
Untersuchungen zum
Vorkommen und molekularen Mechanismus
der Biofilm-Bildung bei Enterokokken
aus verschiedenen klinischen Bereichen

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich 18 – Naturwissenschaften
der Universität Kassel

vorgelegt von

Susanne Schlüter

aus Brilon

Kassel, im Dezember 2008

I Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Charakteristika, medizinische Relevanz & Pathogenität von Enterokokken	3
1.2 Virulenzfaktoren bei <i>E. faecalis</i> und <i>E. faecium</i>	6
1.2.1 Enterococcal surface protein (Esp)	6
1.2.2 Aggregationssubstanzen	7
1.2.3 Cytolysin	8
1.2.4 Gelatinase und <i>fsr</i> Locus	9
1.2.5 Adhesin of collagen from <i>E. faecalis</i> (<i>Ace</i>).....	11
1.2.6 Weitere Virulenzfaktoren	12
1.3 Biofilm-Bildung bei <i>E. faecalis</i> und <i>E. faecium</i>	14
1.3.1 Allgemeine Charakteristika von Biofilmen und Biofilm-Bildung	14
1.3.2 Weltweites Vorkommen und klinische Bedeutung der Biofilm-Bildung bei Enterokokken	17
1.3.3 Biofilm-Bildung beeinflussende Faktoren	19
1.3.4 Molekulare Mechanismen der Biofilm-Bildung bei Enterokokken	20
1.4 Die Bakterielle Vaginose: das Enigma und die Biofilm-Bildung	31
1.4.1 Krankheitsbild der Bakteriellen Vaginose	31
1.4.2 Diagnose und Therapie	32
1.4.3 Ätiologie und Pathogenese der Bakteriellen Vaginose	33
2 Ziele der Arbeit	36
3 Material und Methoden	37
3.1 Geräte und Zubehör	37
3.2 Verbrauchsmaterial	38
3.3 Chemikalien	38
3.4 Nährmedien und Zusätze	39
3.4.1 Fertignährmedien.....	39
3.4.2 Medien für spezielle Nachweise	39
3.4.3 Zusätze und sonstige Materialien.....	40
3.5 Antibiotika	40
3.6 Puffer und Lösungen	41
3.6.1 Elektrophoresen und Gel-Färbelösungen.....	41
3.6.2 Gesamt-DNA-, Plasmid-DNA- und Gesamt-RNA-Isolierung.....	42
3.6.3 Sonstige Puffer und Lösungen	43
3.7 Kits und sonstige kommerziell erhältliche Materialien	44
3.8 Enzyme, PCR-Reagenzien und Primer	44
3.9 Bakterienstämme und Zellen	48
3.9.1 Kollektiv der Enterokokken-Isolate	49
3.9.2 Herstellung der Biofilm-Mutantenstämme	50

3.10 Mikrobiologische Kultur- und Standardmethoden	51
3.10.1 Isolierung, Kultivierung und Stammhaltung der Stämme	51
3.10.2 Biochemische Identifizierung	51
3.10.3 Antibiotikaresistenzbestimmungen	52
3.10.4 Verwertung verschiedener Substrate	52
3.10.5 Wachstumsverhalten	53
3.11 Methoden zum phänotypischen Nachweis von Virulenzfaktoren & Biofilm-Bildung	53
3.11.1 Gelatinase-Produktion	53
3.11.2 β -Hämolyse.....	53
3.11.3 Verklumpung.....	53
3.11.4 DNase-, Lipase- und H ₂ O ₂ -Produktion	54
3.11.5 Bacteriocin-Bildung.....	54
3.11.6 Biofilm-Bildung.....	55
3.11.7 Primäre Anheftung an abiotische Oberflächen.....	55
3.11.8 Hydrophobizität der Zelloberfläche.....	56
3.11.9 Adhärenz an HeLa-Zellen.....	56
3.12 Molekularbiologische Methoden	57
3.12.1 Präparation der Gesamt-DNA zum Einsatz in die PCR	57
3.12.2 Gesamt-DNA-Extraktion	57
3.12.3 Präparation von Plasmid-DNA.....	58
3.12.4 Restriktion von Plasmid-DNA	58
3.12.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	59
3.12.6 Nachweis spezifischer Gen-Abschnitte mittels PCR.....	59
3.12.7 Methoden zur Typisierung von Bakterienstämmen	65
3.12.8 Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von DNA.....	68
3.12.9 DNA-Sequenzierung.....	69
3.12.10 Gesamt-RNA-Extraktion	69
3.12.11 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	70
3.12.12 Formamid-Gelelektrophorese zum Nachweis von RNA.....	70
3.12.13 RT-PCR	70
3.13 Proteinbiochemische Methoden.....	71
3.13.1 Extraktion von Zellwand-assoziierten Proteinen.....	71
3.13.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	72
3.13.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	72
3.13.4 Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie	73
3.14 Mikroskopie	74
3.14.1 Rasterelektronen-Mikroskopie.....	74
3.14.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	75
3.15 Statistische Auswertung und sonstige verwendete Computer-Software	76

4 Ergebnisse.....	77
4.1 <i>E. faecalis</i> isoliert aus verschiedenem klinischen Material.....	77
4.1.1 Phänotypischer und genotypischer Nachweis von Virulenzfaktoren.....	77
4.1.2 Vorkommen von Biofilm-Bildung	79
4.1.3 Zusammenhang von Biofilm-Bildung mit bestimmten Virulenzfaktoren	80
4.2 <i>E. faecium</i> isoliert aus verschiedenem klinischen Material	84
4.3 <i>E. faecalis</i> isoliert von Patientinnen mit dem Krankheitsbild Bakterielle Vaginose	85
4.3.1 Phänotypischer und genotypischer Nachweis von Virulenzfaktoren.....	85
4.3.2 Vorkommen von Biofilm-Bildung	86
4.3.3 Zusammenhang von Biofilm-Bildung mit bestimmten Virulenzfaktoren	88
4.4 Vergleich der <i>E. faecalis</i> Stämme aus Vaginalabstrichen mit Isolaten anderer klinischer Herkunft	92
4.5 Charakterisierung von <i>E. faecalis</i> Biofilm-Mutantenstämmen.....	95
4.5.1 Herstellung und Typisierung von <i>E. faecalis</i> Biofilm-Mutantenstämmen	95
4.5.2 Charakterisierung der <i>E. faecalis</i> Biofilm-Mutantenstämme	98
5 Diskussion.....	115
5.1 <i>E. faecalis</i> isoliert aus verschiedenem klinischen Material.....	115
5.1.1 Phänotypischer und genotypischer Nachweis von Virulenzfaktoren.....	115
5.1.2 Biofilm-Bildung und Zusammenhang mit bestimmten Virulenzfaktoren.....	118
5.2 <i>E. faecium</i> isoliert aus verschiedenem klinischen Material	121
5.3 <i>E. faecalis</i> isoliert von Patientinnen mit dem Krankheitsbild Bakterielle Vaginose	123
5.3.1 Phänotypischer und genotypischer Nachweis von Virulenzfaktoren.....	123
5.3.2 Biofilm-Bildung und Zusammenhang mit bestimmten Virulenzfaktoren.....	124
5.4 Vergleich der <i>E. faecalis</i> Stämme aus Vaginalabstrichen mit Isolaten anderer klinischer Herkunft	126
5.5 Charakterisierung von <i>E. faecalis</i> Biofilm-Mutantenstämmen.....	127
5.5.1 Untersuchung der <i>E. faecalis</i> Stämme 1.3 und 1.3.7	128
5.5.2 Untersuchung der <i>E. faecalis</i> Stämme 1.10 und 1.10.16.....	131
5.5.3 Untersuchung der <i>E. faecalis</i> Stämme 2.11 und 2.11.8.....	135
6 Zusammenfassung	138
7 Ausblick.....	140
8 Literaturverzeichnis.....	141
9 Anhang.....	153

II Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ...	Mikro...
16S rDNA	ribosomale DNA der kleinen Untereinheit (16S)
A. bidest	Aqua bidestillata
<i>aacA-aphD</i>	Gen für Aminoglykosid-Resistenz mittels AAC(6 ['])-APH(2 ^{''})
Ab	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
Ab ^{sr}	Sensitivität/Resistenz gegenüber Antibiotikum
amu	atomic mass unit
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AP-PCR	arbitrarily primed PCR
AS	Aminosäure <i>oder</i> Aggregationssubstanz
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Bap	<u>B</u> iofilm <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein von <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>bee</i>	Gen-Cluster, <u>b</u> iofilm <u>e</u> nhancer in <i>Enterococcus</i>
BF	Biofilm
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
BV	Bakterielle Vaginose
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CFU	Colony Forming Unit
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
CRBSI	intravascular-catheter-related bloodstream infection
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Extinktion
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
ECM	extrazelluläre Matrix; extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	enhanced mass spectrometry (full scan)
<i>ermB</i>	Gen für erythromycin resistance methylase B
<i>esp</i>	Gen für das <u>E</u> nterococcal <u>s</u> urface <u>p</u> rotein Esp
<i>esp_{fm}</i>	Gen für das <u>E</u> nterococcal <u>s</u> urface <u>p</u> rotein Esp bei <i>E. faecium</i>
<i>et al.</i>	et alii
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol

FA	Formamid
for	forward (Primer)
<i>fsr</i>	QS-kontrollierter Genlocus <i>fsr</i> (<i>E. faecalis</i> regulator)
G.	<i>Gardnerella</i>
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GelE ^{-/+}	Gelatinase-positiv/negativ
GBAP	gelatinase biosynthesis-activating pheromone
h	hour / hours, Stunde / Stunden
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLR	high level resistance
HMW	high molecular weight
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
L.	<i>Lactobacillus</i>
log	logarithmisch
Lsg.	Lösung
LTA	lipoteichoic acid
M	Marker
M	Molarität
m...	milli...
min	Minute / Minuten
MG	Molekulargewicht
MLST	Multilocus Sequence Typing
MLVA	Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis
MO	Mikroorganismus / Mikroorganismen
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NCCLS	National Committee on Clinical Laboratory Standards
nm	Nanometer
oc	open circular (Plasmide)
OD ₅₉₅	optische Dichte bei 595 nm
<i>orf</i>	open reading frame
p.a.	per analysis
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PBP	Penicillin-bindendes-Protein
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis, Pulsfeldgelelektrophorese
PID	Pelvic Inflammatory Disease
PMN	polymorphonukleare Leukozyten
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid

PS	Polystyrol
PUM	phosphate urea magnesium (Puffer)
QS	Quorum Sensing
RAPD	random amplified polymorphic DNA
REM	Rasterelektronen-Mikroskopie
rep-PCR	PCR basierend auf repetitiven Genom-Sequenzen
rev	revers (Primer)
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonucleicacid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
S.	<i>Staphylococcus</i>
SDS	sodium dodecyl sulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris acetate acid EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris boric acid EDTA
TEM	Transmissionselektronen-Mikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
<i>tetK</i>	Gen für Tetracyclin-Resistenz über aktiven Efflux
<i>tetM</i>	Gen für Tetracyclin-Resistenz über Targetveränderung
THB	Todd Hewitt Broth
TMB	Tetramethylbenzidin
Tn	Transposon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Trypton-Soja-Bouillon (Trypticase Soy Broth)
TSBG	Trypton-Soja-Bouillon + 1% Glucose
U	Unit (Einheit Enzyme)
ÜN	über Nacht
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
UTI	urinary tract infection, Harnwegsinfektion
VF	Virulenzfaktor / -faktoren
V	Volt
VNTR	Variable-Number Tandem-Repeat
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
vs	versus
v/v	volume / volume
VT	Volumenteile
w/v	weight / volume
wt	Wildtyp
Z	Zentralwert (Median)

III Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Strukturelle Ähnlichkeit des Esp-Proteins von <i>E. faecalis</i> mit dem Bap-Protein von <i>S. aureus</i>	6
Abb. 2	Modell zum Mechanismus der <i>fsr</i> Aktivierung	10
Abb. 3	Dynamische Struktur eines Biofilms (schematisch).....	16
Abb. 4	Struktureller Aufbau des <i>bee</i> Operons von <i>E. faecalis</i> (schematisch)	25
Abb. 5	Struktureller Aufbau des <i>ebp</i> Operons von <i>E. faecalis</i> (schematisch)	27
Abb. 6	Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen des <i>esp</i> Gens bei <i>E. faecalis</i> verschiedener klinischer Herkunft.....	81
Abb. 7	Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen der Gelatinase-Produktion bei <i>E. faecalis</i> verschiedener klinischer Herkunft	81
Abb. 8	Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen des <i>asa1</i> Gens bei <i>E. faecalis</i> verschiedener klinischer Herkunft.....	82
Abb. 9	Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen von <i>esp</i> und/oder der Gelatinase-Produktion bei <i>E. faecalis</i> verschiedener klinischer Herkunft	83
Abb. 10	Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen von <i>esp</i> und/oder <i>asa1</i> bei <i>E. faecalis</i> verschiedener klinischer Herkunft	83
Abb. 11	Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen des <i>esp</i> Gens bei <i>E. faecalis</i> aus Vaginalabstrichen.....	88
Abb. 12	Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen von Gelatinase-Produktion bei <i>E. faecalis</i> aus Vaginalabstrichen	89
Abb. 13	Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen des <i>asa1</i> Gens bei <i>E. faecalis</i> aus Vaginalabstrichen.....	89
Abb. 14	Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen von <i>esp</i> und/oder GelE bei <i>E. faecalis</i> aus Vaginalabstrichen	90
Abb. 15	Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen von <i>esp</i> und/oder <i>asa1</i> bei <i>E. faecalis</i> aus Vaginalabstrichen	91
Abb. 16	Vergleich der Inzidenzen bestimmter Virulenzfaktoren bei <i>E. faecalis</i> Stämmen unterschiedlicher Herkunft	92
Abb. 17	Vergleich bzgl. der Biofilm-Bildungsfähigkeit der untersuchten <i>E. faecalis</i> Stämme verschiedener Herkunft.....	93
Abb. 18	Dendrogramm zur Typisierung der <i>E. faecalis</i> Wildtyp- und BF-Mutantenstämme mittels PFGE	96
Abb. 19	Biofilm-Assay der Wildtyp- und BF-Mutantenstämme	97
Abb. 20	Wachstumscharakteristik der <i>E. faecalis</i> Wildtyp- und BF-Mutantenstämme	97
Abb. 21	CLSM der Stämme 1.3 und 1.3.7	98
Abb. 22	CLSM der Stämme 1.10 und 1.10.16	99
Abb. 23	CLSM der Stämme 2.11 und 2.11.8	99
Abb. 24	REM der Stämme 1.3 (a) und 1.3.7 (b).....	100
Abb. 25	REM der Stämme 1.10 (a,b) und 1.10.16 (c,d).....	101
Abb. 26	REM der Stämme 2.11 (a,b,c,d) und 2.11.8 (e,f).....	102
Abb. 27	Dendrogramm der Ergebnisse des API [®] 50 CH von Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen ..	103
Abb. 28	Primäre Anheftung an abiotische Oberflächen bei Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämmen	105

Abb. 29	Hydrophobizität der Zelloberflächen von Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämmen	106
Abb. 30	Nachweis von Plasmiden der <i>E. faecalis</i> Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämmen.....	107
Abb. 31	Proteinexpressionsmuster der <i>E. faecalis</i> Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämme	108
Abb. 32	RT-PCR-Analysen von Bereichen des <i>bee</i> Locus der Stämme 1.10 und 1.10.16.....	112
Abb. 33	Untersuchte Abschnitte des <i>bee</i> Locus der <i>E. faecalis</i> Stämme 1.10 und 1.10.16 mittels PCR und RT-PCR (schematisch)	113
Abb. 34	Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen eines Teilbereichs der Sortase-1 des <i>bee</i> Locus der <i>E. faecalis</i> Stämme 1.10, 1.10.16 und E99.....	114
Abb. 35	Alignment der Sequenzen verschiedener Pili-Proteine: Vergleich und Identifizierung konservierter Motive bei den Proteinen Bee-1, Bee-2 und Bee-3	132
Abb. 36	Wachstumskurven der <i>E. faecalis</i> Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämme	167
Abb. 37	Dendrogramm der BOXA2R-PCR zur Typisierung der <i>E. faecalis</i> Wildtyp- und Biofilm-Mutanten	167
Abb. 38	Dendrogramm (schematisches Cluster) der PFGE-Fingerprintmuster zur Typisierung der <i>E. faecalis</i> Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämme	168
Abb. 39	Modell der Biogenese von Pili (Mandlik <i>et al.</i> , 2008).....	168
Abb. 40	Vergleich der DNA-Sequenzen eines Teilbereichs der Sortase-1 des <i>bee</i> Locus der <i>E. faecalis</i> Stämme 1.10, 1.10.16 und E99	169

IV Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Ergebnisse verschiedener Studien zum Vorkommen der Biofilm-Bildung bei Enterokokken in unterschiedlichen Ländern und Kontinenten der Welt	17
Tab. 2	Derzeit bekannte genetische Determinanten, die an der Biofilm-Bildung bei <i>E. faecalis</i> beteiligt sind.....	21
Tab. 3	Score-System nach Nugent <i>et al.</i> (1991) zur Bewertung Gram-gefärbter Vaginalsekrete....	33
Tab. 4	Verwendete Antibiotika	40
Tab. 5	Verwendete Antibiotikatestblättchen.....	40
Tab. 6	Verwendete Primer	45
Tab. 7	Verwendete Primer (Fortsetzung).....	46
Tab. 8	Verwendete Primer (Fortsetzung).....	47
Tab. 9	Verwendete Bakterienstämme und Zellen.....	48
Tab. 10	Übersicht zu Anzahl und Herkunft untersuchter Enterokokken-Isolate	49
Tab. 11	Ergebnisse der Nachweise von Virulenzfaktoren bei <i>E. faecalis</i> verschiedener klinischer Herkunft.....	78
Tab. 12	Vorkommen von Biofilm-Bildung bei <i>E. faecalis</i> verschiedener klinischer Herkunft.....	80
Tab. 13	Ergebnisse der Nachweise von Virulenzfaktoren bei <i>E. faecalis</i> aus Vaginalabstrichen	86
Tab. 14	Vorkommen von Biofilm-Bildung bei <i>E. faecalis</i> aus Vaginalabstrichen.....	87
Tab. 15	Vergleich des Vorkommens von Biofilm-Bildung bei den untersuchten <i>E. faecalis</i> Stämmen verschiedener Herkunft.....	94
Tab. 16	Phänotypische und genotypische Nachweise verschiedener Virulenzfaktoren bei den <i>E. faecalis</i> Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen.....	104
Tab. 17	Mittels Massenspektrometrie identifizierte, differentiell exprimierte Proteine der <i>E. faecalis</i> Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämmen	110
Tab. 18	Mittels Massenspektrometrie identifizierte, differentiell exprimierte Proteine der <i>E. faecalis</i> Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämmen (Fortsetzung).....	111
Tab. 19	Vorkommen von Biofilm-Bildung bei <i>E. faecalis</i> Stämmen aus verschiedenem Material ...	119
Tab. 20	Daten <i>E. faecalis</i> Isolate aus verschiedenem klinischen Material – Virulenzfaktoren.....	153
Tab. 21	Daten <i>E. faecalis</i> Isolate aus verschiedenem klinischen Material – VF (Fortsetzung).....	154
Tab. 22	Daten <i>E. faecalis</i> Isolate aus verschiedenem klinischen Material – VF (Fortsetzung).....	155
Tab. 23	Zusätzliche Daten <i>E. faecalis</i> Isolate aus verschiedenem klinischen Material – Antibiogramme und Antibiotikaresistenzgen-Nachweise.....	156
Tab. 24	Zusätzliche Daten <i>E. faecalis</i> Isolate aus verschiedenem klinischen Material – Antibiogramme und Antibiotikaresistenzgen-Nachweise (Fortsetzung)	157
Tab. 25	Zusätzliche Daten <i>E. faecalis</i> Isolate aus verschiedenem klinischen Material – Antibiogramme und Antibiotikaresistenzgen-Nachweise (Fortsetzung)	158
Tab. 26	Daten <i>E. faecium</i> aus verschiedenem klinischen Material – Virulenzfaktoren	159
Tab. 27	Daten <i>E. faecium</i> aus verschiedenem klinischen Material – VF (Fortsetzung)	160
Tab. 28	Zusätzliche Daten <i>E. faecium</i> Isolate aus verschiedenem klinischen Material – Antibiogramme und Antibiotikaresistenzgen-Nachweise.....	161
Tab. 29	Zusätzliche Daten <i>E. faecium</i> Isolate aus verschiedenem klinischen Material – Antibiogramme und Antibiotikaresistenzgen-Nachweise (Fortsetzung)	162
Tab. 30	Daten <i>E. faecalis</i> Isolate aus Vaginalabstrichen - BV positiv	163
Tab. 31	Zusätzliche Daten <i>E. faecalis</i> Isolate aus Vaginalabstrichen – BV positiv	164
Tab. 32	Daten <i>E. faecalis</i> aus Vaginalabstrichen – BV negativ.....	165
Tab. 33	Zusätzliche Daten zu den <i>E. faecalis</i> Isolaten aus Vaginalabstrichen – BV negativ.....	166

1 Einleitung

Enterokokken sind kommensale Besiedler des Intestinaltrakts sowie des weiblichen Genitaltrakts von Menschen und verschiedenen Tieren. Andererseits gehören die beiden häufig vorkommenden Spezies dieser Gattung *Enterococcus (E.) faecalis* und *E. faecium* zu den bedeutsamsten humanpathogenen Erregern verschiedener, mitunter lebensbedrohlicher Infektionen. Bei der Behandlung der von Enterokokken verursachten, v.a. nosokomialen Infektionen stellen sich insbesondere die hohe Anpassungsfähigkeit an die jeweilige Umwelt und zunehmende Antibiotikaresistenzen dieser opportunistisch pathogenen Bakterien als problematisch dar. Untersuchungen zu der Kommensale-Pathogen-Dynamik dieser Erreger haben bisher einige bakterien- und wirtsspezifische Faktoren identifiziert, die zur Entstehung und Entwicklung enterokokkaler Infektionen beitragen, der genaue Mechanismus der Pathogenese dieser Erkrankungen ist allerdings weitgehend unbekannt (Gilmore *et al.*, 2002; Baldassarri *et al.*, 2005).

Eine Eigenschaft der Enterokokken sowie anderer Infektionserreger, die in den letzten Jahren immer stärker in den Fokus der Untersuchungen zur Virulenz getreten ist, ist die Fähigkeit dieser Bakterien zur Biofilm-Bildung. Ein Biofilm ist eine sessile Gemeinschaft von Mikroorganismen, die charakterisiert ist durch die Anheftung an ein bestimmtes Substrat, eine Grenzfläche oder aneinander sowie die Einbettung in eine von den Mikroorganismen produzierten Matrix aus extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS). Die in einem Biofilm formierten Zellen zeigen einen veränderten Phänotyp bzgl. der Wachstumsrate und Gentranskription (Donlan & Costerton, 2002). Wissenschaftlichen Schätzungen zufolge sind bei ca. 60 % aller mikrobiellen Infektionen Biofilme involviert. Vorteile für die Mikroorganismen in der Ausbildung eines Biofilms umfassen u.a. den Schutz gegenüber spezifischer Wirtsabwehr und Antibiotika sowie eine erhöhte Verfügbarkeit von Nährstoffen aufgrund der Möglichkeit zur Besiedlung nährstoffreicher Habitate (Jefferson, 2004).

Die Bakterielle Vaginose (BV) ist die häufigste mikrobielle Störung (Dysbiose) des Vaginalmilieus der geschlechtsreifen Frau und u.a. charakterisiert durch eine Konzentrationsverschiebung der Normalflora zu einem breiten Spektrum von verschiedenen, anaeroben Keimen. Die eindeutige Krankheitsursache und –entstehung ist bis heute noch ungeklärt und aktueller Gegenstand intensiver medizinischer Forschung. Die Hypothese der polymikrobiellen Störung steht dabei der Annahme gegenüber, dass *Gardnerella vaginalis* der spezifische ätiologische Keim dieser Erkrankung ist. Neuste vaginalmikrobiologische Untersuchungen implizieren auch hier, dass Biofilme eine Rolle während dieser oft rezidivierenden Erkrankung spielen (Swidsinski *et al.*, 2005). Enterokokken werden als natürliche Flora der Vagina angesehen, dennoch bestehen Anhaltspunkte auf eine mögliche Beteiligung dieser Bakteriengattung an der Entstehung der Bakteriellen Vaginose (Kelly *et al.*, 2003). Der Untersuchung der Inzidenz von Virulenzfaktoren und Biofilm-Bildung bei

vaginalen Enterokokken-Stämmen wurde bislang wenig Bedeutung beigemessen, so dass kaum Daten vorliegen und mögliche Zusammenhänge nicht erfasst werden konnten.

