunden werden.

Das Immunodominant Antigen A wurde als ein extrazelluläres Protein mit einer Signalsequenz und einer TMH vorhergesagt.

Das *alkaline shock protein 23* und das *Staphylococcal secretory antigen SsaA* konnten keinem Kompartiment mit einem signifikantem Score zugeordnet werden. Für das SsaA wurde jedoch eine TMH aufgezeigt. Mit dem Programm SignalP konnte bei dem Protein SsaA eine Signalsequenz nachgewiesen werden, so dass es sich bei dem SsaA wahrscheinlich ebenfalls um ein extrazelluläres Protein handelt.

Es konnten einige Proteine dem zytoplasmatischen Kompartiment zugeordnet werden: die Enolase, das Phosphocarrier Protein HPr, die Alkylhydroperoxidase Reductase, die Dihydrolipoamid Dehydrogenase und die Phosphoglycerat Kinase. Bei der Enolase und der Phosphoglycerat Kinase konnte zusätzlich eine TMH beschrieben werden.

Tabelle 4.5: Massenspektrometrische Analyse der Proteinspots aus der zweidimensionalen Gelelektrophorese

	Größe [kDa]	Größe theo. [Da]	Score	Charakterisiertes Protein mit Accession Nummer	
1	210	157 138	101	Aap, NP_763730	MALDI-TOF
2	190	157 138		Aap, NP_763730	MALDI-TOF
3	52	49 696	122	Dihydrolipoamide dehydrogenase, AAW54055	MALDI-TOF
4	45	47 247	74	Enolase, AAW53886	MALDI-TOF
5	43	42 739	82	Phosphoglycerat kinase AAW53874	MALDI-TOF
6	31	24 547	87	Immunodominant antigen A, AAW53038	MALDI-TOF
7	25	24 532	92	Immunodominant antigen A, Q5HL49	QTOF MS
8	26	24 532	92	Immunodominant antigen A, Q5HL49	QTOF MS
9	21	18 688	90	Alkaline shock protein 23, AAW55150	MALDI-TOF
10	23	21 086		alkyl hydroperoxide reductase, C subunit Q5HRY1	MALDI-TOF
1s	8	16 611	116	secretory antigen SsaA, Q8CMK5	QTOF MS
2s	26	21 086	74	alkyl hydroperoxide reductase, C subunit Q5HRY1	QTOF MS
3s	23	21 086	74	alkyl hydroperoxide reductase, C subunit Q5HRY1	QTOF MS
4s	15	9 507	107	Phosphocarrier protein HPR, Q8CMM7	QTOF MS

5 Diskussion

Die ehemals als apathogen eingestufte Spezies *Staphylococcus epidermidis* stellt im Rahmen nosokomialer und Fremdkörper-assoziiierter Infektionen in der modernen Medizin einen wichtigen Krankheitserreger mit hoher Morbidität und abhängig vom Patientenkollektiv auch hoher Mortalität dar. Der wichtigste Pathogenitätsfaktor von *S. epidermidis* ist die Fähigkeit der Bakterien zur Anheftung an Polymeroberflächen und zur Bildung mehrlagiger Biofilme¹⁶¹⁻¹⁶³. Im Anschluss an eine initiale Adhärenzphase, in welcher die Bakterien in Kontakt mit der zu besiedelnden Oberfläche treten, erfolgt die Akkumulation in einem mehrschichtigen Zellverband. In diesem werden die Zellen, die in keinem direkten Kontakt zur Oberfläche stehen, durch interzelluläre Adhäsion gehalten. Die interzelluläre Adhäsion wird entscheidend über das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin (PIA) vermittelt¹⁰³. In vorangegangenen Untersuchungen hatte sich eine regulative Funktion von σ^B auf die Expression von PIA gezeigt. In der vorliegenden Arbeit sollte der regulative Einfluss von σ^B auf die extrazellulären Proteine von *S. epidermidis* untersucht werden und Fragen nach weiteren Virulenzfaktoren und deren Regulation beantwortet werden.

5.1 Proteasen

In den durchgeführten SDS PAGE Auftrennungen der Kulturüberstände zeigte sich in den σ^B Mutanten der untersuchten Stämme hochregulierte Proteine (Abbildung 4.1). In der Massenspektroskopie konnten die hochregulierten Proteine als extrazelluläre Proteasen identifiziert werden. In der beobachteten Bande der Größe 38 kDa konnte eine Cysteinprotease, in den Banden von 29, 27 und 26 kDa konnte eine Serinprotease identifiziert werden. In der Literatur sind die beobachteten Proteasen von *S. epidermidis* schon isoliert und näher beschrieben worden. Die Cysteinprotease Ecp von *S. epidermidis* ist ein pre-pro Enzym und besitzt eine große Homologie zu anderen Proteasen von Staphylokokken^{24, 153, 164}. Sie besitzt eine theoretische Größe von 19832 Da, die unprozessierte pro Form der Protease eine theoretische Größe von 41357 Da¹⁷⁵. Die bei den durchgeführten Untersuchungen im Kulturüberstand charakterisierte Cysteinprotease besaß eine ungefähre Größe von 38 kDa und entspricht demnach der unprozessierten pro Form der Protease. Die entsprechende aktive Form der

Protease konnte nur anhand von Größenangaben aus der Literatur auf dem SDS PAGE in den Stämmen 1457, 1057 und ihren entsprechenden Mutanten beobachtet werden (Abbildung 4.1). Die Identifizierung der beobachteten aktiven Protease gelang in der Massenspektroskopie nicht. Rice *et al.* beschrieben die unprozessierte Form der Cysteinprotease (SspB) bei *S. aureus* mit einer Größe von 40 kDa und zwei prozessierte Formen zwischen 22 bis 23 kDa¹⁵³. Nur in dieser Untersuchung konnte die prozessierte Cysteinprotease als eine Doppelbande identifiziert werden. Interessanterweise stellte sich bei späteren Untersuchungen der benutzte Stamm *S. aureus* RN6390 als eine funktionelle σ^B Mutante durch eine Mutation im *rsbU* Gen heraus. Auch in der vorliegenden Arbeit traten bei *S. epidermidis* zwei Banden im Bereich der Cysteinprotease von 18 und 20 kDa in den σ^B Mutanten auf. Der Wildtyp besaß hingegen nur eine 20 kDa große Bande in diesem Größenbereich (Abbildung 4.1). Die Bedeutung der Doppelbanden in den σ^B Mutanten ist nicht geklärt.

Die Serinprotease Esp von *S. epidermidis* wird ebenfalls als ein pre-pro Enzym transkribiert. Im SDS PAGE konnte eine im MALDI TOF als Serinprotease identifizierte Bande von 29 kDa charakterisiert werden. Sie wurde von zwei Banden mit 26 und 27 kDa gefolgt, die ebenfalls als Serinproteasen identifiziert wurden (Abbildung 4.1). Bei unterschiedlichen Acrylamidkonzentration im SDS Gel konnten Größenvariationen der Serinprotease beobachtet werden. Die Ursache ist unklar (siehe Abbildung 4.2).

In der Literatur konnte eine aktive Serinprotease von *S. epidermidis* mit einer Größe von 25 bzw. 27 kDa im Kulturüberstand beobachtet werden^{119, 129}. Eine Konfiguration der Serinprotease Esp mit drei Banden im Kulturüberstand ist zuvor noch nicht bei *S. epidermidis* beobachtet worden. Die Sequenz der Protease Esp zeigte eine 59 % Homologie zur V8 Serinprotease (SspA) von *S. aureus* (siehe 8.3).

Eine im Kulturüberstand von *S. epidermidis* bekannte Metalloprotease konnte bei den durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig bestimmt werden. Die Metalloprotease SepP1 von *S. epidermidis* wird von dem Gen *sepA* codiert und wird als ein pre-pro Enzym synthetisiert^{39, 181}.

Ein vermehrtes Auftreten von extrazellulären Proteasen im Kulturüberstand sollte in einer gesteigerten Proteaseaktivität nachvollziehbar sein. Aus diesem Grunde wurde die extrazelluläre gesamt Proteaseaktivität gemessen. Die Messungen zeigten mindestens

eine Verdoppelung der extrazellulären Proteaseaktivität in den σ^B Mutanten (Abbildung 4.9). Auf Casein-Agarplatten konnte die gemessene Aktivitätssteigerung der Proteasen bestätigt und gleichzeitig visualisiert werden (Abbildung 4.8). Die im SDS PAGE beobachtete Erhöhung der Proteaseexpression in den σ^B Mutanten kann durch mehrere Mechanismen bedingt sein. Ein durch σ^B beeinflusster Prozessierungsmechanismus, modifizierte Exportmechanismen oder eine Regulation auf Transkriptionsebene sind nur einige denkbare Möglichkeiten. Zur weiteren Klärung der Regulationsmechanismen wurden Transkriptionsanalysen der Proteasegene durchgeführt. Die Transkriptionsanalysen zeigten eine negative Regulation der Proteasegene durch σ^B auf Transkriptionsebene (Abbildung 4.11, 4.12 und 4.13).

Alternative Sigmafaktoren können direkt nur eine positive Regulation ausüben. Die negative Regulation der Proteasen setzt somit einen zwischengeschalteten Regulator voraus, der den regulativen Einfluss von σ^B auf die Effektorgene übermittelt. Zwei globale Regulatoren *agr* und *sarA* wurden in die Transkriptionsanalysen miteinbezogen, um mögliche Regulationen der extrazellulären Proteasen über diese Regulatoren zu untersuchen. Bei den durchgeführten Transkriptionsanalysen der σ^B Mutanten zeigte sich eine stärkere Transkription von *sarA* bei allen Stämmen, führend in der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zum Wildtyp. Die basalen Transkriptionsanalysen zeigten eine vergleichbare Transkriptionsrate unter allen in dieser Studie untersuchten Stämmen. Die Transkriptionsanalyse von *agr* bzw. dem regulativen Transkriptionsprodukt *RNA III* zeigte bei 1457*sigB* und 8400*sigB* eine stärkere Transkription. Der Stamm 1057 zeigte keine Veränderung der Transkription durch σ^B . In den basalen Transkriptionsanalysen zeigte sich eine deutlich gesteigerte Transkriptionsrate von *agr* in den Stämmen 1057 und 1057*sigB* (siehe 4.1.6). Die fehlende Modulation der *agr* Transkription durch σ^B könnte in den Stämmen 1057 und 1057*sigB* auf das schon im Wildtyp sehr hohe Transkriptionsniveau von *agr* zurückzuführen sein. Eine weitere Steigerung der Transkriptionsrate scheint über das bestehende Niveau nicht mehr möglich zu sein. Das stark erhöhte Transkriptionsniveau von *agr* könnte für die hohe extrazelluläre Proteaseaktivität in den Stämmen 1057 und 1057*sigB* verantwortlich sein (siehe 4.1.4). *Agr* scheint somit mitverantwortlich für die Übermittlung der σ^B induzierten Regulation von extrazellulären Proteasen zu sein.

In der Literatur konnten schon Vuong *et al.*¹⁹² bei *S. epidermidis* eine positive Regulation der extrazellulären Proteaseaktivität durch *agr* zeigen. Bei *S. aureus* sind beiden globalen Regulatorsysteme *agr*^{120, 138, 149} und *sarA*³⁰ schon weitreichend beschrieben worden. Sie sind die wichtigsten und best untersuchtesten Regulatoren für extrazelluläre Proteine bei *S. aureus*. Bei *S. aureus* zeigte sich eine negative Regulation von extrazellulären Proteasen durch *sarA* und eine positive Regulation durch *agr*^{6, 26, 165, 190}. *SarA* ist in der Lage, alle bei *S. aureus* bekannten extrazelluläre Proteasen (Cysteinprotease SspB, Serinprotease SspA, Metalloprotease Aur, Cysteinprotease ScpA)^{26, 31} direkt ohne Modulation von *agr* und dessen Transkriptionsprodukt *RNA III* zu steuern¹²⁸. Es konnte eine positive Regulation auf die Transkription von *RNA III* durch die Bindung von SarA an das *agr* Operon gezeigt werden^{14, 29, 121}. In Stämmen mit funktionsfähiger σ^B Regulationskaskade wird die *agr* Expression durch σ^B negativ beeinflusst unabhängig von dem beschriebenen positiven Effekt von SarA¹⁴. Diese Ergebnisse unterstützen die These bei *S. epidermidis* einer σ^B abhängigen negativen Regulation von *agr*. Die fehlende negative Regulation von *agr* bei den σ^B Mutanten führt im Folgenden zu einer positiven Regulation der Proteasegene und zu der beobachteten gesteigerten extrazellulären Proteaseaktivität. Da, wie bereits angesprochen, Sigmafaktoren nur eine positive Regulation ausüben können, muss es noch einen weiteren bis jetzt unbekanntem Regulator geben, der die Regulationsvermittlung von σ^B zu *agr* übernimmt.

Wie in der Literatur beschrieben, werden alle beobachteten extrazellulären Proteasen als pre-pro Enzyme transkribiert. Pre-pro Enzyme werden durch unterschiedliche Mechanismen in ihre aktive Form prozessiert. Häufig wird eine gegenseitige Prozessierung bei extrazellulären Proteasen beobachtet. Zur genaueren Untersuchung der Prozessierungsmechanismen der beobachteten Proteasen wurden Inhibitionsstudien mit Proteaseinhibitoren auf Casein-Agarplatten durchgeführt.

Nach Zugabe eines Cysteinprotease spezifischen Inhibitors E64 in Casein-Agarplatten konnte bei den kultivierten Kulturen der Stämme 1057 und 1457 mit ihren isogenen Mutanten eine Reduktion eines lysierenden Proteaseringes beobachtet werden. Eine Veränderung des Proteaseprofils bei den Stämmen 8400 und 8400*sigB* konnte nicht beobachtet werden. Die Inhibitionsstudie mit E64 zeigt neben der Inhibition des lysierenden Ringes keine Veränderung der Proteaseaktivität (Abbildung 5.1). Eine

Funktion in der Proteaseprozessierung ist somit unwahrscheinlich. Bei den benutzten Versuchsbedingungen besitzt die Cysteinprotease eine lysierende Eigenschaft von Casein. Die fehlende Inhibition eines lysierenden Proteaseringes im Stamm 8400 und 8400*sigB* scheint ein erster Hinweis zu sein, dass der Stamm 8400 und 8400*sigB* keine aktive Form der Cysteinprotease im Kulturüberstand besitzen, die mit dem benutzten Versuchsaufbau dargestellt werden kann (Abbildung 5.1). Berücksichtigt man die Beobachtungen aus dem SDS PAGE (Abbildung 4.1), wo keine Cysteinproteasenbande bei 38 kDa im Stamm 8400 und 8400*sigB* identifiziert werden konnte, kann man den Stamm 8400 und 8400*sigB* als einen funktionellen Deletionsstamm der Cysteinprotease ansehen. Die Transkriptionsdaten von 8400, 8400*sigB* zeigten eine Transkription der Cysteinprotease nach 24 h, die sich jedoch nicht im SDS Gel nachvollziehen ließ. Die basalen Transkriptionsdaten beim Stamm 8400, 8400*sigB* zeigten eine reduzierte basale Transkriptionsrate um den Faktor 118 (Abbildung 4.13 und 4.15). Die Transkriptionsdaten, Inhibitionsstudien und SDS PAGE belegen eine deutlich reduzierte Aktivität der Cysteinprotease im Kulturüberstand der Stämme 8400, 8400*sigB*.

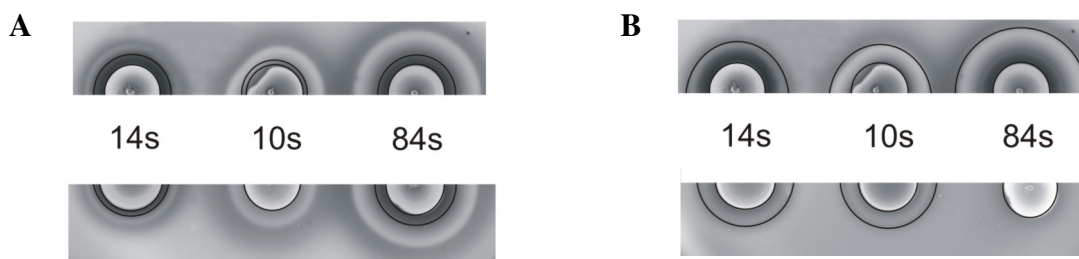


Abbildung 5.1: Inhibitionsstudie auf Casein-Agarplatten

Dargestellt sind die denaturierten Casein-Agarplatten der aufgetragenen Mutanten. 14s: 1457*sigB*, 10s: 1057*sigB* 84s: 8400*sigB*.

Die obere Reihe zeigt die Casein-Agarplatten ohne Proteaseinhibitorzusatz, die untere Reihe zeigt die Casein-Agarplatten mit Proteaseinhibitorzusatz A: E64 und B: EDTA.

Zu A: Die lysierenden Proteaseringe sind mit dunklen Ringen markiert.

Zu B: Die gesamte Proteaseaktivität ist mit dunklen Ringen markiert.

Nach Zugabe eines Metalloprotease spezifischen Proteaseinhibitors EDTA in die Casein-Agarplatten zeigte sich eine deutliche Reduktion der Proteaseaktivität in allen untersuchten Stämmen. Besonders im Stamm 8400, 8400*sigB* wurde nahezu die gesamte Proteaseaktivität vollständig inhibiert. Hieraus konnte eine zentrale Bedeutung der Metalloprotease in der Prozessierung der extrazellulären Proteasen geschlossen werden. Wie oben ausgeführt, handelt es sich bei den Stämmen 8400 und 8400*sigB* um funktionelle Deletionsstämme der Cysteinprotease. Die vollständige Inhibition der

extrazellulären Proteaseaktivität der Stämme 8400 und 8400*sigB* setzt die simultane Inhibition der Serinprotease Esp voraus. Da EDTA ein Metalloproteasen spezifischer Inhibitor ist, findet diese simultane Inhibition wahrscheinlich über eine ausbleibende Prozessierung der pro Form durch die inhibierte Metalloprotease statt. Die Metalloprotease kann somit als verantwortlich für die Serinproteaseprozessierung identifiziert werden.

Die in den Stämmen 1457, 1057 und ihren entsprechenden Mutanten beobachtete Aktivität eines denaturierenden Proteaseringes stellt eine von diesem Aktivierungsmechanismus ausgeschlossene Protease dar. Es liegt nahe, die Cysteinprotease als ursächlich hinter dieser Bande zu vermuten, auch wenn die Cysteinprotease zuvor als ein lysierender Hof auf den Casein-Agarplatten identifiziert werden konnte. Der Widerspruch der lysierenden und denaturierenden Höfe kann mit der fehlenden Aktivität der Serin- und Metalloprotease begründet werden. Die lysierende Eigenschaft der Cysteinprotease könnte als Bedingung die vorhergehende Spaltung des Caseins durch die genannten Proteasen haben. Eine bisher unbekannte, weitere Protease kann jedoch mit letzter Sicherheit nicht ausgeschlossen werden.

In der Literatur ist nur wenig bekannt über die Regulation von extrazellulären Proteasen bei *S. epidermidis*. Im Gegensatz zu *S. epidermidis* wurde viel Forschungsarbeit über die extrazellulären Proteasen bei *S. aureus* durchgeführt. *S. aureus* sezerniert in seinem Kulturüberstand vier näher beschriebene Proteasen, die als eine Serinprotease SspA³⁸, eine Cysteinprotease SspB, eine weitere Cysteinprotease ScpA^{144, 153} und eine Metalloprotease Aur⁹ beschrieben wurden. Die Proteasen von *S. aureus* werden ähnlich wie bei *S. epidermidis* als pre-pro Enzyme synthetisiert. In Untersuchungen konnte eine gegenseitige Aktivierung der Proteasen von *S. aureus* durch Prozessierung gezeigt werden. Die Serinprotease (SspA) wird von der Metalloprotease (Aur), abhängig von autokatalytischen Prozessierungen, proteolytisch aktiviert^{37, 94, 125} (Abbildung 5.2). Die Cysteinprotease SspB befindet sich in einem Operon mit der Serinprotease SspA und wird mit ihr cotranskribiert. Die Protease SspB wird durch proteolytische Spaltung durch SspA im Kulturüberstand aktiviert^{27, 153}. Die zweite Cysteinprotease ScpA wird unabhängig von allen bekannten Proteasen von *S. aureus* aktiviert^{15, 173}. Der Prozessierungsmechanismus der Metalloprotease ist weitgehend unklar. Eine autokatalytische Prozessierung, wie es bei Thermolysin ähnlichen Proteinen häufig der

Fall ist ¹¹⁶, konnte durch Shaw *et al.* ausgeschlossen werden ¹⁷³. Eine Analyse der Schnittstellen der pro Form zeigte eine hohe Spezifität von einer Gruppe von Serinproteasen Spl, die in den Überstand von *S. aureus* sezerniert werden. Diese Serinproteasen besitzen nur ein pre Fragment und benötigen somit keine proteolytische Aktivierung ¹⁵⁰. Es ist somit möglich, dass die Proteaseaktivierungskaskade seinen Beginn bei den Spl Proteasen hat und sich über Aur zu SspA und SspB fortsetzt.

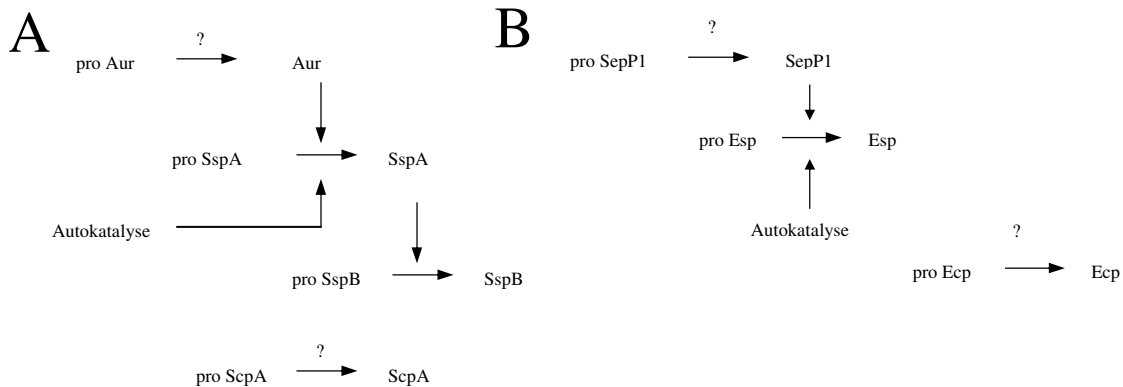


Abbildung 5.2: Proteaseaktivierungskaskade von *S. epidermidis* und *S. aureus*

A stellt die modifizierte Proteaseaktivierungskaskade bei *S. aureus* von Shaw *et al.* dar. B stellt die in dieser Arbeit beschriebene Proteaseaktivierungskaskade bei *S. epidermidis* dar.

Die große Homologie der Proteasen von *S. epidermidis* zu *S. aureus* machen ähnliche Prozessierungsmechanismen der Proteasen sehr wahrscheinlich (siehe 8.1, 8.2 und 8.3). Die in den durchgeführten Inhibitionsstudien dieser Arbeit dargestellte Prozessierung der Serinprotease durch eine Metalloprotease lässt sich bei *S. aureus* wiederfinden. Die Aktivierung der Metalloprotease ist jedoch weiterhin unklar. Eine Aktivierung der Metalloprotease in *S. epidermidis* durch die Spl Proteasen ist nicht möglich, da die Serinproteasen Spl in keinem Koagulase-negativen Staphylokokken Stamm identifiziert werden konnten. Eine BLAST Suche in dieser Arbeit konnte keine Homologien im Genom von *S. epidermidis* aufzeigen.

S. aureus besitzt zwei extrazelluläre Cysteinproteasen, ScpA und SspB. Die Sequenz der Cysteinprotease von *S. epidermidis* Ecp zeigte eine Homologie von 60 % zum Staphopain A (ScpA) (siehe Anhang 8.2) und 43 % zum Staphopain B (SspB) (siehe Anhang 8.1) ¹³¹. Die Cysteinprotease SspB von *S. aureus* befindet sich mit einem Staphostatin B (SscB) und der Serinprotease SspA in einem Operon *ssp* ¹⁵³. Alle drei Gene werden von demselben Promoter gesteuert und so gemeinsam transkribiert. Im

Gegensatz dazu liegt die Cysteinprotease ScpA außerhalb des *ssp* Operons bei *S. aureus*. Bei *S. epidermidis* liegt die Cysteinprotease Ecp, ähnlich wie die Cysteinprotease ScpA bei *S. aureus*, in einem eigenen Operon. Die Konfiguration der Gene lässt somit eine Homologie der Ecp zur ScpA von *S. aureus* annehmen. Mit dem Hintergrund der Aktivierungskaskade von Shaw *et al.* wird dies durch die durchgeführten Inhibitionsstudien, die durch die Zugabe von EDTA eine Inhibition der Serinprotease, jedoch eine aktive Cysteinprotease zeigten, bestätigt (Abbildung 5.2).

Bei genauerer Betrachtung der Serinprotease im SDS PAGE fielen 3 Banden auf, die in der Massenspektroskopie als Serinproteasen identifiziert werden konnten. Die größte Bande von 29 kDa im Stamm 8400 und 8400*sigB* zeigte eine vergleichbare Intensität zum Stamm 1057 und 1057*sigB*. Mit dem Wissen, dass es sich bei der Serinprotease um ein pre-pro Enzym handelt, muss es sich bei der großen Bande von 29 kDa um die pro Form handeln. Die kleineren Banden, die Prozessierungsprodukte der Protease, besaßen im Stamm 8400 und 8400*sigB* eine deutlich geringere Intensität zu den Stämmen 1057, 1057*sigB* und 1457*sigB*. Aus unbekanntem Gründen scheint die Prozessierung der Protease langsamer abzulaufen als in den Vergleichsstämmen. Wie in den durchgeführten Untersuchungen herausgearbeitet, wird die pro Form der Serinprotease in die aktive Form durch die Metalloprotease prozessiert. Die basalen Transkriptionsanalysen der Metalloprotease hatten ein vergleichbares Transkriptionsniveau im Stammvergleich gezeigt (Abbildung 4.16). Im stammspezifischen Vergleich der Transkriptionsdaten fiel eine unterschiedliche Metalloproteasetranskription im Vergleich mit der Serin- und Cysteinprotease auf. 1457 zeigte im Verhältnis die geringste Metalloproteasetranskription, gefolgt von einer etwas höheren Transkription bei 1057. Bei 8400 wies die Metalloprotease die höchste Transkriptionsrate der untersuchten Proteasen auf. Vor dem Hintergrund des beschriebenen Prozessierungsmechanismus und der hohen Konzentration der Metalloprotease im Stamm 8400 im Verhältnis zur Serinprotease konnte die verzögerte Prozessierung der Serinprotease und Akkumulation der pro Form nicht erklärt werden.

Die Analyse des Gens *esp* in *S. epidermidis* hatte in vorangegangenen Studien gezeigt, dass Esp einer Prozessierung, ähnlich der Serinprotease (SspA) von *S. aureus*, unterliegt⁴⁰. Die Prozessierung von SspA bei *S. aureus* erfolgt durch eine komplexe, abwechselnd autokatalytische und Metalloproteasen abhängige Spaltung des pro Peptides. Für die

Prozessierung durch die Metalloprotease ist eine autokatalytische Spaltung an Position Q_{↓44}SSKQQ Voraussetzung. Das pro Peptid von SspA besitzt zwei Schnittstellen für die Metalloprotease, KGGN_{↓58}LKPLE und direkt vor dem aktiven, fertigen Protein REHAN_{↓69}VILP. Ein Vergleich des pro Peptides von *S. aureus* und *S. epidermidis* zeigt große Unterschiede. Nur die Schnittstelle der Metalloprotease bei KGGN_{↓58}LKPLE konnte bei *S. epidermidis* identifiziert werden¹²⁵. Bei vorangegangenen Untersuchungen konnte durch Sequenzierung des N-Terminales Endes von Esp der Beginn der fertigen Protease bei ₆₇VILPNN bestimmt werden^{119, 129}. Die zusätzliche Schnittstelle bei KGGN_{↓58}LKPLE lässt einen ähnlichen schrittweisen Prozessierungsmechanismus vermuten wie bei *S. aureus* beobachtet, auch wenn die spezifischen Schnittstellen, besonders die der autokatalytischen Prozessierung, z. T. nicht übereinstimmen. Diese Annahme wird durch die Beobachtung von drei Banden im SDS PAGE gestützt, welche mit dem Hintergrund der schrittweisen Prozessierung bei *S. aureus*, aus der pro Form, einem Intermediärprodukt und der aktiven Protease bestehen¹²⁵. Die Diskrepanz von vielen akkumulierten Vorstufen der Serinprotease und einer hohen Metalloproteasenkonzentration im Stamm 8400 und 8400*sigB* kann durch eine Störung des komplizierten Aktivierungsmechanismus der Serinprotease, z. B. durch eine Punktmutation, erklärt werden. Da im SDS PAGE eine Prozessierung der Serinprotease beim Stamm 8400 nachzuvollziehen ist, kann eine vollständige Unterbrechung der Aktivierungskaskade ausgeschlossen werden. Im Stamm 1457*sigB* ist fast ausschließlich die aktive Serinprotease zu beobachten. Der entsprechende Wildtyp 1457 besitzt nur eine schwach abzugrenzende Serinproteasenbande der aktiven Form. Dies lässt sich gut mit der Transkriptionsanalyse in Einklang bringen, die eine stärkere Transkription in der Mutante nach 24 h zeigte. Im Stamm 1457*sigB* scheint ein günstiges Verhältnis der Serin- und Metalloprotease bei ungestörtem Prozessierungsmechanismus vorzuliegen, so dass alle Vorstufen in die aktive Protease umgewandelt werden können (Abbildung 4.1). Im Stamm 1057*sigB* können alle Vorstufen der Serinprotease beobachtet werden. Schon im Wildtyp können schwache Banden der Vorstufen abgegrenzt werden. Die basalen Transkriptionsdaten zeigten eine deutlich höhere Transkription der Serinprotease im genetischen Hintergrund 1057 zum Referenzstamm 1457 von einer bis zu 781 fach stärkeren Transkription. Im Gegensatz zu 8400, 8400*sigB* führte der Anstieg der Transkription bei einer funktionsfähigen

Aktivierungskaskade zu einem gleichzeitigen Anstieg der beobachteten Intermediärprodukte und der aktiven Protease. Der starke Anstieg der Transkription der Serinprotease macht bei einer nahezu identischen Transkriptionsrate der Metalloprotease zu den Referenzstämmen 1457, 1457*sigB* eine Überlastung des Prozessierungsprozesses mit Akkumulation der Vorstufen wahrscheinlich. Dies führte zu einer vermehrten Akkumulation der pro Form und des Intermediärproduktes im Kulturüberstand (Abbildung 4.1).

Zusammenfassend lässt sich festhalten: σ^B ist ein negativer Regulator von extrazellulären Proteasen. Er vermittelt über *agr* die Regulation der Proteasen bei den Stämmen 1457 und 8400. Im Stamm 1057 ließ sich aufgrund der hohen Transkriptionsrate von *agr* im Wildtyp keine Transkriptionsregulation von *agr* durch σ^B feststellen. Die Regulation der Proteasen wird wahrscheinlich in diesem Stamm über einen weiteren Regulator wie *sarA* mitbeeinflusst. Bei allen untersuchten Stämmen lässt sich eine geringe Regulation von *sarA* durch σ^B feststellen. Jeder untersuchte Stamm besitzt eine etwas unterschiedliche Zusammensetzung der extrazellulären Proteasen. So besitzt 8400 eine deutlich reduzierte Cysteinproteasenaktivität bzw. stellt eine natürliche Cysteinproteasenmutante dar. Zusätzlich scheint er eine reduzierte Serinproteasenaktivität zu besitzen.

5.2 Lipasen

Im Kulturüberstand von *S. epidermidis* konnten neben den herab regulierten Proteasen noch differentiell regulierte Banden beobachtet werden. In der Bande von 90 kDa wurde die Lipase SEL-1 (SERP2388, Accession Number YP_189935) identifiziert, in der Bande von 100 kDa konnte eine Lipase mit nicht abschließend geklärter Identität charakterisiert werden (siehe 4.2.1). Die Lipasen im Kulturüberstand bei *S. epidermidis* zeigten ein differentielles Bild der σ^B abhängigen Expression. Im SDS Gel konnte bei 100 kDa eine Lipase identifiziert werden, die in den Stämmen 1457 und 8400 eine verminderte Expression durch die σ^B Mutation zeigte. Im Stamm 1057 konnte dem entgegengesetzt eine stärkere Expression durch σ^B festgestellt werden. In der Literatur konnten bei *S. epidermidis* zwei unterschiedliche Lipasen im Kulturüberstand isoliert und näher charakterisiert werden. Farrell *et al.* konnten eine Lipase SEL-1 isolieren, die von dem Gen *gehC* kodiert wird⁴⁴. Die aktive Lipase besaß eine im SDS PAGE

beobachtete Größe von 43 kDa. Im Kulturüberstand konnten Farrell *et al.* eine 97 kDa große Bande identifizieren, welche eindeutig mit anti-Lipaseserum reagierte, obwohl die theoretische Größe der pro Lipase nur 77 kDa entspricht⁴⁴. Eine zweite Lipase SEL-2 konnte von Longshaw *et al.* isoliert werden⁹⁶. Sie wird von dem Gen *gehD* kodiert und besitzt eine theoretische Größe von 72 kDa. Auftrennungen im SDS PAGE zeigten eine Größe von 45 kDa der prozessierten Form der Lipase.

Die im SDS Gel beobachtete Expression der Lipasen sollte in einer nachvollziehbaren Änderung der Lipaseaktivität messbar sein. Aus diesem Grunde wurden die Kulturüberstände der untersuchten Stämme in einem Aktivitätstest untersucht und mit der σ^B Mutante verglichen. Die verwendete Methode wurde von Smeltzer *et al.* etabliert und stellte sich als spezifisch zur Messung von Lipaseaktivität in seinen Untersuchungen dar¹⁷⁶. In den durchgeführten Messungen stellte sich der Stamm 8400 und 8400*sigB* mit der am höchsten gemessenen Lipaseaktivität dar, mit einer mehr als doppelt so hohen Lipaseaktivität im Stamm 8400*sigB* als im Vergleich zum Wildtyp. Die Aktivitäten der Stämme 1457 und 1057 unterschieden sich nur geringfügig, mit einer leicht höheren Aktivität im Stamm 1057. Bei den Stämmen 1057 und 1057*sigB* zeigte im Gegensatz zu den Vergleichsstämmen die Mutante eine niedrigere Aktivität (siehe 4.2.3). Der beobachtete Phänotyp im SDS Gel lässt sich somit gut auf Aktivitätsebene nachvollziehen. Zur Untersuchung einer σ^B abhängigen Regulation auf Transkriptionsebene wurden Transkriptionsanalysen der Lipasengene durchgeführt. In den Transkriptionsanalysen der Gene *gehC* und *gehD* konnte die differentielle Expression zwischen den genetischen Hintergründen aus dem Phänotyp nicht nachvollzogen werden. Hier zeigte sich eine stärkere Transkription der Lipase SEL-1 in allen untersuchten Mutanten in der stationären Wachstumsphase. Die basalen Transkriptionsdaten ergaben deutlich unterschiedliche Transkriptionsniveaus. Die Lipase SEL-1 wird im Stamm 1457 am niedrigsten und im Stamm 8400 mit einer bis zu 23-fach stärkeren Transkription nachgewiesen. Auffällig ist eine hohe basale Transkription bei beiden Lipasen in den Stämmen 1057 und 1057*sigB* in der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zu den Vergleichsstämmen (siehe 4.2.5). Zur Klärung des Widerspruchs der Transkriptionsanalysen und des Phänotyps wurden Zymographie-Gele angefertigt. Mit Ausnahme des Stammes 1057 besaßen alle Wildtypen eine lipolytische Aktivität ausschließlich im Bereich zwischen 66 und

97 kDa (Abbildung 4.23). Bei vorangegangenen Studien hatte sich gezeigt, dass in diesem Bereich die unprozessierten pro Formen der Lipasen zu erwarten sind^{44, 96}. Schon die unprozessierten pro Formen der Lipasen von *S. epidermidis* besitzen eine lipolytische Aktivität, was mit vorherigen Untersuchungen von Staphylokokkenlipasen übereinstimmt¹⁵⁹. 1057 zeigte zusätzlich zu den Vergleichsstämmen eine lipolytische Aktivität im Bereich um 45 kDa. Bei allen σ^B Mutanten konnte eine kräftige Lysezone im Bereich der prozessierten Lipasen um 45 kDa identifiziert werden. Zwischen den großen Lysezonen traten feinere Banden auf, die ebenfalls eine lipolytische Aktivität besaßen. Auffällig ist die Bildung eines verwaschenen, unscharfen Lysebereichs zwischen diesen Zwischenstufen in den Stämmen 1457*sigB* und 1057. Die nativen SDS PAGE zeigten deutlich eine σ^B abhängige Prozessierung der Lipasen im Kulturüberstand von *S. epidermidis*. Die Prozessierung scheint in einer schrittweisen Prozessierung des Propeptides zu geschehen. Alle Zwischenprodukte sind dabei lipolytisch aktiv. Farrell *et al.* hatten ähnliche Beobachtungen bei der Isolierung der Lipase SEL-1 gemacht⁴⁴. Auch sie konnten mehrere Zwischenprodukte bei 97, 68, 64 und 46 kDa, abhängig vom Alter der Kultur, ausmachen.

In der Literatur konnte für die Prozessierung der pro Lipase von *Staphylococcus hyicus* eine Proteasen abhängige Spaltung gezeigt werden. Weiterführende Untersuchungen konnten zwei Metalloproteasen im Kulturüberstand von *S. hyicus* zeigen, wovon die Protease ShpII sich verantwortlich für die Prozessierung der pro Lipase zur fertigen Lipase zeigte⁷. Bei *S. aureus* wurden Prozessierungsstudien der Lipasen mit Proteaseinhibitoren durchgeführt¹⁵⁸. Es wurden Aktivitätsanalysen von SDS PAGE durchgeführt, die ein aktives pro Enzym und ein aktiviertes fertiges Enzym zeigten. Zwischen diesen beiden Formen konnte eine breite, unspezifische Aktivität detektiert werden. Einzelne Banden ließen sich nicht abgrenzen. Die Zugabe eines Cysteinproteaseinhibitors E64 in die wachsende Kultur inhibierte die Prozessierung der pro Lipase. Die Zugabe von Phosphoramidon, ein Metalloproteaseinhibitor, führte ebenfalls zu einer fehlenden Prozessierung der pro Form. Die Zugabe eines Serinproteaseinhibitors, Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF), führte zu keiner Akkumulation der unprozessierten Lipase, beeinflusste jedoch die Freisetzung der Intermediärprodukte. Die Autoren folgerten, dass eine Cystein- bzw. Metallo-cysteinprotease an der Prozessierung beteiligt ist.

In den Analysen zu den extrazellulären Proteasen in *S. epidermidis* in der vorliegenden Arbeit konnte 8400 als ein funktioneller Deletionsstamm der Cysteinprotease beschrieben werden. Im nativen SDS PAGE ist eine unbeeinträchtigte Prozessierung der Lipasen zu sehen. Eine Beteiligung der Cysteinprotease kann somit ausgeschlossen werden. Auffällig ist der fehlende verwaschene, unscharfe Lysebereich in den Stämmen 8400 und 8400*sigB* im Bereich zwischen 66 und 45 kDa. Die Cysteinprotease scheint in den Stämmen 1457, 1057 und den entsprechenden Mutanten für eine unspezifische Degradierung der Lipasen verantwortlich zu sein, die in einer fehlenden Bandenbildung in Form eines verwaschenen, unscharfen Lysebereichs zu beobachten ist.

Die Zugabe eines Metalloproteaseinhibitor bei *S. aureus* führte ebenfalls zu einer Akkumulation der unprozessierten Vorstufen. Die Zugabe eines Serinproteaseinhibitors und damit eine Unterbrechung der von Shaw *et al.* ¹⁷³ postulierten Proteasenaktivierungskaskade führte zu keiner Hemmung der Prozessierung. Die Metalloprotease kann so eindeutig bei *S. aureus* ebenfalls wie bei *S. hyicus* als mitverantwortlich für die Prozessierung identifiziert werden. Vor diesem Hintergrund ist eine Prozessierung der Lipasen bei *S. epidermidis* durch die Metalloprotease als wahrscheinlich anzusehen. Die Beteiligung der Serinprotease kann nicht abschließend ausgeschlossen werden.

Da die Proteasen als verantwortlich für die Prozessierung der Lipasen identifiziert werden konnten, sind sie wichtige Regulatoren der extrazellulären Lipaseaktivität. Unter diesem Gesichtspunkt ist die Diskrepanz der Transkriptionsanalysen und gemessenen Lipaseaktivität in den Stämmen 1057 und 1057*sigB* erklärbar. Beide Stämme haben in den Untersuchungen zur Proteaseaktivität die höchste extrazelluläre Proteaseaktivität gezeigt. Demzufolge findet eine verstärkte Prozessierung der Lipase statt. Wenzig *et al.* konnten in *S. hyicus* eine Degradation der fertigen Lipase feststellen ¹⁹⁵. Die Degradationsprodukte besaßen keine lipolytische Aktivität mehr. Sie folgerten, dass eine Degradation hinter dem Val₂₄₆ zu einem Verlust der katalytischen Funktion des Enzyms führt. Die niedrigere lipolytische Gesamtaktivität des Stammes 1057*sigB* im Vergleich zu seinem Wildtyp, auch bei hochregulierter Transkription der Lipasegene, ist somit wahrscheinlich auf die hohe extrazelluläre Proteaseaktivität und damit Degradation der Lipase zurückzuführen. Reziprok ist dementsprechend beim Stamm 8400 und 8400*sigB* mit der am niedrigsten gemessenen extrazellulären proteolytischen Gesamtaktivität die höchste Lipaseaktivität zu messen (siehe 4.2.3).