Die Therapie einer BV wie auch von anderen Infektionen, bei denen Biofilme beteiligt sind, wird offenbar dadurch erschwert, dass in einem Biofilm organisierte Bakterien eine erhöhte Resistenz insbesondere gegenüber Antibiotika aufweisen (Swidsinski *et al.*, 2008). Daher wäre die Entwicklung neuer therapeutischer Wirkstoffe wichtig, die die Biofilm-Bildung der Infektionserreger hemmen und als Alternative oder Ergänzung zur Antibiotikagabe eingesetzt werden könnten. Hierzu sind Kenntnisse über die molekularen Mechanismen der Biofilm-Bildung dieser Erreger eine unabdingbare Voraussetzung, um neue Angriffspunkte spezieller Wirkstoffe abzuleiten.

Die Erforschung der Biofilm-Bildung und deren molekularer Mechanismen bei Enterokokken ist erst Ende der 90er Jahre in den Blickpunkt der Wissenschaft gerückt. Die Prävalenz variiert weltweit, allerdings scheinen bisherigen Untersuchungen zufolge insgesamt betrachtet *E. faecalis* Stämme eine höhere Fähigkeit zur Biofilm-Bildung aufzuweisen als *E. faecium* Isolate (Mohamed & Huang, 2007). Mit Hilfe von verschiedensten molekularbiologischen Methoden sind in jüngster Zeit mehrere genetische Determinanten entdeckt worden, die die Biofilm-Bildung bei Enterokokken beeinflussen, wodurch erkennbar wurde, dass es sich hierbei scheinbar um einen multifaktoriellen Prozess handelt. Zu den ersten beschriebenen Faktoren bei *E. faecalis* gehört das insbesondere von Toledo-Arana *et al.* (2001) und Tendolkar *et al.* (2004, 2006) untersuchte Enterococcal surface protein (Esp). Diese sowie mehrere andere Studien haben den Einfluss dieses Oberflächenproteins auf die Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* und kürzlich auch bei *E. faecium* gezeigt (Van Wamel *et al.*, 2007). Dennoch scheinen Esp-unabhängige Mechanismen der Biofilm-Bildung zu existieren (Kristich *et al.*, 2004; Mohamed *et al.*, 2004; Di Rosa *et al.*, 2006). Auch wurde gezeigt, dass das Quorum Sensing-kontrollierte, Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystem *fsr* (Mohamed *et al.*, 2004, 2006; Pillai *et al.*, 2004; Hancock & Perego, 2004) sowie die davon positiv regulierte Zinkmetalloprotease Gelatinase (Kristich *et al.*, 2004; Mohamed *et al.*, 2004; Hancock & Perego, 2004) die Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* beeinflussen. Die Beschreibung zusätzlicher Faktoren, z.B. von Pili (Nallapareddy *et al.*, 2006), den durch den *bee* Locus codierten, putativen Zellwandproteinen (Tendolkar *et al.*, 2006) oder bestimmten Transkriptionsregulatoren (Hufnagel *et al.*, 2004; Bourgogne *et al.*, 2007) verdeutlichen die Komplexität dieses Vorgangs, der bis heute noch nicht vollkommen aufgeklärt ist. Hierzu sind weiterführende Untersuchungen erforderlich, insbesondere zur Erforschung der Rolle der bereits bekannten genetischen und umweltbedingten Faktoren auf die Regulation der Biofilm-Bildung sowie zur Identifizierung neuer einflussnehmender Determinanten.

1.1 Charakteristika, medizinische Relevanz & Pathogenität von Enterokokken

Enterokokken sind Gram-positive, fakultativ anaerobe Bakterien, die als Kokken einzeln, in Paaren oder kurze Ketten auftreten und den Intestinaltrakt des Menschen und verschiedener Tiere besiedeln. Sie wurden früher zu den Streptokokken gezählt, nach heutiger Systematik werden sie nunmehr aufgrund biochemischer und vor allem basierend auf modernsten molekularbiologischen Methoden in der eigenen Gattung *Enterococcus* und der Familie Enterococcaceae innerhalb der Ordnung der Lactobacillales (Milchsäurebakterien) zusammengefasst. Allgemeine Eigenschaften zur Charakterisierung von Enterokokken sind das Wachstum bei 10°C und 45°C, das Wachstum bei einem pH-Wert von bis zu 9,6 und in Anwesenheit von 6,5 % NaCl, das Überleben einer thermischen Behandlung bei 60°C für 30 min sowie das Wachstum in Anwesenheit von 40 % Galle. Des Weiteren besitzen alle Spezies das spezifische Antigen der Lancefield-Gruppe D (Lipoteichonsäure) auf ihrer Oberfläche und sind, bis auf wenige Ausnahmen, in der Lage Pyrrolidonyl- β -naphthylamid zu hydrolysieren (Nachweis von PYRase). Sie besitzen keine Oxidase- oder Katalase-Aktivität aufgrund fehlender Cytochrome. Wenige Spezies, z.B. *E. gallinarum* und *E. casseliflavus*, sind motil, auch kommt Pigmentierung vor (*E. casseliflavus*, *E. mundtii* u.a.). Bedeutsames Merkmal dieser Gattung ist außerdem die Fähigkeit zur Hydrolyse von Äskulin (Facklam *et al.*, 2002).

Das Hauptreservoir von Enterokokken ist der Magen- und Darmtrakt höherer Wirbeltiere sowie des Menschen. Weiterhin sind sie physiologische Kommensalen des weiblichen Genitaltrakts. Enterokokken sind Bestandteil der Intestinalflora vieler Vogelarten, inklusive Nutzgeflügel, sowie von Reptilien und Insekten und können ebenso im Boden, auf Pflanzen und in Gewässern gefunden werden. Manche Spezies dieser Gattung sind hauptsächlich mit einem bestimmten Habitat assoziiert, während die Arten *E. faecalis* und *E. faecium* weit verbreitet sind (Aarestrup *et al.*, 2002).

Enterokokken sind natürlich resistent gegenüber allen Cephalosporinen, semisynthetischen β -Laktamen (Isoxazolylpenicilline), Monobactamen und Polymyxinen. Gegen Aminoglycoside besteht eine Resistenz auf niedrigem Niveau (low-level), begründet durch die verminderte Aufnahme der Antibiotika in die Zelle sowie bei einzelnen Spezies durch die Produktion einer Acetyltransferase vom AAC(6')-I Typ. *E. faecalis* ist außerdem unempfindlich gegenüber Lincosamiden und Streptograminen aufgrund des Besitzes eines natürlichen ABC-Transporters. Die Spezies *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* und *E. flavescens* sind intrinsisch resistent gegen Vancomycin (low-level: 2–32 $\mu\text{g/ml}$). Diese chromosomal codierte Resistenz wird als VanC-Phänotyp bezeichnet und wird vermittelt durch die Produktion einer Ligase, die die Bildung eines D-Alanyl-D-Serin-Dipeptids katalysiert. Während der Biosynthese des Peptidoglycans ergibt der Einbau dieses Zellwandbestandteils eine modifizierte

Aminosäuren-Seitenkette, was das Bindungsvermögen von Vancomycin an diesen Angriffspunkt reduziert (Cetinkaya *et al.*, 2000; Facklam *et al.*, 2002; Klare *et al.*, 2003).

Von den derzeit mehr als 30 beschriebenen Spezies haben lediglich *E. faecalis* und *E. faecium* größere medizinische Bedeutung erlangt. Mit einer Häufigkeit von ca. 12 % stellen sie die zweit- bis dritt wichtigste Bakteriengattung bei nosokomialen Infektionen dar (Facklam *et al.*, 2002; Klare *et al.*, 2003). *E. faecalis* ist für 80-90 % aller von Enterokokken verursachten Infektionen beim Menschen verantwortlich (Jones *et al.*, 2004), wobei die Anteile regional und zwischen einzelnen Krankenhäusern deutlich zugunsten von *E. faecium* verschoben sein können (Treitman *et al.*, 2005). Für gewöhnlich wird Enterokokken keine vergleichbar hohe Virulenz zugeschrieben wie anderen Gram-positiven Bakterien, z.B. *Staphylococcus (S.) aureus*, Pneumokokken oder Streptokokken der Gruppe A. In der Regel verursachen sie Infektionen bei entsprechender Prädisposition wie z.B. einer Immunschwäche des Patienten. Ausgewählte Stämme werden sogar bei der Herstellung von Lebensmitteln und als Probiotika therapeutisch eingesetzt. Einige Virulenzfaktoren sind jedoch auch bei Enterokokken beschrieben, obwohl deren Relevanz bzgl. der Pathogenese bestimmter Krankheiten häufig nicht klar ist (Koch *et al.*, 2004).

Typische von Enterokokken verursachte Infektionen sind komplizierte bzw. nosokomiale Harnwegsinfektionen (meist *E. faecalis*), Endokarditiden (meist *E. faecalis*) und Bakteriämien/Sepsen. Außerdem ist eine Beteiligung von *E. faecium* und *E. faecalis* an polymikrobiellen Wundinfektionen, Peritonitiden und Infektionen der oberen Atemwege möglich, wobei bislang unklar ist, welchen Anteil sie dabei als Infektionserreger oder vielmehr als begleitende Flora spielen (Malami *et al.*, 2002). Gründe für die zunehmende Bedeutung dieser opportunistisch pathogenen Bakterien als nosokomiale Infektionserreger sind höchstwahrscheinlich auf mehrere Faktoren und deren Interaktion zurückzuführen (Malami *et al.*, 2002; Mascini & Bonten, 2005). Ein wichtiger Risikofaktor ist der durch Cephalosporingabe ausgelöste Selektionsdruck aufgrund der intrinsischen Resistenz dieser Infektionserreger gegen Cephalosporine. Neben dem breiten Spektrum an natürlichen Antibiotikaresistenzen sind Enterokokken außerdem zum Erwerb weiterer Resistenzen in der Lage, beispielsweise gegen Tetracycline, Makrolide oder Aminoglycoside (high-level). Die zunehmend auftretenden erworbenen Resistenzen gegenüber Glycopeptiden und Ampicillin sind besonders problematisch, und auch gegen die zwei neuartigen, bakteriostatisch wirkenden Antibiotika Quinupristin-Dalfopristin und Linezolid wurden bereits Resistenzen beschrieben (Bonten *et al.*, 2001). Dadurch wird das therapeutische Spektrum insbesondere bei häufig multiresistenten *E. faecium* und Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) erheblich eingeschränkt (Werner *et al.*, 2007).

Der Vorgang, wie Enterokokken vom „harmlosen Kommensalen“ zum lebensbedrohenden Pathogen werden, ist bisher kaum verstanden. Es wird angenommen, dass sie durch die Entwicklung von Fähigkeiten zur Besiedlung neuer Nischen und/oder durch das Ausnutzen eines geschwächten Immunsystems zur Translokation vom Intestinaltrakt in den Blutstrom des Wirtsorganismus in der Lage sind. Weitere Infektionsquellen stellen intravenöse, Urin- oder Gallen-Katheter dar sowie der Urinaltrakt, operative Wunden oder die Mundhöhle. Außerdem können Enterokokken über Hände von Krankenhauspersonal, klinische Instrumente oder von Patient zu Patient übertragen werden (Gilmore *et al.*, 2002). Die genetische Plastizität, somit ihre schnelle Anpassungs- und Überlebensfähigkeit unter extremen Bedingungen sowie das Potenzial zur Weitergabe von Resistenz- und Virulenzdeterminanten an andere pathogene Mikroorganismen zeigt die Wichtigkeit der Forschung nach alternativen Vorsorge- und Behandlungsmöglichkeiten, z.B. die Entwicklung von Impfstoffen basierend auf bestimmten Oberflächenantigenen der Enterokokkenzelle wie Kapselpolysacchariden oder anderen Virulenzfaktoren (Koch *et al.*, 2004).

Die Pathogenese der von Enterokokken verursachten Infektionen ist bislang nur ansatzweise aufgeklärt, allerdings wird hierbei die Biofilm-Bildung bei Enterokokken, ebenso wie bei Staphylokokken (insbesondere *S. aureus* und *S. epidermidis*), *Pseudomonas aeruginosa* und anderen Gram-negativen Erregern, immer mehr als ein weiteres, wichtiges virulentes Merkmal angesehen. Mehrere Studien haben die Fähigkeit von *E. faecalis* und *E. faecium* zur Adhärenz an verschiedene Biomaterialien sowie zur Biofilm-Bildung *in vitro* gezeigt und in Korrelation mit der Pathogenese bestimmter Infektionen gebracht (Baldassarri *et al.*, 2005a). Neuste Ansätze der medizinischen Forschung basieren daher auf der Entwicklung von antimikrobiellen Wirkstoffen, die die Biofilm-Bildung bei bedeutsamen Infektionserregern hemmen. Als Alternative zur Antibiotikagabe könnten Medikamente in der Therapie zum Einsatz kommen, die beispielsweise in spezifische Abläufe des Quorum Sensings (QS) eingreifen und diesen Vorgang somit inhibieren. QS wird die für manche Erreger beschriebene Fähigkeit von Bakterien genannt, in Abhängigkeit ihrer Zelldichte die Genexpression zu regulieren. Biofilm-Bildung ist einer von vielen Phänotypen und Virulenzfaktoren, die über QS-Systeme kontrolliert werden (Kjelleberg & Molin, 2002). Derzeit sehr ausführlich untersuchte QS-Systeme und deren regulatorische Effekte auf die Biofilm-Bildung sind die von *S. aureus* und *S. epidermidis*. Diese zeigen allerdings, dass die Entwicklung neuer antimikrobieller Wirkstoffe, die auf die Interferenz mit QS-kontrollierten Systemen beruhen, bei jedem spezifischen Pathogen und der Art von Infektion aufgrund der Diversität und Komplexität dieser regulatorischen Systeme eingehender Untersuchungen bedarf (Otto, 2004). Insofern ist die Untersuchung molekularer Mechanismen der Biofilm-Bildung als Basis zur Entwicklung neuer Therapie-Möglichkeiten auch bei Enterokokken von großer Bedeutung.

1.2 Virulenzfaktoren bei *E. faecalis* und *E. faecium*

1.2.1 Enterococcal surface protein (Esp)

Shankar *et al.* (1999) identifizierten und beschrieben das Zellwand-assoziierte Protein Esp (Enterococcal surface protein) bei *E. faecalis*, dessen Vorkommen in klinischen Isolaten (29 % *esp*⁺ bei Blut-Isolaten und 42 % *esp*⁺ bei Endokarditis-Isolaten) signifikant erhöht war im Vergleich zu kommensalen Faeces-Isolaten (3 %). Waar *et al.* (2002a) konnten das *esp* Gen allerdings auch in höherer Anzahl (40 %) in *E. faecalis* aus Faeces gesunder Menschen nachweisen. Die strukturelle Analyse von Esp des Stammes *E. faecalis* MMH594 ergab, dass das Protein eine molekulare Masse von ca. 202 kDa aufweist und aus 1873 Aminosäuren besteht. Es enthält charakteristische Strukturen anderer Zellwand-lokalisierter Proteine Gram-positiver Bakterien wie eine Transportsignalsequenz am Anfang des N-Terminus und ein Zellwand-Ankermotiv am C-Terminus, was bei Esp in leicht abgewandelter Form zum konservierten LPxTG-Motiv vorliegt. Auffallend ist die aus mehreren, hochkonservierten Tandemsequenzwiederholungen (A- und C-Repeats) bestehende Kernregion des Proteins, die bei verschiedenen Stämmen als Folge homologer Rekombination in ihrer Anzahl variieren (siehe Abb. 1). Die Anzahl dieser Sequenzwiederholungen in einem Isolat, die bei den meisten untersuchten Stämmen bei ein bis drei A-Repeats und sieben C-Repeats lag, erwies sich außerdem als stabil. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass alle Stämme, die das *esp* Gen besitzen, das Protein an ihrer Zelloberfläche exprimieren (Shankar *et al.*, 1999).

Esp weist strukturelle Ähnlichkeit mit Bap (Biofilm associated protein) von *Staphylococcus aureus* auf (Toledo-Arana *et al.*, 2001), was erste Hinweise auf eine Beteiligung von Esp an der Biofilm-Bildung bei Enterokokken (Abb. 1) und damit einhergehend auf eine Rolle als Virulenzfaktor gab. In *E. faecium* konnte eine Variante des Esp_{fm} beschrieben werden, die

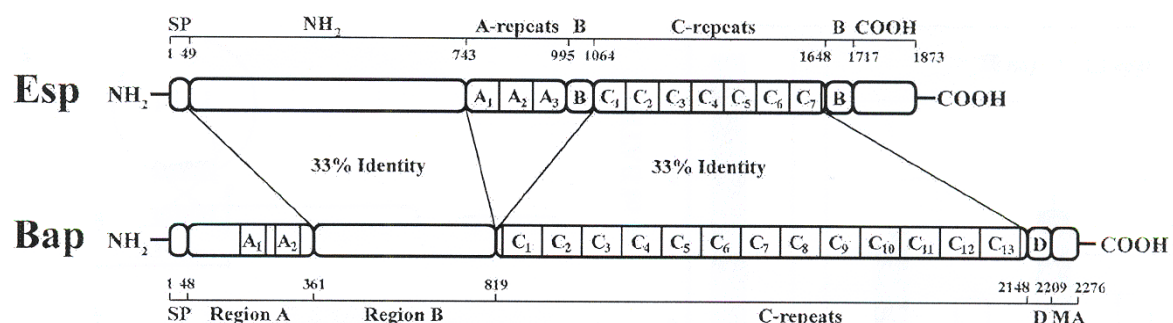


Abb. 1 Strukturelle Ähnlichkeit des Esp-Proteins von *E. faecalis* mit dem Bap-Protein von *S. aureus*

Dargestellt ist die Struktur des Esp-Proteins des Stammes *E. faecalis* MMH594 und die des Bap-Proteins des Stammes *S. aureus* V329 mit den entsprechenden prozentualen Angaben der Ähnlichkeiten der verschiedenen Regionen dieser Proteine (N-Terminus, C-Repeats). Zahlen geben die Aminosäuren bzw. deren Position an (Toledo-Arana *et al.*, 2001). SP, Signalpeptid; MA, Membrananker; D, Region D; B, B-Repeats

gehäuft in epidemischen vancomycin-resistenten Stämmen nachgewiesen werden konnte (Willems *et al.*, 2001; Eaton & Gasson, 2002). Andere Studien konnten eine Unabhängigkeit des Esp_{fm} von der Vancomycin-Resistenz zeigen, dennoch stehen diese beiden Faktoren unter Selektionsdruck vermutlich miteinander in Verbindung (Woodford *et al.*, 2001; Harrington *et al.*, 2004). Esp_{fm} weist 89 % Identität (Gen und Protein) mit Esp von *E. faecalis* auf, so dass eine ähnliche Funktion zu vermuten ist (Eaton & Gasson, 2002).

Das *esp* Gen ist chromosomal codiert und wurde innerhalb einer 150 kb großen Pathogenitätsinsel (PAI) des klinischen Isolats *E. faecalis* MMH594 in Nähe des Cytolysin-Operons gefunden, was auf eine synergistische Funktionsweise dieser beiden Virulenzfaktoren hindeutet. Neben diesen und verschiedenen anderen Genen mit vermutlicher Virulenzfunktion codiert die PAI mehrere Gene für Transposasen und Rekombinasen, mit Hilfe derer es höchstwahrscheinlich zu Umstrukturierungen innerhalb der PAI kommen kann. Dies erlaubt dem Bakterium eine hohe Anpassungsfähigkeit seiner Virulenz unter bestimmten Umweltbedingungen (Shankar *et al.*, 2002). In *E. faecium* ist *esp_{fm}* ebenfalls Bestandteil einer PAI, die jedoch stark von der in *E. faecalis* beschriebenen PAI abweicht (Leavis *et al.*, 2004). Die Fähigkeit zum Transfer des *esp* Gens konnte für *E. faecalis* und *E. faecium* in Konjugationsexperimenten gezeigt werden (Oancea *et al.*, 2004).

Im Maus-Modellversuch konnte nachgewiesen werden, dass Esp als Adhäsine die Bindung von *E. faecalis* an Blasen-Uroepithelzellen und somit die Kolonisation erleichtert, was zur Persistenz der Bakterien während einer Harnwegsinfektion beiträgt (Shankar *et al.*, 2001). Dies erklärt höchstwahrscheinlich auch hohe Inzidenzraten von Esp bei Harnwegsinfektionen (66,7 % bzw. 72,2 %; Creti *et al.*, 2004; Seno *et al.*, 2005). Eine erhöhte Fähigkeit zur Kolonisation an Intestinalzellen und Translokation in mesenteriale Lymphknoten bei Anwesenheit von Esp konnte hingegen nicht beobachtet werden (Pultz *et al.*, 2005).

1.2.2 Aggregationssubstanzen

Aggregationssubstanzen (AS) sind auf Pheromon-induzierbaren Plasmiden codierte, Oberflächen-lokalisierte Proteine, die eine Bindung von bakteriellen Donorzellen an Plasmid-freie Rezipientenzellen vermitteln und somit einen sehr effektiven konjugativen Plasmid-Transfer ermöglichen. Annähernd 20 Plasmide dieser Familie wurden bisher beschrieben, wobei pCF10, pAD1 und pPD1 die am besten charakterisierten Plasmide darstellen. Die Gene, die die entsprechenden AS (Asc10, Asa1, Asp1) codieren, zeigen über 90 % Homologie bzgl. ihrer Aminosäuresequenzen, wovon sich die AS Asa373 jedoch signifikant unterscheidet (Hirt *et al.*, 1996). Wie Zellwandproteine anderer Gram-positiver Bakterien besitzen auch AS eine Signalpeptid-Sequenz, eine Oberflächen-exponierte Region sowie die Zellwand durchdringende und in der Cytoplasmamembran verankerte Domänen. Des

Weiteren konnten bei diesen Proteinen zwei N-terminale Arg-Gly-Asp (RGD) Motive identifiziert werden, die eine Bindung zu Integrinen an der Oberfläche von Wirtszellen vermitteln (Clewell & Dunny, 2002).

Die Erhöhung der Virulenz von *E. faecalis* durch die Expression von AS erfolgt auf mehreren Stufen. Zum einen kann dieser plasmid-codierte Virulenzfaktor leicht innerhalb der Spezies auf andere Stämme übertragen werden. Des Weiteren sind AS Adhäsine, die die Adhärenz von *E. faecalis* an Epithelzellen und somit deren Kolonisation fördern (Kreft *et al.*, 1992). Außerdem begünstigen sie die Internalisierung (Vanek *et al.*, 1999) und das Überleben des Enterokokken-Stamms in intestinalen Makrophagen und PMNs nach Phagozytose (Rakita *et al.*, 1999), woraus eine Resistenz gegenüber der Immunabwehr des Wirts resultiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression von AS die Internalisierung durch intestinale Epithelzellen (Olmsted *et al.*, 1994) sowie die Adhärenz an extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, Thrombospondin, Vitronectin und Kollagen Typ I fördert (Rozdzinski *et al.*, 2001). Sexpheromon-Plasmide wurden ebenfalls in *E. faecium* beschrieben, wobei sie in dieser Spezies häufig assoziiert mit einer Vancomycin-Resistenz auftraten (Magi *et al.*, 2003).

1.2.3 Cytolysin

Das Toxin Cytolysin, welches von manchen *E. faecalis* Stämmen sekretiert wird, ist ein bakterielles Bacteriocin und gehört der Klasse der Lantibiotika an. Das aktive Cytolysin weist sowohl hämolytische wie auch bakterizide Aktivität auf und besteht aus zwei nicht-identischen strukturellen Untereinheiten (Cyl_L und Cyl_S), welche ribosomal als Vorläufer synthetisiert und posttranslational verändert werden. Genetisch codiert wird das Toxin durch ein komplexes Operon, das aus acht Genen (*cyIR2*, *cyIR1*, *cyiL_L*, *cyiL_S*, *cyiM*, *cyiB*, *cyiA* und *cyiI*) besteht, und sowohl chromosomal innerhalb einer PAI als auch auf großen Pheromonplasmiden (z.B. pAD1) lokalisiert sein kann. Nach der Modifizierung werden beide Untereinheiten mittels des ATP-bindenden CylB-Transporters durch die Cytoplasmamembran sekretiert und von der Serinprotease CylA jeweils mittels der Abspaltung von sechs Aminosäuren extrazellulär aktiviert. Das Operon scheint des Weiteren über einen neuartigen QS-Mechanismus mittels Autoinduktion reguliert zu werden, wobei ein bestimmter Schwellenwert der sekretierten und aktivierten Untereinheit Cyl_S (Autoinduktor) erreicht sein muss (Coburn & Gilmore *et al.*, 2003). Außerdem sind ebenfalls die beiden regulatorischen Einheiten CylR1 und CylR2 an der Aktivierung der Genexpression beteiligt (Coburn *et al.*, 2004).

Cytolysin weist eine breite toxische Aktivität gegenüber verschiedenen Zelltypen auf, darunter eine Vielzahl Gram-positiver Bakterien, humane und bovine Erythrozyten sowie humane intestinale Epithelzellen (Cox *et al.*, 2005). Dieser Faktor trägt durch eine direkte

Gewebeschädigung zur Pathogenität von *E. faecalis* bei. Des Weiteren profitiert der Cytolysin-produzierende Stamm durch die Lyse der Zellen von Nährstoffen, die für nicht-Cytolysin-produzierende Stämme unzugänglich sind. Fast alle Infektionsmodelle, von *Caenorhabditis elegans* bis hin zu Kaninchen, haben gezeigt, dass Cytolysin zur Virulenz von *E. faecalis* beiträgt, die genauen Mechanismen der Pathogenität sind allerdings bisher meist spekulativ. Aufgrund von Ergebnissen, die bei der gemeinsamen Expression von Cytolysin und Aggregationssubstanz eine achtfach erhöhte Letalität in einem Endokarditis-Modell im Vergleich zur Expression von nur einem Faktor demonstrierten (Chow *et al.*, 1993), wurde ein Synergismus dieser beiden Determinanten (wobei vermutlich ebenfalls Esp beteiligt ist) bzgl. der Virulenz von *E. faecalis* postuliert (Coburn & Gilmore *et al.*, 2003).

1.2.4 Gelatinase und *fsr* Locus

Bakterielle Proteasen können direkte sowie indirekte Schädigungen des Wirtsgewebes hervorrufen. Mögliche Auswirkungen dieser Enzyme können u.a. die indirekte Degradation von Bindegewebe des Wirts durch die Aktivierung von wirtseigenen Matrix-Metalloproteasen (Okamoto *et al.*, 1997), die direkte Degradation des Bindegewebes sowie von Gewebsproteinen oder die Deregulation bestimmter Komponenten des Wirtsabwehrsystems durch die Degradierung von Immunoglobulinen sein (Prokesova *et al.*, 1992). Die von Enterokokken sekretierte Gelatinase ist eine Zink-Metalloprotease, welche Gelatine, Kollagen, Casein, Lactoglobulin und andere biologisch aktive Proteine zu hydrolysieren vermag. Bei *E. faecalis* wird dieses Enzym durch das *gelE* Gen codiert, dessen Expression vom *fsr* Locus (*E. faecalis* Regulator) in Abhängigkeit von der Zelldichte positiv reguliert wird. In Abb. 2 wird ein schematisches Diagramm des vermeintlichen Mechanismus der *fsr* Aktivierung und dessen Effekt auf die Synthese der Gelatinase GelE und Serinprotease SprE dargestellt (Gilmore *et al.*, 2002). Der Autoinduktor GBAP (gelatinase biosynthesis-activating pheromone), ein C-terminales Peptid (ein zyklisches Lacton) des FsrB-Proteins, wird sekretiert und interagiert mit dem membrangebundenen Signaltransduktor FsrC. Wahrscheinlich gibt dieser das Signal über Phosphorylierung an den Regulator FsrA weiter, welcher die Transkription von *fsrB/fsrC* sowie *gelE/sprE* induziert (Qin *et al.*, 2000, 2001). Genetische Analysen von *fsrA*-, *fsrB*- und *fsrC*-Disruptionsmutanten ließen somit vermuten, dass es sich hier um ein QS-abhängiges Zwei-Komponenten-Regulatorsystem handelt (Nakayama *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2000, 2001). Mittlerweile wurde dieses Modellsystem zum Teil revidiert, da ein weiterer Locus *fsrD* innerhalb von *fsrB* identifiziert wurde, welcher für das GBAP-Propeptid codiert (Nakayama *et al.*, 2006).

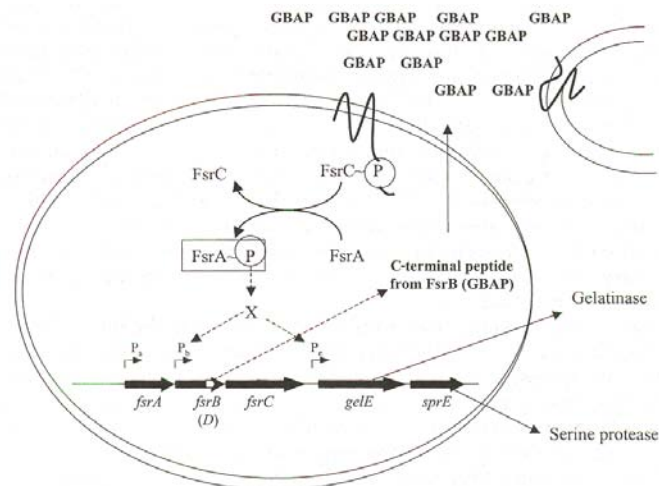


Abb. 2 Modell zum Mechanismus der *fsr* Aktivierung

Die *fsr* Produkte autoregulieren vermutlich ihre Gene über einen zelllichte-abhängigen Mechanismus und regulieren somit die Expression von Gelatinase und Serinprotease. In diesem Modell interagiert der sekretierte Autoinduktor GBAP (gelatinase biosynthesis-activating pheromone) mit dem membrangebundenen Signaltransduktorfaktor FsrC. Dieser gibt das Signal mittels Phosphorylierung an den Regulator FsrA weiter, welcher wiederum die Transkription von *fsrB/C* und *gelE/sprE* induziert. P_a , P_b , P_e , aktive Promotoren (Gilmore *et al.*, 2002).

Die Gelatinase, welche als reifes Enzym eine Masse von ca. 33 kDa aufweist, wird somit als Präproenzym synthetisiert und durch C-terminales Processing aktiviert (Del Papa *et al.*, 2007). Zeng *et al.* (2005) konnten zeigen, dass die Gelatinase-Produktion ein wichtiger Faktor für die erfolgreiche Translokation von *E. faecalis* durch Monolayer von humanen Kolon-Karzinomzellen (T84) *in vitro* darstellt.

Im Maus-Peritonitismodell zeigte sich eine signifikante Abschwächung der Virulenz bei allen drei Mutanten (*fsrA*, *fsrB*, *fsrC*), die weder Gelatinase- noch Serinprotease-Produktion aufwiesen, im Vergleich zum Wildtypstamm OG1RF. Allerdings konnten aufgrunddessen keine Aussagen über unabhängige Rollen der drei Loci gemacht werden (Qin *et al.*, 2000). Eine vorige Studie konnte feststellen, dass eine *gelE*-Disruptionsmutante von OG1RF eine signifikante Verzögerung des Todeszeitpunkts sowie leicht erhöhte LD₅₀-Werte im Maus-Peritonitismodellversuch bewirkte (Singh *et al.*, 1998), jedoch bestand Unsicherheit über einen unabhängigen Einfluss der Gelatinase auf die Virulenz aufgrund des gleichzeitigen Verlusts der Serinprotease-Produktion. Die Untersuchung einer *sprE*-Mutante zeigte dann allerdings eine unabhängige Rolle bei der Infektion in diesem Modell (Qin *et al.*, 2000). Folgestudien stellten eine verminderte Virulenz bei *fsrA*-, *fsrB*-, *fsrC*-, *gelE*- und *sprE*-Mutanten von OG1RF sowohl im Maus-Peritonitismodell als auch im Nematodenmodell (*Caenorhabditis elegans*) fest (Sifri *et al.*, 2002) sowie für eine *fsrB*-Mutante ebenfalls im Kaninchen-Endophthalmitismodellversuch (Mylonakis *et al.*, 2002; Engelbert *et al.*, 2004), was die Rolle dieses QS-Systems und der beiden Proteasen für die Virulenz von *E. faecalis* verdeutlichte. Ergebnisse von Engelbert *et al.* (2004) liessen allerdings vermuten, dass

möglicherweise zusätzliche pleiotrophe Effekte auf die Expression anderer Virulenzeigenschaften die Pathogenität von *E. faecalis* im Endophthalmitismodell beeinflussen. Schließlich konnten auch Bourgoigne *et al.* (2006) mittels Microarray-Technologie zeigen, dass das FsrABC-System eine große Anzahl weiterer Gene sowohl positiv wie auch negativ zu regulieren vermag.

1.2.5 Adhesin of collagen from *E. faecalis* (Ace)

Eine bakterielle Infektion wird initiiert durch die Bindung der Bakterienzelle an die Wirtszelle und/oder an extrazelluläre Matrixsubstanzen (ECM). Diese Fähigkeit zur Bindung an verschiedene ECM-Bestandteile, z.B. an Kollagene oder Glykoproteine wie Laminine, Fibronectin und Vitronectin, wurde in verschiedenen Studien für *E. faecalis* und *E. faecium* beschrieben (Zareba *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1998; Styriak *et al.*, 1999). Zum Teil waren die Ergebnisse jedoch wenig konform, was wahrscheinlich auf unterschiedliche Versuchsdurchführungen *in vitro* (Teststämme, Wachstumsbedingungen, Wahl der Methode etc.) zurückzuführen war (Gilmore *et al.*, 2002). Einige Untersuchungen bezeichnen *E. faecalis* und *E. faecium* als wenig oder nicht adhärent bzgl. Fibronectin (Zareba *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1998). Auch für Vitronectin (7,4 % für *E. faecalis* und 8 % für *E. faecium*), Laktoferrin (11,3 % und 12,2 %) und Thrombosporin (12,5 % und 9,8 %) ergaben sich relativ geringe Werte (Zareba *et al.*, 1997). Unter Stressbedingungen (z.B. nach Wachstum bei 46°C) konnte eine Studie hingegen eine bis zu 40fache Erhöhung der Bindungsfähigkeit mehrerer getesteter *E. faecalis* Stämme an Kollagen Typ I und Typ IV sowie Laminin nachweisen (Xiao *et al.*, 1998).

Von sieben identifizierten putativen Adhäsinen im Genom von *E. faecalis* V583 (Paulsen *et al.*, 2003), die die strukturelle Organisation von MSCRAMM (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) aufweisen (Sillanpää *et al.*, 2004), wurde u.a. das Ace (Adhesin of collagen from E. faecalis) bisher am eindringlichsten untersucht. Dieses 74 kDa große Protein zeigt signifikante strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Kollagen-Bindeprotein Cna von *S. aureus* und ist in *E. faecalis* weit verbreitet (Nallapareddy *et al.*, 2000a), während das *cna* Gen in nur ca. 38 – 56 % der *S. aureus* nachgewiesen werden konnte (Gilmore *et al.*, 2002). Das Ace-Protein besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz (31 Aminosäuren), einer nicht-repetitiven A-Domäne, einer B-Domäne, die aus 2,4 – 5,4 Tandemrepeats aufgebaut ist, gefolgt von einer Zellwanddomäne, die die Konsensussequenz LPxTG enthält, einer hydrophoben Transmembranregion sowie dem cytoplasmatischen C-Terminus. Aufgrund der variablen B-Domäne tritt das Ace in vier unterschiedlichen Formen auf, wobei die Funktion der B-Domäne noch ungeklärt ist (Nallapareddy *et al.*, 2000a). In Proteinextrakten verschiedener *E. faecalis* Stämme konnte mittels Westernblot-Analysen Ace in den bei 46°C kultivierten Zellen nachgewiesen werden,

während das Protein in den meisten bei 37°C angezogenen Kulturen nicht detektiert werden konnte. Außerdem ergab die Korrelation der *in vitro* Produktion des Ace mit der Fähigkeit zur Bindung an Kollagen Typ I und IV sowie Laminin (Nallapareddy *et al.*, 2000b) und Dentin (Kowalski *et al.*, 2006), dass das Protein die Adhäsion der Bakterienzellen an diese ECM-Proteine vermittelt. Quantitative RT-PCR-Analysen zeigten des Weiteren, dass die Transkription von *ace* durch die Anwesenheit von Kollagen Typ I und Typ IV sowie Serum im Medium scheinbar erhöht wird und somit eine Liganden-abhängige Signalinduktion vorliegt (Nallapareddy & Murray, 2006). Ein Einfluss des *ace* von *E. faecalis* auf die primäre Anheftung an Polystyrol (PS) sowie die Biofilm-Bildung konnte nicht detektiert werden (Mohamed *et al.*, 2004).

In *E. faecium* wurde ein homologes Protein Acm identifiziert, das eine wichtige Rolle bei der Adhäsion des Bakteriums an Kollagen Typ I spielt (Nallapareddy *et al.*, 2003) und vornehmlich in klinischen Isolaten, insbesondere in zu dem Krankenhaus-assoziierten klonalen Komplex 17 (CC-17) gehörenden Stämmen, nachgewiesen wurde (Nallapareddy *et al.*, 2008a). Im Ratten- bzw. Maus-Modellversuch konnte Acm in Verbindung mit der Pathogenese von Endokarditis, jedoch nicht mit Peritonitis, gebracht werden (Nallapareddy *et al.*, 2008b).

1.2.6 Weitere Virulenzfaktoren

Enterokokken besitzen offensichtlich weitere, z.T. wenig untersuchte Virulenzfaktoren, deren exakte Rolle während einer Infektion noch überwiegend ungeklärt ist. Die Hyaluronidase ist ein degradierendes Enzym, dessen Substrat der Bindegewebsbestandteil Hyaluronsäure (ein Mucopolysaccharid) darstellt. Durch Depolymerisation des Mucopolysaccharids kommt es zu Gewebeschädigungen, was die Invasion des Bakteriums begünstigt. Eine weitere Rolle des Enzyms stellt die Versorgung mit Nährstoffen (Disaccharide) für das Bakterium dar, welche durch die Spaltung der Hyaluronsäure entstehen. Zusätzlich zur Zerstörung, die vom Enzym selbst ausgeht, könnte die Aktivität der Hyaluronidase gewebschädigende Effekte anderer bakterieller Toxine begünstigen. Hyaluronidase wird als potentieller Virulenzfaktor in verschiedenen Gram-positiven Bakterien angesehen, u.a. *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus pyogenes* (Hynes & Walton, 2000). In *E. faecium* wurde das *hyl* Gen überwiegend in klinischen Isolaten (Rice *et al.*, 2003) und insbesondere in solchen *E. faecium* Stämmen nachgewiesen, die dem epidemisch-virulenten klonalen Komplex 17 (CC-17) angehören (Klare *et al.*, 2005). In *E. faecalis* sind zwei putative Hyaluronidase-Gene, *hylA* (ef3023) und *hylB* (ef0818) bekannt, die potentielle Virulenzfaktoren darstellen (Nallapareddy *et al.*, 2005; Tsigrelis *et al.*, 2007).

Die Superoxid-Produktion von neutrophilen Granulozyten und anderen phagozytischen Zellen des menschlichen Abwehrsystems ist essentiell für die Bekämpfung von

Mikroorganismen. Superoxid-Anionen (O_2^-) können aber auch als Nebenprodukte des Metabolismus bei Enterokokken entstehen, wobei es unter bestimmten Bedingungen über verschiedene radikalische Reaktionen zur Bildung des zell- und gewebeschädigenden Wasserstoffperoxids (H_2O_2) kommen kann. Der Metabolismus der Superoxid-Produktion ist von Huycke *et al.* (2001) beschrieben worden. Zuvor wiesen Huycke *et al.* (1996) eine signifikant erhöhte extrazelluläre Superoxid-Produktion im Vergleich zu Stämmen aus Faeces gesunder Versuchspersonen bei *E. faecalis* Isolaten nach, die mit Endokarditis oder Bakteriämie assoziiert waren. Die Erkenntnis eines eindeutigen Zusammenhangs der Superoxid-Produktion mit der Enterokokken-Virulenz erfordert jedoch bislang weitere Studien.

Enterokokken sind außerdem in der Lage Bacteriocine zu produzieren. Diese antimikrobiellen und ribosomal synthetisierten Peptide der Enterokokken werden als Enterocine bezeichnet und weisen für gewöhnlich eine inhibierende Aktivität gegenüber nah verwandten Spezies auf. Einige von *E. faecium*, *E. faecalis* und *E. mundtii* produzierte Enterocine, wie Enterocin A oder Mundtacin, sind bereits sehr gut charakterisiert, andere zeichnen sich allerdings durch eine ungewöhnliche strukturelle oder genetische Eigenschaft aus, so dass Franz *et al.* (2007) ein vereinfachtes Klassifizierungsschema ausgearbeitet haben. Dieses gruppiert die Enterocine wie folgt: Klasse I Enterocine (Lantibiotika), Klasse II Enterocine (kleine, nicht-lantibiotische Peptide), Klasse III Enterocine (zyklische Enterocine) und Klasse IV Enterocine (große Proteine). Enterocin-Produktion ist eine weit verbreitete Fähigkeit der Enterokokken. Häufig ist ein Stamm in der Lage, mehrere Enterocine gleichzeitig zu bilden (De Vuyst *et al.*, 2003). Als Teil einer natürlichen Flora oder während einer Infektion kann die Bildung von Bacteriocinen den Enterokokken einen kompetitiven Vorteil gegenüber anderen Bakterienspezies oder -gattungen am jeweiligen Standort verschaffen und so zur eigenen Kolonisierung und Etablierung beitragen. Manche Bacteriocine, die von Milchsäurebakterien produziert werden, weisen sogar ein breites Aktivitätsspektrum gegenüber verschiedenen Gram-positiven pathogenen Bakterien auf, z.B. *Listeria* spp. oder *Staphylococcus* spp. (Franz *et al.*, 2007).

Lowe *et al.* (1995) beschreiben ein immunodominantes Antigen (EfaA, *E. faecalis* Antigen A), das aus Seren von Patienten mit einer von *E. faecalis* verursachten Endokarditis isoliert wurde. Auch in einem Maus-Peritonitismodell konnte bei Tieren, die mit einer *efaA*-Disruptionsmutante des Stamms OG1RF infiziert wurden, eine moderate, aber signifikant reduzierte Sterblichkeitsrate im Vergleich zum Wildtypstamm festgestellt werden (Singh *et al.*, 1998). Die präzise Rolle von EfaA in der Pathogenese enterokokkaler Infektionen ist bisher jedoch unklar.

Ein weit verbreitetes Gencluster bei *E. faecalis*, das an der Biosynthese eines Polysaccharid-Antigens beteiligt ist, wurde von Xu *et al.* (1998) beschrieben. Dieses *epa* (enterococcal

polysaccharide antigen) Gencluster besteht aus 17 benachbarten Genen (*orfde1* bis *orfde16* sowie *orfde5_6*). Die Charakterisierung dieses Clusters (Xu *et al.*, 2000) erbrachte eine Identifizierung mehrerer potentieller Ribosomen-Bindestellen, und mittels weiterer genetischer Analysen sowie insbesondere anhand von Transposon-Mutagenesen konnten zwei Transkripte (*orfde4 – orfde5* und *orfde6 – orfde10*) verifiziert werden. Die *orfde4*- und *orfde6*-Mutanten des Stamms OG1RF zeigten sowohl eine Abschwächung der Virulenz in Maus-Peritonitismodellen als auch eine erhöhte Anfälligkeit zur Phagozytose, was auf eine Rolle als Virulenzfaktor bei Enterokokken hinweist, allerdings ebenfalls weiterer Studien zur genauen Spezifizierung bedarf.

Zusammenfassend kann dargestellt werden, dass die Virulenz von Enterokokken insbesondere basiert auf die Fähigkeit der Bakterien

- zur Adhäsion und Kolonisation mittels Aggregationssubstanzen oder anderen Oberflächenproteinen,
- zur Resistenz gegenüber der wirtseigenen Abwehr mit Hilfe von Aggregationssubstanzen,
- zur Inhibierung anderer Bakterien mittels der Produktion von Cytolysin und / oder anderer Bacteriocine sowie
- zur Gewebeschädigung durch Bildung von extrazellulären Superoxiden, Gelatinase, Hyaluronidase und Cytolysin.

1.3 Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* und *E. faecium*

1.3.1 Allgemeine Charakteristika von Biofilmen und Biofilm-Bildung

Biofilme spielen in vielen natürlichen, insbesondere aquatischen Ökosystemen eine bedeutende Rolle. Erste Entdeckungen und Beschreibungen von Biofilm-Bildung auf Zähnen („Plaque“) gehen bis ins 17. Jahrhundert zurück. Mittlerweile haben mikroskopische und quantitative Techniken gezeigt, dass nahezu alle Bakterien die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung auf einer Vielzahl verschiedenster Oberflächen besitzen. Einer der ersten Bereiche, in denen Biofilm-Bildung als Problem erkannt wurde, sind industrielle (Ab)wassersysteme, wo bakterielle Biofilme kostenintensive Beschädigungen an verschiedenen Rohrleitungen durch Ansiedlung an deren Wände verursachen. Nachfolgend zeigte sich, dass auch solche Bakterien, die chronische Infektionen in Verbindung mit diversen medizinischen Gerätschaften oder Hilfsmitteln (z.B. Katheter) hervorrufen, in Biofilmen auf diesen Materialien zu wachsen vermögen (Donlan & Costerton, 2002; Raad *et al.*, 2005).

Ein Biofilm ist definiert als eine sessile mikrobielle Lebensgemeinschaft, deren Zellen an ein Substrat, eine Grenzfläche oder aneinander angeheftet sind, in ein Gerüst von

extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind und einen modifizierten Phänotyp bzgl. Wachstumsrate und Gentranskription im Vergleich zu planktonisch wachsenden Zellen aufweisen. Zu einem Biofilm formierte Zellen weisen eine höhere Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen wie Antibiotika (Foley & Gilbert, 1997), Desinfektionsmitteln und Germiziden auf. Dies liegt entweder an der verminderten Penetration der antimikrobiellen Substanz durch die Biofilm-Matrix, der veränderten Wachstumsrate der MO im Biofilm oder an anderen physiologischen Modifizierungen als Folge der Repression oder Induktion spezifischer Gene, z.B. nach Synthese von Sigma-Faktoren (Donlan & Costerton, 2002; Jefferson, 2004). Außerdem sind Bakterien in einem Biofilm resistent gegen Phagozytose, was die Möglichkeit zur Bekämpfung der Bakterien durch die wirtseigene Abwehr stark erschwert (Lewis, 2001). Speziell für *E. faecalis* konnte des Weiteren gezeigt werden, dass Biofilm-produzierende Stämme eine längere Zeit (> 24 h) in Makrophagen überleben können als solche Stämme, die keine extrazellulären Polysaccharid-ähnlichen Substanzen bilden (Baldassarri *et al.*, 2001).

Die Bildung eines Biofilms ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess (Dunne, 2002). Er beginnt mit der Adhäsion planktonischer Zellen an eine biotische (Zelle, Gewebe etc.) oder abiotische Oberfläche. Diese erste Phase wird primäre Anheftung genannt, an der u.a. bestimmte Mediatoren wie Zelloberflächenmoleküle beteiligt sind. Der zweite Abschnitt der Biofilm-Entwicklung ist gekennzeichnet durch die Formation von sog. Mikrokolonien, die durch die Interaktion der MO mit der Oberfläche und zwischen einzelnen Zellen zustande kommen. Dieser Vorgang kann ebenfalls von spezifischen Oberflächenkomponenten beeinflusst werden, z.B. Adhäsinen wie dem PIA (Polysaccharide intercellular adhesin) von *S. epidermidis* (Mack *et al.*, 1996). In der dritten Phase findet die „Reifung“ des Biofilms statt, die charakterisiert ist durch die Umstellung des Metabolismus (Beloïn & Ghigo, 2005) und somit zur Produktion verschiedener extrazellulärer Substanzen (Polysaccharide, Proteine u.a.) zur Entstehung einer Umgebungsmatrix, in der die Zellen eingebettet sind. Der entstandene Biofilm mit umgebenden Matrixstrukturen ist ein hoch viskoelastisches Gebilde, das schließlich in einer „gummiartigen“ Weise auf äußere Belastungen reagiert (Donlan & Costerton, 2002). Im letzten Stadium der Biofilm-Bildung kommt es ggf. zu einer Ablösung einzelner planktonischer Zellen oder Fragmente des Biofilms, so dass die Besiedlung anderer Oberflächen möglich ist (Costerton *et al.*, 1999). Biofilme, die in einer Umwelt mit geringen Scherkräften gebildet wurden, weisen eine geringe Spannungsstärke auf und brechen daher leicht, wohingegen solche, die in einer Umgebung mit starken Scherkräften entstanden sind, extrem widerstandsfähig gegenüber mechanischer Zerstörung sind (Donlan & Costerton, 2002).

Betrachtungen lebender Biofilme *in situ*, was insbesondere durch die Technik der Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) möglich wurde, zeigten zunächst, dass ein Biofilm kein

starres Gebilde, sondern ein vielschichtiges, in Zeit und Raum heterogenes Konstrukt ist, und dass die Mikrokolonie die strukturelle Basiseinheit darstellt (Lawrence *et al.*, 1991). Lebende, vollhydrierte Biofilme bestehen aus ca. 15 % Zellen und ca. 85 % Matrix-Material. Die Zellen sind in matrix-eingebetteten „Türmen“ oder „pilzartigen Strukturen“ angeordnet, und offene Wasserkanäle durchziehen die Zwischenräume dieser Mikrokolonien (Abb. 3). Das durchfließende Wasser verursacht somit eine konvektive Strömung (Donlan & Costerton, 2002). Diese dynamische Basisstruktur eines Biofilms ist universell, allerdings existieren geringe Variationen in Abhängigkeit verschiedener Faktoren wie Umwelteinflüsse etc. (Branda *et al.*, 2005).