5.3 Aap

Im Vergleich zwischen Wildtyp und korrespondierender Mutante kann auf dem SDS Gel eine σ^B abhängige Prozessierung des Aap identifiziert werden (Abbildung 4.28). Prozessierungsschritte von extrazellulären Proteinen werden häufig von extrazellulären Proteasen katalysiert. Es liegt nahe, den regulativen Einfluss von σ^B auf die Prozessierung des Aap über die Regulation der extrazellulären Proteasen zu vermuten. Bei den vorangegangenen Untersuchungen hatte sich eine unterschiedliche Aktivität der einzelnen Proteasen bei den untersuchten Stämmen gezeigt. Betrachtet man die im SDS PAGE beobachtete Aap Prozessierung mit diesem Hintergrund, so können einige stammspezifische Unterschiede in der Prozessierung voneinander abgegrenzt werden. Die Stämme 1057 und 1057*sigB* besitzen nur eine Bande im Größenbereich von Aap. Die PCR Analyse des Aap (siehe 4.3.3) ließ ein mittel großes Aap Protein zwischen dem Aap von 1457 und 8400 erwarten. Bei der beobachteten Bande handelt es sich jedoch um ein kleineres Protein als bei den Vergleichsstämmen beobachtet. Demnach muss es sich um ein Prozessierungsprodukt von Aap handeln. Die unprozessierte Form von Aap ist somit weder bei 1057 noch 1057*sigB* im Überstand zu detektieren. Die schnelle Prozessierung bei diesen beiden Stämmen ist dem Anschein nach auf die hohe beobachtete Proteaseaktivität in diesem Stamm zurückzuführen. Die Stämme 1457 und 8400 besitzen eine nahezu vergleichbare proteolytische Aktivität. Bei beiden Stämmen lassen sich gut die unprozessierten Vorstufen von Aap abgrenzen. In den entsprechenden Mutanten steigt im Stamm 1457*sigB* die Proteaseaktivität über die vom Stamm 8400*sigB* an. Entsprechend ist keine unprozessierte Vorstufe mehr im Überstand zu detektieren im Gegensatz zu 8400*sigB*, wo noch eine zarte Bande der Vorstufe zu identifizieren ist. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse der Transkriptionsanalyse, wonach bei allen Stämmen ungefähr gleichwertige Metalloproteaseaktivitätsniveaus zu erwarten sind, ist eine Funktion der Metalloprotease in der Prozessierung des Aap unwahrscheinlich. Rohde *et al.* konnten zeigen, dass eine proteolytische Prozessierung von Aap Voraussetzung zur Aap abhängigen Biofilmbildung ist¹⁵⁶. Die Prozessierung von Aap mit *S. epidermidis* eigenen Proteasen konnte dabei mit $\alpha 2$ Makroglobulin inhibiert werden. E64 als Cysteinprotease spezifischer Proteaseinhibitor hatte dabei keinen inhibitorischen Effekt. Es wurde daraus gefolgert, dass eine Metallo- oder Serinprotease für die Prozessierung verantwortlich ist. Die Serinprotease besitzt bei

allen Stämmen unterschiedliche Transkriptionsniveaus ($1057 > 8400 > 1457$). In den Untersuchungen zur Serinprotease konnte ein gestörter Aktivierungsmechanismus der Serinprotease im Stamm 8400 gezeigt werden (siehe oben). Obwohl die Transkriptionsanalysen eine hohe Aktivität der Serinproteasen im Stamm 8400 vermuten lassen, liegt tatsächlich eine deutlich geringere Aktivität im Kulturüberstand vor ($1057 > 1457 > 8400$). Die im Kulturüberstand der untersuchten Stämme wahrscheinlich vorliegende Aktivität der Serinprotease korreliert mit der beobachteten Prozessierung von Aap und ist deshalb wahrscheinlich für die differentielle Prozessierung des Aap verantwortlich.

Mit Hilfe einer graphischen Auswertung der Lage der erhaltenen Peptide bei den massenspektrometrischen Analysen wurde versucht, den Ort der Schnittstelle einzugrenzen (siehe 4.3.5). Hierbei stellte sich heraus, dass zwei Peptide aus der MALDI TOF Analyse direkt hinter der Signalsequenz bis zur Position 127 aa bei dem größeren Protein von 210 kDa im Stamm 1457 lagen. Die massenspektrometrischen Analysen des kleineren Proteins von 180 kDa ergaben das erste Peptid nach 200 aa. In der MALDI TOF Analyse werden die Peptide durch einen enzymatischen Verdau gewonnen. Die gewonnenen Peptide können durch nicht stattgefundenen Spaltung zwischen einzelnen Versuchen variieren. Auch bei der Aufnahme des Massenspektrums können Peptide dem Detektor entgehen, was ebenfalls zu leichten Variationen in der Peptidgewinnung führt. Es ist jedoch relativ unwahrscheinlich, dass gleich zwei Peptide in diesem engen Bereich hinter dem Signalpeptid nicht im Verdau entstehen und nicht im Massenspektrometer registriert werden. Es ist somit anzunehmen, dass die gezielte Prozessierung vom 210 zum 180 kDa Protein am N-Terminale Ende des Proteins im Stamm ATCC 12228 durch die Serinprotease im Bereich von 127 aa bis 200 aa geschieht.

Im zweidimensionalen SDS PAGE kann die Prozessierung des Aap im Detail verfolgt werden. Das größere Aap Protein von 210 kDa im Stamm 1457 wird in der Mutante vollständig prozessiert. Nur das kleinere Aap Protein von 180 kDa ist etwas schwächer zu detektieren. Auffällig in der zweidimensionalen SDS PAGE Studie sind die unspezifischen Proteinketten, die von beiden Aap Formen abgehen. Das Aap wird somit nicht nur spezifisch an einer Schnittstelle prozessiert, sondern unterliegt zusätzlich einer unspezifischen Degradierung. Die Degradationsprodukte des größeren Proteins von

210 kDa führen interessanterweise nicht zu dem kleineren Protein von 180 kDa. Dies könnte mit einer unterschiedlichen Lokalisation der gezielten und unspezifischen Prozessierung begründet sein.

Neben der Regulation der Prozessierung von Aap durch σ^B über die extrazellulären Proteasen zeigte sich eine schwache positive Regulation auf Transkriptionsebene. Bei allen Mutanten konnte eine 2,5 bis 3,5-fache schwächere Transkription in der exponentiellen Wachstumsphase gemessen werden. In der stationären Wachstumsphase konnte kein signifikanter Einfluss von σ^B auf die Transkription beobachtet werden. Durch Reporter-gen Experimente konnten Giachino *et al.* eine Regulation von direkt von σ^B abhängigen Genen, wie *asp23*, vornehmlich in der exponentiellen Wachstumsphase zeigen⁵⁶. Dies stimmt mit der beobachteten Transkription von Aap überein und unterstützt die beobachtete eventuelle direkte positive Regulation von Aap durch σ^B . Durch die Hochregulation von Aap in der exponentiellen Wachstumsphase wird vermehrt Aap für die akkumulative Wachstumsphase bereitgestellt, durch die niedrige Proteaseaktivität jedoch nicht prozessiert. Aap muss somit neben der Proteaseaktivitäts abhängigen Funktionsweise in der Biofilmbildung noch weitere Aufgaben und Funktionsmechanismen besitzen.

5.4 Immunodominant A

Bei der Analyse des Sekretoms von *S. epidermidis* im zweidimensionalen SDS PAGE konnte das Immunodominant A (IsaA) in drei separaten Spots identifiziert werden. Alle drei Spots waren deutlich im Wildtyp vermehrt exprimiert. Das Immunodominant A besitzt eine Signalsequenz, jedoch keinen Zellwandanker.

In Immunisierungsstudien bei denen Mäuse mit *S. epidermidis* immunisiert wurden, konnten Antikörper gegen das Immunodominant A nachgewiesen werden¹⁷². Eine Impfung von Mäusen mit aufgereinigtem IsaA führte jedoch zu keiner Reduktion von Bakterien im Blut und in der Milz. Des Weiteren konnte eine Serumprotein bindende Eigenschaft dem IsaA nachgewiesen werden. Um welche Serumproteine es sich handelt, und ob diese proteinbindende Funktion eine Relevanz in vivo besitzt, ist ungeklärt¹⁷².

Die Untersuchung des Sekretoms einer *agr* Mutante von *S. epidermidis* im Vergleich zum Wildtyp zeigte eine Expression von IsaA im Wildtyp in der exponentiellen

Wachstumsphase, mit einem Abfall in der stationären Phase. Die *agr* Mutante zeigte keinen Abfall der Expression von IsaA in der stationären Wachstumsphase. IsaA scheint somit negativ von *agr* in der stationären Wachstumsphase reguliert zu werden. Dieses Expressionsmuster entspricht dem von einigen Zellwand- und Exoproteinen von *S. aureus* wie dem Protein A, Fibrinogen bindendes Protein, α -Toxin, β Hämolyisin, und TSST-1^{21, 169, 188}. Alle diese Proteine werden in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert und von der späten exponentiellen Wachstumsphase an von *agr* suprimiert. Da *agr* u. a. von σ^B abhängig ist (siehe oben), ist es wahrscheinlich, dass ein Teil der σ^B vermittelten Expression von IsaA über *agr* ausgeübt wird.

Über die Funktion des Immunodominant A bei *S. epidermidis* ist nichts bekannt. Bei *S. aureus* konnte das Immunodominant A als eines der wichtigsten immunogenen Komponenten identifiziert werden. Gesunde und Sepsispatienten zeigten gleichermaßen einen Titer gegen IsaA, wobei Sepsispatienten eine sehr starke Immunantwort gegen IsaA besaßen⁹⁷. Sekretomanalysen von biofilmständigen Zellen ergaben sieben Spots von IsaA in 8 h alten Kulturen. Nach 48 h konnte kein IsaA mehr nachgewiesen werden¹⁵². Dies deutet bei *S. aureus* auf eine mögliche ähnliche Suppression durch *agr* in der stationären Wachstumsphase wie bei *S. epidermidis* hin.

Untersuchungen der Lokalisation des IsaA zeigten ein Auftreten des Proteins nur in der Zellwandfraktion und im Kulturüberstand von Bakterienkulturen. Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten zudem ein bevorzugtes Auftreten von IsaA Protein im Septum sich trennender Zellen, was die angenommene Funktion im Zellwandmetabolismus unterstützt¹⁶⁸. Produktionsprofile ergaben einen raschen Anstieg der IsaA Expression in der frühen Wachstumsphase und ein Sistieren der Produktion in der stationären Wachstumsphase mit Abfall auf Werte wie zu Beginn der Messungen. Diese Messungen konnten auf Transkriptionsebene nachvollzogen und bestätigt werden¹⁶⁷. Das Expressionsprofil scheint somit eng mit dem Bakterienwachstum zu korrelieren. Die genauen Regulationsmechanismen des Immunodominant A sind weitgehend unbekannt, auch wenn der Einfluss von einzelnen Regulatoren, wie *yyFG*, *sarA*, *agr* und σ^B , als gesichert angesehen werden kann. Auch die Bedeutung und Funktion ist nur in Ansätzen verstanden.

5.5 Staphylococcal secretory antigen

Im Überstand der σ^B Mutante von 1457 konnte ein ca. 8 kDa großes verstärkt exprimiertes Protein als *Staphylococcal secretory antigen* (SsaA, SE1876) identifiziert werden. Eine Suche in der Protein NCBI Datenbank ergab fünf Proteine im Genom von *S. epidermidis* ATCC 12228, die eine ähnliche oder gleiche Bezeichnung aufwiesen. Ein Alignment der fünf gefundenen Proteine zeigte deutliche Unterschiede unter diesen als SsaA bezeichneten Proteinen. Sie ergaben zwischen 30 und 40 % Homologien untereinander. Nur die Proteine SE1872 und SE1876 wiesen eine höhere Identität von 61 % auf. Bei genauerer Betrachtung der Proteine konnte eine hohe Ähnlichkeit aller Proteine im C-Terminale Ende festgestellt werden. Der N-Terminale Abschnitt der fünf Proteine wies dagegen eine hohe Variabilität auf und unterschied sich erheblich in seiner Größe und Aminosäurenabfolge (siehe 8.7). Eine Untersuchung mit der Domänensuche, integriert in die BLASTp Suche, verdeutlichte diese Beobachtung nochmals. Bei allen fünf SsaA Proteinen von *S. epidermidis* konnte C-Terminal eine Domäne gefunden werden, die Homologien zu folgenden Domänen zeigte (siehe 8.8):

1. Eine COG3942 Domäne, welche die Proteine als Oberflächenantigene klassifiziert. Diese Domäne wurde in 20 verschiedenen Proteinen aus Bakteriengenomen von *S. aureus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* und *Caulobacter vibrioides* gefunden.
2. Eine pfam05257: CHAP Domäne. Die CHAP Domäne wird mit einer Amidase-Funktion in Verbindung gebracht^{11, 155}. Proteine, die diese Domäne besitzen, werden mit dem Zellwandmetabolismus in Verbindung gebracht. Bei einem Protein von *E. coli* liegt die Domäne N-Terminale und übernimmt die Funktion einer Glutathionylspermidine Amidase (EC:3.5.1.78.)¹⁷.
3. Eine Domäne einer N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase. Sie ist weitverbreitet und ihr wird eine wichtige Funktion als Peptidoglycanhydrolase in der Zellseparation zugeschrieben⁷⁵.

Die Domäne wurde bei allen fünf Proteinen im C-Terminale Abschnitt der Proteine identifiziert. Die Funktion dieser Proteingruppe lässt sich aufgrund der Funktionen der Domänen-Homologien als ein extrazelluläres, zelloberflächen assoziiertes Protein, welches im Zellwandmetabolismus involviert ist, zusammenfassen.

Das in den durchgeführten Untersuchungen identifizierte Protein SE1876 (Accession Number NP_765431.1) gehört zu den SsaA Proteinen ohne großen N-Terminalen Abschnitt. Über seine Funktion ist noch nichts bekannt. Es wurde im Rahmen der Sequenzierung des Genoms von *S. epidermidis* ATCC 12228 von Zhang *et al.*²⁰⁰ annotiert und nicht weiter untersucht. Aufgrund der Doppelbezeichnungen der Proteine und um eine Unterscheidung zu ermöglichen, wird das identifizierte Protein SE1876 neu benannt und im Weiteren als JCK1 bezeichnet. Das in den durchgeführten Untersuchungen charakterisierte Protein JCK1 wurde zuvor nicht im Kulturüberstand von *S. epidermidis* beschrieben. Eine Homologiesuche zu Proteinen von *S. aureus* zeigte eine 68 % Homologie zu SA2097 und eine 61 % Homologie zu einem Protein von *S. saprophyticus*. Das Protein SA2097 konnte bei *S. aureus* zuvor schon von Resch *et al.* im Kulturüberstand von planktonischen Zellen bei *S. aureus* identifiziert werden¹⁵². Auch Burlak *et al.* konnten Homologe Proteine zu SA2097 im Kulturüberstand von *S. aureus* identifizieren²². Die Funktion ist weiterhin unklar. Interessanterweise besitzt das Protein SA2097 eine 99 % und das JCK1 eine 68 % Homologie zu einem Protein von *S. aureus* COL, welches als Staphyloxanthin bezeichnet wird. Die Homologie zu dem Staphyloxanthin beruht auf einem Annotationsfehler. Das Staphyloxanthin wird nicht durch ein Gen codiert, sondern wird mit Hilfe der Gene, codierend im Operon crtOPQMN (Accession Nummer X97985), synthetisiert. Staphyloxanthin ist als ein Beta-D-glucopyranosyl-1-O-(4,4'-diaponeurosporen-4-oate)-6-O-(12-methyltetradecanoate) identifiziert worden¹³⁷ und kann somit nicht durch ein Gen codiert werden. Eine Homologie zu den Enzymen, codierend im Operon crtOPQMN, konnte durch Alignments ausgeschlossen werden. Die Identität des Homologen Proteins von *S. aureus* COL ist damit unklar.

5.6 Moonlighting Proteine

Bei der Untersuchung des Kulturüberstandes im zweidimensionalen SDS PAGE konnten sieben zytoplasmatische Proteine ohne Signalsequenzen identifiziert werden. Fünf Proteine waren in der Mutante herabreguliert, zwei konnten mit einer höheren Expression beschrieben werden. Wie gelangen zytoplasmatische Proteine in den Kulturüberstand? Sind sie Teil eines hoch komplexen Netzwerkes von spezialisierten Proteinfunktionen oder sind sie Ausdruck einer im Wachstumsprozess

voranschreitenden Zelllyse? Burlak *et al.* führten eine umfassende Analyse aller Exoproteine von *S. aureus* in Flüssigkulturen durch²². Erntezeitpunkte waren die mittlere exponentielle und stationäre Wachstumsphase, orientiert an der OD der Kulturen. Bis zu 625 verschiedene Proteine konnten Sie in der stationären Wachstumsphase näher charakterisieren, darunter viele zytoplasmatische Proteine. Sie führten dies auf autolytische Prozesse und die damit verbundene Freisetzung von intrazellulären Proteinen im Wachstumsverlauf einer Bakterienkultur zurück, wie es zuvor schon beobachtet wurde^{28, 93, 184}. Autolytische Prozesse können jedoch nur dann eine Erklärung für die beobachtete differentielle Regulierung der Proteine in dieser Arbeit liefern, wenn eine ausgeprägte differentielle intrazelluläre Regulation angenommen wird. In den letzten Jahren wurden verstärkt Forschungsanstrengungen in die funktionelle Charakterisierung von Proteinen investiert. Überraschenderweise konnten Proteinen mehrere funktionelle Eigenschaften zugeordnet werden, die es erheblich erschwerten, eindeutig abgegrenzte Funktionen eines Proteins festzuhalten. Hierzu gehören Proteine, die durch Genfusion entstehen, Proteine, die ihre hochspezifische Funktion in verschiedenen Lokalisierungen ausführen, Splice-Varianten und Proteine, die durch posttranskriptionale Modifikation entstanden sind. Neben diesen Gruppen von Proteinen werden immer mehr Proteine einer weiteren Gruppe zugeordnet, zu den sogenannten „moonlighting Proteinen“. In diese Gruppe werden Proteine eingeordnet, die nicht in die oben genannten Gruppen eingeordnet werden können und mehrere, völlig unterschiedliche Funktionen besitzen. Der Wechsel der verschiedenen Funktionen geschieht dabei durch unterschiedliche Mechanismen: abhängig von der Lokalisation des Proteins (intrazellulär/extrazellulär), abhängig von welchem Zelltyp sie synthetisiert werden, Co-Faktoren, Multimer-Bildung, Komplex-Bildung, oder durch mehrere Bindungsstellen an dem Protein⁷³. Beispiele von *moonlighting* Proteinen sind die PutA Proline Dehydrogenase von *E. coli*, die im Zytoplasma als Transkriptionsrepressor agiert^{123, 132}, das Thioredoxin ebenfalls von *E. coli*, welche als Untereinheit der T7 DNA Polymerase fungiert¹¹¹. Bei *L. monocytogenes* wurden die zytosolischen Proteine Elongation Faktor TU und Dnak mit Plasminogen-bindenden Eigenschaften auf der Zelloberfläche detektiert¹⁷⁰. Dnak ist auch auf der Zelloberfläche von *S. agalactiae* präsent⁷⁰. Auch bei Staphylokokken sind *moonlighting* Funktionen bekannt. So konnte ein Transferrin-bindendes

Zellwandprotein mit großer Homologie zur Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase bei Staphylokokken identifiziert werden ¹¹⁷.

Die Charakterisierung von zytoplasmatischen Proteinen im Kulturüberstand muss somit keineswegs Ausdruck einer Autolyse sein, sondern kann Hinweis auf komplexe, multiple Funktionen von Proteinen sein.

5.6.1 Alkaline shock protein 23

Das *alkaline shock protein 23* (Asp23) wurde mit einer Größe von 21 kDa im zweidimensionalen SDS PAGE des Wildtyps 1457, bei einer theoretischen Größe von 18 688 Da, beobachtet. Asp23 wurde erstmals von Kuroda *et al.* ⁹¹ als ein 23 kDa Protein im Zytoplasma von *S. aureus* beobachtet. *asp23* wird bei alkalinen Schock hochreguliert. In σ^B *knock-out* Studien bei *S. aureus* konnte eine starke Regulation von *asp23* festgestellt werden ^{56, 90}. Ein entsprechendes σ^B abhängiges Promotormotiv konnte bestätigt werden ¹¹⁵. Durch Genfusion mit dem Luziferasegen konnte der Expressionsverlauf in der Wachstumskurve nachvollzogen werden. Es zeigte sich eine hohe Aktivierung des Gens in der exponentiellen Wachstumsphase mit einem Abfall zur stationären Phase hin ⁵⁶. Die Funktion des zytoplasmatischen Asp23 ist nicht bekannt. In Proteomstudien von extrazellulären Proteine konnte Asp23 mehrfach in *S. aureus* identifiziert werden, obwohl es keine Signalsequenz besitzt ^{22, 174}. Ein Transportmechanismus und eine eventuelle extrazelluläre Funktion sind ebenfalls nicht bekannt.

In *S. epidermidis* konnten Knobloch *et al.* ⁸⁶ einen sehr ähnlich zu *S. aureus* organisierten Genlokus von *asp23* nachweisen. Die Mutanten mit ausgeschalteter σ^B Regulationskaskade (*rsbU*, *rsbV*) oder inaktivem σ^B besaßen in seinen Untersuchungen keine nachweisbaren *asp23* Transkriptionsprodukte. Quantitative RT PCR Analysen zeigten Transkriptionsunterschiede von einer über 1000-fachen verminderten Transkription bei den Mutanten ⁸⁶. Eine Funktion bei *S. epidermidis* ist ebenfalls nicht bekannt.

5.6.2 Enolase

Die Enolase von *S. epidermidis* wurde mit einer Größe von 45 kDa im zweidimensionalen SDS PAGE beobachtet und besitzt eine theoretische Größe von 47.218 Da. Die Enolase katalysiert die Konversion von 2-Phosphoglycerat (2-PG) zu

Phosphoenolpyruvat (PEP) und ist somit ein essentielles Enzym in der Verstoffwechslung von Kohlenhydraten über die Glykolyse. Des Weiteren ist es essentiell für die Glukoneogenese. Interessanterweise wurde in den durchgeführten Untersuchungen die Enolase, als klassisches zytoplasmatisches Enzym, extrazellulär und in der Expression durch σ^B beeinflusst identifiziert. In Untersuchungen zu immunogenen Proteinen bei *S. epidermidis* konnte Enolase schon zuvor bei elektrophoretischen Auftrennungen von Zelloberflächenproteinen charakterisiert werden. Es konnten Antikörper gegen Enolase in Seren von infizierten Hasen nachgewiesen werden. Auch eine serumproteinbindende Funktion der Enolase konnte gezeigt werden. Eine Impfung von Mäusen mit aufgereinigter Enolase führte zu einer messbaren, jedoch nicht signifikanten Reduktion von kultivierbaren Bakterien aus der Milz¹⁷².

In Streptokokken konnte ebenfalls Enolase auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden. *Streptococcus pyogenes* als auch *S. pneumoniae* exprimieren eine Enolase auf der Zelloberfläche, die starke Plasminogen-bindende Eigenschaften besitzt^{134, 180, 196}. In *S. pneumoniae* konnte die Enolase dabei bevorzugt in der Zellwand und erwartungsgemäß im Zytoplasma nachgewiesen werden. Auch hier konnten Antikörper gegen Enolase in Patientenseren nachgewiesen werden. Ein Alignment der Enolase von *S. epidermidis* und *S. pyogenes* zeigt eine 80 % Übereinstimmung der Sequenzen (siehe 8.10).

Bei *S. aureus* konnte die Enolase schon mehrfach bei Proteomstudien im Kulturüberstand identifiziert werden^{22, 25, 174}. Carneiro *et al.* konnten die Expression von zelloberflächengebundener Enolase bei *S. aureus* nachweisen und zeigten mit Inhibitionsstudien eine Lamininbindende Funktion der Enolase^{22, 25, 174}. In einer weiteren Studie konnten Proteine an der Oberfläche von *S. aureus* nachgewiesen werden, die die Staphylokinase vor einer Inhibition mit $\alpha 2$ - Antiplasmin schützen und den Umsatz von Plasminogen zu Plasmin durch Staphylokinase fördern. Als Plasminogen bindendes Proteine wurden dabei inosine 5P-monophosphate Dehydrogenase (IMPDH), α -Enolase und Ribonucleotid Reductase identifiziert¹¹⁸. Es ergaben sich hiermit erste Homologien von *S. aureus* zu Streptokokken. Bei beiden Bakterien scheint ein Oberflächenprotein zu existieren, welches Plasminogen bindet und die Umsetzung zu Plasmin durch Staphylokinase bzw. Streptokinase fördert. Dieser

Mechanismus könnte als eines der wichtigsten Mechanismen zur Gewebeinvasion fungieren.

Über den Transportmechanismus der Enolase ist bei Staphylokokken und Streptokokken noch nichts bekannt. Lediglich bei der Enolase von *E. coli* konnte durch Bindung von 2-Phosphoglycerat (2-PG) an Lys₃₄₁ eine Automodifikation induziert werden, die wahrscheinlich zu einem Export der Enolase über einen unbekanntem Mechanismus führt. Die modifizierte Enolase konnte in einer höheren Konzentration im Kulturmedium nachgewiesen werden. Mutationen an dem Lys₃₄₁ führten zu einem Verlust des Exports von Enolase¹⁶.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte erstmals die Expression einer extrazellulären Enolase als σ^B abhängig bei *S. epidermidis* beschrieben werden. Die Enolase wird als eines der wichtigsten Plasminogen-bindenden Proteine bei Streptokokken und *S. aureus* angesehen und trägt wahrscheinlich mit einer Aktivierung des Plasminogens durch Interaktion mit Staphylokinase bzw. Streptokinase zur Gewebeinvasion bei. Die Gewebeinvasion als wichtiger Virulenzfaktor könnte somit zum Teil über die Regulation der Enolase unter der Kontrolle von σ^B stehen.

5.6.3 Alkylhydroperoxid Reduktase subunit C

In den hier durchgeführten Untersuchungen des Sekretoms von *S. epidermidis* konnte im Wildtyp als auch in der σ^B Mutante eine Alkylhydroperoxid Reduktase (*alkyl hydroperoxide reductase subunit C*, AhpC) identifiziert werden. In der Mutante konnten zwei Spots mit einer Größe von 23 und 26 kDa der Alkylhydroperoxid Reduktase zugeordnet werden, die im Vergleich zum Wildtyp stärker exprimiert wurden. Im Wildtyp war besonders der etwas größere Spot von 26 kDa deutlich schwächer exprimiert.

Die Alkylhydroperoxid Reduktase konnte zuvor noch nicht bei *S. epidermidis* identifiziert werden. Funktionen und Regulationen sind bei *S. epidermidis* unbekannt. Bei *S. aureus* konnte die Alkylhydroperoxid Reduktase zuvor schon mehrmals im Kulturüberstand beschrieben werden^{22, 174, 201}. Ziebandt *et al.* konnten dabei weder eine Regulation der Expression durch *agr* noch durch σ^B nachweisen²⁰¹. Die Ergebnisse stehen somit im Gegensatz zu den bei *S. epidermidis* beobachteten.

Brady *et al.* beschrieben eine Alkylhydroperoxid Reduktase im Überstand von *S. aureus* bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Ein Vergleich zwischen

planktonischen und biofilmständigen Zellen ergab in Transkriptionsuntersuchungen eine negative Regulation in biofilmständigen Zellen. Der verantwortliche Regulator konnte jedoch nicht identifiziert werden²⁰. Des Weiteren konnten Brady *et al.* Antikörper nach 42 Tagen gegen die Alkylhydroperoxid Reduktase im Serum von Hasen detektieren, die in einem Osteomyelitismodell mit *S. aureus* infiziert wurden. Ob die erst späte Antikörperbildung auf eine Autolyse im Infektionsverlauf und somit erst verspäteten Kontakt des Immunsystems mit der Alkylhydroperoxid Reduktase zurückzuführen ist, ist unklar.

5.6.4 Phosphocarrier Protein HPr

Bei der Untersuchung des Kulturüberstandes im zweidimensionalen SDS PAGE konnte ein ca. 15 kDa großes Phosphocarrier Protein HPr identifiziert werden. Das Phosphocarrier Protein HPr zeigte sich im Wildtyp mit einer etwas geringeren Expression. Die Expression des Proteins wird somit negativ durch σ^B beeinflusst. Das Phosphocarrier Protein HPr ist in Untersuchungen bei verschiedenen Bakterien näher untersucht worden. Es wird als ein Bestandteil des Phosphoenolpyruvat abhängigen Phosphotransferase Systems (PTS) intrazellulär, membranständig lokalisiert¹⁶⁶. Das PTS transferiert die Phosphatgruppe vom Phosphoenolpyruvat an von extrazellulär aufzunehmende Zucker und ermöglicht somit erst die Aufnahme von Zuckern¹⁵¹.

Zuvor konnte das Phosphocarrier Protein HPr schon bei mehreren Untersuchungen im Kulturüberstand von *S. aureus* beschrieben werden^{22, 174}. Bei einer Studie mit Seren von Sepsispatienten zeigten drei von fünf Sepsis Patienten eine Immunantwort gegen das Protein. In Seren von gesunden Patienten konnten keine Antikörper gegen das Phosphocarrier Protein HPr nachgewiesen werden. Die Seren der nicht reaktiven Patienten waren im Gegensatz zu den reaktiven in einer früheren Phase der Sepsis gewonnen worden⁹⁷. Die Immunantwort scheint sich somit erst im Verlauf der Infektion auszubilden.

Auch bei Untersuchungen von Exoproteinen von Gruppe A Streptokokken konnte ein Phosphocarrier Protein HPr extrazellulär nachgewiesen werden. Eine Immunantwort konnte hier jedoch nicht gezeigt werden⁹³.

Interessanterweise ist das HPr Protein von *Streptococcus equi* durch immunologische Untersuchungen auf der Zelloberfläche nachgewiesen worden³⁶. Zuvor konnte bei Streptokokken mehrmals HPr an der Zelloberfläche identifiziert werden^{41, 74, 179}. Alle

an der Zelloberfläche bei Streptokokken nachgewiesenen HPr Proteine besaßen nicht mehr das N-Terminal gelegene Methionin (HPr-1). Eine Regulation des HPr durch Abspaltung des Methionins konnte zuvor durch Vadeboncoeur gezeigt werden¹⁸⁵. Eine Bedeutung des HPr-1 im extrazellulären Raum ist nicht bekannt auch, wenn das HPr-1 als eine mitogene extrazelluläre Komponente schon beschrieben wurde⁵⁵.

5.6.5 Dihydrolipoamid Dehydrogenase

Im Wildtyp konnte im Kulturüberstand ein verstärkt exprimiertes Protein identifiziert werden, welches sich in der Massenspektroskopie als eine Dihydrolipoamid Dehydrogenase herausstellte. Das Protein besaß auf dem SDS PAGE eine Größe von 52 kDa und eine theoretische Größe von 49665 Da. Der beobachtete Phänotyp ließ auf eine positiv beeinflusste Expression durch σ^B im Kulturüberstand schließen. Die Dihydrolipoamid Dehydrogenase (EC 1.8.1.4.) ist ein ubiquitäres Flavoprotein, welches die NAD⁺ abhängige Oxidation von Dihydrolipoamid in mehreren Multienzymkomplexen katalysiert. Es dient als E3 Untereinheit bei drei 2-oxo Säure Dehydrogenase Multienzymkomplexen. Dazu gehören die Pyruvat Dehydrogenase (PDH), die 2-oxoglutarat Dehydrogenase (OGDH) und die *branched chain* 2-oxo Säure Dehydrogenase (BDCDH). Des Weiteren hat sie eine Funktion als L-Untereinheit beim Glycinspaltungssystem (*glycin cleavage system*, GCS). In *E. coli* werden noch weitere Stoffwechselmechanismen, wie der Membrantransport von Glukose und Aminosäuren, als Dihydrolipoamid Dehydrogenase abhängig angenommen^{133, 154}.

Obwohl die Dihydrolipoamid Dehydrogenase keine Signalsequenz besitzt, konnte sie zuvor mehrmals im Kulturüberstand von *S. aureus* beobachtet werden^{22, 174}. In einer Untersuchung konnte die Dihydrolipoamid Dehydrogenase bei *S. epidermidis* als immunogen und mit Serumprotein bindenden Eigenschaften charakterisiert werden. Eine Impfung mit rekombinantem Protein führte nach 24 h zu keiner messbaren Reduktion der CFU in der Milz und im Blut¹⁷². Die Dihydrolipoamid Dehydrogenase liegt bei *S. aureus* in einem Operon *pdh*, welches noch für vier weitere Gene codiert⁶⁷. Da die Dihydrolipoamid Dehydrogenase Bestandteil des PDH und OGDH ist und beide Komplexe unabhängig von einander reguliert werden können, ist ein eigenständiger Promoter für *pdhD* anzunehmen^{1, 49, 130}. Bei Untersuchungen des *pdhD* Gens bei *S. aureus*, welches für die Dihydrolipoamid Dehydrogenase codiert, konnte kein Sigmafaktor abhängiger Promoter oberhalb des Gens identifiziert werden^{66, 67}. Da die

Untersuchungen schon relativ weit zurück liegen, kann nicht mit Sicherheit ein damals unbekannter Sigmafaktor abhängiger Promoter ausgeschlossen werden.

In *Streptococcus pneumoniae* konnte eine Abnahme der Virulenz nach Ausschaltung der Dihydrolipoamid Dehydrogenase beobachtet werden. Diese Beobachtung wurde als unabhängig von der 2-oxo Säure Dehydrogenase Aktivität gesehen und mit einer Abnahme des α -Galaktoside und Galaktose Metabolismus erklärt. Die Virulenzabnahme ist somit wahrscheinlich durch eine Störung des Kohlenstoffmetabolismus bedingt¹⁷⁷. Welche Rolle eine extrazelluläre Dihydrolipoamid Dehydrogenase in der Virulenz besitzt, ist bisher noch nicht in Studien untersucht worden.

5.6.6 Phosphoglycerat Kinase

In der massenspektroskopischen Analyse von Proteinen im Kulturüberstand von *S. epidermidis* konnte eine Phosphoglycerat Kinase (PGK) mit einer Größe von 43 kDa identifiziert werden. Die Phosphoglycerat Kinase wurde verstärkt im Wildtyp exprimiert und wurde somit positiv durch σ^B in der Expression beeinflusst. Intrazellulär gehört die PGK zu den essentiellen Enzymen der Glykolyse und der Glukoneogenese. Es wandelt 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat und die Umkehrreaktion durch die Übertragung eines Phosphates auf ADP zu ATP um.

Bei vorangegangenen elektrophoretischen Untersuchungen des Sekretoms von Staphylokokken konnte die Phosphoglycerat Kinase schon zuvor im Kulturüberstand beobachtet werden^{22, 174}. Antikörper konnten in einem Infektionsmodell im Serum von Mäusen nicht nachgewiesen werden. In einer Studie mit Screening Untersuchungen von *S. aureus* Stämmen nach Vancomycin und Teicoplanin Resistenzen konnte in Proteomanalysen eine Überexpression von Phosphoglycerat Kinase bei resistenten Stämmen gezeigt werden. Eine Bedeutung der Hochregulation bei hetero-Glukopeptid-intermediären *S. aureus* (hGISA) ist nicht bekannt¹⁰⁶.

Bei Gruppe A Streptokokken konnte die Phosphoglycerat Kinase ebenfalls extrazellulär im Kulturüberstand schon charakterisiert werden. In Mausinfektionsmodellen konnte im Gegensatz zu Patientenserum mit Zustand nach Streptokokkeninfektionen eine Immunantwort gegen die Phosphoglycerat Kinase nachgewiesen werden. Ob das Protein aktiv sezerniert wird, konnte jedoch nicht geklärt werden⁹³.

In einer Studie mit Agglutinationsassays konnte eine Bindung von *Streptococcus* an F-Aktin gezeigt werden, weshalb ein aktinbindendes Protein an der Zelloberfläche angenommen wurde. Westernblots mit α Aktinantikörpern zeigten eine Bindung an die Phosphoglycerat Kinase. Bindungsassays ergaben keine Funktion der Phosphoglycerat Kinase in der initialen Bindung an epithelialen Zellen, jedoch konnte in Invasionsassays mit aufgereinigter PGK, konzentrationsabhängig die Invasion inhibiert werden. Die Autoren folgerten eine Funktion der PGK in der Bindung an Aktin und der Invasion eukaryotischer epithelialer Zellen²³.

Zuvor konnte in zwei weiteren Studien PGK an der Oberfläche von *Streptococcus agalactiae* und *Streptococcus oralis* nachgewiesen werden^{70, 197}. Daraufhin wurde in einem passiven intraperitonealem Impfmodel die Wirkung von Antikörpern gegen PGK untersucht. Im Vergleich zu Antikörpern, die gegen die gesamte Zelle gewonnen wurden, konnte ein Impfschutz erreicht werden, der jedoch nicht so effektiv wie der mit dem Vergleichsantikörper war. Diese Ergebnisse unterstreichen das Vorkommen von PGK an der Zelloberfläche von Streptokokken und eine virulenzassoziierte Funktion⁷⁰.

6 Zusammenfassung

Die Biofilmbildung bei *Staphylococcus epidermidis* stellt einen hoch potenten Virulenzfaktor dar, der es dem Bakterium ermöglicht, auf polymeren Kunststoffoberflächen, geschützt vor dem humanen Immunsystem, zu wachsen. Der globale Stressregulator σ^B stellte sich als verantwortlich für die Regulation des für den Biofilm codierenden Operons *icaADBC* heraus. In der vorliegenden Arbeit wurden extrazelluläre Proteine des σ^B Regulons gesucht und näher charakterisiert. Hierbei konnten durch σ^B positiv, differentiell und negativ regulierte extrazelluläre Proteine in drei unabhängigen genetischen Hintergründen gefunden werden.

Die im Kulturüberstand durch σ^B negativ regulierten Proteine konnten in der Massenspektroskopie als eine Cystein- und Serinprotease charakterisiert werden. In Transkriptionsanalysen, phänotypischen Beobachtungen im SDS PAGE und Untersuchungen auf Aktivitätsebene konnte eine Hochregulation aller extrazellulären Proteasen bei *S. epidermidis*, mit Einschluss der in der Massenspektroskopie nicht beschriebenen Metalloprotease, durch eine σ^B Mutation gezeigt werden. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich der verwendete Stamm 8400 als ein natürlicher funktioneller Deletionsstamm der Cysteinprotease. In Studien mit Proteaseinhibitoren konnte eine Aktivierung der Serinprotease durch die Metalloprotease gezeigt werden. Die Cysteinprotease zeigte sich als nicht integriert in diese Aktivierungskaskade. Transkriptionsanalysen der globalen Regulatoren *agr* und *sarA* unterstützten Ergebnisse aus der Literatur, die eine Regulation von extrazellulären Proteasen über *agr* beschrieben. Der regulatorische Einfluss von σ^B auf die extrazellulären Proteasen wird wahrscheinlich über *agr* vermittelt.

Im SDS PAGE konnten in den Stämmen 1457 und 8400 hochregulierte Proteine gesehen werden, die sich im Stamm 1057 herabreguliert darstellten. Die beobachteten differentiell regulierten Proteine im Kulturüberstand erwiesen sich in der Massenspektroskopie als Lipasen. In Aktivitätsanalysen konnte der Phänotyp nachvollzogen werden. Die phänotypischen Beobachtungen im SDS PAGE und Untersuchungen der extrazellulären lipolytischen Aktivität standen im Widerspruch zu den durchgeführten Transkriptionsanalysen, welche keine differentielle Transkription der Lipasen zeigten. Zymographie SDS PAGE der Lipasen zeigten eine deutlich

stärkere Prozessierung der Lipasen im Stamm 1057, welches zu einer Degradierung und Inaktivierung der Lipasen führte und für die differentielle Regulation im Phänotyp und auf Aktivitätsebene verantwortlich war. σ^B ist somit in der Lage, über die Regulation von extrazellulären Proteasen Regulationen auf Transkriptionsebene durch Prozessierung zu modulieren. In der Literatur konnte die Metalloprotease als verantwortlich für die Prozessierung der Lipasen identifiziert werden. Aus den Zymographie SDS PAGE ließ sich, vor dem Hintergrund der Analysen zur Regulation der Proteasen, die Cysteinprotease als verantwortlich für eine unspezifische Degradierung der Lipasen beschreiben.

Die im SDS PAGE positiv durch σ^B regulierten Proteine konnten als *accumulation associated protein* (Aap) in der Massenspektroskopie identifiziert werden. Durchgeführte Transkriptionsanalysen zeigten eine schwache positive Regulation auf Transkriptionsebene durch σ^B . Auftrennungen im zweidimensionalen SDS PAGE zeigten eine spezifische und unspezifische Prozessierung. Die Schnittstelle der spezifischen Prozessierung zeigte sich hinter der Signalsequenz N-Terminal lokalisiert. Eine Beteiligung der Serinprotease in der spezifischen Prozessierung wird in dieser Arbeit diskutiert.

Zur genaueren Analyse des Kulturüberstandes wurden zweidimensionale SDS PAGE angefertigt. Es zeigte sich eine Vielzahl von Proteinen im Kulturüberstand, die von σ^B beeinflusst wurden. Eine Auswahl konnte in der Massenspektroskopie identifiziert werden. Im Stamm 1457 wurden folgende Proteine mit einer erhöhten Expression identifiziert: Dihydrolipoamid Dehydrogenase, Enolase, Phosphoglyceratkinase, Immunodominant A, *alkaline shock proteine* (asp23). Im Stamm 1457sigB: *staphylococcal secretory antigen* (SsaA), Alkylhydroperoxid Reduktase, Phosphocarrier Protein HPr. Nur das Immunodominant A und das *staphylococcal secretory antigen* (SsaA) konnten dem extrazellulären Kompartiment durch Signalpeptide eindeutig zugeordnet werden. In der Diskussion der Ergebnisse konnten Analysen der Proteine und homologe Proteine von verwandten Bakterien in der Literatur gefunden werden, die extrazelluläre unbekannte Funktionen der Proteine nahelegen und eine Kontamination durch autolytische Prozesse unwahrscheinlich machen.

7 Literaturverzeichnis

1. **Adler, L. A. and S. Arvidson.** 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of genes encoding a multiprotein complex involved in secretion of proteins from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **170**:5337-5343.
2. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
3. **Archer, G. L.** 2000. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci, p. 2092-2100. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, Philadelphia.
4. **Archer, G. L. and M. W. Climo.** 1994. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2231-2237.
5. **Arvidson, S.** 2000. Extracellular enzymes, p. 379-385. In V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), *Gram-positive pathogens*. ASM Press, Washington, D.C.
6. **Arvidson, S. and K. Tegmark.** 2001. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:159-170.
7. **Ayora, S., P. E. Lindgren, and F. Gotz.** 1994. Biochemical properties of a novel metalloprotease from *Staphylococcus hyicus subsp. hyicus* involved in extracellular lipase processing. *J. Bacteriol.* **176**:3218-3223.
8. **Baldassarri, L., G. Donnelly, A. Gelosia, M. C. Voglino, A. W. Simpson, and G. D. Christensen.** 1996. Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Infect. Immun.* **64**:3410-3415.
9. **Banbula, A., J. Potempa, J. Travis, C. Fernandez-Catalan, K. Mann, R. Huber, W. Bode, and F. Medrano.** 1998. Amino-acid sequence and three-dimensional structure of the *Staphylococcus aureus* metalloproteinase at 1.72 Å resolution. *Structure.* **6**:1185-1193.
10. **Banerjee, S. N., T. G. Emori, D. H. Culver, R. P. Gaynes, W. R. Jarvis, T. Horan, J. R. Edwards, J. Tolson, T. Henderson, and W. J. Martone.** 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am. J. Med.* **91**:86S-89S.