Abb. 3 Dynamische Struktur eines Biofilms (schematisch)

Die in der Biofilm-Matrix eingebetteten Zellen bilden Mikrokolonien, die als „Türme“ oder „pilzartige Strukturen“ angeordnet sind. Deren Zwischenräume werden von offenen Wasserkanälen durchzogen. Das durchfließende Wasser (hier mittels blauer Pfeile dargestellt) verursacht eine konvektive Strömung und beeinflusst somit die dynamische Struktur des Biofilms (Donlan & Costerton, 2002).

Eine Untersuchung der Ultrastruktur von *E. faecalis* Biofilmen zeigte, dass die Biofilmbildung dieser Spezies auf verschiedenen Substraten stark variiert (Erlandsen *et al.*, 2004). Mittels Rasterelektronen-Mikroskopie (REM) konnten die Autoren offensichtliche qualitative Unterschiede erkennen zwischen unter statischen Bedingungen gebildeten Biofilmen, die auf Polystyrol-Oberflächen gewachsen waren, und solchen, die auf für Nieren-Dialyse verwendeten Zellulose-Kathetern entstanden sind. Auf dem PS-Substrat wiesen die im Biofilm formierten Zellen des Stamms *E. faecalis* OG1RF größere interzelluläre Zwischenräume auf, während die Bakterien auf den Zellulose-Kathetern sehr dicht gepackt waren. Des Weiteren lagen in nicht-kolonisierten Zwischenräumen die Zellen auf dem PS-Untergrund als kleinere Aggregate verteilt vor, während auf dem Zellulose-Material größere, mehrschichtige Zellcluster zu sehen waren. Herausragend war auch die Entdeckung von Exopolysaccharid-ähnlichen Substanzen, die als interzelluläre Verbindungen sowie zwischen den Zellen und dem Substrat zu erkennen waren. Diese Substanzen konnten zum einen auf

der gesamten Zelloberfläche mit Ausnahme des Septums beobachtet werden, zum anderen zeigten sie sich in größerem Maße bei dem auf den Zellulose-Kathetern gewachsenen Biofilm. Letzteres lässt vermuten, dass diese Oberfläche die Produktion der extrazellulären Substanz stimuliert hat, und dieser Vorgang von den Umgebungsfaktoren wie der Beschaffenheit des Substrats beeinflusst wird (Erlandsen *et al.*, 2004).

1.3.2 Weltweites Vorkommen und klinische Bedeutung der Biofilm-Bildung bei Enterokokken

In den letzten Jahren konnten vermehrt Fälle von Enterokokken-Infektionen registriert werden, bei denen offensichtlich die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung eine bedeutsame Rolle bei der Pathogenese gespielt (Peculiene *et al.*, 2000; Raad *et al.*, 2005; Seno *et al.*, 2005; Mohamed *et al.*, 2004; Baldassarri *et al.*, 2006) und somit das Interesse insbesondere in der medizinischen Forschung forciert hat. Mehrere klinische Studien berichten allerdings von verhältnismäßig unterschiedlichen Ergebnissen bzgl. der Prävalenz der Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* und *E. faecium* in verschiedenen Ländern und Kontinenten der Welt (Tab. 1).

Tab. 1 Ergebnisse verschiedener Studien zum Vorkommen der Biofilm-Bildung bei Enterokokken in unterschiedlichen Ländern und Kontinenten der Welt

E. fc, *E. faecalis*; *E. fm*, *E. faecium*; --, keine Isolate von *E. faecium* untersucht

Land	Anzahl untersuchter Isolate insgesamt	Prävalenz <i>E. fc</i>	Prävalenz <i>E. fm</i>	Herkunft der Isolate	Referenz
Spanien	152 <i>E. fc</i>	57,2%	--	Hospitalisierte Patienten	Toledo-Arana <i>et al.</i> , 2001
Italien	73 <i>E. fc</i> 24 <i>E. fm</i>	79,5%	48,0%	Infektionen, Gesunde, Umweltproben	Baldassarri <i>et al.</i> , 2001
Italien	52 <i>E. fc</i>	96,2%	--	Orthopädische Infektionen	Baldassarri <i>et al.</i> , 2006
Italien	83 <i>E. fc</i> 45 <i>E. fm</i>	95,2%	28,8%	Infektionen, Intestinalflora, Umweltproben	Di Rosa <i>et al.</i> , 2006
Italien	15 <i>E. fc</i> 32 <i>E. fm</i>	86,7%	15,6%	Diverse klinische Proben	Dupre <i>et al.</i> , 2003
UK	70 <i>E. fc</i> 38 <i>E. fm</i>	100%	42,1%	Blutkulturen	Sandoe <i>et al.</i> , 2003
USA	163 <i>E. fc</i>	92,6%	--	Endokarditis und andere klinische Proben	Mohamed <i>et al.</i> , 2004; 2005
Japan	352 <i>E. fc</i>	100%	--	Urintrakt-Infektionen	Seno <i>et al.</i> , 2005
Polen	108 <i>E. fc</i> 35 <i>E. fm</i>	59,2%	8,6%	Diverse klinische Proben	Dworniczek <i>et al.</i> , 2005
Indien	171 <i>E. fc</i> 25 <i>E. fm</i>	26,0%	0,0%	Diverse klinische Proben	Prakash, 2005

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zum einen eine höhere Anzahl der *E. faecalis* Stämme im Vergleich zu *E. faecium* fähig sind Biofilme zu bilden, zum anderen scheint diese Fähigkeit unter den Isolaten weltweit zu variieren.

Mehrere Studien haben die Fähigkeit von *E. faecalis* und *E. faecium* zur Adhärenz an verschiedene Biomaterialien wie Katheter (Joyanes *et al.*, 1999; 2000) sowie zur Biofilm-Bildung (Baldassarri *et al.*, 2001) *in vitro* gezeigt. Weiterhin wurde das Vermögen von Enterokokken zur Bindung an medizinische Utensilien wie Gallen-Stents (Dowidar *et al.*, 1991), Harnröhren-Stents (Keane *et al.*, 1994), intravaskuläre Katheter (Sandoe *et al.*, 2003) und gastrostomische Silikongeräte (Dautle *et al.*, 2003) sowie an intraokulares Linsenmaterial (Kobayakawa *et al.*, 2005) beobachtet und mit der Fähigkeit zur Biofilm-Bildung in Korrelation gebracht. Die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung auf abiotischen Oberflächen scheint sogar unter nicht-optimalen physiologischen Bedingungen zwar mit reduzierter Effizienz, aber dennoch vorhanden zu sein (Lleo *et al.*, 2007). Auch sind einige Stämme in der Lage, an verschiedene eukaryotische Zelllinien *in vitro* zu adhären (Archimbaud *et al.*, 2002; Dupre *et al.*, 2003). Dies lässt vermuten, dass mittels dieser Adhäsionsfähigkeit solche Stämme auch *in vivo* im Wirtsorganismus persistieren und eine Infektion hervorrufen können. Wenn sich die Erreger zudem in einem Biofilm formieren, kann dies zu einer begrenzten Therapierbarkeit der bakteriellen Infektion mit Antibiotika führen.

Verschiedene epidemiologische Studien lassen auf einen Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und Pathogenese bei von Enterokokken verursachten Infektionen schließen. Ergebnisse von Mohamed *et al.* (2004) belegten, dass alle untersuchten 79 *E. faecalis* Isolate, die eine Endokarditis verursacht haben, Biofilm-Bildner waren. Außerdem fanden die Autoren in dieser Gruppe häufiger starke Biofilm-Bildner (39 %) im Vergleich zu Isolaten aus anderem klinischen Material (6 %), woraus sich ein Beitrag der Biofilm-Bildung zur Pathogenese der Endokarditis vermuten ließe. Baldassarri *et al.* (2006) konnten zeigen, dass *E. faecalis* Stämme, die von mit orthopädischen Geräten (70 % von Implantaten) assoziierten Infektionen isoliert wurden, eine erhöhte Fähigkeit zur Biofilm-Bildung hatten. Dies impliziert einen Zusammenhang zwischen der Biofilm-Bildung und Enterokokken-Infektionen, die mit Biomaterialien assoziiert sind. Dies unterstützen auch Resultate von Sandoe *et al.* (2003) und Raad *et al.* (2005), welche eine Korrelation zwischen von Enterokokken verursachten Bakteriämien, bei denen intravaskuläre Katheter zum Einsatz kamen (CRBSI), und erhöhter Fähigkeit dieser Blutkultur-Isolate zur Biofilm-Bildung zeigten. Auch scheinen Harnwegsinfektionen (UTI) vorwiegend von Biofilm-bildenden Enterokokken-Isolaten verursacht zu werden, da alle 352 von Seno *et al.* (2005) untersuchten *E. faecalis* Stämme aus UTI Biofilme bilden konnten.

1.3.3 Biofilm-Bildung beeinflussende Faktoren

Bei *E. faecalis* wird die Produktion von Biofilm durch den Zusatz von 1 % Glukose in Trypton-Soja-Bouillon (TSB) im Vergleich zum Wachstum in TSB ohne Glukose stark erhöht (Baldassarri *et al.*, 2001). Pillai *et al.* (2004) konnten eine Glukose-abhängige Erhöhung der Biofilm-Bildung beim Stamm *E. faecalis* OG1RF feststellen, welche im Gegensatz dazu bei einer *fsrA*-Insertionsmutante sowie einer *gelE*-Insertionsmutante bei einem Wachstum in Gegenwart von 1 % Glukose nicht auftrat. Dies ließ vermuten, dass zum einen der *fsr* Locus unter der Kontrolle eines Glukose-abhängigen Transkriptionsregulators steht, zum anderen kontrolliert *fsr* die Biofilm-Bildung durch die Produktion einer oder durch beide assoziierte Proteasen. Im Gegensatz dazu scheinen geringe Konzentrationen von Glukose (0,2 %) die Menge an Biofilm bei *E. faecalis* zu verringern (Kristich *et al.*, 2004). Welchen Einfluss der Transkriptionsregulator *bopD* (siehe 1.3.4.5) hierbei hat, ist weitgehend unbekannt. Auch konnte bei Studien zum Einfluss von Esp auf die Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* gezeigt werden, dass bei Anwesenheit von 0,5 % oder mehr Glukose im Medium die Biofilm-Bildung bei *esp*-positiven Stämmen erhöht ist (Tendolkar *et al.*, 2004; 2006).

Die Untersuchung der Biofilm-Bildungsfähigkeit von verschiedenen *esp*-negativen Stämmen demonstrierte außerdem den Einfluss unterschiedlicher Medien. Während die Biofilm-Bildung des Stamms OG1RF in TSB, M17 und M9YE nach ca. 6-8 h eine Plateau-Phase erreichte, wurde die Biofilm-Produktion dagegen in THYE und BHI nach ca. 4 h eingestellt und die Menge des Biofilms nahm sogar ab (Kristich *et al.*, 2004).

Einen weiteren Faktor stellt die Salzkonzentration im Medium dar. In derselben Studie wurde eine signifikante Reduktion der Biofilm-Bildung von OG1RF in Gegenwart von 2-3 % NaCl bei unbeeinflusstem Wachstum festgestellt (Kristich *et al.*, 2004). Auch die Eliminierung von Eisen im Medium ist entscheidend (Baldassarri *et al.*, 2001). Der Zusatz von Serum im Medium kann ebenfalls die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung beeinflussen (Mohamed *et al.*, 2006; siehe auch 1.3.4.5).

Somit scheinen bestimmte Umweltbedingungen die Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* zu regulieren, was auch Untersuchungen anderer Bakterien gezeigt haben (Branda *et al.*, 2005; Donlan & Costerton, 2002). Insbesondere bestimmte Nährmedien-Komponenten wie Glukose oder Serum, die Verfügbarkeit von Eisen oder CO₂ sowie andere Faktoren (Temperatur, Osmolarität, pH-Wert) können die Biofilm-Bildung beeinflussen.

Den initialen Schritt im mehrstufigen Prozess der Biofilm-Bildung stellt die Adhäsion an abiotische oder biotische Oberflächen dar. Diese Interaktion kann in sehr spezifischen Bindungsstellen (z.B. aufgrund von bestimmten Proteinen der Zelloberfläche) begründet sein oder auch nicht-spezifischer Natur sein, welche von der gesamten Zelloberfläche ausgehen. Beide werden von grundlegenden physiko-chemischen Kräften wie Lifshitz-Van der Waals-Kräften, elektrostatischen Kräften und Lewis-Säure-Base-Interaktionen vermittelt (Van

Loosdrecht *et al.*, 1987). Da unter physiologischen Bedingungen fast alle biologischen Oberflächen eine negative Netto-Ladung aufweisen, sind elektrostatische Interaktionen bei der bakteriellen Adhäsion meist abstoßend, so dass die o.g. Kräfte zunächst überwunden werden müssen. In heterogenen Kulturen von *E. faecalis* konnte mittels Messung von Zeta-Potentialen eine veränderte Ladung der Zelloberflächen (van Merode *et al.*, 2006b) festgestellt werden, welche in einer erhöhten Anheftung der Zellen an Polystyrol und folglich einer gesteigerten Biofilm-Bildungsfähigkeit im Vergleich zu homogenen Kulturen resultierte (van Merode *et al.*, 2006a). Heterogene Kulturen sind Reinkulturen eines Stammes, die sich durch Subpopulationen auszeichnen, welche Zellen mit Unterschieden in bestimmten Merkmalen enthalten (z.B. bzgl. der Zellgröße). Die Heterogenität einer Kultur ist eine stabile Eigenschaft, die unabhängig vom verwendeten Medium, der Kohlenstoffquelle, der Wachstumsphase oder der Anwesenheit von Esp oder Aggregationssubstanz sowie Plasmiden ist. Kultur-Heterogenität scheint eine verbreitete Eigenschaft bei *E. faecalis* Stämmen zu sein, da 13 von 29 untersuchten Isolaten (45 %) aus Faeces von gesunden Menschen sowie von Patienten mit verschiedenen Infektionen Heterogenität in ihren Zeta-Potentialen zeigten (van Merode *et al.*, 2006b). Somit stellt dieses Merkmal einen weiteren Aspekt bei Überlegungen zu Einflussfaktoren der Biofilm-Bildung bei Enterokokken dar.

1.3.4 Molekulare Mechanismen der Biofilm-Bildung bei Enterokokken

Aufgrund einer größeren Anzahl verfügbarer molekularbiologischer und proteinbiochemischer Methoden sowie deren erhöhter Sensitivität konnten insbesondere in den letzten vier bis fünf Jahren bei *E. faecalis* mehrere genetische Determinanten, die bei der Biofilm-Bildung von Enterokokken eine Rolle spielen, identifiziert und charakterisiert werden (Tab. 2). Dies hat v.a. verdeutlicht, dass es sich hierbei um einen komplexen Vorgang handelt, der von einer Reihe von Faktoren beeinflusst wird. Nichtsdestotrotz ist der Prozess der Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* und *E. faecium* keineswegs im Gesamten verstanden und weitere Forschungsarbeiten sind erforderlich, die die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Faktoren *in vitro* und *in vivo* untersuchen. Auch lassen bestimmte Resultate vermuten, dass es sich um unterschiedliche molekulare Mechanismen bei der Ausprägung eines schwachen im Vergleich zur Bildung eines starken Biofilms handelt (Hufnagel *et al.*, 2004). Im Folgenden werden derzeit bekannte Einflussfaktoren und entsprechende Zusammenhänge zur Biofilm-Bildung beschrieben, wobei auf die für diese Arbeit besonders relevanten Faktoren detaillierter eingegangen wird.

Tab. 2 Derzeit bekannte genetische Determinanten, die an der Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* beteiligt zu sein scheinen

Aufgeführt sind Gene bzw. Genloci und von ihnen codierte Proteine mit entsprechenden Referenzangaben (modifiziert nach Mohamed & Huang, 2007)

Gen / Genlocus	Protein / Funktion	Referenz
<i>esp_{fc}</i> <i>esp_{fm}</i>	Enterococcal surface protein: Oberflächenprotein	Toledo-Arana <i>et al.</i> (2001) Tendolkar <i>et al.</i> (2004, 2006) Heikens <i>et al.</i> (2007)
<i>fsrA</i> , <i>fsrB</i> , <i>fsrC</i>	<i>E. faecalis</i> regulator: Zwei-Komponenten Quorum Sensing Signaltransduktionssystem, das die Expression von Gelatinase und Serinprotease reguliert	Mohamed <i>et al.</i> (2004) Mohamed & Murray (2006) Pillai <i>et al.</i> (2004) Hancock & Perego (2004)
<i>gelE</i>	Sekretorische Zinkmetalloprotease Gelatinase E	Mohamed <i>et al.</i> (2004) Kristich <i>et al.</i> (2004) Hancock & Perego (2004)
<i>atn</i>	Autolysin	Mohamed <i>et al.</i> (2004)
<i>epa</i> (<i>orfde4</i>)	Enterococcal polysaccharide antigen: putative Glycosyltransferase, die in die Polysaccharid-Synthese involviert ist	Mohamed <i>et al.</i> (2004)
<i>etaR</i>	enterococcal two-component system regulator	Mohamed <i>et al.</i> (2004)
<i>bopD</i>	Biofilm on plastic surface: putativer Zuckerbindender Transkriptionsregulator	Hufnagel <i>et al.</i> (2004)
<i>bee1</i> , <i>bee2</i> , <i>bee3</i>	Biofilm enhancer in <i>Enterococcus</i> : putative Zellwandproteine	Tendolkar <i>et al.</i> (2006)
<i>dltA</i>	D-Alanine Lipoteichoic Acid: D-Alanin-D-Alanyl-Transportprotein-Ligase	Fabretti <i>et al.</i> (2006)
<i>salA</i> , <i>salB</i>	Secretory antigen-like A; Secretory antigen-like B: Zellhülle	Mohamed <i>et al.</i> (2006)
<i>ebpA</i> , <i>ebpB</i> , <i>ebpC</i>	Endocarditis and biofilm-associated pili	Nallapareddy <i>et al.</i> (2006)
<i>srtC</i>	Sortase C: Enzym, das Oberflächenproteine in der Zellwand verankert	Nallapareddy <i>et al.</i> (2006)
<i>ebpR</i>	Transkriptionsregulator von <i>ebpABC</i>	Bourgogne <i>et al.</i> (2007)

1.3.4.1 Enterococcal surface protein (Esp)

Esp (Shankar *et al.*, 1999) ist einer der ersten Virulenzfaktoren gewesen, die in Verbindung mit der Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* gebracht werden konnten. Toledo-Arana *et al.* (2001) entdeckten zunächst einen Zusammenhang der beiden Eigenschaften, da 93,5 % aller *esp*-positiven Isolate zur Biofilm-Bildung befähigt waren, wohingegen keiner der *esp*-negativen Stämme Biofilm produzierte. Die insertionelle Inaktivierung des *esp* Gens bei zwei Mutanten bewirkte eine verminderte Biofilm-Bildung, allerdings nicht bei einer weiteren *esp*-Mutante, deren Wildtypstamm die Fähigkeit zur sehr starken Biofilm-Bildung hatte. Daraus ließ sich schließen, dass Esp die primäre Anheftung und die Biofilm-Bildung auf abiotischen Oberflächen erhöht, aber insbesondere bei einem Phänotyp mit sehr starker Biofilm-Bildungsfähigkeit weitere Faktoren bei der Abwesenheit von Esp beteiligt sein müssen.

Weitere genetische Analysen konnten einen Einfluss von Esp auf die Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* bestätigen. Die Transformation und erfolgreiche Expression von Esp bei zwei

genetisch gut charakterisierten, *esp*-negativen Stämmen (FA2-2 und OG1RF) resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Biofilm-Bildung im Vergleich zu den Wildtypstämmen (Tendolkar *et al.*, 2004). Außerdem konnte mittels Generierung von Deletionsmutanten gezeigt werden, dass allein die N-terminale Domäne des Proteins für eine Erhöhung der Biofilm-Bildung ausreicht. Zudem hatte die Expression von Esp in heterologen Wirten (*E. faecium* und *Lactococcus lactis*) keinen Anstieg der Biofilm-Bildung in diesen Stämmen zur Folge, was auf eine notwendige Interaktion von Esp mit anderen *E. faecalis*-spezifischen Faktoren zur Erhöhung der Biofilm-Bildung schließen ließ (Tendolkar *et al.*, 2005).

Das zum beschriebenen Protein in *E. faecalis* homologe Esp_{fm} in *E. faecium* (Willems *et al.*, 2001; Eaton & Gasson, 2002) konnte in folgenden Studien ebenfalls mit der Fähigkeit zur Biofilm-Bildung in Verbindung gebracht werden. Die Höhe der Expression von Esp_{fm} auf der Zelloberfläche verschiedener klinischer *E. faecium* Isolate korrelierte stark mit der Fähigkeit der Stämme zur primären Anheftung und zur Biofilm-Bildung (Van Wamel *et al.*, 2007). Außerdem hing die Höhe der Esp_{fm} -Expression stark von den Wachstumsbedingungen ab. Bei fünf von sechs *esp_{fm}*-positiven Stämmen konnte eine signifikante Erhöhung bei einer Kultivierung bei 37°C im Vergleich zu 21°C nachgewiesen werden. Drei von sechs Stämmen zeigten außerdem eine signifikante Erhöhung der Esp_{fm} -Expression nach Anzucht unter anaeroben Bedingungen. Die Autoren hielten diesen variierenden Expressionsgrad für eine mögliche Erklärung der z.T. gegensätzlichen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zur Rolle des Esp_{fm} bei der Biofilm-Bildung (Van Wamel *et al.*, 2007). Durch die Erzeugung einer *esp_{fm}*-Mutante eines klinischen *E. faecium* Isolats, die Esp_{fm} nicht mehr exprimierte und eine signifikant verminderte Fähigkeit zur primären Anheftung und zur Biofilm-Bildung hatte, konnte bestätigt werden, dass Esp_{fm} auch bei *E. faecium* eine essentielle Rolle bzgl. der Biofilm-Bildung spielt (Heikens *et al.*, 2007).

Im Gegensatz dazu existieren mehrere Studien, die eine Fähigkeit zur Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* unabhängig von der Anwesenheit von Esp belegen. Kristich *et al.* (2004) untersuchten u.a. den gut charakterisierten Biofilm-bildenden Stamm OG1RF, der *esp*-negativ ist. Die Autoren stellten die Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* als einen komplexen Vorgang dar, der von verschiedenen Umweltbedingungen abhängig und hierzu die Expression von Esp nicht erforderlich sei. Durch die Untersuchung eines Kollektivs bestehend aus 163 *E. faecalis* Isolaten konnten Mohamed *et al.* (2004) ebenfalls zeigen, dass die Anwesenheit von *esp* zwar nicht notwendig zur Ausprägung eines Biofilms ist, allerdings wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen *esp* und einer erhöhten Biofilm-Bildung bei *esp*-positiven Stämmen gefunden. Auch andere Berichte konnten aus ihren Ergebnissen keine Assoziation von *esp* mit der Fähigkeit zur Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* und *E. faecium* ableiten (Sandoe *et al.*, 2003; Dupre *et al.*, 2003; Ramadhan & Hegedus, 2005; Dworniczek *et al.*, 2005; Raad *et al.*, 2005; van Merode *et al.*, 2006b; Di Rosa *et al.*,

2006). Eine jüngste Studie belegte die Involvierung von *esp* am Vorgang der Biofilm-Bildung, erkannte dem Faktor aber eine volle Kontrolle während dieses Prozesses ab (Arciola *et al.*, 2008). Dementsprechend ist der genaue Mechanismus, wie *esp* die Biofilm-Bildung bei Enterokokken beeinflusst, immer noch nicht geklärt.

1.3.4.2 *fsr* Locus und Gelatinase

Der Einfluss des regulatorischen Locus *fsr* auf die Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* wurde erstmals von Mohamed *et al.* (2004) beschrieben. In dieser Studie zeigte sowohl die *fsrA*- als auch die *fsrB*- und *fsrC*-Mutante des Wildtypstamms OG1RF eine verminderte Fähigkeit zur Biofilm-Produktion von ca. 28 – 32 %. Pillai *et al.* (2004) konnten diese Ergebnisse durch weitere Untersuchungen dieser Mutanten bestätigen. Zeitnah war es einer anderen Arbeitsgruppe möglich zu zeigen, dass die Biofilm-Produktion von *fsrA*-, *fsrB*-, *fsrC*- und *gelE*-Insertionsmutanten signifikant erniedrigt war, und dass dieses QS-System die Biofilm-Bildung über die Expression der assoziierten Gelatinase kontrolliert (Hancock & Perego, 2004). Allerdings scheint der *fsr* Locus auch unabhängig von der Produktion der Gelatinase die Biofilm-Bildung zu beeinflussen, da eine Gelatinase/Serin-Protease-Doppelmutante eine etwas höhere Biofilm-Bildung zeigte als die drei *fsr*-Mutanten (Mohamed *et al.*, 2004). Eine Folgestudie belegte den Einfluss, da das Einbringen des *fsr* Locus in einen starken Biofilm-Bildner (*fsr*, *gelE*⁺, *esp*⁺, GelE⁺) eine Reduktion der Biofilm-Bildung um 41 % im Vergleich zum Wildtyp bewirkte, und ein ähnlicher Effekt auch für einen mittelmäßig starken Biofilmbildenden Stamm erzielt werden konnte (Mohamed & Murray, 2006).