11. **Bateman, A. and N. D. Rawlings.** 2003. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends Biochem. Sci.* **28**:234-237.
12. **Becker, L. A., M. S. Cetin, R. W. Hutkins, and A. K. Benson.** 1998. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigmaB from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J. Bacteriol.* **180**:4547-4554.
13. **Bischoff, M., P. Dunman, J. Kormanec, D. Macapagal, E. Murphy, W. Mounts, B. Berger-Bachi, and S. Projan.** 2004. Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* sigmaB regulon. *J. Bacteriol.* **186**:4085-4099.
14. **Bischoff, M., J. M. Entenza, and P. Giachino.** 2001. Influence of a functional sigB operon on the global regulators sar and agr in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**:5171-5179.
15. **Bjoorklind, A. and H. Jornvall.** 1974. Substrate specificity of three different extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta* **370**:524-529.
16. **Boel, G., V. Pichereau, I. Mijakovic, A. Maze, S. Poncet, S. Gillet, J. C. Giard, A. Hartke, Y. Auffray, and J. Deutscher.** 2004. Is 2-phosphoglycerate-dependent automodification of bacterial enolases implicated in their export? *J. Mol. Biol.* **337**:485-496.
17. **Bollinger, J. M., Jr., D. S. Kwon, G. W. Huisman, R. Kolter, and C. T. Walsh.** 1995. Glutathionylspermidine metabolism in *Escherichia coli*. Purification, cloning, overproduction, and characterization of a bifunctional glutathionylspermidine synthetase/amidase. *J. Biol. Chem.* **270**:14031-14041.
18. **Bowden, M. G., L. Visai, C. M. Longshaw, K. T. Holland, P. Speziale, and M. Hook.** 2002. Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen-binding adhesin? *J. Biol. Chem.*
19. **Boyce, J. M.** 1997. Epidemiology and Prevention of Nosocomial Infections, p. 309-329. In K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), *The Staphylococci in Human Disease*. Churchill Livingstone, New York.
20. **Brady, R. A., J. G. Leid, A. K. Camper, J. W. Costerton, and M. E. Shirtliff.** 2006. Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to a biofilm infection. *Infect. Immun.* **74**:3415-3426.
21. **Bronner, S., H. Monteil, and G. Prevost.** 2004. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**:183-200.

22. **Burlak, C., C. H. Hammer, M. A. Robinson, A. R. Whitney, M. J. McGavin, B. N. Kreiswirth, and F. R. DeLeo.** 2007. Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection. *Cell Microbiol.* **9**:1172-1190.
23. **Burnham, C. A., S. E. Shokoples, and G. J. Tyrrell.** 2005. Phosphoglycerate kinase inhibits epithelial cell invasion by group B streptococci. *Microb. Pathog.* **38**:189-200.
24. **Carmona, C. and G. L. Gray.** 1987. Nucleotide sequence of the serine protease gene of *Staphylococcus aureus*, strain V8. *Nucleic Acids Res.* **15**:6757.
25. **Carneiro, C. R., E. Postol, R. Nomizo, L. F. Reis, and R. R. Brentani.** 2004. Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. *Microbes. Infect.* **6**:604-608.
26. **Chan, P. F. and S. J. Foster.** 1998. Role of SarA in virulence determinant production and environmental signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **180**:6232-6241.
27. **Chan, P. F. and S. J. Foster.** 1998. The role of environmental factors in the regulation of virulence-determinant expression in *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Microbiology* **144** (Pt 9):2469-2479.
28. **Chaussee, M. S., R. O. Watson, J. C. Smoot, and J. M. Musser.** 2001. Identification of Rgg-regulated exoproteins of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **69**:822-831.
29. **Cheung, A. L., M. G. Bayer, and J. H. Heinrichs.** 1997. sar Genetic determinants necessary for transcription of RNAII and RNAPIII in the agr locus of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **179**:3963-3971.
30. **Cheung, A. L., J. M. Koomey, C. A. Butler, S. J. Projan, and V. A. Fischetti.** 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.
31. **Chien, Y., A. C. Manna, S. J. Projan, and A. L. Cheung.** 1999. SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for sar-dependent gene regulation. *J. Biol. Chem.* **274**:37169-37176.
32. **Christensen, G. D., J. T. Parisi, A. L. Bisno, W. A. Simpson, and E. H. Beachey.** 1983. Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **18**:258-269.
33. **Cramton, S. E., M. Ulrich, F. Götz, and G. Döring.** 2001. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in

- Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun. **69**:4079-4085.
34. **de Vos, P., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer, and W. B. Whitman.** 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, *The Firmicutes*. Springer, New York.
 35. **Deighton, M. A. and B. Balkau.** 1990. Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. J. Clin. Microbiol. **28**:2442-2447.
 36. **Dixon, S., M. Haswell, D. Harrington, and I. C. Sutcliffe.** 2001. Surface immunolocalisation of HPr in the equine pathogen *Streptococcus equi*. Syst. Appl. Microbiol. **24**:486-489.
 37. **Drapeau, G. R.** 1978. Role of metalloprotease in activation of the precursor of staphylococcal protease. J. Bacteriol. **136**:607-613.
 38. **Drapeau, G. R., Y. Boily, and J. Houmard.** 1972. Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. **247**:6720-6726.
 39. **Dubin, G.** 2002. Extracellular proteases of *Staphylococcus spp.* Biol. Chem. **383**:1075-1086.
 40. **Dubin, G., D. Chmiel, P. Mak, M. Rakwalska, M. Rzychon, and A. Dubin.** 2001. Molecular cloning and biochemical characterisation of proteases from *Staphylococcus epidermidis*. Biol. Chem. **382**:1575-1582.
 41. **Dubreuil, J. D., M. Jacques, D. Brochu, M. Frenette, and C. Vadeboncoeur.** 1996. Surface location of HPr, a phosphocarrier of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in *Streptococcus suis*. Microbiology **142** (Pt 4):837-843.
 42. **Emori, T. G. and R. P. Gaynes.** 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Rev. **6**:428-442.
 43. **Evans, R. C. and C. J. Holmes.** 1987. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. Antimicrob. Agents Chemother. **31**:889-894.
 44. **Farrell, A. M., T. J. Foster, and K. T. Holland.** 1993. Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. J. Gen. Microbiol. **139** (Pt 2):267-277.

45. **Ferreira, A., M. Gray, M. Wiedmann, and K. J. Boor.** 2004. Comparative genomic analysis of the sigB operon in *Listeria monocytogenes* and in other Gram-positive bacteria. *Curr. Microbiol.* **48**:39-46.
46. **Ferreira, A., C. P. O'Byrne, and K. J. Boor.** 2001. Role of sigma(B) in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4454-4457.
47. **Fitzpatrick, F., H. Humphreys, E. Smyth, C. A. Kennedy, and J. P. O'Gara.** 2002. Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Hosp. Infect.* **52**:212-218.
48. **Fluckiger, U., C. Wolz, and A. L. Cheung.** 1998. Characterization of a sar homolog of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **66**:2871-2878.
49. **Freese, E. and U. Fortnagel.** 1969. Growth and sporulation of *Bacillus subtilis* mutants blocked in the pyruvate dehydrogenase complex. *J. Bacteriol.* **99**:745-756.
50. **Fridkin, S. K., J. R. Edwards, F. C. Tenover, R. P. Gaynes, and J. E. McGowan, Jr.** 2001. Antimicrobial resistance prevalence rates in hospital antibiograms reflect prevalence rates among pathogens associated with hospital-acquired infections. *Clin. Infect. Dis.* **33**:324-330.
51. **Fritsche, D.** 1971. The role of lipases in the lipid- and total metabolism of *Staphylococcus aureus*. *Zentralbl. Bakteriol. [Orig. A]* **217**:483-500.
52. **Gajiwala, K. S. and S. K. Burley.** 2000. Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**:110-116.
53. **Gardy, J. L., M. R. Laird, F. Chen, S. Rey, C. J. Walsh, M. Ester, and F. S. Brinkman.** 2005. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics.* **21**:617-623.
54. **Gerke, C., A. Kraft, R. Süßmuth, O. Schweitzer, and F. Götz.** 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* **273**:18586-18593.
55. **Gerlach, D., H. Alouf, L. Moravek, M. Pavlik, and W. Kohler.** 1992. The characterization of two new low molecular weight proteins (LMPs) from *Streptococcus pyogenes*. *Zentralbl. Bakteriol.* **277**:1-9.
56. **Giachino, P., S. Engelmann, and M. Bischoff.** 2001. Sigma(B) activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**:1843-1852.

57. **Gill, S. R., D. E. Fouts, G. L. Archer, E. F. Mongodin, R. T. Deboy, J. Ravel, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R. J. Dodson, S. C. Daugherty, R. Madupu, S. V. Angiuoli, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I. R. Hance, K. E. Nelson, and C. M. Fraser.** 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* **187**:2426-2438.
58. **Götz, F.** 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* **43**:1367-1378.
59. **Hartford, O., L. O'Brien, K. Schofield, J. Wells, and T. J. Foster.** 2001. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology* **147**:2545-2552.
60. **Heilmann, C., C. Gerke, F. Perdreau-Remington, and F. Götz.** 1996. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect. Immun.* **64**:277-282.
61. **Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters, and F. Götz.** 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* **24**:1013-1024.
62. **Heilmann, C., G. Thumm, G. S. Chhatwal, J. Hartleib, A. Uekotter, and G. Peters.** 2003. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **149**:2769-2778.
63. **Heinzelmann, M., D. O. Herzig, B. Swain, M. A. Mercer-Jones, T. M. Bergamini, and H. C. Polk, Jr.** 1997. Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* **4**:705-710.
64. **Helmann, J. D.** 1991. Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Mol. Microbiol.* **5**:2875-2882.
65. **Helmann, J. D.** 2002. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol* **46**:47-110.
66. **Helmann, J. D. and M. J. Chamberlin.** 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:839-872.
67. **Hemila, H.** 1991. Lipoamide dehydrogenase of *Staphylococcus aureus*: nucleotide sequence and sequence analysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1129**:119-123.

68. **Hogt, A. H., J. Dankert, and J. Feijen.** 1985. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. *J. Gen. Microbiol.* **131 (Pt 9):**2485-2491.
69. **Horsburgh, M. J., J. L. Aish, I. J. White, L. Shaw, J. K. Lithgow, and S. J. Foster.** 2002. sigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional rsbU strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J. Bacteriol.* **184:**5457-5467.
70. **Hughes, M. J., J. C. Moore, J. D. Lane, R. Wilson, P. K. Pribul, Z. N. Younes, R. J. Dobson, P. Everest, A. J. Reason, J. M. Redfern, F. M. Greer, T. Paxton, M. Panico, H. R. Morris, R. G. Feldman, and J. D. Santangelo.** 2002. Identification of major outer surface proteins of *Streptococcus agalactiae*. *Infect. Immun.* **70:**1254-1259.
71. **Hussain, M., M. Herrmann, C. von Eiff, F. Perdreau-Remington, and G. Peters.** 1997. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect. Immun.* **65:**519-524.
72. **Jäger, S., D. Mack, H. Rohde, M. A. Horstkotte, and J. K. M. Knobloch.** 2005. Disintegration of *Staphylococcus epidermidis* biofilms under glucose limitation depends on the activity of the alternative sigma factor σ^B . *Appl. Environ. Microbiol.* **71:**in press.
73. **Jeffery, C. J.** 1999. Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24:**8-11.
74. **Jenkinson, H. F.** 1989. Properties of a phosphocarrier protein (HPr) extracted from intact cells of *Streptococcus sanguis*. *J. Gen. Microbiol.* **135:**3183-3197.
75. **Kajimura, J., T. Fujiwara, S. Yamada, Y. Suzawa, T. Nishida, Y. Oyamada, I. Hayashi, J. Yamagishi, H. Komatsuzawa, and M. Sugai.** 2005. Identification and molecular characterization of an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase Sle1 involved in cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **58:**1087-1101.
76. **Kazmierczak, M. J., S. C. Mithoe, K. J. Boor, and M. Wiedmann.** 2003. *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. *J. Bacteriol.* **185:**5722-5734.
77. **Kies, S., M. Otto, C. Vuong, and F. Götz.** 2001. Identification of the *sigB* operon in *Staphylococcus epidermidis*: construction and characterization of a *sigB* deletion mutant. *Infect. Immun.* **69:**7933-7936.
78. **Kloos, W. E., D. N. Ballard, J. A. Webster, R. J. Hubner, A. Tomasz, I. Couto, G. L. Sloan, H. P. Dehart, F. Fiedler, K. Schubert, H. de Lencastre, I. S. Sanches, H. E. Heath, P. A. Leblanc, and A. Ljungh.** 1997. Ribotype

- delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:313-323.
79. **Kloos, W. E. and T. L. Bannerman.** 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:117-140.
80. **Kloos, W. E. and T. L. Bannerman.** 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*, p. 264-282. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*.
81. **Knobloch, J. K., S. Jäger, J. Huck, M. A. Horstkotte, and D. Mack.** 2005. *mecA* is not involved in the σ^B -dependent switch of the expression phenotype of methicillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1216-1219.
82. **Knobloch, J. K. M., K. Bartscht, S. Jäger, D. Rohde, M. A. Horstkotte, and D. Mack.** 2005. *barAB* a new regulatory gene locus mediating NaCl induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation, p. 538. In .
83. **Knobloch, J. K. M., K. Bartscht, A. Sabottke, H. Rohde, H. H. Feucht, and D. Mack.** 2001. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J. Bacteriol.* **183**:2624-2633.
84. **Knobloch, J. K. M., M. A. Horstkotte, H. Rohde, P. M. Kaulfers, and D. Mack.** 2002. Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:683-687.
85. **Knobloch, J. K. M., M. A. Horstkotte, H. Rohde, and D. Mack.** 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* **191**:101-106.
86. **Knobloch, J. K. M., S. Jäger, M. A. Horstkotte, H. Rohde, and D. Mack.** 2004. RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor σ^B by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infect. Immun.* **72**:3838-3848.
87. **Knobloch, J. K. M., M. Nedelmann, K. Kiel, K. Bartscht, M. A. Horstkotte, S. Dobinsky, H. Rohde, and D. Mack.** 2003. Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5812-5818.
88. **König, D. P., F. Perdreau-Remington, J. Rutt, P. Stossberger, R. D. Hilgers, and G. Plum.** 1998. Slime production of *Staphylococcus epidermidis*: increased

- bacterial adherence and accumulation onto pure titanium. *Acta Orthop. Scand.* **69**:523-526.
89. **Krimmer, V., H. Merkert, C. von Eiff, M. Frosch, J. Eulert, J. F. Lohr, J. Hacker, and W. Ziebuhr.** 1999. Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2667-2673.
90. **Kullik, I., P. Giachino, and T. Fuchs.** 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.
91. **Kuroda, M., T. Ohta, and H. Hayashi.** 1995. Isolation and the gene cloning of an alkaline shock protein in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**:978-984.
92. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
93. **Lei, B., S. Mackie, S. Lukomski, and J. M. Musser.** 2000. Identification and immunogenicity of group A Streptococcus culture supernatant proteins. *Infect. Immun.* **68**:6807-6818.
94. **Lindsay, J. A. and S. J. Foster.** 1999. Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability in response to environmental conditions in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* **262**:323-331.
95. **Livak, K. J. and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-408.
96. **Longshaw, C. M., A. M. Farrell, J. D. Wright, and K. T. Holland.** 2000. Identification of a second lipase gene, gehD, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases. *Microbiology* **146 (Pt 6)**:1419-1427.
97. **Lorenz, U., K. Ohlsen, H. Karch, M. Hecker, A. Thiede, and J. Hacker.** 2000. Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **29**:145-153.
98. **Ludwicka, A., B. Jansen, T. Wadstrom, and G. Pulverer.** 1984. Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. [A]* **256**:479-489.
99. **Mack, D.** 1999. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J. Hosp. Infect.* **43 Suppl**:S113-S125.

100. **Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, and R. Laufs.** 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* **178**:175-183.
101. **Mack, D., M. Haeder, N. Siemssen, and R. Laufs.** 1996. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J. Infect. Dis.* **174**:881-884.
102. **Mack, D., M. Nedelmann, A. Krokotsch, A. Schwarzkopf, J. Heesemann, and R. Laufs.** 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.
103. **Mack, D., J. Riedewald, H. Rohde, T. Magnus, H. H. Feucht, H. A. Elsner, R. Laufs, and M. E. Rupp.** 1999. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect. Immun.* **67**:1004-1008.
104. **Mack, D., H. Rohde, S. Dobinsky, J. Riedewald, M. Nedelmann, J. K. M. Knobloch, H. A. Elsner, and H. H. Feucht.** 2000. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect. Immun.* **68**:3799-3807.
105. **Mack, D., N. Siemssen, and R. Laufs.** 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.
106. **MacKenzie, F. M., P. Greig, D. Morrison, G. Edwards, and I. M. Gould.** 2002. Identification and characterization of teicoplanin-intermediate *Staphylococcus aureus* blood culture isolates in NE Scotland. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**:689-697.
107. **Maeda, H. and T. Yamamoto.** 1996. Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **377**:217-226.
108. **Mah, T. F. and G. A. O'Toole.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**:34-39.
109. **Manna, A. C., M. G. Bayer, and A. L. Cheung.** 1998. Transcriptional analysis of different promoters in the sar locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **180**:3828-3836.

110. **Marchler-Bauer, A. and S. H. Bryant.** 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* **32**:W327-W331.
111. **Mark, D. F. and C. C. Richardson.** 1976. *Escherichia coli* thioredoxin: a subunit of bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **73**:780-784.
112. **McAleese, F. M., E. J. Walsh, M. Sieprawska, J. Potempa, and T. J. Foster.** 2001. Loss of clumping factor B fibrinogen binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease. *J. Biol. Chem.* **276**:29969-29978.
113. **McGavin, M. J., C. Zahradka, K. Rice, and J. E. Scott.** 1997. Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infect. Immun.* **65**:2621-2628.
114. **Mirel, D. B., V. M. Lustre, and M. J. Chamberlin.** 1992. An operon of *Bacillus subtilis* motility genes transcribed by the sigma D form of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **174**:4197-4204.
115. **Miyazaki, E., J. M. Chen, C. Ko, and W. R. Bishai.** 1999. The *Staphylococcus aureus* rsbW (orf159) gene encodes an anti-sigma factor of SigB. *J. Bacteriol.* **181**:2846-2851.
116. **Miyoshi, S. and S. Shinoda.** 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes. Infect.* **2**:91-98.
117. **Modun, B. and P. Williams.** 1999. The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect. Immun.* **67**:1086-1092.
118. **Molkanen, T., J. Tynnela, J. Helin, N. Kalkkinen, and P. Kuusela.** 2002. Enhanced activation of bound plasminogen on *Staphylococcus aureus* by staphylokinase. *FEBS Lett.* **517**:72-78.
119. **Moon, J. L., A. Banbula, A. Oleksy, J. A. Mayo, and J. Travis.** 2001. Isolation and characterization of a highly specific serine endopeptidase from an oral strain of *Staphylococcus epidermidis*. *Biol. Chem.* **382**:1095-1099.
120. **Morfeltdt, E., L. Janzon, S. Arvidson, and S. Lofdahl.** 1988. Cloning of a chromosomal locus (exp) which regulates the expression of several exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* **211**:435-440.
121. **Morfeltdt, E., K. Tegmark, and S. Arvidson.** 1996. Transcriptional control of the agr-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **21**:1227-1237.

122. **Muller, E., J. Hubner, N. Gutierrez, S. Takeda, D. A. Goldmann, and G. B. Pier.** 1993. Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. *Infect. Immun.* **61**:551-558.
123. **Muro-Pastor, A. M., P. Ostrovsky, and S. Maloy.** 1997. Regulation of gene expression by repressor localization: biochemical evidence that membrane and DNA binding by the PutA protein are mutually exclusive. *J. Bacteriol.* **179**:2788-2791.
124. **Nedelmann, M., A. Sabottke, R. Laufs, and D. Mack.** 1998. Generalized transduction for genetic linkage analysis and transfer of transposon insertions in different *Staphylococcus epidermidis* strains. *Zentralbl. Bakteriologie.* **287**:85-92.
125. **Nickerson, N. N., L. Prasad, L. Jacob, L. T. Delbaere, and M. J. McGavin.** 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.*
126. **Nilsson, M., L. Frykberg, J. I. Flock, L. Pei, M. Lindberg, and B. Guss.** 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **66**:2666-2673.
127. **Noble, W. C.** 1997. Staphylococcal Carriage and Skin and Soft Tissue Infection, p. 401-412. *In* K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), *Staphylococci in Human Disease*. Churchill Livingstone, New York.
128. **Novick, R. P.** 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* **48**:1429-1449.
129. **Ohara-Nemoto, Y., Y. Ikeda, M. Kobayashi, M. Sasaki, S. Tajika, and S. Kimura.** 2002. Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. *Microb. Pathog.* **33**:33-41.
130. **Ohne, M.** 1975. Regulation of the dicarboxylic acid part of the citric acid cycle in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **122**:224-234.
131. **Oleksy, A., E. Golonka, A. Banbula, G. Szmyd, J. Moon, M. Kubica, D. Greenbaum, M. Bogyo, T. J. Foster, J. Travis, and J. Potempa.** 2004. Growth phase-dependent production of a cell wall-associated elastinolytic cysteine proteinase by *Staphylococcus epidermidis*. *Biol. Chem.* **385**:525-535.
132. **Ostrovsky, d. S. and S. Maloy.** 1993. PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:4295-4298.

133. **Owen, P., G. J. Kaczorowski, and H. R. Kaback.** 1980. Resolution and identification of iron-containing antigens in membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **19**:596-600.
134. **Pancholi, V. and V. A. Fischetti.** 1998. alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J. Biol. Chem.* **273**:14503-14515.
135. **Pei, L. and J. I. Flock.** 2001. Lack of *fbe*, the gene for a fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*, reduces its adherence to fibrinogen coated surfaces. *Microb. Pathog.* **31**:185-193.
136. **Pei, L., M. Palma, M. Nilsson, B. Guss, and J. I. Flock.** 1999. Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **67**:4525-4530.
137. **Pelz, A., K. P. Wieland, K. Putzbach, P. Hentschel, K. Albert, and F. Gotz.** 2005. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **280**:32493-32498.
138. **Peng, H. L., R. P. Novick, B. Kreiswirth, J. Kornblum, and P. Schlievert.** 1988. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **170**:4365-4372.
139. **Peters, G., R. Locci, and G. Pulverer.** 1981. Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [B]* **173**:293-299.
140. **Peters, G., R. Locci, and G. Pulverer.** 1982. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J. Infect. Dis.* **146**:479-482.
141. **Peters, G. and G. Pulverer.** 2001. Die Familie der *Micrococcaceae*, p. 250-260. In W. Köhler, H. J. Eggert, B. Fleischer, R. Marre, H. Pfister, and G. Pulverer (ed.), *Die Medizinische Mikrobiologie*. Urban und Fischer, München.
142. **Petersohn, A., M. Brigulla, S. Haas, J. D. Hoheisel, U. Volker, and M. Hecker.** 2001. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**:5617-5631.
143. **Piggot, P. J. and D. W. Hilbert.** 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:579-586.
144. **Potempa, J., A. Dubin, G. Korzus, and J. Travis.** 1988. Degradation of elastin by a cysteine proteinase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **263**:2664-2667.

145. **Potempa, J., W. Watorek, and J. Travis.** 1986. The inactivation of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor by proteinases from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **261**:14330-14334.
146. **Price, C. W., P. Fawcett, H. Ceremonie, N. Su, C. K. Murphy, and P. Youngman.** 2001. Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **41**:757-774.
147. **Rachid, S., S. Cho, K. Ohlsen, J. Hacker, and W. Ziebuhr.** 2000. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: the possible involvement of the alternative transcription factor sigB. *Adv. Exp. Med. Biol.* **485**:159-166.
148. **Rachid, S., K. Ohlsen, W. Witte, J. Hacker, and W. Ziebuhr.** 2000. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3357-3363.
149. **Recsei, P., B. Kreiswirth, M. O'Reilly, P. Schlievert, A. Gruss, and R. P. Novick.** 1986. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agr. *Mol. Gen. Genet.* **202**:58-61.
150. **Reed, S. B., C. A. Wesson, L. E. Liou, W. R. Trumble, P. M. Schlievert, G. A. Bohach, and K. W. Bayles.** 2001. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon. *Infect. Immun.* **69**:1521-1527.
151. **Reizer, J., M. H. Saier, Jr., J. Deutscher, F. Grenier, J. Thompson, and W. Hengstenberg.** 1988. The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in gram-positive bacteria: properties, mechanism, and regulation. *Crit Rev. Microbiol.* **15**:297-338.
152. **Resch, A., S. Leicht, M. Saric, L. Pasztor, A. Jakob, F. Gotz, and A. Nordheim.** 2006. Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics.* **6**:1867-1877.
153. **Rice, K., R. Peralta, D. Bast, J. de Azavedo, and M. J. McGavin.** 2001. Description of staphylococcus serine protease (ssp) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of sspA-encoded serine protease. *Infect. Immun.* **69**:159-169.
154. **Richarme, G.** 1987. Binding protein-dependent transports in 2-oxo acids dehydrogenase mutants of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **893**:373-377.

155. **Rigden, D. J., M. J. Jedrzejewski, and M. Y. Galperin.** 2003. Amidase domains from bacterial and phage autolysins define a family of gamma-D,L-glutamate-specific amidohydrolases. *Trends Biochem. Sci.* **28**:230-234.
156. **Rohde, H., C. Burdelski, K. Bartscht, M. Hussain, F. Buck, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, C. Heilmann, M. Herrmann, and D. Mack.** 2005. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.* **55**:1883-1895.
157. **Rohde, H., J. K. M. Knobloch, M. A. Horstkotte, and D. Mack.** 2001. Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* **190**:105-112.
158. **Rollof, J. and S. Normark.** 1992. In vivo processing of *Staphylococcus aureus* lipase. *J. Bacteriol.* **174**:1844-1847.
159. **Rosenstein, R. and F. Gotz.** 2000. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie* **82**:1005-1014.
160. **Rupp, M. E. and G. L. Archer.** 1994. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin. Infect. Dis.* **19**:231-243.
161. **Rupp, M. E., P. D. Fey, C. Heilmann, and F. Götz.** 2001. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J. Infect. Dis.* **183**:1038-1042.
162. **Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, K. Bartscht, and D. Mack.** 1999. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect. Immun.* **67**:2627-2632.
163. **Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, and D. Mack.** 1999. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect. Immun.* **67**:2656-2659.
164. **Sabat, A., K. Kosowska, K. Poulsen, A. Kasprowicz, A. Sekowska, B. B. van Den, J. Travis, and J. Potempa.** 2000. Two allelic forms of the aureolysin gene (*aur*) within *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **68**:973-976.
165. **Said-Salim, B., P. M. Dunman, F. M. McAleese, D. Macapagal, E. Murphy, P. J. McNamara, S. Arvidson, T. J. Foster, S. J. Projan, and B. N.**

- Kreiswirth.** 2003. Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. J. Bacteriol. **185**:610-619.
166. **Saier, M. H., Jr.** 1985. Mechanisms and Regulation of Carbohydrate Transport in Bacteria. Academic Press, New York.
167. **Sakata, N. and T. Mukai.** 2007. Production profile of the soluble lytic transglycosylase homologue in *Staphylococcus aureus* during bacterial proliferation. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **49**:288-295.
168. **Sakata, N., S. Terakubo, and T. Mukai.** 2005. Subcellular location of the soluble lytic transglycosylase homologue in *Staphylococcus aureus*. Curr. Microbiol. **50**:47-51.
169. **Saravia-Otten, P., H. P. Muller, and S. Arvidson.** 1997. Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by agr and an agr-independent mechanism. J. Bacteriol. **179**:5259-5263.
170. **Schaumburg, J., O. Diekmann, P. Hagendorff, S. Bergmann, M. Rohde, S. Hammerschmidt, L. Jansch, J. Wehland, and U. Karst.** 2004. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. Proteomics. **4**:2991-3006.
171. **Schumacher-Perdreau, F., C. Heilmann, G. Peters, F. Gotz, and G. Pulverer.** 1994. Comparative analysis of a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain and its adhesion-positive, accumulation-negative mutant M7. FEMS Microbiol. Lett. **117**:71-78.
172. **Sellman, B. R., A. P. Howell, C. Kelly-Boyd, and S. M. Baker.** 2005. Identification of immunogenic and serum binding proteins of *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun. **73**:6591-6600.
173. **Shaw, L., E. Golonka, J. Potempa, and S. J. Foster.** 2004. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. Microbiology **150**:217-228.
174. **Sibbald, M. J., A. K. Ziebandt, S. Engelmann, M. Hecker, A. de Jong, H. J. Harmsen, G. C. Raangs, I. Stokroos, J. P. Arends, J. Y. Dubois, and J. M. van Dijl.** 2006. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **70**:755-788.
175. **Sloot, N., M. Thomas, R. Marre, and S. Gatermann.** 1992. Purification and characterisation of elastase from *Staphylococcus epidermidis*. J. Med. Microbiol. **37**:201-205.
176. **Smeltzer, M. S., M. E. Hart, and J. J. Iandolo.** 1992. Quantitative spectrophotometric assay for staphylococcal lipase. Appl. Environ. Microbiol. **58**:2815-2819.

177. **Smith, A. W., H. Roche, M. C. Trombe, D. E. Briles, and A. Hakansson.** 2002. Characterization of the dihydrolipoamide dehydrogenase from *Streptococcus pneumoniae* and its role in pneumococcal infection. *Mol. Microbiol.* **44**:431-448.
178. **Sperber, W. H. and S. R. Tatini.** 1975. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* **29**:502-505.
179. **Sutcliffe, I. C., S. D. Hogg, and R. R. Russell.** 1993. Identification of *Streptococcus mutans* antigen D as the HPr component of the sugar-phosphotransferase transport system. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**:67-70.
180. **Tettelin, H., K. E. Nelson, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, R. T. Deboy, D. H. Haft, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. Gwinn, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, S. L. Salzberg, M. R. Lewis, D. Radune, E. Holtzapple, H. Khouri, A. M. Wolf, T. R. Utterback, C. L. Hansen, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, S. Angiuoli, T. Dickinson, E. K. Hickey, I. E. Holt, B. J. Loftus, F. Yang, H. O. Smith, J. C. Venter, B. A. Dougherty, D. A. Morrison, S. K. Hollingshead, and C. M. Fraser.** 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**:498-506.
181. **Teufel, P. and F. Gotz.** 1993. Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* **175**:4218-4224.
182. **Timmerman, C. P., A. Fleer, J. M. Besnier, L. De Graaf, F. Cremers, and J. Verhoef.** 1991. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect. Immun.* **59**:4187-4192.
183. **Tojo, M., N. Yamashita, D. A. Goldmann, and G. B. Pier.** 1988. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **157**:713-722.
184. **Trost, M., D. Wehmhoner, U. Karst, G. Dieterich, J. Wehland, and L. Jansch.** 2005. Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Proteomics.* **5**:1544-1557.
185. **Vadeboncoeur, C.** 1995. HPr: heteromorphous protein. *Res. Microbiol.* **146**:525-530.
186. **van Schaik, W., M. H. Tempelaars, J. A. Wouters, W. M. de Vos, and T. Abee.** 2004. The alternative sigma factor sigmaB of *Bacillus cereus*: response to stress and role in heat adaptation. *J. Bacteriol.* **186**:316-325.

187. **Van Wamel, W. J., C. M. Vandenbroucke-Grauls, J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 1998. The effect of culture conditions on the in-vitro adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **47**:705-709.
188. **Vandenesch, F., J. Kornblum, and R. P. Novick.** 1991. A temporal signal, independent of agr, is required for hla but not spa transcription in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **173**:6313-6320.
189. **Veenstra, G. J., F. F. Cremers, H. van Dijk, and A. Fleer.** 1996. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* **178**:537-541.
190. **Vojtov, N., H. F. Ross, and R. P. Novick.** 2002. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:10102-10107.
191. **Vuong, C., C. Gerke, G. A. Somerville, E. R. Fischer, and M. Otto.** 2003. Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **188**:706-718.
192. **Vuong, C., F. Götz, and M. Otto.** 2000. Construction and characterization of an agr deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **68**:1048-1053.
193. **Vuong, C., S. Kocianova, J. M. Voyich, Y. Yao, E. R. Fischer, F. R. DeLeo, and M. Otto.** 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem.* **279**:54881-54886.
194. **Waldvogel, F. A.** 2000. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock), p. 2069-2092. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, vol. 2. Churchill Livingstone, Philadelphia.
195. **Wenzig, E., F. Lottspeich, H. M. Verheij, G. H. De Haas, and F. Götz.** 1990. Extracellular processing of the *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry (Life Sci. Adv.)* 47-56.
196. **Whiting, G. C., J. T. Evans, S. Patel, and S. H. Gillespie.** 2002. Purification of native alpha-enolase from *Streptococcus pneumoniae* that binds plasminogen and is immunogenic. *J. Med. Microbiol.* **51**:837-843.
197. **Wilkins, J. C., D. Beighton, and K. A. Homer.** 2003. Effect of acidic pH on expression of surface-associated proteins of *Streptococcus oralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5290-5296.

198. **Williams, R. J., B. Henderson, L. J. Sharp, and S. P. Nair.** 2002. Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **70**:6805-6810.
199. **Xu, L., H. Li, C. Vuong, V. Vadyvaloo, J. Wang, Y. Yao, M. Otto, and Q. Gao.** 2006. Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **74**:488-496.
200. **Zhang, Y. Q., S. X. Ren, H. L. Li, Y. X. Wang, G. Fu, J. Yang, Z. Q. Qin, Y. G. Miao, W. Y. Wang, R. S. Chen, Y. Shen, Z. Chen, Z. H. Yuan, G. P. Zhao, D. Qu, A. Danchin, and Y. M. Wen.** 2003. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol. Microbiol.* **49**:1577-1593.
201. **Ziebandt, A. K., D. Becher, K. Ohlsen, J. Hacker, M. Hecker, and S. Engelmann.** 2004. The influence of agr and sigmaB in growth phase dependent regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Proteomics.* **4**:3034-3047.
202. **Ziebuhr, W., C. Heilmann, F. Götz, P. Meyer, K. Wilms, E. Straube, and J. Hacker.** 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.
203. **Ziebuhr, W., V. Krimmer, S. Rachid, I. Lossner, F. Gotz, and J. Hacker.** 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 Anhang

8.1 Alignment von Ecp und SspB von *S. aureus*

```

1                               70
MRSA252 (1) MNSSCKTRVFNISILMVSMILSLGAFAN-----NNKAKADSHSKOLEINVKSDKVPQKVKDLAQQQFA
N315 (1) MNSSYKSRVFNISILMVSMILSLGAFAN-----NNKAKADSHSKOLEINVKSDKVPQKVKDLAQQQFA
RP62A (1) ----MKKLSYMITTMLAFTISLALGLFFNSAHADSLPQKNGANQKTTKVTVSNKDVFDARVRLAEEQYL

71                               140
MRSA252 (66) GYAKALDKQSNAKTGKYEELGEAFKIYKFNGEEDNSYYYPVIKD-GKI VYTLT LSPKNKDDLNSKEDMNY
N315 (66) GYAKALDKQSNAKTGKYEELGEAFKIYKFNGEEDNSYYYPVIKD-GKI VYTLT LSPKNKDDLNSKEDMNY
RP62A (67) SRVALLDKASNHKATSITLGEPFKIYKFNKESDGNYYYPVLNKKGDVVYVVTISP-NPSNSKASKQONNY

141                               210
MRSA252 (135) SVKISNFI AKDLDOI KDKNSNITVLTDEKG-FYFEDGKVR LVKATPLANNI KEKESAKTVSFLKQELK
N315 (135) SVKISNFI AKDLDOI KDKNSNITVLTDEKG-FYFEDGKVR LVKATPLPGNV KEKESAKTVSFLKQELK
RP62A (136) SINVSFFLSKILNQYKNQK--ITILTNTKGYEALT EDGKVT LVLKTE RNN EKTYENATESTKFKDLNDFK

211                               280
MRSA252 (204) TTVTP TKVEEN--EAIQEDQVQYENTLKNFKIREQQFDNSWCAGFSMAALLNATKNTDTYNAHDIRTLY
N315 (204) NTVTP TKVEEN--EAIQEDQVQYENTLKNFKIREQQFDNSWCAGFSMAALLNATKNTDTYNAHDIRTLY
RP62A (204) QTASVTKPTLEYQSTRNEMYAEYVNLKNFRIRETQGYNSWCAGYTSMAALLNATYNTNRYNAESVMRYLH

281                               350
MRSA252 (272) FEVSEQDL PNCATFFNQMIEYGKSGQRDIHYOEGVPSYEQVDQLTKDNVGMILAQSVSQNPNDPHLGH
N315 (272) FEVSEQDL PNCSTFFNQMIEYGKSGQRDIHYOEGVPSYEQVDQLTKDNVGMILAQSVSQNPNDPHLGH
RP62A (274) ENLRGHDFQFTGLTSENMLRFGRSQGRNTQYLNRMTSYNEVDQLTNNQGLAVLGKRVESS-DGIHAGHA

351                               403
MRSA252 (342) LAVVANAKIN-DOEKLIYWNPWDTELSIQDASSLLHLSFNRDYNYWYGSMIYGY
N315 (342) LAVVGNAKIN-DOEKLIYWNPWDTELSIQDASSLLHLSFNRDYNYWYGSMIYGY
RP62A (343) MAVAGNAKVINGQKVLITWNPWDNGIMTQDAHSNIIPVSNGDHYEYWYASITYGY

```

Prozentuale Homologien:

	N315	RP62A
MRSA252	97	43
N315		42

In diesem Alignment sind der *cysteine protease precursor* SspB von *Staphylococcus epidermidis* RP62A, Accession Number AAW53223, der *cysteine protease precursor* von *Staphylococcus aureus subsp. aureus* N315, Accession Number NP_374167, und der *cysteine protease precursor* von *Staphylococcus aureus subsp. aureus* MRSA252, Accession Number CAG40025, gegenübergestellt.

8.2 Alignment von Ecp und ScpA von *S. aureus*

```

1                                                                                               70
N315 (1) MKRNFPKLIALSLIISLSVTP-----IANAESNSNIKAKDKKHVQVNVVEDKSVPTDVRNLAQDKYLSYVT
RP62A (1) MKKKLSYMITIMLAETLSLALGLFFNSAHADS LPQKNGANQKTTKVTVSNKDVPDAVRKLAEEQYLSRVA

71                                                                                               140
N315 (66) SLDKIYNKEKASYTLGEPFKIYKFNKSDGNYYFPVLNTEGNIDYIVTISEKITKYSSSSK--YTINVS
RP62A (71) LLDKASNHKATSYTLGEPFKIYKFNKESDGNYYYPVLNKKGDVVYVVTISENPSNSKASKQQNNYSINVS

141                                                                                               210
N315 (134) PFLSKVLNQYKQQITILTN SKGYVVTQNHKAKLVLKTPRLEDK KLKKTESIPTGNNVTQLKQKASVTM
RP62A (141) PFLSKILNQYKNQKITILTN TKGYFALTEDGKVT LVLKTPR NNEKTYENATESTKPKDLNDFKQTASVTK

211                                                                                               280
N315 (204) PTSQFKSNNYTYNEQYINKLENFKIRETQGNWCAGYTSALLNATYNTNKYHAEAVMRF LHPNLQQR
RP62A (211) PTLKYQSTRNEMYAEVYNQKKNFRIRETQYNSWCAGYTSALLNATYNTNRYNAESVMRY LHPNLRGHD

281                                                                                               350
N315 (274) FQFTGLTPREM IYFGQTQGRSPQL LNRMTYNEVDNLT KNNKGIAVLGSRVESRNEMHAGHAMAVVGNAK
RP62A (281) FQFTGLTSNEMLRFGRSQGRNTQY LNRMTS YNEVDQLTTNNQGIAVLGKRVESSDGIHAGHAMAVVGNAK

351                                                                                               395
N315 (344) LDNGQEVII IWNPWDNGFMTQDAKNV IPVSNGDHYRWYS SIYGY
RP62A (351) VNNGQKVIL IWNPWDNGLMTQDAHSNI IPVSNGDHYEWYAS IYGY

```

In diesem Alignment ist die *cysteine protease precursor* SspB von *Staphylococcus epidermidis* RP62A, Accession Number AAW53223 mit dem Staphopain A *precursor* (Staphylopain A) (Staphylococcal cysteine proteinase A) von *Staphylococcus aureus* *subsp. aureus* N315, Accession Number P65826 gegenübergestellt. Die Untersuchung ergab eine Übereinstimmung von 60 %.

8.6 Zeichnung aller gefundenen Peptide von Aap in 1457

Mit Grau sind das Signalpeptid und der Zellwandanker am LPXTG Motiv markiert. Gelb sind alle gefundenen Peptide aus der Massenspektroskopie eingezeichnet. Da das Aap Protein aus einer Vielzahl von Repeats besteht, lassen sich einzelne Peptide mehrmals im Protein matchen. Es sind alle möglichen übereinstimmenden Peptide eingezeichnet, auch wenn sie dadurch mehrmals eingezeichnet wurden.