Mohamed *et al.* (2004) untersuchten ebenfalls *gelE*- und *sprE*-Mutanten des Stamms OG1RF. Eine Insertionsmutante (GelE⁻, SprE⁻) und eine Deletionsmutante (GelE⁻, SprE⁺) zeigten eine Abnahme der Biofilm-Bildung um 46 % bzw. 37 % im Vergleich zum Wildtyp, wohingegen eine *sprE*-Mutante (GelE⁺, SprE⁻) eine zu OG1RF vergleichbare Menge an Biofilm bildete. Die Autoren schlussfolgerten, dass vornehmlich die Gelatinase und nicht die Serin-Protease wichtig für die Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* zu sein scheint (Mohamed *et al.*, 2004). Eine andere Untersuchung unterstützte diese Ergebnisse durch Experimente, in denen ein Biofilm-fördernder Effekt (4,5fach erhöht) bei einem schwachen Biofilm-Bildner (*E. faecalis* JH2; *esp*⁻, GelE⁻) während der Anzucht in einem Medium, dem 20 % des Kulturüberstandes des Gelatinase-Produzenten OG1RF zugesetzt wurde, resultierte (Kristich *et al.*, 2004). Überstände einer *sprE*-Mutante (GelE⁺, SprE⁻) erzielten einen ähnlichen Effekt, währenddessen die einer *gelE*-Mutante (GelE⁻, SprE⁺) keine Biofilm-fördernde Wirkung zeigten. Eine folgende Klonierung von *gelE* in *E. faecalis* JH2 brachte einen moderaten Anstieg der Biofilm-Bildung, was ebenfalls auf eine Erhöhung der Biofilm-Bildung durch die Gelatinase schließen ließ (Kristich *et al.*, 2004). Auch der Zusatz aufgereinigter, aktiver Gelatinase zum Kulturmedium des *E. faecalis* Stamms FA2-2 (GelE⁻, SprE⁻) bewirkte eine Zunahme der Biofilm-Bildungsfähigkeit (Hancock & Perego, 2004).

Der genaue Mechanismus, wie die Gelatinase zu einer Erhöhung der Biofilm-Bildung beiträgt, ist nicht bekannt. Ein Modell zur Funktion von Gelatinase wäre, dass das Enzym an der Produktion eines extrazellulären Signalpeptids beteiligt ist, welches durch eine proteolytische Spaltung seines sekretierten Vorläufer-Peptids in seine aktive Form prozessiert wird und dann als Signal für einen biofilm-fördernden Faktor agiert (Kristich *et al.*, 2004). Andererseits könnten durch die proteolytische Aktivität des Enzyms andere Oberflächenproteine aktiviert werden, die in bestimmter Weise in die Regulation oder den Vorgang der Biofilm-Bildung involviert sind, z.B. an der Sekretion extrazellulärer Substanzen beteiligte Proteine. Für diese Hypothese der proteolytischen Prozessierung inaktiver Exoprotein-Vorläufer würde die bereits bekannte Gelatinase-Funktion der Aktivierung einer Zellwand-Hydrolase (Autolysin) während der Zellseparation von *E. faecalis* (Waters *et al.*, 2003) sprechen (Kristich *et al.*, 2004; Hancock & Perego, 2004).

Im Gegensatz zu den Erkenntnissen aus den genetischen Experimenten konnte allerdings ein Zusammenhang zwischen der Gelatinase-Produktion und der Biofilm-Bildung in mehreren epidemiologischen Studien nicht bestätigt werden (Mohamed & Murray, 2005; Seno *et al.*, 2005; Baldassarri *et al.*, 2006; Di Rosa *et al.*, 2006). Aufgrund der Beobachtung, dass in einer Gruppe von *esp*-negativen *E. faecalis* Isolaten die Biofilm-Bildung bei der Subgruppe der GelE-positiven Stämme leicht erhöht war (Mohamed & Murray, 2005), schlussfolgerten die Autoren, dass die Gelatinase jedoch bei Abwesenheit von *esp* zur Biofilm-Bildung beitragen könnte. Somit ist bisher unklar, ob bzw. wie die Gelatinase-Expression Einfluss auf die Biofilm-Bildung bei Enterokokken nimmt.

1.3.4.3 Biofilm enhancer in *Enterococcus* (*bee* Locus)

Mittels Tn917-basierter Transposonmutagenese konnten Tendolkar *et al.* (2006) einen weiteren Genlocus in *E. faecalis* identifizieren, der die Fähigkeit zur Bildung eines starken Biofilms vermittelt. Dieser ist höchstwahrscheinlich auf einem ca. 80 kb großen, konjugativen Plasmid lokalisiert und kann mit hoher Frequenz (4×10^{-2} /Rezipient) transferiert werden, was durch die Entdeckung von putativen Transposase- und Resolvasegenen downstream dieses Locus zu vermuten war. Die Charakterisierung eines erzeugten Mutantenstammes (P101D12) mit einer um > 70 % verminderten Fähigkeit zur Biofilm-Bildung im Vergleich zum Wildtyp E99 zeigte die Insertion des Tn917 in ein Operon, das aus drei putativen Strukturgenen sowie zwei putativen Sortase-Genen besteht (Abb. 4). Dieses wurde von den Autoren *bee* Locus (Biofilm enhancer in Enterococcus) genannt (Sequenz-Datenbank Akzessionsnummer DQ137124).

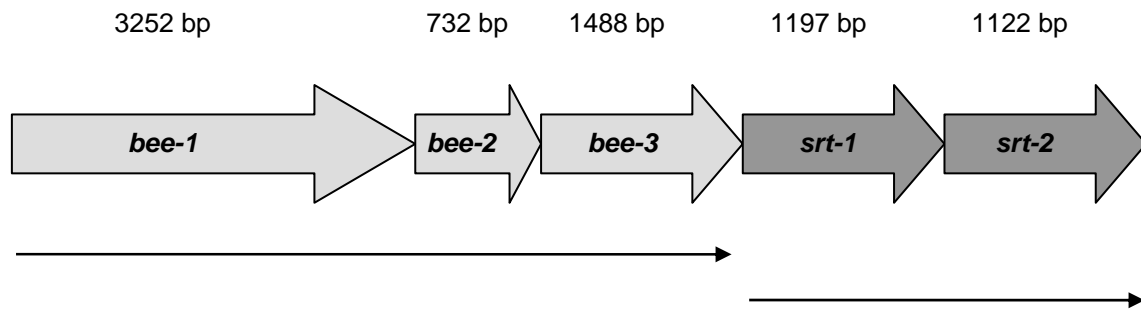


Abb. 4 Struktureller Aufbau des *bee* Operons von *E. faecalis* (schematisch)

Der *bee* Locus besteht aus drei Genen, *bee-1*, *bee-2* und *bee-3*, die putative Zellwandproteine codieren. Downstream dieser Gene codieren zwei *orf* (*srt-1* und *srt-2*) für putative Sortasen. Oberhalb sind die Längen in bp der entsprechenden Gene angegeben, die Linien-Pfeile unterhalb stellen die putativen Transkriptionseinheiten dar (Tendolkar *et al.*, 2006).

Weitere Analysen der Mutante P101D12 ergaben die Insertion des Tn917 innerhalb des zweiten Strukturgens *bee-2*. RT-PCR Analysen zeigten, dass *bee-1*, *bee-2* und *bee-3* sowie *srt-1* und *srt-2* kotranskribiert werden, hingegen *bee-3* und *srt-1* nicht transkriptionell verlinkt sind. Komplementierungsexperimente mit einem Plasmid, das die konstitutive Expression von *bee-2* und *bee-3* in dieser Mutante bewirkt, demonstrierten die Bedeutung beider Proteine für die Biofilm-Bildung. Die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung konnte hierdurch in der komplementierten Mutante wiederhergestellt werden, allerdings nicht in dem Maße, wie es bei dem Wildtyp E99 zu beobachten war. Eine Zerstörung der optimalen stöchiometrischen Interaktion der drei Proteine mit Folge einer inkorrekten Konformation durch die Überexpression ist denkbar, der exakte Mechanismus zum Beitrag an der Biofilm-Bildung bleibt allerdings zu bestimmen.

Die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen von Bee-1, Bee-2 und Bee-3 lassen konservierte LPxTG-Motive gefolgt von einer hydrophoben Domäne erkennen, welche für gewöhnlich am C-Terminus von Zellwandproteinen in Gram-positiven Bakterien lokalisiert sind. Auch die Sequenzhomologien der zwei putativen Sortase-Gene mit anderen Sortase-ähnlichen Enzymen Gram-positiver Bakterien lassen darauf schließen, dass es sich um einen für Zellwand-Proteine codierenden Locus handelt, und dass diese Proteine über einen für sie spezifischen Sortase-abhängigen Mechanismus in der Zellwand verankert werden. Sortasen sind membrangebundene Transamidasen, die die Peptidbindung der Oberflächenproteine zwischen dem Threonin und dem Glycin des LPxTG-Motivs enzymatisch spalten und die Bildung einer Amino-Bindung (-NH-) zwischen der Carboxyl-Gruppe des Threonin und der Amino-Gruppe der Peptidbindung der Zellwandquervernetzung katalysiert (Marraffini *et al.*, 2006). Außerdem haben Vergleiche mit *Streptococcus agalactiae* und *Corynebacterium diphtheriae* mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie ergeben, dass die Proteine, die die Substrate dieser Sortasen darstellen, Pili-ähnliche Strukturen an der Zelloberfläche dieser Mikroorganismen bilden (Lauer *et al.*, 2005; Ton-That & Schneewind, 2003). Somit müssen

weitere Untersuchungen zeigen, ob der *bee* Locus ein ähnliches Gencluster darstellt, das an der Expression von Pilus-Strukturen beteiligt ist.

Tendolkar *et al.* (2006) konnten dieses Gencluster allerdings nur bei 5 % (zwei von 40) der untersuchten, geographisch unabhängigen klinischen *E. faecalis* Stämme nachweisen. Auch das Genom des *E. faecalis* V583 enthält diesen Locus nicht.

1.3.4.4 Endokarditis und Biofilm-assoziierte Pili (*ebp* Locus)

Durch die Charakterisierung eines Operons, dessen Gene ursprünglich unter der Bezeichnung *ef1091* bis *ef1094* geführt wurden, konnten Nallapareddy *et al.* (2006) ein weiteres Gencluster im Stamm *E. faecalis* OG1RF identifizieren, das die Biofilm-Bildung bei dieser Spezies entscheidend beeinflusst. Mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von immunogold-markierten Zellen konnte demonstriert werden, dass die drei von diesem Locus codierten Proteine Bestandteile von Pili bei *E. faecalis* sind. Im Tierexperiment mit Ratten (endovaskuläres Infektionsmodell) zeigte sich außerdem ein Zusammenhang zur Entstehung von Endokarditis, so dass die Autoren das Operon *ebp* (Endocarditis and biofilm-associated pili) benannten. In Folgestudien konnte demonstriert werden, dass dieser Locus eine Bedeutung während der Pathogenese bei von *E. faecalis* verursachten, ascendierenden Harnwegsinfektionen hat. In einem Maus-Modellversuch zur Untersuchung der Rolle bei Peritonitis wurde jedoch kein Einfluss dieses Locus festgestellt (Singh *et al.*, 2007).

Nallapareddy *et al.* (2006) konnten bei allen der 408 untersuchten Isolate mittels Kolonie-Hybridisierungen die Anwesenheit des *ebp* Locus nachweisen, so dass dieser höchstwahrscheinlich einen Teil des Kerngenoms von *E. faecalis* darstellt. Vergleiche mit bisher verfügbaren Sequenzen des Genoms von *E. faecium* lassen zudem einen ähnlichen Locus mit gleicher Organisation der Gene auch in dieser Spezies vermuten. Eine weitere Studie konnte mit Hilfe von Hybridisierungsexperimenten unter insgesamt 55 *E. faecalis* und 36 *E. faecium* Isolaten klinischer und nicht-klinischer Herkunft (Gemüse, Obst, Gewässer, Boden) *ebp* Gene bei 94,6 % der *E. faecalis* Stämme und bei insgesamt 66,7 % der *E. faecium* Stämme nachweisen. Außerdem zeigten Sequenzanalysen Unterschiede in den *ebp* Genen von Stämmen unterschiedlicher Herkunft, so dass diese Variationen Anpassungen an spezifische Umgebungen sein könnten und somit möglicherweise die Fähigkeit zur Adhäsion beeinflussen (Cobo Molinos *et al.*, 2008).

Genetische Analysen von Deletions- bzw. Disruptionsmutanten von OG1RF, welche eine signifikant erniedrigte Fähigkeit zur Biofilm-Bildung und zur primären Anheftung aufwiesen, ergab die Identifizierung eines Operons bestehend aus vier Genen (Abb. 5). Weitere molekularbiologische Untersuchungen demonstrierten, dass die vier Gene *ebpA*, *ebpB*, *ebpC* und *srtC* (jetzt umbenannt in Biofilm and pilus-associated sortase (*bps*); Kemp *et al.*, 2007) als polycistronisches Operon kotranskribiert werden. Zudem konnte zusätzlich ein

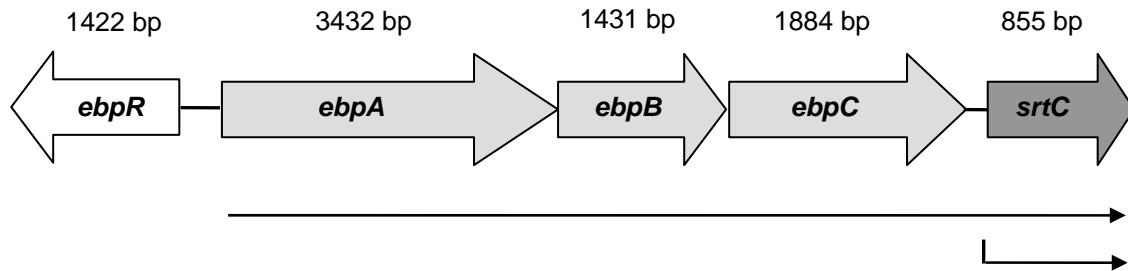


Abb. 5 Struktureller Aufbau des *ebp* Operons von *E. faecalis* (schematisch)

Der *ebp* Locus besteht aus drei Genen, *ebpA*, *ebpB* und *ebpC*, die Proteine pleomorpher Pili bei *E. faecalis* codieren. Downstream dieser Gene codiert ein *orf* (*srtC*) für eine Sortase, die für das Cross-Linking der drei Pili-Proteinuntereinheiten wichtig ist. Oberhalb sind die Längen in bp der entsprechenden Gene angegeben, die Linien-Pfeile unterhalb stellen die putativen Transkriptionseinheiten dar (Nallapareddy *et al.*, 2006). Upstream von *ebpA* codiert ein *orf* für einen transkriptionalen Regulator (EbpR) von *ebpABC* (Bourgoigne *et al.*, 2007).

unabhängiges Transkript von *srtC* in den *ebpA*- und *ebpB*-Disruptionsmutanten detektiert werden. Dieser unvollständige polare Effekt könnte durch identifizierte, mögliche Promoter-Sequenzen upstream von Startcodons der *ebpA* und *srtC* Gene erklärt werden.

Proteinbiochemische Untersuchungen zeigten des Weiteren, dass die drei Ebp-Proteine einen SrtC-abhängigen, heteromeren hochmolekularen Komplex (HMW) mit einer Masse von größer als 200 kDa bilden. Die Analysen ließen vermuten, dass die assoziierte Sortase C einen kovalent verbundenen HMW-Komplex aus den Monomeren von EbpA, EbpB und EbpC generiert, was bereits von Untersuchungen bei anderen gram-positiven Bakterien bzgl. der Formation von Pili-Strukturen bekannt ist (Mandlik *et al.*, 2008). Zudem konnten konservierte Pili-Motive (Pilin-Motiv und E-box sowie LPxTG-Motiv) in den Proteinsequenzen von EbpA, EbpB und EbpC identifiziert werden, was zusammen mit TEM-Aufnahmen bestätigte, dass dieser Locus für Pili-Strukturen bildende Proteine codiert. Gleichzeitig zeigten die mikroskopischen Aufnahmen der peritrichen Pili, dass EbpA-Komponenten vorwiegend an der Pilus-Basis zu sehen waren, während die Markierung mit EbpB- und EbpC-Antikörpern über den gesamten Pilus-Schaft stattfand. Aufgrunddessen sowie der hohen Sequenzähnlichkeit von EbpC mit anderen Hauptkomponenten („major subunits“) der Pili Gram-positiver Bakterien ist es sehr wahrscheinlich, dass EbpC den Hauptbestandteil des Schafts dieser *E. faecalis* Pili bildet. Zusammenfassend lassen diese Beobachtungen vermuten, dass diese Pili durch den SortaseC-abhängigen Vorgang eines geordneten Cross-Linkings der drei Ebp-Monomere entstehen, was sehr starke Ähnlichkeit zu kürzlich beschriebenen Mechanismen des Zusammenbaus von Pili-Strukturen bei anderen Gram-positiven Bakterien aufweist, z.B. *Corynebacterium diphtheriae* (Ton-That *et al.*, 2004; Mandlik *et al.*, 2008).

Interessanterweise konnten die Autoren diese anti-Ebp-angefärbten Pili nur in weniger als 20 % der in TSBG kultivierten Zellen und in weniger als 2 % der in BHI gewachsenen Zellen von OG1RF detektieren. Da gleichzeitig kein Unterschied in der Höhe der Transkription des

ebp Locus festzustellen war, lag die Vermutung nahe, dass die Produktion von Pili auf posttranskriptionaler Ebene oder durch andere, bisher unbekannte Faktoren kontrolliert wird. Dies konnte durch die Identifizierung des transkriptionalen Regulators *ebpR* (ursprünglich *ef1090*; Bourgoigne *et al.*, 2007) bestätigt werden. *ebpR*-Deletionsmutanten von OG1RF zeigten eine verminderte Expression von *ebpABC* mit Folge des Verlusts der Pilus-Produktion sowie reduzierter Fähigkeit zur primären Anheftung und Biofilm-Bildung. Molekulare Regulationsanalysen ergaben zum einen, dass die Expression von *ebpR* Sigma A-unabhängig ist und *ebpR* autoaktiviert wird, zum anderen konnten aber trotz des Vorhandenseins eines funktionsfähigen *ebpR* bei der überwiegenden Anzahl der Zellen keine Pili an deren Oberfläche nachgewiesen werden. Somit wird vermutet, dass *ebpR* und/oder *ebpABC* durch andere regulatorische Wege beeinflusst werden und/oder diese selbst andere Faktoren beeinflussen.

1.3.4.5 Weitere an der Biofilm-Bildung beteiligte Faktoren

Hufnagel *et al.* (2004) haben einen Zucker-bindenden Transkriptionsregulator identifiziert, der Bestandteil eines Operons ist, das *bop* (*biofilm on plastic surfaces*) genannt wurde. Der Regulator *bopD* ist Teil des Clusters, das aus vier Genen besteht (*bopA-bopD*). Aus dem starken Biofilm-Bildner *E. faecalis* Type 9 (T9) wurde mittels Transposonmutagenese eine *bopB*-Mutante (Stamm 10D5) generiert, die eine signifikant reduzierte Fähigkeit zur Biofilm-Bildung zeigte. REM-Aufnahmen demonstrierten, dass der Stamm 10D5 einschichtig auf Polystyrol-Flächen wuchs, jedoch die mehrschichtige Ausbildung eines Biofilms vermissen ließ. Somit schien diese Mutante einen Defekt zur Bildung von Mikrokolonien während der zweiten Phase der Biofilm-Bildung (sekundäre Anheftung) aufzuweisen. Außerdem könnte die zugeordnete Funktion (Zucker-bindender Transkriptionsregulator) des *bopD*-codierten Proteins die Abhängigkeit der Fähigkeit zur Biofilm-Bildung von spezifischen Kohlenhydrat-Quellen im Medium erklären. Das Gen *bopD* zeigt Sequenzhomologie mit dem *ccpA* Gen von *E. faecalis*, welches in den Kohlenhydratmetabolismus involviert ist. Von derartigen Katabolitrepressionsproteinen wie CcpA ist bekannt, dass sie die Transkription mehrerer Promotoren regulieren (Bruckner & Titgemeyer, 2002) und somit an der Regulation vieler Gene, die u.a. die Produktion von Biofilm-Bildung beeinflussen könnten, beteiligt sind.

In derselben Studie (Hufnagel *et al.*, 2004) wurde eine Deletionsmutante (T9-TDM) erzeugt, bei der ein Teil von *bopA*, das gesamte Gen *bopB* und ein Teil von *bopC* deletiert war. Im Gegensatz zu der Insertion bei der Transposon-Mutante erhöhte diese nicht-polare Deletion die Biofilm-Bildung signifikant im Vergleich zum Wildtyp OG1RF bei Wachstum in Gegenwart von 1 % Glukose. In Gegenwart von 1 % Maltose war die Transposon-Mutante hingegen in höherem Maße als der Wildtyp zur Biofilm-Bildung befähigt, während die Deletionsmutante einen Biofilm-negativen Phänotyp aufwies (Creti *et al.*, 2006).

Oberflächenmoleküle wie D-Alanin-Lipoteichonsäure (LTA) haben verschiedene Funktionen in Gram-positiven Bakterien, z.B. die Aufrechterhaltung kationischer Homöostase oder die Modulation autolytischer Aktivität (Neuhaus & Baddiley, 2003). Die Inaktivierung des *dltA* Gens, welches für eine D-Alanin-D-Alanyl-Ligase codiert, führte bei einem klinischen Isolat von *E. faecalis* zu einer signifikant reduzierten Fähigkeit zur Biofilm-Bildung sowie verminderter Adhäsionsfähigkeit an eukaryotischen Zellen (Fabretti *et al.*, 2006). Dies war zurückzuführen auf einen Verlust von D-Alanin-Estern in der Teichonsäure, was in einer erhöhten negativen Gesamtladung der bakteriellen Oberfläche resultierte. In einer anderen Untersuchung hingegen konnte bei einer *dltA*-Mutante des Stamms OG1RF kein Unterschied in der Fähigkeit zur Biofilm-Bildung im Vergleich zum Wildtypstamm festgestellt werden (Mohamed *et al.*, 2004).

Dieselbe Studie, die als erstes den Einfluss mehrerer Gene auf die Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* belegte, zeigte signifikante Unterschiede in der Fähigkeit zur Biofilm-Bildung sowie zur primären Anheftung bei Disruptionsmutanten von OG1RF, bei denen die Gene *epa*, *atn*, *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* und *gelE* inaktiviert wurden. Außerdem ergab die Untersuchung mehrerer beschriebener Mutanten, bei denen bekannte Zwei-Komponenten-Regulationssysteme beeinflusst waren (Teng *et al.*, 2002), bei fünf Stämmen keine veränderte Biofilm-Bildungsfähigkeit; allerdings zeigte eine *etaR* Mutante eine geringe (~ 8 %), aber dennoch signifikante Änderung diesbezüglich (Mohamed *et al.*, 2004). Bei der Autolysin-Mutante (*atn*) konnte eine Reduzierung des gebildeten Biofilms um 30 % nachgewiesen werden. Die Mutante, bei der der open reading frame *orfde4* als Bestandteil des *epa* (enterococcal polysaccharide antigen) Genclusters inaktiviert wurde, zeigte eine um 73 % verminderte Biofilm-Bildungsfähigkeit.

Mohamed *et al.* (2006) stellten bei einer *salB*-Disruptionsmutante des Stamms OG1RF eine Reduzierung der Biofilm-Produktion in TSBG-Medium um 54 % fest, eine *salA*-Mutante zeigte ebenfalls eine geringe Abnahme (~ 8 %) im Vergleich zum Wildtyp. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen war außerdem bei der Mutante mit Defekt im *salB* Gen (secretory antigen-like) eine abnormale Zellform und Zelloberfläche zu beobachten. Die beiden Gene wiesen Sequenzhomologie zu einem in *E. faecium* bekannten Gen (*sagA*) auf, welches für ein sekretiertes Antigen codiert, das die Fähigkeit zur Bindung an ein breites Spektrum von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) vermittelt (Teng *et al.*, 2003). Somit wurde eine ähnliche Funktion von *salA* und/oder *salB* in *E. faecalis* vermutet. Die *salB*-Mutante zeigte aber eine erhöhte Fähigkeit zur Bindung an Fibronectin (FN) und Kollagen Typ I (CI) sowie zur Biofilm-Bildung, wenn der Stamm in TSBG mit 10 % Pferdeserum oder mit Fibronectin angezogen wurde. Daher scheint zum einen die Abwesenheit von *SalB* die Fähigkeit zur Adhärenz an FN und CI sowie zur Biofilm-Bildung zu erhöhen, zum anderen scheint Serum und Fibronectin in der *salB*-Mutante eine starke Biofilm-Bildung auszulösen.