	1	52	75
aap (Hussein)	(1)	MGKRRQGPINKKVDFLPNKLNKYSIRKFTVGTASILLGSTLIFGSSSHEAKAAEEKQVDPITQANQNDSSERSLE	
aap RP62A	(1)	MGKRRQGPINKKVDFLPNKLNKYSIRKFTVGTASILLGSTLIFGSSSHEAKAAEEKQVDPITQANQNDSSERSLE	
aap ATCC 12228	(1)	MGKRRQGPINKKVDFLPNKLNKYSIRKFTVGTASILLGSTLIFGSSSHEAKAAEEKQVDPITQANQNDSSERSLE	
aap S. epi 5179	(1)	MGKRRQGPINKKVDFLPNKLNKYSIRKFTVGTASILLGSTLIFGSSSHEAKAAEEKQVDPITQANQNDSSERSLE	
Consensus	(1)	MGKRRQGPINKKVDFLPNKLNKYSIRKFTVGTASILLGSTLIFGSSSHEAKAAEEKQVDPITQANQNDSSERSLE	
	76		150
aap (Hussein)	(76)	NTNQPTVNNEAPQMSSTLQAEEGSNAEAPQSEPTKAEEGGNAEAAQSEPTKAEEGGNAEAPQSEPTKAEEGGNAE	
aap RP62A	(76)	NTNQPTVNNEAPQMSSTLQAEEGSNAEAPQSEPTKAEEGGNAEAAQSEPTKAEEGGNAEAPQSEPTKAEEGGNAE	
aap ATCC 12228	(76)	NTNQPTVNNEAPQMSSTLQAEEGS-----	
aap S. epi 5179	(76)	NTNQPTVNNEAPQMSSTLQAEEGSNAEAPQSEPTKAEEGGNAEAAQSEPTKAEEGGNAEAPQSEPTKAEEGGNAE	
Consensus	(76)	NTNQPTVNNEAPQMSSTLQAEEGSNAEAPQSEPTKAEEGGNAEAAQSEPTKAEEGGNAEAPQSEPTKAEEGGNAE	
	151		225
aap (Hussein)	(151)	AAQSEPTKTEEGSNVKAQSEPTKAEEGSNAEAPQSEPTKTEEGSNAKAAQSEPTKAEEGGNAEAAQSEPTKTEE	
aap RP62A	(151)	AAQSEPTKTEEGSNVKAQSEPTKAEEGSNAEAPQSEPTKTEEGSNAKAAQSEPTKAEEGGNAEAAQSEPTKTEE	
aap ATCC 12228	(100)	-----	
aap S. epi 5179	(151)	AAQSEPTKTEEGSNVKAQSEPTKAEEGSNAEAPQSEPTKTEEGSNAKAAQSEPTKAEEGGNAEAAQSEPTKTEE	
Consensus	(151)	AAQSEPTKTEEGSNVKAQSEPTKAEEGSNAEAPQSEPTKTEEGSNAKAAQSEPTKAEEGGNAEAAQSEPTKTEE	
	226		300
aap (Hussein)	(226)	GSNAEAPQSEPTKAEEGGNAEAPQSEPTKTEEGGNAEAPNVPTIKANSDNDTQTQFSEAPTRNDLARKEDIPAVS	
aap RP62A	(226)	GSNAEAPQSEPTKAEEGGNAEAPQSEPTKTEEGGNAEAPNVPTIKANSDNDTQTQFSEAPTRNDLARKEDIPAVS	
aap ATCC 12228	(100)	-----NAEAPNVPTIKANSDNDTQTQFSEAPTRNDLARKEDIPAVS	
aap S. epi 5179	(226)	GSNAEAPQSEPTKAEEGGYAEAPQSEPTKTEEGGNAEAPNVPTIKANSDNDTQTQFSEAPTRNDLARKEDIPAVS	
Consensus	(226)	GSNAEAPQSEPTKAEEGGNAEAPQSEPTKTEEGGNAEAPNVPTIKANSDNDTQTQFSEAPTRNDLARKEDIPAVS	
	301		375
aap (Hussein)	(301)	KNEELQSSQPNTDSKIEPTTSEPVNLNYSPPFMSLLSMPADSSSNNTKNTIDIPPTTVKGRDNYDFYGRVDIESN	
aap RP62A	(301)	KNEELQSSQPNTDSKIEPTTSEPVNLNYSPPFMSLLSMPADSSSNNTKNTIDIPPTTVKGRDNYDFYGRVDIESN	
aap ATCC 12228	(141)	KNEELQSSQPNTDSKIEPTTSEPVNLNYSPPFMSLLSMPADSSSNNTKNTIDIPPTTVKGRDNYDFYGRVDIQSN	
aap S. epi 5179	(301)	KNEELQSSQPNTDSKIEHTTSEPVNLNYSPPFMSLLSMPADSSSNNTKNTIDIPPTTVKGRDNYDFYGRVDIESN	
Consensus	(301)	KNEELQSSQPNTDSKIEPTTSEPVNLNYSPPFMSLLSMPADSSSNNTKNTIDIPPTTVKGRDNYDFYGRVDIESN	
	376		450
aap (Hussein)	(376)	PTDLNATNLTRYNYGQPPGTTTAGAVQFKNQVSFDKDFDFNIRVANNRQSNITGADGWGFMFSKKDGGDFLKNKG	
aap RP62A	(376)	PTDLNATNLTRYNYGQPPGTTTAGAVQFKNQVSFDKDFDFNIRVANNRQSNITGADGWGFMFSKKDGGDFLKNKG	
aap ATCC 12228	(216)	PTDLNATNLTRYNYGQPPGTTTAGAVQFKNQVSFDKDFDFNIRVANNRQSNITGADGWGFMFSKKDGGDFLKNKG	
aap S. epi 5179	(376)	PTDLNATNLTRYNYGQPPGTTTAGAVQFKNQVSFDKDFDFNIRVANNRQSNITGADGWGFMFSKKDGGDFLKNKG	
Consensus	(376)	PTDLNATNLTRYNYGQPPGTTTAGAVQFKNQVSFDKDFDFNIRVANNRQSNITGADGWGFMFSKKDGGDFLKNKG	
	451		525
aap (Hussein)	(451)	ILREKGTPSAAGFRIDTGYNNPDLDKIQKQAGQYRGTGFVKNDSSQNTSKVSGTPTDFLNYADNTTNDLD	
aap RP62A	(451)	ILREKGTPSAAGFRIDTGYNNPDLDKIQKQAGQYRGTGFVKNDSSQNTSKVSGTPTDFLNYADNTTNDLD	
aap ATCC 12228	(291)	ILREKGTPSAAGFRIDTGYNNPDLDKIQKQAGQYRGTGFVKNDSSQNTSKVSGTPTDFLNYADNTTNDLD	
aap S. epi 5179	(451)	ILREKGTPSAAGFRIDTGYNNPDLDKIQKQAGQYRGTGFVKNDSSQNTSKVSGTPTDFLNYADNTTNDLD	
Consensus	(451)	ILREKGTPSAAGFRIDTGYNNPDLDKIQKQAGQYRGTGFVKNDSSQNTSKVSGTPTDFLNYADNTTNDLD	
	526		600
aap (Hussein)	(526)	GKFHGQKLNNVNLYNASNQFTTATYAGKTWTATLSELGLSPTDSYNFLVTSSQYGNNGSGTYASGVMRADLDGA	
aap RP62A	(526)	GKFHGQKLNNVNLYNASNQFTTATYAGKTWTATLSELGLSPTDSYNFLVTSSQYGNNGSGTYASGVMRADLDGA	
aap ATCC 12228	(366)	GKFHGQKLNNVNLYNASNQFTTATYAGKTWTATLSELGLSPTDSYNFLVTSSQYGNNGSGTYADGVMRADLDGA	
aap S. epi 5179	(526)	GKFHGQKLNNVNLYNASNQFTTATYAGKTWTATLSELGLSPTDSYNFLVTSSQYGNNGSGTYASGVMRADLDGA	
Consensus	(526)	GKFHGQKLNNVNLYNASNQFTTATYAGKTWTATLSELGLSPTDSYNFLVTSSQYGNNGSGTYASGVMRADLDGA	
	601		675
aap (Hussein)	(601)	TLTYTPKAVDGDPIISTKEIPFNKKREFDPNLAPGTEKVVQKGEPIETTTTPTVYVNPNTGEKVGEGETEIKITK	
aap RP62A	(601)	TLTYTPKAVDGDPIISTKEIPFNKKREFDPNLAPGTEKVVQKGEPIETTTTPTVYVNPNTGEKVGEGETEIKITK	
aap ATCC 12228	(441)	TLTYTPKAVDGDPIISTKEIPFNKKREFDPNLAPGTEKVVQKGEPIETTTTPTVYVNPNTGEKVGEGETEIKITK	
aap S. epi 5179	(601)	TLTYTPKAVDGDPIISTKEIPFNKKREFDPNLAPGTEKVVQKGEPIETTTTPTVYVNPNTGEKVGEGETEIKITK	
Consensus	(601)	TLTYTPKAVDGDPIISTKEIPFNKKREFDPNLAPGTEKVVQKGEPIETTTTPTVYVNPNTGEKVGEGETEIKITK	
	676		750
aap (Hussein)	(676)	QPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYGPVDDGDPITSTEEIIPF	
aap RP62A	(676)	QPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYGPVDDGDPITSTEEIIPF	
aap ATCC 12228	(516)	QPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYGPVDDGDPITSTEEIIPF	
aap S. epi 5179	(676)	QPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYGPVDDGDPITSTEEIIPF	
Consensus	(676)	QPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYGPVDDGDPITSTEEIIPF	
	751		825
aap (Hussein)	(751)	DKKREFNPDLKPGEEERVKQKGEPEGTKITTPTKNPLTGEKVGEGETEIKITKQPVDEITEYGGEEIKPGHKDEF	
aap RP62A	(751)	DKKREFNPDLKPGEEERVKQKGEPEGTKITTPTKNPLTGEKVGEGETEIKITKQPVDEITEYGGEEIKPGHKDEF	
aap ATCC 12228	(591)	DKKREFNPDLKPGEEERVKQKGEPEGTKITTPTKNPLTGEKVGEGETEIKITKQPVDEITEYGGEEIKPGHKDEF	
aap S. epi 5179	(751)	DKKREFNPDLKPGEEERVKQKGEPEGTKITTPTKNPLTGEKVGEGETEIKITKQPVDEITEYGGEEIKPGHKDEF	
Consensus	(751)	DKKREFNPDLKPGEEERVKQKGEPEGTKITTPTKNPLTGEKVGEGETEIKITKQPVDEITEYGGEEIKPGHKDEF	

		826		900
aap (Hussein)	(826)	DPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDPITSTEEIPFDK	KR-----
aap RP62A	(826)	DPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDPITSTEEIPFDK	KR-----
aap ATCC 12228	(666)	DPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDPITSTEEIPFDK	KREFDPNLAPGTEKVVQKGE
aap S. epi 5179	(826)	DPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDPITSTEEIPFDK	KR-----
Consensus	(826)	DPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDPITSTEEIPFDK	KR-----
		901		975
aap (Hussein)	(883)	-----	-----	-----
aap RP62A	(883)	-----	-----	-----
aap ATCC 12228	(741)	PGTKITITPTTKNPLTGEKVGEGETEKITKQP	QPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPGKPGVKNP	-----
aap S. epi 5179	(883)	-----	-----	-----
Consensus	(901)	-----	-----	-----
		976		1050
aap (Hussein)	(883)	-----	EFNPDLPGEERVKQKGEPTKTIITPTTKNPLTGEKVGE	-----
aap RP62A	(883)	-----	EFNPDLPGEERVKQKGEPTKTIITPTTKNPLTGEKVGE	-----
aap ATCC 12228	(816)	TGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDPITSTEEIPFDK	KREFNPDLPGEERVKQKGEPTKTIITPTTKNPLTGEKVGE
aap S. epi 5179	(883)	-----	-----	EFNPDLPGEERVKQKGEPTKTIITPTTKNPLTGEKVGE
Consensus	(976)	-----	EFNPDLPGEERVKQKGEPTKTIITPTTKNPLTGEKVGE	-----
		1051		1125
aap (Hussein)	(923)	GEPTTEKITKQPVEIVHYGGEQIPQGHKDEFDPNAPVDSKTEVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDP	-----
aap RP62A	(923)	GEPTTEKITKQPVEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDP	-----
aap ATCC 12228	(891)	GEPTTEKITKQPVEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDP	-----
aap S. epi 5179	(923)	GEPTTEKITKQPVEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDP	-----
Consensus	(1051)	GEPTTEKITKQPVEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDP	-----
		1126		1200
aap (Hussein)	(998)	ITSTEEIPFDK	KREFDPNLAPGTEKVVQKGEPTKTIITPTTKNPLTGEKVGE	-----
aap RP62A	(998)	ITSTEEIPFDK	KREFDPNLAPGTEKVVQKGEPTKTIITPTTKNPLTGEKVGE	-----
aap ATCC 12228	(966)	ITSTEEIPFDK	KREFDPNLAPGTEKVVQKGEPTKTIITPTTKNPLTGEKVGE	-----
aap S. epi 5179	(998)	ITSTEEIPFDK	KREFDPNLAPGTEKVVQKGEPTKTIITPTTKNPLTGEKVGE	-----
Consensus	(1126)	ITSTEEIPFDK	KREFDPNLAPGTEKVVQKGEPTKTIITPTTKNPLTGEKVGE	-----
		1201		1275
aap (Hussein)	(1053)	-----	-----	-----
aap RP62A	(1073)	IKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDPITSTEEIPFDK	KREFDPNLAPG
aap ATCC 12228	(1039)	-----	-----	-----
aap S. epi 5179	(1071)	-----	-----	-----
Consensus	(1201)	-----	-----	-----
		1276		1350
aap (Hussein)	(1053)	-----	-----	-----
aap RP62A	(1148)	TEK	VVQKGEPTKTIITPTTKNPLTGEKVGE	-----
aap ATCC 12228	(1039)	-----	-----	-----
aap S. epi 5179	(1071)	-----	-----	-----
Consensus	(1276)	-----	-----	-----
		1351		1425
aap (Hussein)	(1053)	-----	-----	-----
aap RP62A	(1223)	GKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDPITSTEEIPFDK	KREFNPDLPGEERVKQKGEPTKTIITPTTKN
aap ATCC 12228	(1039)	-----	-----	-----
aap S. epi 5179	(1071)	-----	-----	-----
Consensus	(1351)	-----	-----	-----
		1426		1500
aap (Hussein)	(1053)	-----	-----	-----
aap RP62A	(1298)	PLTGEKVGEGETEKITK	QPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVT	-----
aap ATCC 12228	(1039)	-----	EEIKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVT	-----
aap S. epi 5179	(1071)	-----	GEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVT	-----
Consensus	(1426)	-----	GEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVT	-----
		1501		1575
aap (Hussein)	(1053)	-----	-----	-----
aap RP62A	(1373)	KYGPVDGDPITSTEEIPFDK	KREFNPDLPGEERVKQKGEPTKTIITPTTKNPLTGEKVGE	-----
aap ATCC 12228	(1085)	KYGPVDGDPITSTEEIPFDK	-----	-----
aap S. epi 5179	(1118)	KYGPVDGDPITSEEIPFDK	-----	-----
Consensus	(1501)	KYGPVDGDPITSTEEIPFDK	-----	-----
		1576		1650
aap (Hussein)	(1053)	-----	-----	-----
aap RP62A	(1448)	EITEYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDPITSTEEIPFDK	KR
aap ATCC 12228	(1106)	-----	-----	-----
aap S. epi 5179	(1138)	-----	-----	-----
Consensus	(1576)	-----	-----	-----
		1651		1725
aap (Hussein)	(1053)	-----	-----	-----
aap RP62A	(1523)	EFNPDLPGEERVKQKGEPTKTIITPTTKNPLTGEKVGE	-----	-----
aap ATCC 12228	(1106)	-----	QPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNA	-----
aap S. epi 5179	(1138)	-----	-----	-----
Consensus	(1651)	-----	-----	-----
		1726		1800
aap (Hussein)	(1053)	-----	-----	-----
aap RP62A	(1598)	PKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTK	YGPVDGDPITSTEEIPFDK	KREFDPNLAPGTEKVVQKGEPTK
aap ATCC 12228	(1106)	-----	-----	-----
aap S. epi 5179	(1138)	-----	-----	-----
Consensus	(1726)	-----	-----	-----
		1801		1875
aap (Hussein)	(1053)	-----	-----	-----
aap RP62A	(1673)	TITPTTKNPLTGEKVGEGETEKITK	QPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEV	-----
aap ATCC 12228	(1106)	-----	-----	-----
aap S. epi 5179	(1138)	-----	-----	-----
Consensus	(1801)	-----	-----	-----

8.7 Alignment aller SsaA Proteine im Stamm ATCC 12228

		1	50
SE0433 SsaA like protein	(1)	MKKLAFAITAASGAVLSHHDAEAETQHKVQSGESLWTIAQQYNTSVES	
SE1872 SsaA	(1)	MKKLATATIATAGITFAFAHHAQAETAEQNNDGYNPNPYSYSYTYTIDA	
SE1876 SsaA precursor	(1)	MKKLKTISTLVAAGL--IAFLGHTTHDAEAEN-----	
SE0870 SsaA	(1)	-----	
SE2108 SsaA precursor	(1)	-----	
		51	100
SE0433 SsaA like protein	(51)	IKQNNLSNNMVFPQVINVGGSASQNTSSNTSSSSASSHTVVAGESLNI	
SE1872 SsaA	(51)	EGNYHYTWKGNWSPDRVNTSYNNYNNYNNYYG-----YNNYSNNYNS	
SE1876 SsaA precursor	(31)	-----	
SE0870 SsaA	(1)	-----	
SE2108 SsaA precursor	(1)	-----	
		101	150
SE0433 SsaA like protein	(101)	IANKYGVSVDALMQANHLNGYLMPNQLLIPNGSGSGSGGTATQTSGN	
SE1872 SsaA	(95)	NYNNYNNYQSNNTQSQRRTTQPTGGLGASYSTSSSNVHVTTTTSAPSSNIGVS	
SE1876 SsaA precursor	(31)	-----NNQQQ-----STHNYSTTEVSFS---	
SE0870 SsaA	(1)	-----MKKAIIVMFFVVTVILTIAALIDEFMIQDAKHGQSR	
SE2108 SsaA precursor	(1)	-----MKFKKLLSRIIATMIFGTLSYDAIE	
		151	200
SE0433 SsaA like protein	(151)	YTSPSFNHQNLYTEGQCTWYVFDKRSAGKPTSTYSDAKYWASNAANDG	
SE1872 SsaA	(145)	LSNARSASGNLYTSQCTYYVFDK---VGGKIGSTWGNANNWANAARS	
SE1876 SsaA precursor	(50)	-S-----GNLYTSQCTWYVYDK---TGGKIGSTWGNANSATAQAAG	
SE0870 SsaA	(36)	FTSHHPMKINITYKKQCTYYVFERVKNDGNKINNTWSDAKHWDDKAIDDG	
SE2108 SsaA precursor	(29)	QTHISHAAHNLYGKKQCTWVAFKRRALGKPVSNRWGNAKNYSNARRSG	
		201	250
SE0433 SsaA like protein	(201)	YQVDNTPSVGAIMQSTIPGPYGHVAYVERINGDGSILLSEMNYANGPNNM	
SE1872 SsaA	(192)	YTVNNSPAKGAALQTSQGAYGHVAYVEGVNSNGSIRVSEMNYGHGAGVVT	
SE1876 SsaA precursor	(90)	FTVNNTPEEGAIMQSSGAFGHVAVVESVNNDGSITSEMNYDGGPPALS	
SE0870 SsaA	(86)	YIVDRNPKKGSILQSSKGGYGHVAYLETINEGSMQVSEMNYT-QPVEIT	
SE2108 SsaA precursor	(79)	YATGHKPRKYAVMSTIRGYGHVAVVEKVYKNGKIKSEMNYN-VPLGYG	
		251	272
SE0433 SsaA like protein	(251)	YRTIPASEVSSYAFIH-----	
SE1872 SsaA	(242)	SRTISASQAASYNITH-----	
SE1876 SsaA precursor	(140)	TRTISASEASSYNIHLN----	
SE0870 SsaA	(135)	KRTIHTYDIKNYYYIHPQKIKT	
SE2108 SsaA precursor	(128)	TRITKSAARNYNYLY-----	

Prozentuale Homologien:

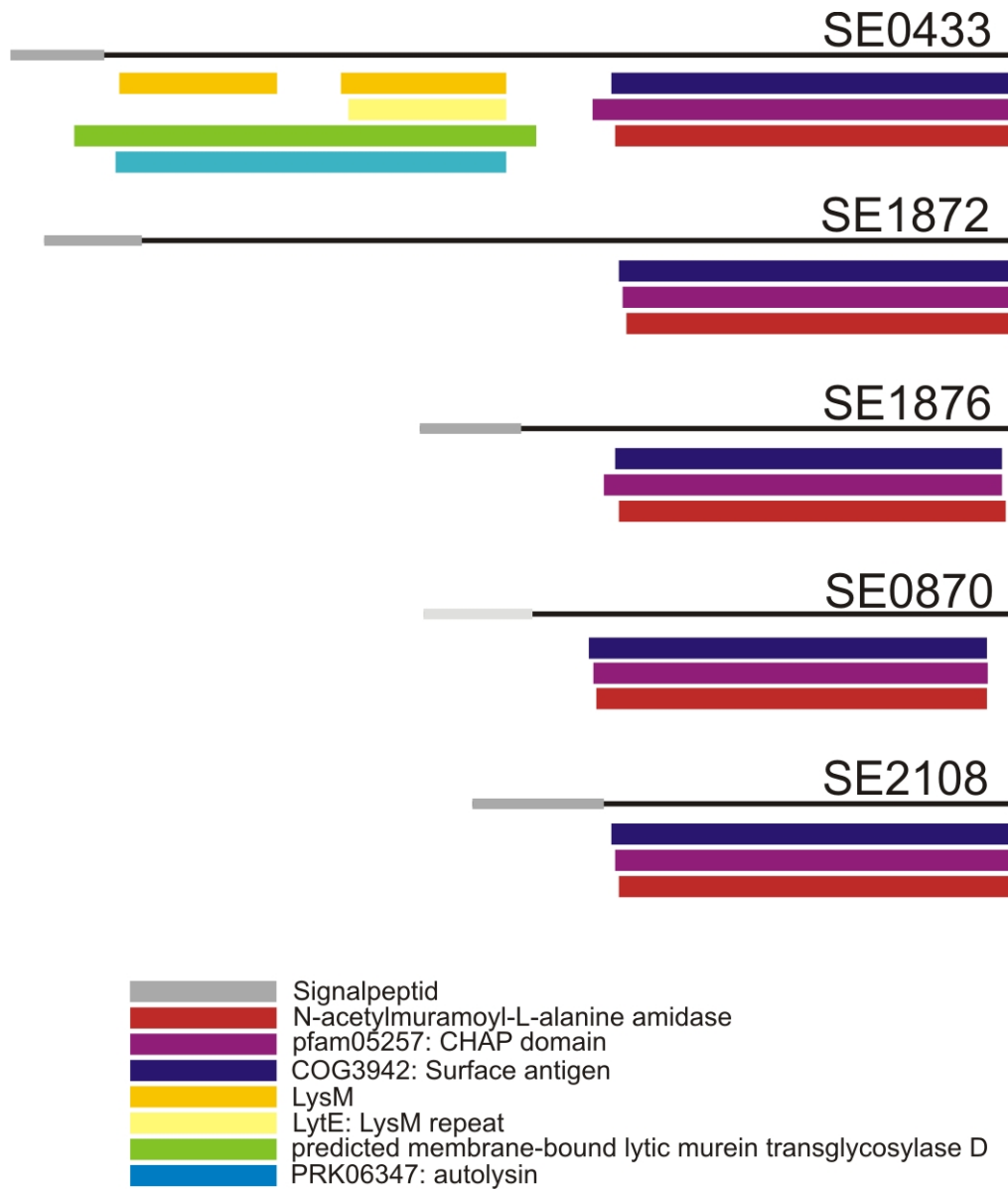
	SE1872 SsaA	SE1876 SsaA precursor	SE0870 SsaA	SE2108 SsaA precursor
SE0433 SsaA like protein	28	42	38	38
SE1872 SsaA		61	37	38
SE1876 SsaA precursor			40	38
SE0870 SsaA				30

Accession Nummern:

SE1876: NP_765431; SE0433: NP_763988; SE1872: NP_765427; SE2108: NP_765663; SE0870: NP_764425

Eingzeichnet ist das mit QTOF identifizierte Segment im Protein SE1876.

8.8 Domänen in den SsaA Proteinen



8.9 Alignment von SE1876 und SA2097

		1		50
S. epi. RP62A	(1)	MKKIKTIS	TLVAGLGI	FLGHTT
S. saprophyticus	(1)	MKKLVTAT	TLLTAGIGAAI	VGLDHGNEADAAEQTOP-----TNQSTTQS
S. aureus MRSA252	(1)	MKKLVTAT	TLLTAGIGTALVGH	QHADA AENYTNYN---YNTTQTTTTTTT
S. aureus N315	(1)	MKKLVTAT	TLLTAGIGTALVGG	AHHADA AENYTNYNNYNYNTTQTTTTTTT
Staphyloxanthin	(1)	MKKLVTAT	TLLTAGIGTALVGG	YHADA AENYTNYNNYNYNTTQTTTTTTT
		51		100
S. epi. RP62A	(44)	EVSFS---	NSGNLYTSGQCTWYVYDKT	GGKIGSTWGNANSWATAAQAAGF
S. saprophyticus	(44)	TSGS-----	ANLYTAGQCTWYVYDKV	GGNIGSTWGNANNWASAASSAGY
S. aureus MRSA252	(48)	TTTTSSISHSGN	LYTAGQCTWYVYDKV	GGEIGSTWGNANNWAAAAQAGF
S. aureus N315	(51)	TTTTSSISHSGN	LYTAGQCTWYVYDKV	GGEIGSTWGNANNWAAAAQAGF
Staphyloxanthin	(51)	TTTTSSISHSGN	LYTAGQCTWYVYDKV	GGEIGSTWGNANNWAAAAQAGF
		101		150
S. epi. RP62A	(91)	TVNNTPEEGAIM	QSSEGAFGHVAF	VESVNDGSI
S. saprophyticus	(89)	TVNNSPEAGSII	QSSTAGGYGHVAV	VENVNSDGS
S. aureus MRSA252	(98)	TVNHTPSKGAII	QSSEGGPF	GHVAVESVNSDGS
S. aureus N315	(101)	TVNHTPSKGAII	QSSEGGPF	GHVAVESVNSDGS
Staphyloxanthin	(101)	TVNHTPSKGAII	QSSEGGPF	GHVAVESVNSDGS
		151		167
S. epi. RP62A	(141)	RTISASEASS	YNYIHLN	
S. saprophyticus	(139)	RTISAGEASS	YNYIHLN	
S. aureus MRSA252	(148)	RTISASEAGNY	IHI-	
S. aureus N315	(151)	RTISASEAGNY	IHI-	
Staphyloxanthin	(151)	RTISASEAGNY	IHI-	

Prozentuale Homologien:

	S. saprophyticus	S. aureus MRSA252	S. aureus N315	Staphyloxanthin
S. epi. RP62A	61	69	68	68
S. saprophyticus		68	69	68
S. aureus MRSA252			99	99
S. aureus N315				99

In diesem Alignment sind das *secretory antigen precursor* SsaA, *putative Staphylococcus epidermidis* RP62A, Accession Number AAW55273, das *putative secretory antigen precursor* von *Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus* ATCC 15305, Accession Number YP_300699, das *putative exported protein* von *Staphylococcus aureus subsp. aureus* MRSA252, Accession Number CAG41369, das *hypothetical protein* SA2097 von *Staphylococcus aureus subsp. aureus* N315, Accession Number NP_375417 und das *staphyloxanthin biosynthesis protein, putative* von *Staphylococcus aureus subsp. aureus* COL, Accession Number YP_187102 gegenübergestellt.

8.10 Alignment von verschiedenen Enolasen

		1		50
Candida albicans	(1)	MSYA	KIHARYVYDSRGNPTVEVDFTDKGLF--RSI	PSGASTGVEALE
E. coli K12	(1)	MSKI	VKIIGREIIDSRRGNPTVEAEVHLEGGFVGMAAAPSGASTGSR	EALE
S. epi. RP62A	(1)	MP	IITDVYAREVLDSRGNPTVEVEVLTESGAFGRALV	PSGASTGHEAVE
S. agalactiae A909	(1)	MS	IITDVYAREVLDSRGNPTLEVEVYTESGAFGRGMV	PSGASTGHEAVE
S. pneumoniae TIGR4	(1)	MS	IITDVYAREVLDSRGNPTLEVEVYTESGAFGRGMV	PSGASTGHEAVE
S. pyogenes M1GAS	(1)	MS	IITDVYAREVLDSRGNPTLEVEVYTESGAFGRGMV	PSGASTGHEAVE
S. aureus N315	(1)	MP	IITDVYAREVLDSRGNPTVEVEVLTESGAFGRALV	PSGASTGHEAVE
		51		100
Candida albicans	(50)	LRDGD	SKWLKKGVLKAVAVNDAIAPALIKAKIDVVDQAKIDEFLLS	LD
E. coli K12	(51)	LRDGD	SKRFLKGGVTKAVAAVNGPIAQALIG--KDAKDAQAGIDKIM	DD
S. epi. RP62A	(51)	LRDGD	SKRYLKGVTKAVENVNEMIAPEIIVEGEFSLDQVSLDKMM	QLD
S. agalactiae A909	(51)	LRDGD	SKRYGLGTQKAVDNNVIAEAIIIG--YDVRDQQAIDRAMIALD	
S. pneumoniae TIGR4	(51)	LRDGD	SKRYGLGTQKAVDNNVIAEAIIIG--YDVRDQQAIDRAMIALD	
S. pyogenes M1GAS	(51)	LRDGD	SKRYLGLGTQKAVDNNVIAEAIIIG--YDVRDQQAIDRAMIALD	
S. aureus N315	(51)	LRDGD	SKRYLKGVTKAVENVNEMIAPEIIVEGEFSLDQVSLDKMM	IALD
		101		150
Candida albicans	(100)	GTPNK	SKLGNAILGVSLAANNAAAAGQIPLYKHIANISNAKKGKGFV	LP
E. coli K12	(99)	GTE	NKSKFGANAILAVSLANAKAAAAGKMPLYEHTAELNGTPG-KYS	MP
S. epi. RP62A	(101)	GTH	NKCKLGNAILGVSIIVAAAAALGQPLYKYLGGFNGKQ----	LP
S. agalactiae A909	(99)	GTP	NKCKLGNAILGVSIIVAAAAALYLEVPLYSYLGGFNTKIV----	LP
S. pneumoniae TIGR4	(99)	GTP	NKCKLGNAILGVSIIVAAAAALYLEIPLYSYLGGFNTKIV----	LP
S. pyogenes M1GAS	(99)	GTP	NKCKLGNAILGVSIIVAAAAALYLEVPLYTYLGGFNTKIV----	LP
S. aureus N315	(101)	GTP	NKCKLGNAILGVSIIVAAAAALGQPLYKYLGGFNGKQ----	LP
		151		200
Candida albicans	(150)	VPFQ	NVLNGGSHAGGALAFQEFMIAPITGVSTFSEALRIGSEVYHNLK	SLT
E. coli K12	(148)	VP	MMNILINGGEHADNNVDIQEFMIQFVGAKEVKEATRMGSEVFHHLAK	VL
S. epi. RP62A	(146)	VP	MMNIVNGGSHSDAPIAFQEFMILEVGAESFKESLRWGAEIFHNLK	SIL
S. agalactiae A909	(144)	TP	MMNILINGGSHSDAPIAFQEFMIMPVGAFTFKEALRWGAEVFHHLK	KKIL
S. pneumoniae TIGR4	(144)	TP	MMNILINGGSHSDAPIAFQEFMILEVGAFTFKEALRWGAEVFHHLK	KKIL
S. pyogenes M1GAS	(144)	TP	MMNILINGGSHSDAPIAFQEFMIMPVGAFTFKEGLRWGAEVFHHLK	KKIL
S. aureus N315	(146)	VP	MMNIVNGGSHSDAPIAFQEFMILEVGAFTFKESLRWGAEIFHNLK	SIL
		201		250
Candida albicans	(200)	KK	YQSQSAGNVGDEGGVAPDIKTPKEALDLMDAIDKAGYKKGK---	VGIA
E. coli K12	(198)	KAK	C--MNTAVGDEGGYAPNLGNSNAELAVIAEAVKAGYELG-KDITLA	
S. epi. RP62A	(196)	SER	C--LETA VGDEGGFAPRFEGTEDAVETI KAIIEAGYKPG-EDVFLG	
S. agalactiae A909	(194)	KER	C--LETA VGDEGGFAPRFEGTEDGVETILKAIIEAGYKPG-EDVFLG	
S. pneumoniae TIGR4	(194)	KSR	C--LETA VGDEGGFAPRFEGTEDGVETILAAIEAGYKPG-KDVFIG	
S. pyogenes M1GAS	(194)	KER	C--LVTAVGDEGGFAPRFEGTEDGVETILKAIIEAGYKPG-EDVFLG	
S. aureus N315	(196)	SKR	C--LETA VGDEGGFAPRFEGTEDAVETIQAIEAGYKPG-EEVFLG	
		251		300
Candida albicans	(247)	MD	VASSEFYKDKYDLDKFNPESDPSKWLSGPQLADLYFQIISEYPIVSI	
E. coli K12	(245)	MD	CAASEFYKDG---KYVLA-GEENKAFITSEFTHFLEELTKQYPIVSI	
S. epi. RP62A	(243)	FD	CASSEFYENG---VYDYTKFEGEHGAKRSAAEQVDYLEELIGKYPIITI	
S. agalactiae A909	(242)	FD	CASSEFYDAERKVYDYSKFEGEGAVRTAAEQIDYLEELVNKYPIITI	
S. pneumoniae TIGR4	(241)	FD	CASSEFYDKERKVYDYTKFEGEGAVRTSAAEQIDYLEELVNKYPIITI	
S. pyogenes M1GAS	(242)	FD	CASSEFYDKERKVYDYTKFEGEGAVRTSAAEQVDYLEELVNKYPIITI	
S. aureus N315	(243)	FD	CASSEFYENG---VYDYSKFEGEHGAKRTAAEQVDYLEELVDKYPIITI	
		301		350
Candida albicans	(297)	ED	PFADDDWLAHVHFFERVGDKIQIVGDDLTVTNPTRIKTAIEKKAA	NAL
E. coli K12	(290)	ED	GLDSDWDGFAYQTKVLGDKIQLVGDDLVVNTKILKEGIEKCIANSI	
S. epi. RP62A	(291)	ED	GMDENDWEGWKQLTDRIQDKVQLVGDDLVVNTTEILSKGIEQIGNSI	
S. agalactiae A909	(292)	ED	GMDENDWDGKALTERLGRVQLVGDDFFVNTIDYLARGIKEEAANSI	
S. pneumoniae TIGR4	(291)	ED	GMDENDWDGKALTERLGRKRVQLVGDDFFVNTIDYLARGIQEAGANSI	
S. pyogenes M1GAS	(292)	ED	GMDENDWDGKVLTERLGRVQLVGDDFFVNTIEYLARGIKENAANSI	
S. aureus N315	(291)	ED	GMDENDWDGKQLTERIGRVQLVGDDLVVNTTEILAKGIEQIGNSI	

		351		400
Candida albicans	(347)	LLKVNQIGTLTE	SIQH	ANDSYAAGWGMVSHRSGETEDTFIADLSVGLRS
E. coli K12	(340)	LLKFNQIGSLTE	TLAAIKMAK	DAGYTAVISHRSGETEDATIADLAVGTAA
S. epi. RP62A	(341)	LLKVNQIGTLTE	TFDAIEMAK	QKAGYTAVVSHRSGETEDTTIADIAVATNA
S. agalactiae A909	(342)	LLKVNQIGTLTE	TFEAIEMAK	EAGYTAVVSHRSGETEDSTIADIAVATNA
S. pneumoniae TIGR4	(341)	LLKVNQIGTLTE	TFEAIEMAK	EAGYTAVVSHRSGETEDSTIADIAVATNA
S. pyogenes M1GAS	(342)	LLKVNQIGTLTE	TFEAIEMAK	EAGYTAVVSHRSGETEDSTIADIAVATNA
S. aureus N315	(341)	LLKVNQIGTLTE	TFDAIEMAK	QKAGYTAVVSHRSGETEDTTIADIAVATNA
		401		445
Candida albicans	(397)	GQIKTGAPAR	SERLAKLNQI	LRIEELGSEAIYAG-KDFQKASQL
E. coli K12	(390)	GQIKTGSMSR	SDRVAKYNQI	LRIEELGKAPYNGRKEIKGQA--
S. epi. RP62A	(391)	GQIKTGSLSR	TDRIAKYNQL	RIEDELYETAKFECIKSFYNLDK-
S. agalactiae A909	(392)	GQIKTGSLSR	TDRIAKYNQL	RIEDQLGEVAYQYKCIKSFYNLKK-
S. pneumoniae TIGR4	(391)	GQIKTGSLSR	TDRIAKYNQL	RIEDQLGEVAYRGLKSFYNLKK-
S. pyogenes M1GAS	(392)	GQIKTGSLSR	TDRIAKYNQL	RIEDQLGEVAYQYKCIKSFYNLKK-
S. aureus N315	(391)	GQIKTGSLSR	TDRIAKYNQL	RIEDQLFETAKYDGIKSFYNLDK-

Prozentuale Homologien:

	E. coli K12	S. epi. RP62A	S. agalactiae A909	S. pneumoniae TIGR4	S. pyogenes M1GAS	S. aureus N315
Candida albicans	53	52	50	51	51	53
E. coli K12		58	59	59	59	59
S. epi. RP62A			79	80	80	94
S. agalactiae A909				94	97	82
S. pneumoniae TIGR4					94	82
S. pyogenes M1GAS						82

In diesem Alignment sind die Enolase von *Candida albicans*, Accession Number AAA34341, Enolase von *Escherichia coli* K12, Accession Number NP_417259, die Enolase von *Staphylococcus epidermidis* RP62A, Accession Number YP_188039, die Enolase von *Streptococcus agalactiae* A909, Accession Number ABA45999, die Enolase von *Streptococcus pneumoniae* TIGR4, Accession Number AAK75238, die putative enolase von *Streptococcus pyogenes* M1 GAS, Accession Number AAK33680 und die Enolase von *Staphylococcus aureus subsp. aureus* N315, Accession Number BAB41964 gegenübergestellt.

9 Formelsammlung

Die Berechnung der transkriptionellen Unterschiede innerhalb eines Experimentes wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode berechnet. Die Berechnung erfolgte nach folgenden Formeln:

Delta CT:

Es wurden die Differenzen zwischen dem zu untersuchenden Gen und dem Mittelwert der drei Messungen vom Housekeeping Gen *gyrB* berechnet.

$$X = \text{Gen} - \text{Mittelwert } gyrB$$

Diese Berechnung wurde für das Gen des Wildtyps und der zu untersuchenden Mutante durchgeführt. Anschließend wurde der Mittelwert der Messungen des Gens vom Wildtyp berechnet.

Delta delta CT:

Jeder einzelne Wert des Gens von der Mutante wurde nun vom Mittelwert des Wildtyp subtrahiert:

$$X = \text{Gen Mutante} - \text{Mittelwert Wildtyp}$$

Der erhaltene Wert wurde in einen Faktor umgerechnet, mit dem sich die Transkriptionsrate des Gens der Mutante vom Wildtyp unterscheidet:

$$\text{Positive Regulation: } 2^{-\text{Wert der Mutante}}$$

$$\text{Negative Regulation: } 1 \times 1/\text{Faktor der positiven Regulation}$$

Alle Versuche wurden im dreifach Ansatz drei mal wiederholt. Jedes Gen wurde somit neun mal gemessen. Aus diesen neun Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet:

$$\text{Mittelwert: } (x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_9)/9$$

$$\text{Standardabweichung: } \sigma_x = \sqrt{\frac{N \sum_{i=1}^N x_i^2 - (\sum_{i=1}^N x_i)^2}{N(N-1)}}$$

σ_x die Standardabweichung der Einzelmessung

N der Stichprobenumfang

x_i die Merkmalsausprägungen am i -ten Element der Stichprobe

10 Danksagung

Ich danke ganz besonders Herrn Prof. Dr. J. K.-M. Knobloch für die Überlassung des spannenden Themas und die kontinuierliche, freundschaftliche Unterstützung und Anleitung in allen Phasen der Arbeit.

Weiteren Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Laufs und Herrn Prof. Dr. M Aepfelbacher für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. W. Solbach, an dessen Institut ich den theoretischen Anteil der Arbeit fertigstellen konnte.

Großen Dank bin ich Herrn Prof. Dr. F. Buck und Herrn Sönke Harder verpflichtet für die massenspektroskopische Analyse der Proteinproben und ausführlichen Erklärungen zum physikalischen Hintergrund der Untersuchungen. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. N. Obermeyer für die großzügige Bereitstellung der 2D Dodeka Gelelektrophoresezelle und die Beratung in 2D Gelelektrophorese Fragen.

Herrn Dr. Holger Rohde danke ich für ein immer offenes Ohr bei allen Fragestellungen, seinen praktischen Hilfen und Anleitungen.

Ein großes Dankeschön auch an alle Mitdoktoranden der Arbeitsgruppen AG Knobloch und AG Rohde für die gute Arbeitsatmosphäre und Unterstützung.

Dank bin ich auch dem Team aus der Nährbodenküche schuldig, die geduldig meine Vielzahl von Extrawünschen erfüllt haben.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und Julia bedanken, die durch ihre kontinuierliche Motivation, Unterstützung und Ermutigung einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Meinem Bruder und meinem Vater danke ich für die Korrektur der Arbeit.

11 Lebenslauf

Name:		Jan-Christoph Kneschke
Geboren:		14.06.1979 in Bremen
Staatsangehörigkeit:		Deutsch
Schulische Laufbahn:	1986	Einschulung in die Waldorfschule in den Walddörfern Hamburg Bergstedt
	1999	Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst:	1999 - 2000	Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz in Hamburg
Studium:	WS 2000/2001	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
	9/2002	Physikum
	8/2003	1. Staatsexamen
	4/2006	2. Staatsexamen
	6/2007	3. Staatsexamen
	28.06.2007	Erteilung der Approbation
Promotion:	11/2003–2/2005	Durchführung der experimentellen Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. K.-M. Knobloch am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
	ab 01/2006	Fortführung der theoretischen Arbeiten am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am

Universitätsklinikum Schleswig-
Holstein, Campus Lübeck

Berufliche Laufbahn: 01/2008 - 12/2009 Assistenzarzt in der Abteilung für
Allgemein- Unfall- und Visceral-
chirurgie im Krankenhaus
14 Nothelfer, Weingarten
ab 04/2010 Assistenzarzt in der Abteilung für
Allgemein-, Visceral-, Thorax- und
Gefäßchirurgie, Klinikum
Memmingen

12 Publikationsverzeichnis

Publizierte Letter und Abstracts:

Kneschke, J., S. Jäger, M. A. Horstkotte, H. Rohde, D. Mack, J. K.-M. Knobloch. 2005. Regulation of extracellular proteins involved in *S. epidermidis* virulence by the alternative sigma factor σ^B . BIOSpektrum Suppl.:170.

Kneschke, J., S. Jäger, D. Mack, J. K.-M. Knobloch. 2006. Regulation of putative extracellular virulence factors in *Staphylococcus epidermidis* by the alternative sigma factor σ^B . Clin. Microbiol. Infect. 12 Suppl. 4: O370.