Dieser Effekt war bei der *sa/A*-Mutante und beim Wildtyp OG1RF nicht zu beobachten. Folglich könnte unter bestimmten Bedingungen auch *in vivo* die *sa/B*-Expression herunter reguliert werden und die Anheftung an FN/CI ermöglichen sowie eine Serum-ausgelöste Erhöhung der Biofilm-Bildung nach sich ziehen.

Ein weiterer Mechanismus, der möglicherweise die Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* beeinflussen könnte, wird „positive Kooperativität“ genannt (Waar *et al.*, 2002b). Dies bedeutet, dass die Adhäsion von Bakterienzellen die Wahrscheinlichkeit zur Adhäsion weiterer Bakterien in der Nähe dieser Zellen erhöht. Erklärungen hierzu basieren auf der Hypothese, dass die Stärke der Interaktionskräfte zwischen adhärierenden Zellen höher ist als die Kräfte zwischen adhärierenden Zellen und dem Substrat sowie zwischen Zellen in Suspension. Dieses Phänomen wurde z.B. bereits für Oral-Streptokokken beschrieben (Van der Mei *et al.*, 1993). Die Autoren untersuchten die Kinetik der Adhäsion bestimmter *E. faecalis* Stämme an hydrophoben Materialien (Silikon, Fluoro-Ethylen-Propylen und Polyethylen) aus denen üblicherweise Drainageröhrchen für Gallenflüssigkeit bestehen. Es zeigte sich, dass die Stämme, die die Aggregationssubstanzen Asa1 und Asa373 exprimierten, in größerer Anzahl aufgrund von „positiver Kooperativität“ anhefteten. Stämme, die lediglich Esp-positiv waren, adhärten ebenfalls, allerdings nicht mit Hilfe dieses Mechanismus, sondern als Resultat der starken Interaktionskräfte mit dem Substrat.

1.4 Die Bakterielle Vaginose: das Enigma und die Biofilm-Bildung

1.4.1 Krankheitsbild der Bakteriellen Vaginose

Die vaginale Normalflora der gesunden Frau besteht überwiegend (ca. 95 %) aus verschiedenen *Lactobacillus* (*L.*) spp., wie *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* und *L. iners* (Tamrakar *et al.*, 2007), die Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Milchsäure produzieren. Dadurch wird der pH-Wert des Scheidenmilieus auf unter 4,5 reduziert und einer Besiedlung durch pathogene Keime des Gastrointestinaltrakts vorgebeugt. Diese Flora wird nach dem deutschen Gynäkologen Albert S. G. Döderlein (1860-1941) auch als Döderlein-Flora, die Milchsäurebakterien (*Lactobacillus* spp.) entsprechend als Döderlein-Stäbchen bezeichnet.

Die Bakterielle Vaginose (BV) ist die häufigste mikrobiologische Störung des Scheidenmilieus bei Frauen im geschlechtsreifen Alter, wobei die Prävalenz zwischen 5 % bei Frauen, die zur Vorsorgeuntersuchung kommen, und über 30 % bei Frauen liegt, die in einer Klinik für sexuell übertragene Erkrankungen betreut werden. In der Schwangerschaft beträgt die Häufigkeit der BV ca. 10-20 % (Eschenbach *et al.*, 1988). Etwa die Hälfte der erkrankten Frauen klagten über charakteristische Symptome wie vermehrtem Fluor, der einen fischigen Geruch aufweist, wohingegen viele Patientinnen mit einer BV sich in ihrem Wohlbefinden nicht beeinträchtigt fühlen (Klebanoff *et al.*, 2004).

Anfänglich wurde der von Herman L. Gardner und Charles D. Dukes erstmals beschriebene Keim *Haemophilus vaginalis*, inzwischen umbenannt in *Gardnerella* (*G.*) *vaginalis* (Greenwood & Pickett, 1980), als alleinige Ursache der BV angesehen, da dieser Keim bei 92 % aller Frauen mit dieser Erkrankung nachweisbar ist (Gardner & Dukes, 1955). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass dieses Bakterium bei bis zu 40 % asymptomatischer Frauen nachgewiesen werden kann. Eine Übertragung des Keims durch Geschlechtsverkehr gilt als wahrscheinlich (Elsner & Hartmann, 1987). *G. vaginalis* ist je nach Umweltbedingungen ein kokkoides bis langgestrecktes Gram-variables, anaerobes Stäbchen, das als einzige Art dieser Gattung nur beim Menschen (Vagina, gelegentlich in Urethra des Mannes und im Darm) in geringen Keimzahlen als Kommensale vorkommt.

Die BV ist charakterisiert durch eine pH-Wert-Erhöhung sowie durch eine deutliche Verschiebung der Vaginalflora zu anaeroben Mikroorganismen, wie *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Mobiluncus* spp. und Peptostreptokokken unter Reduzierung der Anzahl der fakultativ anaeroben Flora, insbesondere der *Lactobacillus* spp. Es kommt somit zu einer charakteristischen Konzentrationsveränderung der in der Vagina vorhandenen Keime. *G. vaginalis* lässt sich mit etwa 10^7 /ml Vaginalsekret nachweisen, im Vergleich zu 10^5 /ml bei nicht erkrankten Frauen. Andere anaerobe Keime vermehren sich sogar von 10^4 /ml auf 10^7 /ml. H_2O_2 -produzierende *Lactobacillus* spp. haben bei Frauen mit BV nur noch einen Anteil von 10 %, während der Anteil anaerober, nicht H_2O_2 -produzierender Stämme dagegen 40 % beträgt (Eschenbach *et al.*, 1989). Auch *Mycoplasma hominis* tritt häufiger und in

höherer Konzentration bei Frauen mit BV auf. Ein weiterer Keim, der offensichtlich eine entscheidende Rolle bei der BV spielt, ist der Gram-positive, kokkenförmige Anaerobier *Atopobium vaginae* (Rodriguez-Jovita *et al.*, 1999), da dieses Bakterium in mitunter neusten, molekularen Untersuchungen auffällig häufig zusammen mit *G. vaginalis* bei BV nachgewiesen wurde (Fredricks *et al.*, 2005; Bradshaw *et al.*, 2006; De Backer *et al.*, 2007). Vermehrte Leukozytenzahlen und nennenswerte Infektionszeichen der Vagina fehlen allerdings, so dass keine Kolpitis vorliegt. Somit handelt es sich bei der BV um eine mikrobiologische Dysbalance, auch Dysbiose genannt.

1.4.2 Diagnose und Therapie

Die Diagnose BV gilt in der gynäkologischen Praxis als gesichert, wenn mindestens drei der folgenden vier Befunde erhoben werden können (nach Amsel *et al.*, 1983):

- Auftreten von dünnflüssigem, homogenen grau-weißen Fluor
- pH-Wert des Vaginalsekrets > 4,5
- Positiver „Whiff“-Test (Amin-Geruch nach Alkalisierung durch Zugabe von 10 %iger KOH-Lösung)
- Beobachtung von „Schlüsselzellen“ (Clue Cells) bei mindestens 20 % der Epithelzellen im Nativpräparat des Vaginalsekrets

Clue Cells sind abgeschilferte Vaginalepithelzellen, an die Bakterien der Scheidenflora adhärirt sind. *G. vaginalis* gilt lediglich als Leitkeim der BV, da er in der überwiegenden Anzahl der Erkrankungen nachgewiesen werden kann.

Zusätzlich sollte die Diagnose einer BV nach Nugent *et al.* (1991) mit Hilfe eines Gram-Präparats der Scheidenflüssigkeit gestellt werden. Hierbei wird bei 1000facher Vergrößerung die Anzahl der *Lactobacillus* spp., der Gram-negativen bis Gram-variablen kurzen Stäbchen (*G. vaginalis*, *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp. etc.) sowie der Gram-negativen, kommaförmigen *Mobiluncus* spp. bewertet und als bestimmter Score angegeben (Tab. 3). Dabei wird ein Gesamt-Score von 0-3 als Normalflora und ein Score von 7-10 als Bakterielle Vaginose bewertet. Die Bedeutung des unscharf definierten, intermediären Scores von 4-6 ist klinisch unklar, stellt aber möglicherweise ein Vorstadium einer BV oder anderer Störungen des Scheidenmilieus dar (Mendling *et al.*, 2006).

Tab. 3 Score-System nach Nugent *et al.* (1991) zur Bewertung Gram-gefärbter Vaginalsekrete

Die Bewertung erfolgt anhand der durchschnittlichen Anzahl der bei 1000facher Vergrößerung (Ölimmersion) pro Gesichtsfeld gezählten Bakterienzellen. Dabei gilt: 0 = nicht nachweisbar; 1+ = Anzahl < 1; 2+ = Anzahl 1-4; 3+ = Anzahl 5-30; 4+ = Anzahl >30. Der Gesamt-Score zur Bewertung errechnet sich durch die Addition der Scores der aufgeführten Morphotypen. Gram-negative, kommaförmige Stäbchen gehen dabei weniger stark in die Berechnung des Gesamt-Scores ein.

Score	Gram-positive lange Stäbchen: <i>Lactobacillus</i> spp.	Gram-negative bis Gram-variable kurze Stäbchen: <i>Gardnerella</i> spp. <i>Bacteroides</i> spp. <i>Prevotella</i> spp.	Gram-negative kommaförmige Stäbchen: <i>Mobiluncus</i> spp.
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ oder 2+
2	2+	2+	3+ oder 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

Die an BV erkrankten Frauen werden i.d.R. je nach individuell gelagertem Fall mit Metronidazol oder Clindamycin als Vaginalcreme bzw. oral in Tablettenform behandelt. Für die Wirksamkeit sonstiger Therapien, wie z.B. die Döderlein-Lyophilisat-Anwendung, gibt es keinen eindeutigen wissenschaftlichen Beleg und somit keine verfügbare Indikation. Auch für die routinemäßige Mitbehandlung des Sexualpartners gibt es keine ausreichende wissenschaftliche Basis (Martius & Hoyme, 2006). Allerdings scheint die zusätzliche Gabe eines Präparats aus zwei probiotischen *Lactobacillus* Stämmen nach erfolgreicher Therapie das Rezidiv-Risiko signifikant zu erniedrigen (Larsson *et al.*, 2008).

1.4.3 Ätiologie und Pathogenese der Bakteriellen Vaginose: neuste Erkenntnisse und mögliche Zusammenhänge

Ein großes Problem bei der medizinischen Behandlung der BV ist, dass die Krankheit trotz korrekter Therapie häufig rezidiert, was wiederum ein Hinweis auf ein begrenztes Verständnis der Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung darstellt. Des Weiteren resultiert das Interesse am Verständnis der Krankheitsursachen und –entstehung aus Anzeichen auf die Assoziation der BV mit einem erhöhten Risiko zu anderen Erkrankungen oder Komplikationen. Der Zusammenhang zwischen BV und postoperativen gynäkologischen Infektionen, z.B. nach Hysterektomie oder Interruptio, scheint wissenschaftlich gesichert zu sein, währenddessen ein erhöhtes Risiko für entzündliche Beckenerkrankungen (PID; Endometritis, Salpingitis, Oophoritis) sowie für spontane Aborte fraglich ist (Larsson *et al.*, 2005). In der Schwangerschaft erhöht die BV allerdings über eine aufsteigende Infektion das Risiko für einen vorzeitigen Blasensprung, vorzeitige Wehen oder eine Frühgeburt (Martius & Hoyme, 2006). Außerdem besteht eine erhöhte HIV-Ansteckungs- und Übertragungsgefahr (Losikoff *et al.*, 2007).

Ob die BV eine sexuell übertragbare Krankheit, also eine exogene Infektion, oder endogenen Ursprungs ist, ist heute noch absolut ungeklärt. Scheinbar tragen mehrere, verschiedene Risikofaktoren zur Entstehung und Entwicklung dieser Erkrankung bei (Cherpes *et al.*, 2008). Neuere Ergebnisse belegen den direkten Zusammenhang zwischen BV und Interleukin-1 β -Werten, so dass durch genetisch bedingte Unterschiede in der Immunreaktion die mikrobielle Kolonisation der Vagina beeinflusst werden könnte (Macones *et al.*, 2004). Durch die Anwendung der relativ neuen, kulturunabhängigen molekularen Methode der PCR-DGGE (Denaturierende Gradientengelelektrophorese), mit Hilfe derer die Identifizierung einer großen Anzahl an Bakterien-Spezies in einem komplexen Ökosystem und somit die Untersuchung dessen Zusammensetzung möglich ist, konnte die Diversität der vaginalen Mikroflora während einer BV gezeigt werden. Devillard *et al.* (2005) fanden bei einer Frau mit rezidivierender BV in einem Untersuchungszeitraum von sechs Wochen hauptsächlich pathogene Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Morganella morganii* u.a.), *Staphylococcus epidermidis* und *Candida albicans*. Die von Anukam & Reid (2007) durchgeführte Analyse der Vaginalflora von 34 Frauen mit BV ergab die Identifizierung von *Mycoplasma hominis* in 35 % aller Proben sowie verschiedene andere Spezies wie unkultivierbare *Streptococcus* spp. In beiden Studien wurden Keime wie *G. vaginalis*, *Prevotella* spp. oder *Mobiluncus* spp., die regelmäßig mit BV assoziiert gefunden werden, nicht detektiert. In einer weiteren umfangreichen Studie wurde mittels Erstellung von 16S rDNA-Klon-Bibliotheken ebenfalls gezeigt, dass in der Vaginalflora der Frauen mit BV eine große Diversität von Mikroorganismen vorherrscht, u.a. wurden neben den häufig in Verbindung mit BV gebrachten Spezies auch zahlreiche unbekannte Bakterien entdeckt (Fredricks *et al.*, 2005). Auch Swidsinski *et al.* (2005) konnten mittels FISH (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung) mit 34 verschiedenen familien-, gattungs- und speziesspezifischen Sonden ein größeres Keimspektrum sowie höhere Konzentrationen bestimmter Bakterien bzw. Bakteriengruppen bei 20 untersuchten Frauen mit BV beschreiben. Herausragend war allerdings die Entdeckung eines adhärennten Biofilms, der nur bei den mit BV erkrankten Frauen auftrat und *G. vaginalis* als Hauptbestandteil (60–95 %) dieses Biofilms zeigte, was diesen Keim wieder mehr in den Fokus der Überlegungen zur Pathogenese der BV rückte. Somit scheint auch bei dieser häufigen Erkrankung die Biofilm-Bildung eine bedeutsame Rolle zu spielen. Unterstützt werden diese Beobachtungen von Untersuchungen, die eine Toleranz von *G. vaginalis* Biofilmen gegenüber einer fünffach erhöhten Konzentration an H₂O₂ und einer bis zu achtfach höheren Konzentration an Milchsäure im Vergleich zu einer planktonischen Kultur zeigten (Patterson *et al.*, 2007). Folglich trägt die Biofilm-Bildung scheinbar zum Überleben von *G. vaginalis* bei gleichzeitiger Anwesenheit von *Lactobacillus* spp. bei. Auch im Hinblick auf die Therapie der BV wäre dies ein wichtiger Aspekt, denn eingesetzte

Medikamente müssten demzufolge ebenfalls den Biofilm während der BV bekämpfen können (Swidsinski *et al.*, 2008).

Wie dieser Biofilm entsteht und welche Bakterien der Vaginalflora daran beteiligt sind, ist bisher unbekannt. Swidsinski *et al.* (2005) fanden neben *G. vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella* spp. und anderen Anaerobiern auch Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken, letztere in insgesamt 25 % der BV-positiven Proben. Enterokokken werden in der gesunden Vaginalflora als natürliche Kommensalen betrachtet und somit bei routinemäßigen diagnostischen Untersuchungen von Vaginalabstrichen regelmäßig isoliert. Ob sie auch in einer gestörten Flora nur ein kommensaler Bestandteil sind oder aber bei der Entstehung einer mikrobiellen Störung des Scheidenmilieus aufgrund ihrer opportunistischen Pathogenität eine Rolle spielen, wurde bisher kaum untersucht. Auch können Enterokokken die Ursache vaginaler Infektionen (Vaginitis) sein, deren Ausgangspunkt möglicherweise eine vaginale Dysbiose ist. Ein möglicher Einfluss von Enterokokken auf die Vaginalflora und somit eine potenzielle Bedeutung für die Pathogenese der BV wurde jedoch von Kelly *et al.* (2003) durch die Isolierung eines *E. faecium* Stammes, der eine *Lactobacillus* spp. inhibierende, bacteriocin-ähnliche Substanz produziert, postuliert. Die Autoren halten es für möglich, dass bacteriocin-produzierende Enterokokken-Stämme antagonistisch auf das Wachstum vaginaler *Lactobacillus* spp. wirken und somit zur Etablierung der BV-assoziierten Mikroflora beitragen, insbesondere nach antibiotischer Behandlung mit Clindamycin, die zu einer Persistenz und vermehrtem Wachstum v.a. der intrinsisch resistenten *E. faecalis* führt. Auch von De Kwaadsteniet *et al.* (2006) konnte ein Bacteriocin, produziert von einem aus Vaginalsekret isolierten *E. faecium* Stamm, charakterisiert werden, das Aktivität gegenüber eines *Lactobacillus* spp. Isolats zeigte. Des Weiteren existieren nur vereinzelt Erkenntnisse über die Inzidenz von Virulenzfaktoren und Biofilm-Bildung bei vaginalen Enterokokkenstämmen (z.B. Creti *et al.*, 2004) im Vergleich zu Isolaten aus Faeces oder anderem Untersuchungsmaterial, so dass potentielle Zusammenhänge bislang nicht erfasst werden konnten.

2 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden Enterokokken-Stämme aus unterschiedlichen klinischen Bereichen auf ihre Fähigkeit zur Biofilm-Bildung und das Vorhandensein von verschiedenen Virulenzfaktoren untersucht. Einen Schwerpunkt bildete die Erforschung eines Kollektivs bestehend aus einer größeren Anzahl an *E. faecalis* Isolaten aus Vaginalabstrichen. Insbesondere sollten erstmals Stämme untersucht werden, die von Patientinnen mit positivem Befund bzgl. der Krankheit Bakterielle Vaginose stammten.

Hauptziele dieser Arbeit waren

- der Nachweis und der Vergleich des Vorkommens von Biofilm-Bildung und bestimmten Virulenzfaktoren bei Isolaten aus verschiedenem klinischen Material, insbesondere bei *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen,
- der Vergleich von *E. faecalis* Stämmen, die aus Vaginalabstrichen von Patientinnen mit der Diagnose der Bakteriellen Vaginose kultiviert wurden, und Isolaten von Patientinnen mit negativem Befund bzgl. der Bakteriellen Vaginose, sowie
- die Untersuchung der Korrelation von Biofilm-Bildungsfähigkeit der Isolate und dem Vorkommen bestimmter Virulenzfaktoren, um Rückschlüsse zum Einfluss dieser Faktoren auf den Prozess der Biofilm-Bildung und dessen molekularen Mechanismus zu ziehen.

Basierend auf im Verlauf der Arbeit gewonnenen Ergebnissen, die mit denen anderer Forschergruppen übereinstimmen, wurde deutlich, dass mehrere Faktoren an der Bildung von Biofilmen bei *E. faecalis* beteiligt sind und folglich verschiedene molekulare Mechanismen existieren müssen. Daher sollte in einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit mittels der Erzeugung von Spontanmutanten die Identifizierung neuer, potenzieller Einflussfaktoren auf die Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* ermöglicht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Zubehör

Autoklaven und Sterilisaton / Trocknung

Laborautoklav DANN 4-5-6
Tisch-Autoklav DANN 250
Trocknungsschrank UE300

Zirbus, Osterode / Harz
Zirbus, Osterode / Harz
Memmert GmbH, Schwabach

Inkubation

Brutschrank Modell 500
Brutschrank Typ U30
Brutraum
Wasserbad
Thermoblock
Anaerobentopf (GasPak®System)

Memmert GmbH, Schwabach
Memmert GmbH, Schwabach
Kälte-Hunke, Bonn
Thermo Haake, Karlsruhe
Thermolyne/Sybron (Dubuque, USA)
BD Diagnostics, Heidelberg

Kühlung und Gefrieren

Kühlzelle Typ 60/215
Gefrierschrank öko super
Kühlschrank
Stickstoffbehälter

Viessmann, Hof /Saale
Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen
Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen
Messer, Griesheim (Abteilung Genetik)

Zentrifugen

Kühlzentrifuge Sigma 3K30
Tischzentrifuge
Untertischzentrifuge
PCR-Cup Minizentrifuge

Sigma Laborzentrifugen, Osterode / Harz
Sigma Laborzentrifugen, Osterode / Harz
Beckmann Coulter, Unterschleißheim
ABlmed, Langenfeld

Thermocycler

Primus 25
Primus 96 plus

MWG Biotech, Ebersberg
MWG Biotech, Ebersberg

Geldokumentation

UV-Transilluminator TFL-35M
Kamera
PC incl. Software
Drucker Modell P93DW

Appligene, Illkirch (Frankreich)
Intas, Göttingen
Intas, Göttingen
Mitsubishi Electric Corporation

Elektrophorese

Minigel-Elektrophoresekammer
Horizontalgel-System
RTF Trennstelltrafo LTS 002
Power Supply A011
SDS-Gelsystem Mini PROTEAN 3 Cell
Power Supply PowerPac 300

Renner, Dannstadt
Eigenbau Abt. Mikrobiologie
VEB, Thalheim
H. Hölzel, Dorfen
Bio-Rad Laboratories, München
Bio-Rad Laboratories, München

Sonstige Geräte

Gilson-Pipetten (5 ml, 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl)
Multipipette DV8-200 (200 µl; 8-Kanal)
Analysewaage BA 110 S
Präzisionswaage BA 610
pH-Meter
Spektralphotometer Uvikon 930

ABlmed, Langenfeld
ABlmed, Langenfeld
Sartorius, Göttingen
Sartorius, Göttingen
WTW, Weilheim
Kontron Instruments, Eching

Phasenkontrastmikroskop BH 2
Sicherheitswerkbank ASW-UP IV-1906
Eismaschine
Magnetrührer IKAMAG REO
ELISA-Washer
FastPrep FP120 Bio101
SpeedVac UniVapo 100H Concentrator
Vortex VF 2
Schüttler: Mixer 5432
Tisch-Rundschüttler
Mikrowelle

Olympus, Hamburg
Bleymehl Reinraumtechnik, Inden
Ziegra, Isernhagen
IKA Labortechnik, Staufen
Sigma, Deisenhofen
Savant Instruments, New York
UniEquip, Martinsried
IKA Labortechnik, Staufen
Eppendorf, Hamburg
Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Lloyds

3.2 Verbrauchsmaterial

Petrischalen (steril)
96well Mikrotiterplatten (PS, steril, mit Deckel)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)
Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 10 µl)
PCR Tubes (DNase-/RNase-frei; 200 µl)
PCR Filter-Tips
(1000 µl, 100 µl, 10 µl; DNase-/RNase-frei)
Schraubdeckelröhrchen (50 ml, 15 ml; steril)
Silicatperlen (\varnothing 0,17-0,18 mm)
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)
Spritzen
Kanülen
Einmal-Küvetten
Mikro-Schraubröhrchen (2 ml; steril; PP)
Einmal-Impfösen (10 µl, 1 µl)
Infusionswasser (A. ad iniectionem, steril)
HyPure™ Molecular Biology Grade Water

Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
B. Braun, Melsungen
Sarstedt, Nümbrecht
Terumo, Eschborn
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
B. Braun, Melsungen
HyClone, Utah (USA)

3.3 Chemikalien

Acridinorange
Agarose NEEO Ultra Qualität
APS (Ammoniumpersulfat)
Bromphenolblau
BSA (bovine serum albumin)
Coomassie Brilliant Blue G250 / R250
EDTA
Ethidiumbromid
DEPC
D-Glucose
Glutardialdehyd
Kristallviolett
MOPS
Osmiumtetroxid
PMSF
RNase-ExitusPlus-Lösung
SDS (sodium dodecyl sulfate)
TEMED

AppliChem, Darmstadt
Roth, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Serva, Heidelberg
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roth, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
AppliChem, Darmstadt
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roth, Karlsruhe
AppliChem, Darmstadt
Roth, Karlsruhe
Roth, Karlsruhe
Serva, Heidelberg
AppliChem, Darmstadt
Roth, Karlsruhe
Roth, Karlsruhe

Alle übrigen Chemikalien wurden in p.a. Qualität von Merck (Darmstadt) bezogen.

3.4 Nährmedien und Zusätze

Sofern nicht anders angegeben wurden Substanzen oder Zusätze zur Herstellung von (speziellen) Nährmedien von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

3.4.1 Fertignährmedien

Die Zusammensetzung folgender verwendeter Fertignährmedien (Granulate) sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen, sie wurden diesen entsprechend zubereitet.

Brain-Heart-Infusion (BHI)	Merck, Darmstadt / Roth, Karlsruhe
Columbia-Blutagar	BD Diagnostics, Heidelberg
Iso-Sensitest-Medium	Oxoid, Wesel
Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar	Merck, Darmstadt
Man-Rogosa-Sharpe-Medium (MRS)	Roth, Karlsruhe / AppliChem, Darmstadt
Mueller-Hinton-Medium	Merck, Darmstadt
Phenolrot-Bouillon	Merck, Darmstadt
TSB	BD Diagnostics, Heidelberg
THB	Roth, Karlsruhe

3.4.2 Medien für spezielle Nachweise

Gelatinase-Agar

Hefe-Extrakt	2,0 g/l
Pepton aus Casein	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Gelatine	30,0 g/l
Agar-Agar	15,0 g/l

Eingewogene Komponenten mit A. bidest versetzen und unter Rühren bei 50°C im Wasserbad vollständig lösen, den pH-Wert auf $7,4 \pm 0,2$ einstellen und autoklavieren (121°C, 15 min). Platten innerhalb einer Woche verwenden.

TMB-Medium (Eschenbach *et al.*, 1989)

Basis: MRS-Agar	1 l
TMB	250 mg/l
Horseradish Peroxidase	10 mg/l

Tributyrat-Agar

Fleischpepton	2,5 g/l
Caseinpepton	2,5 g/l
Hefe-Extrakt	3,0 g/l
Agar-Agar	12,0 g/l
Tributyrat	10 ml/l

Den pH-Wert auf $7,5 \pm 0,2$ einstellen und Medium autoklavieren (121°C, 15 min). Danach unter ständigem Rühren auf 50°C abkühlen, so dass das Tributyrat vor dem Giessen gut gelöst ist und die Platten eine gleichmäßige Trübung aufweisen.

3.4.3 Zusätze und sonstige Materialien

α -Methyl-Glucopyranosid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agar-Agar	AppliChem, Darmstadt
Defibriniertes Pferde- oder Schafblut	Oxoid, Wesel
D-Ribose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anaerocult [®] C	Merck, Darmstadt
Gelatine	BD Diagnostics, Heidelberg
Horseradish Peroxidase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Arabinose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Sorbose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TMB (3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tributyrin	Acros Organics, Geel (Belgien)

3.5 Antibiotika

Alle Antibiotika (Tab. 4) wurden mit Ausnahme von Teicoplanin (Sanofi-Aventis, Frankfurt/Main) von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Die jeweils hergestellten Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert und den abgekühlten Medien nach dem Autoklavieren in entsprechender Konzentration zugesetzt. Alle Antibiotikatestblättchen (Tab. 5) wurden von der Firma Oxoid (Wesel) bezogen.

Tab. 4 Verwendete Antibiotika

Name	Abkürzung	Breakpoint-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Ampicillin	AMP	2 / 8
Ciprofloxacin	CIP	1 / 2
Erythromycin	E	1 / 4
Gentamycin	GM	500 (HLR)
Streptomycin	SM	1000 (HLR)
Teicoplanin	TEC	8 / 16
Tetracyclin	TC	1 / 4
Vancomycin	VA	4 / 8

Tab. 5 Verwendete Antibiotikatestblättchen

Name	Abkürzung	Konzentration [μg]
Ampicillin	AMP	10
Ciprofloxacin	CIP	5
Doxycyclin	DO	30
Erythromycin	E	15
Ofloxacin	OFX	5
Synercid (Quinupristin/Dalfopristin)	QD	15
Rifampicin	RD	2
Teicoplanin	TEC	30
Vancomycin	VA	30

3.6 Puffer und Lösungen

3.6.1 Elektrophoresen und Gel-Färbelösungen

TAE-Puffer (50 x)

Tris-Base	242 g/l
Eisessig	57,1 ml/l
EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)	100 ml/l

TBE-Puffer (10 x)

Tris-Base	108 g/l
Borsäure	55 g/l
EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)	40 ml/l

DNA-Probenladepuffer

Glycerin	50 % (v/v)
Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)	15 % (v/v)

MOPS-Puffer (10 x, pH 7,0)

MOPS	200 mM
NaCH ₃ COO x 3 H ₂ O	50 mM
EDTA	10 mM

Mit DEPC-behandeltem A. bidest ansetzen und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahren.

RNA-Probenladepuffer (5 x)

MOPS-Puffer (10 x)	40 % (v/v)
Glycerin	20 % (v/v)
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	0,8 % (v/v)
Formaldehyd (37 %)	7,2 % (v/v)
Formamid	30,84 % (v/v)
Bromphenolblau	0,2 % (w/v)

Mit DEPC-behandeltem A. bidest die entsprechende Menge auffüllen, ca. 3 Monate bei 4°C haltbar.

DEPC-behandeltes Wasser

0,1 % (v/v) DEPC in A. bidest geben, stark schütteln und ÜN bei RT inkubieren, am folgenden Tag zur Inaktivierung von DEPC autoklavieren.

Ethidiumbromid-Färbelösung

1 mg/l Ethidiumbromid in A. bidest, lichtgeschützt lagern.

SDS-Elektrophoresepuffer (1 x)

Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)

SDS-Trenngelpuffer (4 x, pH 8,8)

Tris/HCl	1,5 M
SDS	0,8 % (w/v)

SDS-Sammelgelpuffer (4 x, pH 6,8)

Tris/HCl	0,5 M
SDS	0,8 % (w/v)

Acrylamid-Stammlösung (30 %)

Acrylamid	29,2 % (w/v)
N,N-Methylen-Bisacrylamid	0,8 % (w/v)

Lösung bei 4°C lichtgeschützt maximal 30 Tage aufbewahren.

SDS-Probenladepuffer (4 x, pH 6,8)

Tris-Base	0,25 M
SDS	8 %
Glycerin	50 %
β-Mercaptoethanol	10 %
EDTA	4 mM
Bromphenolblau	0,01 %

Coomassie-Färbelösung (kolloidal)

Coomassie Brilliant Blue R250	0,1 % (w/v)
H ₃ PO ₄ (85 %)	2,0 % (v/v)
AlSO ₄ x 18 H ₂ O	5 % (w/v)

23,5 ml Phosphorsäure und 50 g Aluminiumsulfat in 800 ml A. bidest lösen. 1 g Coomassie Brilliant Blue R250 in 20 ml A. bidest lösen und 30 min rühren, diese Lösung dann langsam zur Aluminiumsulfat-Lösung tropfen und auf 1 l auffüllen. Färbelösung nicht filtrieren. Vor Anfärbung die PA-Gele gut wässern (90 s in A. bidest erhitzen, 10 min bei RT inkubieren). Die Färbelösung ist mehrmals verwendbar, wenn sie nicht erhitzt wurde. So angefärbte PA-Gele müssen nicht entfärbt werden.

3.6.2 Gesamt-DNA-, Plasmid-DNA- und Gesamt-RNA-Isolierung**Natriumphosphat-Puffer (0,1 M, pH 8,0, 200 ml)**

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (0,2 M)	94,7 ml
NaH ₂ PO ₄ (0,2 M)	5,3 ml
A. bidest	100 ml

TE-Puffer (pH 8,0)

Tris/HCl	10 mM
EDTA	1 mM

RNase A

10 mg/ml in TE-Puffer (pH 8,0) lösen und zur Inaktivierung von DNasen 15 min kochen, bei -20°C lagern.

TERMLS-Puffer (Resuspensions- und Lyse-Puffer, 10 ml)

Tris/HCl (100 mM, pH 8,0)	2,5 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	0,2 ml
D-Saccharose	2 g
Lysozym	0,15 g
Mutanolysin	1000 U
RNase A (10 mg/ml)	25 µl
A. bidest	7,3 ml

Puffer P2 (Lyse-Puffer)

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Puffer P3 (Neutralisationspuffer, pH 5,5)

KCH ₃ COO	3 M
----------------------	-----

Puffer QBT (Äquibrierungspuffer, pH 7,0)

NaCl	750 mM
MOPS	50 mM
Isopropanol	15 % (v/v)
Triton X-100	0,15 % (v/v)

Puffer QC (Waschpuffer, pH 7,0)

NaCl	1M
MOPS	50 mM
Isopropanol	15 % (v/v)

Puffer QF (Elutionspuffer, pH 8,5)

NaCl	1,25 M
Tris/HCl	50 mM
Isopropanol	15 % (v/v)

3.6.3 Sonstige Puffer und Lösungen**PBS-Puffer (10 x, pH 7,4)**

NaCl	80,0 g/l
KCl	2,0 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	17,8 g/l
KH ₂ PO ₄	2,4 g/l

PUM-Puffer (pH 7,1)

K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	22,2 g/l
KH ₂ PO ₄	7,26 g/l
Urea	1,8 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g/l

Hucker´s Crystal Violet-Färbelösung (100 ml, 2 %)

Lösung 1: 20 ml Kristallviolett-Lösung (10 % in 96%igem EtOH)

Lösung 2: 80 ml Ammoniumoxalat-Lösung (1 % in A. bidest)

48 h vor Gebrauch Lösung 1 und Lösung 2 mischen.

Bradford-Reagenz

Coomassie Brilliant Blue G250	10 %
EtOH (95 %)	5 %
H ₃ PO ₄ (85 %)	10 %

Coomassie Brilliant Blue G250 in EtOH lösen, Phosphorsäure zugeben und 1 h bei RT rühren. Reagenz filtrieren und im Dunkeln bei 4°C aufbewahren.

Soerensen-Puffer (100 ml, pH 7,2)

KH ₂ PO ₄ (1 M)	2,74 ml
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (1 M)	7,26 ml
A. bidest	90 ml

3.7 Kits und sonstige kommerziell erhältliche Materialien

Plasmid Midi Isolation Kit	Qiagen, Hilden
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-up System	Promega, Mannheim
Wizard [®] SV Total RNA Isolation Kit	Promega, Mannheim
AccessQuick [™] RT-PCR System	Promega, Mannheim
McFarland Standard System	bioMérieux, Nürtingen
API [®] 50 CH System	bioMérieux, Nürtingen
Gram-Färbung Set	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandards	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler [™] DNA Ladder Mix (100-10000 bp)	
GeneRuler [™] 1kb DNA Ladder (250-10000 bp)	
GeneRuler [™] 50bp DNA Ladder (50-1031 bp)	
GeneRuler [™] 100bp DNA Ladder plus (100-3000 bp)	
Protein-Längenstandards	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained Molecular Weight Marker (19-117 kDa)	
PageRuler [™] Protein Ladder (10-200 kDa)	
Precision Plus Protein [™] Standard (10-250 kDa)	Bio-Rad Laboratories, München

3.8 Enzyme, PCR-Reagenzien und Primer

dNTPs (je 100 µM Stock-Lösung)	Roth, Karlsruhe; Invitrogen, Karlsruhe
MgCl ₂ (25 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Puffer mit KCl (10 x, ohne MgCl ₂)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
	Zusammensetzung:
	100 mM Tris/HCl (pH 8,8)
	500 mM KCl
	0.8 % (v/v) Nonidet P40
Taq-Puffer (Standard, MgCl ₂ -frei)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
	Zusammensetzung:
	100 mM Tris/HCl
	500 mM KCl (pH 8,3)
Taq-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot;
	New England Biolabs, Frankfurt a. M.;
	eigene Aufreinigung (Engelke <i>et al.</i> , 1990;
	Pluthero, 1993)

Lysozym
Mutanolysin
DNase I (RNase-frei)
RNase A
Restriktionsendonukleasen

AppliChem, Darmstadt
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MBI Fermentas, St. Leon-Rot;
New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Synthese von Invitrogen, Karlsruhe

Primer (Tab. 6)

Tab. 6 Verwendete Primer

Zielgen	Primer	Sequenz 5' → 3'	Position	Referenz
<i>aacA-aphD</i>	aacA-aphD1	TAA TCC AAG AGC AAT AAG GGC	2144–2164	Strommenger <i>et al.</i> , 2003
	aacA-aphD2	GCC ACA CTA TCA TAA CCA CTA	2371–2350	
<i>ace</i>	aceB-for	AAA ATG TGG AAA TGC CAA CAG AAG AAA GTC	986-1015	Nallapareddy <i>et al.</i> , 2000a
	aceB-rev	ATT TAA TTT TTG AAT TGG TTC ACT AAG CAG	1896-1867	
<i>asa1</i>	ASA11	GCA CGC TAT TAC GAA CTA TGA	3205-3225	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004; Galli <i>et al.</i> , 1990
	ASA12	TAA GAA AGA ACA TCA CCA CGA	3582-3562	
<i>asa373</i>	asa373-for	GGA CGC ACG TAC ACA AAG CTA C	3094-3115	Creti <i>et al.</i> , 2004
	asa373-rev	CTG GGT GTG ATT CCG CTG TTA	3713-3693	
<i>bee1</i>	P101D12-2-for	GAA CTC GAT TCT GAT ACG AAT GTC TTT AA	3114-3142	Tendolkar <i>et al.</i> , 2006
<i>bee2</i>	Bee12-for	CGG ACA AAG AAT TAG CTA CCG TTC AC	3980-4005	
<i>bee3</i>	P101D12-1-rev	CAA GAT AAG CAT CTG TTA CAT CAT AGG CTG	4511-4482	
<i>bee1</i>	bee1-for2267	TAC TGT TTC TCT CAA AGA AGA G	2267-2288	diese Arbeit
	bee1-rev3282	CAT CTT TTT GTT CTT TCC CAT C	3282-3261	
<i>bopD</i>	bopD-for	GGC TTC CTC GTT GAT GGC TTC	736-756	Hufnagel <i>et al.</i> , 2004
	bopD-rev	ACG GCA CGG AAT TTG GGT AAA C	862-839	
<i>boxA</i>	BOXA2R	ACG TGG TTT GAA GAG ATT TTC G	10-31	Malathum <i>et al.</i> , 1998; Koeuth <i>et al.</i> , 1993
<i>cyIA</i>	CYT-I	ACT CGG GGA TTG ATA GGC	425-442	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004; Coque <i>et al.</i> , 1995
	CYT-IIb	GCT GCT AAA GCT GCG CTT	1112-1095	
<i>ddl_{E.fc}</i>	E.fc-for	ATC AAG TAC AGT TAG TCT TTA TTA G	98-123	Kariyama <i>et al.</i> , 2000
	E.fc-rev	ACG ATT CAA AGC TAA CTG AAT CAG T	1038-1014	

Tab. 7 Verwendete Primer (Fortsetzung)

Zielgen	Primer	Sequenz 5' → 3'	Position	Referenz
<i>E. fm</i> spezifisch	E.fm-for	TTG AGG CAG ACC AGA TTG ACG	310-330	Kariyama <i>et al.</i> , 2000; Cheng <i>et al.</i> , 1997
	E.fm-rev	TAT GAC AGC GAC TCC GAT TCC	967-947	
<i>ebpA</i>	EF1091MF1	AAT GTG TTA AAC CAT CAA GGG AAT	577-600	Nallapareddy <i>et al.</i> , 2006
	EF1091MR1	ACT CCT TTT TGA ACT TCA CCA ATC	878-855	
<i>ef0591</i>	EF0591-for	CGG AAG TAT TGC GTT TGG TGG G	99-120	Creti <i>et al.</i> , 2004
	EF0591-rev	CGT CTG CTT TAA TAG ACC CCA G	1003-982	
<i>esp</i>	ESP12R	AAT TGA TTC TTT AGC ATC TGG	1341-1362 (<i>E. fc</i>) 1455-1476 (<i>E. fm</i>)	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
	ESP14F	AGA TTT CAT CTT TGA TTC TTG G	1851-1831 (<i>E. fc</i>) 1965-1945 (<i>E. fm</i>)	
<i>espA</i>	esp46	TTA CCA AGA TGG TTC TGT AGG CAC	2256-2279	Shankar <i>et al.</i> , 1999
	esp47	CCA AGT ATA CTT AGC ATC TTT TGG	3192-3169	
<i>espC_{fc}</i>	esp2	CAG ATG GAT CAT CTG ATG AAG T	3254-3275	
	esp5	GTA ACG TTA CTG TTA CAT CTG C	5359-5338	
<i>espC_{fm}</i>	TE98	AAA TCT GAC GCT GAC AAA TAT AAT CC	3433-3458	Eaton & Gasson, 2002
	TE103	CTA TCA CTT TTG TCC CTG CCT C	5806-5785	
<i>ermB</i>	ermB1	CAT TTA ACG ACG AAA CTG GC	836-855	Jensen <i>et al.</i> , 1999
	ermB2	GGA ACA TCT GTG GTA TGG CG	1260-1241	
<i>gelE</i>	GEL11	TAT GAC AAT GCT TTT TGG GAT	1145-1165	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
	GEL12	AGA TGC ACC CGA AAT AAT ATA	1357-1337	
<i>hyl</i>	HYLn1	ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG	1026-1046	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
	HYLn2	GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA	1301-1281	
16S rDNA	rrs-for	GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC C	796-817	Kariyama <i>et al.</i> , 2000
	rrs-rev	TCG TTG CGG GAC TTA ACC CAA C	1117-1096	
<i>tetM</i>	tetM1	AGT GGA GCG ATT ACA GAA	301-318	Strommenger <i>et al.</i> , 2003
	tetM2	CAT ATG TCC TGG CGT GTC TA	459-440	

Tab. 8 Verwendete Primer (Fortsetzung)

Zielgen	Primer	Sequenz 5'→3'	Position	Referenz
<i>srt-1</i> (<i>bee</i> Locus)	Sor1L-for	GCC AAA GAT CCG GGT AAA GCC TAT TAT AAA GAG	6135-6167	Tendolkar <i>et al.</i> , 2006
	Sor1R-rev	CGG ACT AAG GTA AAA GTC ACG CCT GCT TTG GG	6784-6753	
	P101D12- 11-for	CCC AAA GCA GGC GTG ACT TTT ACC TTA GTC CG	6753-6784	
<i>srt-2</i> (<i>bee</i> Locus)	Sor2R-rev	GCC CAA TTT CAA ACG ATA GCA ATC CCC TGG	8032-8003	
<i>vanA</i>	VanA-for	CAT GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT A	130-154	Kariyama <i>et al.</i> , 2000; Clark <i>et al.</i> , 1993
	VanA-rev	CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT CAA	1159-1136	
<i>vanB</i>	VanB1/3-for	AAG CTA TGC AAG AAG CCA TG	148-167	Elsayed <i>et al.</i> , 2001
	VanB1/3-rev	CCG ACA ATC AAA TCA TCC TC	683-664	
<i>vanC1</i>	VanC1-for	GGT ATC AAG GAA ACC TC	246-272	Kariyama <i>et al.</i> , 2000; Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995
	VanC1-rev	CTT CCG CCA TCA TAG CT	1067-1051	
<i>vanC2/3</i>	VanC2/3-for	CGG GGA AGA TGG CAG TAT	350-367 (<i>vanC2</i>) 343-360 (<i>vanC3</i>)	Kariyama <i>et al.</i> , 2000; Satake <i>et al.</i> , 1997
	VanC2/3-rev	CGC AGG GAC GGT GAT TTT	833-816 (<i>vanC2</i>) 826-809 (<i>vanC3</i>)	
VNTR-1	VNTR1-for	CTG TGA TTT GGA GTT AGA TGG	jeweils VNTR- spezifische flankierende Region	Top <i>et al.</i> , 2004
	VNTR1-rev	CAT TGT CCA GTA GAA TTA GAT TTG		
VNTR-2	VNTR2-for	GAT GCT TAT TTC CAC TGC TTG TTG		
	VNTR2-rev	GTT TTA CCC TCT CTT TTA AGG TCA ATG		
VNTR-7	VNTR7-for	CTA TCA GTT TCA GCT ATT CCA TC		
	VNTR7-rev	CTG GTA CGA ATC AAA TCA AGT G		
VNTR-8	VNTR8-for	GGG GAG TGG CAA AAA ATA GTG TG		
	VNTR8-rev	CAG ATC ATC AAC TAT CAA CCG CTG		
VNTR-9	VNTR9-for	CTG CAT CTA ATA ACA AGG ACC CAT G		
	VNTR9-rev	ACA TTC CGA TTA ACG CGA AAT AAG		
VNTR-10	VNTR10-for	CCT ACA GAA AAT CCA GAC GG		
	VNTR10-rev	TTT TTT CCA TCC TCT TGA ATT G		

3.9 Bakterienstämme und Zellen

In Tab. 9 sind verwendete Referenz- bzw. Indikatorstämme sowie deren für diese Arbeit wichtigen Eigenschaften und Verwendungszwecke aufgeführt. Des Weiteren wurden zur Untersuchung der 80 *E. faecalis* Isolate aus Vaginalabstrichen bzgl. hemmender Effekte auf Milchsäurebakterien (siehe 3.11.5) neun *Lactobacillus* spp. Wildtypstämme, die aus Vaginalabstrichen isoliert wurden, verwendet.

Tab. 9 Verwendete Bakterienstämme und Zellen

Bakterienstamm / Zelllinie	Eigenschaft / Verwendungszweck	Referenz / Herkunft
<i>E. faecalis</i> V583	Van ^r , <i>vanB</i> ⁺ , GelE ⁺ , Genom vollständig sequenziert	Sahm <i>et al.</i> , 1989; Paulsen <i>et al.</i> , 2003; Tendolkar <i>et al.</i> , 2003
<i>E. faecalis</i> MMH594	<i>esp</i> ⁺ , <i>cylA</i> ⁺ , <i>asa1</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , GelE ⁺	Huycke <i>et al.</i> , 1991; Shankar <i>et al.</i> , 2002
<i>E. faecalis</i> DSM 2570 (ATCC 29212)	Kontrollstamm Antibiotikaresistenzprüfung	DSMZ Braunschweig
<i>E. faecalis</i> DSM 12956 (ATCC 51299)	Kontrollstamm Antibiotikaresistenzprüfung, HLR-Gm, HLR-Sm; <i>vanB</i> ⁺	DSMZ Braunschweig, Swenson <i>et al.</i> , 1995
<i>E. faecalis</i> JH2-2	Indikatorstamm Bacteriocin- Produktion; Plasmid-frei, Rif ^r , Fus ^r	Jacob & Hobbs, 1974
<i>E. faecalis</i> OG1X	Negativkontrolle Verklumpung, Pheromonproduzent, Sm ^r , GelE ⁻	Ike <i>et al.</i> , 1983
<i>E. faecalis</i> OG1X:pAD1	Positivkontrolle zum Nachweis des <i>asa1</i> Gens und Verklumpung	Tomich <i>et al.</i> , 1979; Francia <i>et al.</i> , 2001
<i>E. faecalis</i> OG1X:pAM373	Positivkontrolle zum Nachweis des <i>asa373</i> Gens und Verklumpung	Clewell <i>et al.</i> , 1985
<i>E. faecalis</i> OG1RF	starker BF-Bildner, Kontrollstamm BF- Assay, Plasmid-frei, Rif ^r , Fus ^r	Dunny <i>et al.</i> , 1978
<i>E. faecalis</i> T9	<i>asa1</i> ⁺ , <i>esp</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , sehr starker BF- Bildner, Kontrollstamm BF-Assay	Maekawa <i>et al.</i> , 1992; Hufnagel <i>et al.</i> , 2004
<i>E. faecium</i> BM4147	Van ^r , <i>vanA</i> ⁺ , Prototyp Tn 1546	Arthur <i>et al.</i> , 1993
<i>E. faecium</i> E155	Kontrollstamm MLVA	Bonten <i>et al.</i> , 1996; Van Wamel <i>et al.</i> , 2007
<i>E. faecium</i> E734	Positivkontrolle zum Nachweis des <i>hyl</i> Gens, Kontrollstamm MLVA	Bonten <i>et al.</i> , 1996; Willems <i>et al.</i> , 2001; Leavis <i>et al.</i> , 2004
<i>E. faecium</i> 64/3	Indikatorstamm Bacteriocin- Produktion; Plasmid-frei, Rif ^r , Fus ^r	RKI, Wernigerode
<i>L. acidophilus</i> DSM 20079 ^T (ATCC 4356)	Indikatorstamm Bacteriocin- Produktion	DSMZ Braunschweig, Johnson <i>et al.</i> , 1980
<i>L. crispatus</i> DSM 20584 ^T (ATCC 33820)	Indikatorstamm Bacteriocin- Produktion	DSMZ Braunschweig
<i>S. aureus</i> DSM 1104 (ATCC 25923)	Positivkontrolle DNase- und Lipase- Produktion	DSMZ Braunschweig
HeLa DSM ACC 57 (ATCC CCL 2)	Epithelzellen Cervix-Karzinom; Zellkultur Adhärenz-Assay	DSMZ Braunschweig, Scherer <i>et al.</i> , 1953

3.9.1 Kollektiv der Enterokokken-Isolate

Die in dieser Arbeit untersuchten Enterokokken-Stämme wurden aus klinischem Probenmaterial isoliert, das zur Untersuchung den bakteriologischen Abteilungen des Zentrallabors des Klinikums Kassel, eines medizinischen Diagnostiklabors in Kassel oder eines Labors in Göttingen zugesandt wurden. Diese Einrichtungen beziehen täglich eine Anzahl von mehreren hundert Proben nicht nur von Krankenhäusern, von niedergelassenen Ärzten, Betriebsmedizinern und Behörden aus dem Stadtgebiet Kassel bzw. Göttingen, sondern erhalten auch Material von Auftraggebern aus einem großen nord- und mittelhessischen sowie niedersächsischen Einzugsgebiet.

Insgesamt wurden 150 *E. faecalis* und 78 *E. faecium* aus verschiedenem humanen Probenmaterial sowie weitere 80 Isolate aus Vaginalabstrichen (40 Patientinnen mit BV und 40 Patientinnen ohne BV) untersucht, so dass ein möglichst breites Spektrum von Enterokokken-Isolaten aus unterschiedlichen klinischen Bereichen hinsichtlich der Fähigkeit zur Biofilm-Bildung getestet und miteinander verglichen werden konnte.

36 der insgesamt 64 untersuchten Stämme aus humanen Faeces wurden aus einem bestehenden Kollektiv der Arbeitsgruppe (Pairan, 2001) übernommen. Ferner wurden Isolate aus diversen Umweltproben in die Versuche integriert. Die Tab. 10 gibt eine Übersicht über alle in dieser Arbeit untersuchten Enterokokken-Stämme, weitere Angaben zur Herkunft oder zum Probenmaterial befinden sich in den Tab. 20 bis Tab. 33 des Anhangs.

Tab. 10 Übersicht zu Anzahl und Herkunft untersuchter Enterokokken-Isolate

Probenmaterial	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Faeces	37	27
Urin	44	10
Wunden	26	6
Invasiv ¹⁾	19	21
Umwelt ²⁾	4	11
Divers ³⁾	20	3
Vagina ⁴⁾	80	-

¹⁾ Aszites (6 Isolate), Abszess (2), Bauchpunktat (1), Bauchhöhle (operativ, 2), Blut (10), Galle (1), Hüftgewebe (operativ, 1), Liquor (1), Milz (1), Pankreas (1), Peritonitis (4), Pericard (1), Pleura (1), Perikutane endoskopische Gastrostomie (PEG, 2), Serom (1), Venenkatheterspitze (5)

²⁾ Boden (2), Geflügelkot (8), Rattenkot (2), Rinderkot (1), Gewässer (2)

³⁾ Penis (1), Vulva (1), Cervix (1), Rachen (1), Zahnabszess (1), Dialysewasser (1), Hoden (1), Vagina, unspezifisch (12), Gewebe (1), Totalendoprothese (TEP, 1), Trachealsekret (2)

⁴⁾ 40 Stämme von Patientinnen mit BV + 40 Stämme von Patientinnen ohne BV (Vergleichsgruppe)

Die Vaginalabstriche, aus denen die 80 in dieser Arbeit untersuchten *E. faecalis* isoliert wurden, wurden vom Diagnostiklabor routinemäßig auf das Vorhandensein von anderen aeroben Keimen, Anaerobiern, Pilzen, Mycoplasmen und Ureaplasmen sowie von Döderlein-Flora qualitativ bzw. semi-quantitativ untersucht (siehe Tab. 31 und Tab. 33 im Anhang).

Die Diagnose der Bakteriellen Vaginose erfolgte gemäß den Kriterien nach Amsel *et al.* (1983; siehe 1.4.2). Zusätzlich wurde der kulturelle Nachweis einer verringerten Anzahl von H₂O₂-produzierenden *Lactobacillus* spp. (TMB-Medium) zur Diagnose der BV herangezogen.

Der Nachweis von *Gardnerella vaginalis* galt als zusätzliches Anzeichen der Erkrankung, war für eine positive Diagnosestellung aber nicht zwingend erforderlich, da hierzu allein die oben angeführten Kriterien ausschlaggebend sind (siehe 1.4.2). Die Vergleichsgruppe setzte sich aus Enterokokken-Isolaten aus Vaginalabstrichen zusammen, deren Untersuchung einen negativen Befund bzgl. BV und allen anderen kulturellen Nachweisen (aerobes/anaerobes Wachstum, Pilze, Mycoplasmen/Ureaplasmen) lieferte, jedoch *E. faecalis* mäßig oder reichlich nachgewiesen wurden. Bei der überwiegenden Anzahl der Vergleichsgruppen-Proben konnte außerdem eine Döderlein-Flora nicht oder nur stark vermindert nachgewiesen werden.

3.9.2 Herstellung der Biofilm-Mutantenstämme

Die Erzeugung von Biofilm-Mutantenstämmen erfolgte in Anlehnung an eine von Christensen *et al.* (1987) beschriebene Methode zur kulturellen Selektion von Variantenstämmen von *S. epidermidis*. Bei dieser Bakterienspezies wurde mittels dieser Vorgehensweise ein stabiler, schwach Biofilm-bildender Stamm (RP62A-NA) aus einem pathogenen, sehr starken BF-Produzenten (RP62A, ATCC 35984) isoliert. Ein isolierter Stamm der zweiten Generation (RP62A-NAR) erlangte die Fähigkeit zur BF-Bildung zurück.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher erstmals diese Methodik angewandt, um Biofilm-Mutanten von *E. faecalis* herzustellen. Hierzu wurden aus dem vorliegenden Enterokokken-Kollektiv mehrere Isolate ausgewählt, die sich in bereits untersuchten Merkmalen bzgl. der genetischen Ausstattung und der Biofilm-Bildungsfähigkeit möglichst stark unterschieden. Biofilm-negative Isolate wurden in 5 ml TSBG (TSB + 1 % Glukose) ÜN bei 37°C im Reagenzglas kultiviert. Am folgenden Tag wurde die Kultur verworfen, das Gefäß dreimal vorsichtig mit 5 ml sterilem PBS-Puffer gewaschen und das mit frischem Medium befüllte Reagenzglas wiederum ÜN inkubiert. Dieses Vorgehen wurde täglich wiederholt, so dass nach mehreren Tagen ein Biofilm, der sich an der Wand des Reagenzglases gebildet hatte, zu erkennen war. Zur Überprüfung auf eine veränderte Biofilm-Bildungsfähigkeit wurde nach dem Waschschrift mit einem Glasstab etwas Bakterienmaterial von der Wand des Reagenzglases abgenommen und auf Blutagarmedium kultiviert. Nach erfolgter Inkubation (ÜN, 37°C) wurden gut separierte Einzelkolonien auf eine erhöhte Biofilm-Bildungsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp mittels Biofilm-Assays (siehe 3.11.6) untersucht.

Zur Erzeugung von Stämmen, die eine verringerte Fähigkeit zur Biofilm-Bildung hatten als der Wildtyp, wurden Isolate in 5 ml TSB ÜN bei 37°C im Reagenzglas inkubiert, am Folgetag bei geringer Geschwindigkeit zentrifugiert (500 g, 10 min) und aus dem Überstand 10 µl der Kultur in frisches Medium überimpft (ÜN, 37°C). Dieses Vorgehen wurde ebenfalls täglich wiederholt. Um den jeweiligen Stamm schließlich auf eine veränderte Fähigkeit zur Biofilm-Bildung hin zu überprüfen, wurde im Anschluss an die Zentrifugation ein Aliquot des

Kulturüberstands auf Blutagarmedium ausplattiert, ÜN inkubiert und am darauf folgenden Tag gut separierte Einzelkolonien mittels Biofilm-Assays (siehe 3.11.6) gescreent.

Die täglich überimpften Kulturansätze wurden in Abständen von jeweils ca. 7 Tagen auf veränderte Biofilm-Bildungsfähigkeit überprüft. Wenn solche Stämme isoliert werden konnten, wurden diese zunächst auf ihre Stabilität bezüglich der veränderten Fähigkeit zur Biofilm-Bildung untersucht, indem sie täglich erneut auf Blutagarmedium überimpft (mindestens 20mal) und im Anschluss nochmals mittels Biofilm-Assay getestet wurden.

3.10 Mikrobiologische Kultur- und Standardmethoden

3.10.1 Isolierung, Kultivierung und Stammhaltung der Stämme

Zur Isolierung von Enterokokken-Isolaten aus Faeces-Proben wurde etwas Stuhl-Material mit einer Einmal-Impföse auf KAA-Medium aufgebracht und ÜN bei 37°C inkubiert. Stämme aus anderem klinischen Material (Vaginalsekret, Urin, Wunden, Blut, Gewebe und andere Proben) wurden von den jeweiligen diagnostischen Laboren isoliert und in Abstrichtupfern oder auf Blutagarmedium zur Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Isolierte Enterokokken-Stämme wurden auf Blut- oder BHI-Agarplatten so oft (i.d.R. mehr als dreimal) überimpft, bis eine Reinkultur vorlag. Zur Stammhaltung wurden von jedem Enterokokken-Isolat Dauerkulturen hergestellt, indem eine sich in der späten log-Phase befindende Kultur in BHI-Bouillon 1:1 mit steriler Glycerin-Lösung (100 %) gemischt und bei -70°C bzw. -20°C gelagert wurde. Isolate, die momentan untersucht wurden, wurden auf Blut- oder BHI-Agarplatten ÜN bei 37°C kultiviert, bei +4°C gelagert und spätestens nach vier Wochen erneut überimpft bzw. aus den angelegten Dauerkulturen angezogen.

Lactobacillus spp. wurden auf MRS-Agarplatten oder in MRS-Bouillon bei 37°C und 5 % CO₂ im Anaerobentopf isoliert und kultiviert.

3.10.2 Biochemische Identifizierung

Die überwiegende Anzahl der aus dem verschiedenen Probenmaterial isolierten Enterokokken-Stämme wurde mit Hilfe des WalkAway96-Systems (Dade Behring) im Zentrallabor des Klinikums Kassel oder mittels des Vitek-Systems (bioMérieux, Nürtingen) im medizinisch-diagnostischen Labor Hülsmann-Becker (Kassel) identifiziert sowie deren Antibiotikaresistenzspektren erstellt. Diese Stämme wurden zur Bestätigung der Ergebnisse ggf. zunächst mittels Gram-Färbung u.a. biochemischer Tests und dem Identifizierungsschema nach Manero & Blanch (1999) untersucht. Mit Hilfe der Anwendung einer spezifischen PCR nach Kariyama *et al.* (2000; siehe 3.12.6.1) konnte die Genus- bzw. Spezies-Zugehörigkeit der Isolate bestimmt werden. Antibiotikaresistenzen wurden ggf. wie unter 3.10.3 beschrieben überprüft.

3.10.3 Antibiotikaresistenzbestimmungen

3.10.3.1 Agardiffusion

Resistenzbestimmungen mittels Agardiffusionsverfahren wurden nach der DIN-Vorschrift 58940 (Teil 3 mit Beiblatt 1) durchgeführt. Hierzu wurde eine Suspension des Teststammes in 0,9 %iger NaCl-Lösung entsprechend der Trübung eines McFarland Standards 0,5 hergestellt, diese 1:100 verdünnt und damit eine Iso-Sensitest- bzw. Mueller-Hinton-Agarplatte inokuliert ($1-5 \times 10^6$ KBE / ml). Nach Auflegen der Ab-Blättchen wurden die Platten 18 ± 2 h bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ bebrütet und durch Bestimmung der Hemmhofdurchmesser resistentes, intermediäres oder sensibles Verhalten des Isolats gegenüber getesteten Antibiotika ermittelt. Die Grenzwerte der Hemmhofdurchmesser zur Beurteilung des Resistenzverhaltens wurden der entsprechenden DIN-Vorschrift bzw. den Herstellerangaben (Oxoid, Wesel) entnommen. Als Kontrollstämme dienten *E. faecalis* ATCC 29212 und *E. faecalis* ATCC 51299.

3.10.3.2 Mikrodilution

Die Durchführung des Mikrodilutionsverfahrens erfolgte nach der DIN-Vorschrift 58940 (Teil 4 mit Beiblatt 1, Teil 8). 100 μl des Ab-haltigen Mediums in der Vertiefung einer Mikrotiterplatte wurden mit einer mittels McFarland Standard hergestellten Teststamm-Suspension angeimpft (Inokulum: $1-5 \times 10^5$ KBE / ml) und 20 ± 2 h bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ bebrütet. Beurteilung von resistentem, intermediärem oder sensiblem Verhalten des Isolats gegenüber getesteten Antibiotika erfolgte gemäß der in der entsprechenden DIN-Vorschrift aufgeführten Grenzwerte. *E. faecalis* ATCC 29212 und *E. faecalis* ATCC 51299 wurden stets als Kontrollstämme mitgeführt.

3.10.4 Verwertung verschiedener Substrate

Die hergestellten Biofilm-Mutanten und ihre Wildtypstämme wurden mittels API 50 CH-Testsystem nach Angaben des Herstellers auf die Verwertung von 49 verschiedenen Kohlenhydratsubstraten untersucht, um eventuelle Unterschiede in deren stoffwechselphysiologischen Eigenschaften zu erkennen. Die mit Bakteriensuspension beimpften Teststreifen wurden nach 24 h und nach 48 h Inkubation bei 37°C ausgewertet und die Ergebnisse mittels BioNumerics Software 2.5 (MRI, Karlsruhe) ausgewertet. Die Analyse zur Gruppierung (Clustern) der Isolate erfolgte mittels des Dice-Koeffizienten.

3.10.5 Wachstumsverhalten

Um mögliche Auswirkungen der Mutation auf das Wachstumsverhalten zu untersuchen, wurden Wachstumskurven der hergestellten Biofilm-Mutanten und ihrer Wildtypstämme erstellt. Dazu wurden die Teststämme aus einer Vorkultur in 50 ml TSBG angeimpft (Startinokulum $OD_{600} \sim 0,05$) und bei 37°C und 100 rpm inkubiert. In einem Zeitraum von 8,5 h wurde in Abständen von 20 min die OD_{600} bestimmt.

3.11 Methoden zum phänotypischen Nachweis von Virulenzfaktoren und Biofilm-Bildung

3.11.1 Gelatinase-Produktion

Der Nachweis, ob die Teststämme die Fähigkeit zum Gelatine-Abbau besitzen, wurde mittels einer Methode nach Vergis *et al.* (2002) erbracht. Hierzu wurden die Isolate auf die klaren Gelatine-Agarplatten strichförmig aufgeimpft und 24 h bei 37°C bebrütet. Die bewachsenen Platten wurden am nächsten Tag für ca. 3 h bei 4°C gekühlt und anschließend ausgewertet. Gelatinase-Produktion zeigt sich durch Bildung eines trüben Hofes um die Wuchszone. Als Positivkontrollen dienten die Stämme *E. faecalis* MMH594 oder *E. faecalis* V583, Negativkontrolle war *E. faecium* 64/3.

3.11.2 β -Hämolyse

Die Fähigkeit zum vollständigen Abbau von Erythrozyten wurde untersucht, indem die Isolate strichförmig auf Blutagarplatten (5-10 % Pferdeblut) aufgeimpft und für 48 h bei 37°C und 8-10 % CO_2 -Gehalt im Anaerobentopf bebrütet wurden. β -Hämolyse zeigt sich durch Aufhellung des Agars um die Wuchszone. Als Positivkontrolle diente *E. faecalis* ATCC 29212, Negativkontrolle war *E. faecium* 64/3.

3.11.3 Verklumpung

Der phänotypische Nachweis von Aggregationssubstanz wurde nach Dunny *et al.* (1978) durchgeführt. Der Überstand einer ÜN-Kultur (50 ml THB, 37°C) des Pheromonproduzenten *E. faecalis* OG1X wurde autoklaviert (15 min) und im Verhältnis 1:5 mit frischem THB-Medium verdünnt. 2,5 ml dieses pheromonhaltigen Mediums wurden dann mit 25 μ l (1 %) einer ÜN-Kultur des Teststamms (THB, 37°C) angeimpft, bei 37°C und ca. 80 rpm inkubiert und stündlich auf Aggregat-Bildung kontrolliert. Als Negativkontrolle wurde *E. faecalis* OG1X, als Positivkontrolle OG1X:pAD1 verwendet, außerdem wurde von jedem Stamm ein weiterer Ansatz als Kontrolle auf konstitutive Verklumpung in THB-Medium ohne pheromonhaltigem Überstand angeimpft.

3.11.4 DNase-, Lipase- und H₂O₂-Produktion

Der Nachweis zur Produktion von DNase wurde entsprechend den Herstellerangaben mittels DNase-Agar der Firma BD Diagnostics (Heidelberg) geführt. Nach punktförmiger Beimpfung der Teststämmen wurden die Platten für 48 h bei 37°C bebrütet, dann mit 1 M HCl beflutet und ca. 5 min bei RT inkubiert. DNase-Produktion zeigt sich im trüb gewordenen Agar durch klare Höfe um die Beimpfungszone, da die im Agar noch vorhandene DNA durch Behandlung mit Salzsäure ausfällt. Als Positivkontrolle diente *S. aureus* ATCC 25923.

Lipase-Produktion wurde durch strichförmiges Aufimpfen der Teststämmen auf Tributyrat-Agar nachgewiesen. Nach bis zu fünftägiger Inkubation bei 37°C zeigt sich eine Lipolyse als klarer Hof um den Teststammausstrich. Die Platten wurden täglich begutachtet, da bereits nach einem Tag bei positivem Ergebnis Aufhellung beobachtet werden kann. Als Positivkontrolle wurde stets *S. aureus* ATCC 25923 mitgeführt.

Die Produktion von Wasserstoffperoxid wurde mittels Ausstrich der Teststämmen auf TMB-Medium nach Eschenbach *et al.* (1989) getestet. Nach Inkubation für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ zeigen H₂O₂-produzierende Stämme auf dem hell-cremigen Agar dunkelblaue Kolonien. Dies ist auf einen blauen Farbkomplex zurückzuführen, der sich durch Umwandlung des TMB (chromogenes Substrat der Peroxidase) bildet, wenn die im Agar ebenfalls enthaltene Peroxidase in Anwesenheit von H₂O₂ TMB oxidiert. Da die Peroxidase sehr instabil ist, müssen die Platten spätestens 48 h nach der Herstellung verwendet werden. Als Positivkontrolle diente *E. faecalis* OG1RF.

3.11.5 Bacteriocin-Bildung

Zur Untersuchung von Bacteriocin-Bildung der Enterokokken gegenüber den zwei Indikatorstämmen *E. faecalis* JH2-2 und *E. faecium* 64/3 wurde eine Kolonie des Teststammes auf eine BHI-Agarplatte, die zuvor mit einer Suspension des Indikatorstammes beimpft worden war, punktförmig aufgetragen und nach einer Inkubation von 24 h bei 37°C entstandene Hemmhof beurteilt. Die Indikatorstämmen wurden zuvor in 5 ml BHI-Bouillon für 2 h bei 37°C angezogen, in 0,9 %iger NaCl-Lösung 1:100 verdünnt und auf eine BHI-Agarplatte gegeben. Die entstandenen Hemmhöfe wurden mit + (≤ 1 mm), ++ (2-4 mm) und +++ (> 4 mm) beurteilt (Klare *et al.*, 2005; RKI, persönliche Mitteilung).

Die Untersuchung hemmender Effekte von Enterokokken aus Vaginalabstrichen gegenüber *Lactobacillus* spp. wurde in Anlehnung an Mayr-Harting *et al.* (1972) durchgeführt. Hierzu wurden 2 µl einer ÜN-Kultur (MRS, 37°C) der *E. faecalis* Teststämmen auf eine MRS-Agarplatte gegeben. Nach kurzem Einziehen der Bakteriensuspension wurde die beimpfte Platte mit 5 ml MRS-Weichagar (0,8 %), dem 100 µl einer ÜN-Kultur des *Lactobacillus* spp. Indikatorstammes zugegeben wurde, übergossen und nach Aushärtung 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.11.6 Biofilm-Bildung

Die Fähigkeit der Enterokokken-Isolate, Biofilme auf abiotischen Oberflächen zu bilden, wurde mittels eines semi-quantitativen Assays nach Christensen *et al.* (1985) untersucht. Hierzu wurden 20 µl einer ÜN-Kultur des Teststamms in TSBG zu 180 µl frischem Medium (1:10 Verdünnung) in eine Vertiefung einer 96well-Mikrotiterplatte gegeben und für 18 h bei 37°C in einer Plastikwanne mit feuchten Zellstofftüchern (Verdunstungsschutz) inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und der Biofilm vorsichtig dreimal mit PBS-Puffer mit Hilfe eines ELISA-Washers (Sigma, Deisenhofen) gewaschen, um alle freien Zellen zu entfernen. Zur Fixierung des Biofilms wurde eine Trocknung bei 60°C für 1 h durchgeführt. Es folgte eine Anfärbung des Biofilms für 3 min mit 100 µl Hucker's Crystal Violet-Lösung (2 %). Die Platten wurden unter fließendem Leitungswasser gut abgespült und 10 min bei 60°C getrocknet (Baldassarri *et al.*, 2001). Anschließend erfolgte eine OD-Messung des angefärbten Biofilms bei 595 nm (Fusion α, Packard Biosciences, jetzt Perkin-Elmer; Abteilung Biochemie / Universität Kassel). Der Assay wurde pro Teststamm mindestens dreimal mit jeweils vier Replikaten durchgeführt und die Mittelwerte berechnet. Diese wurden wie folgt bewertet:

$OD_{595} < 0,120$	kein BF-Bildner
$0,120 \leq OD_{595} \leq 0,240$	schwacher BF-Bildner
$OD_{595} > 0,240$	starker BF-Bildner

Auf jeder Platte wurden stets die Stämme *E. faecalis* T9 (sehr starker BF-Bildner, $OD_{595} = 1,20 \pm 0,230$; Baldassarri *et al.*, 2005b), *E. faecalis* OG1RF (starker BF-Bildner, $OD_{595} \sim 0,3$) und *E. faecium* 64/3 (kein BF-Bildner, $OD_{595} \sim 0,003$) sowie Negativwerte (nur Medium) als Kontrollen mitgetestet.

3.11.7 Primäre Anheftung an abiotische Oberflächen

Zur Untersuchung der Wildtyp- und BF-Mutantenstämme wurde deren Fähigkeit zur primären Anheftung an abiotische Oberflächen getestet (Van Wamel *et al.*, 2007; Hufnagel *et al.*, 2004). Eine ÜN-Vorkultur des Teststamms (TSBG, 37°C) wurde auf eine $OD_{595} = 0,1$ in Medium eingestellt und 200 µl dieser Bakteriensuspension in jeweils eine Vertiefung einer 96well-Mikrotiterplatte gegeben. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37°C wurde das Medium entfernt, die Wells vorsichtig dreimal mit PBS-Puffer gewaschen, fixiert und angefärbt wie unter 3.11.6 beschrieben, sowie anschließend mittels OD_{595} -Messung (Fusion α; Abteilung Biochemie / Universität Kassel) ausgewertet. Der Assay wurde pro Teststamm in unabhängigen Ansätzen fünfmal mit je zwölf Replikaten wiederholt.

3.11.8 Hydrophobizität der Zelloberfläche

Mittels eines Hydrophobizitätstests (Tendolkar *et al.*, 2005) unter Verwendung von n-Hexadecan wurde untersucht, ob sich die Zelloberflächen von Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen in ihrer Hydrophobizität unterscheiden. Hierzu wurden die Teststämme in 5 ml TSBG ÜN bei 37°C angezogen, im Verhältnis 1:50 in Medium verdünnt und 4 h bis zum Erreichen der log-Phase der Kultur inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen zweimal mit PUM-Puffer gewaschen und auf eine $OD_{400} = 1,0$ eingestellt. Zu 3 ml dieser eingestellten Zellsuspension wurden 300 µl n-Hexadecan (1:10) zugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze ca. 2 min gut durchmischt (Vortex) und 15 min bei RT stengelassen, bis eine vollständige Phasentrennung eingetreten war. Mit einer Kanüle wurde vorsichtig, ohne eine Kontamination durch die organische obere Phase zu erhalten, ein Teil der unteren wässrigen Phase abgezogen, in eine Einmalküvette überführt und die OD_{400} gegen PUM-Puffer gemessen. Die Berechnung der Hydrophobizität erfolgte nach:

$$\% \text{ Hydrophobizität} = [1 - OD_{400} \text{ Endwert} / OD_{400} \text{ Startwert (ca. 1,0)}] \times 100$$

Der Assay wurde pro Teststamm viermal in unabhängigen Ansätzen wiederholt.

3.11.9 Adhärenz an HeLa-Zellen

Um zu untersuchen, ob sich die Eigenschaft zur Anheftung an eukaryontische Zellen zwischen Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen verändert hat, wurde ein Adhärenz-Assay durchgeführt (Baldassarri *et al.*, 2005b; Saringen *et al.*, 2000). Hierzu wurden HeLa-Zellen, welche Epithelzellen eines humanen Cervix-Karzinoms sind (Scherer *et al.*, 1953), verwendet, da die Wildtypstämmen von *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen isoliert wurden. HeLa-Zellen wachsen in Monolayern und erreichen schnell Konfluenz. Die HeLa-Zellen wurden in 24well-Zellkulturplatten (BD Diagnostics, Heidelberg) in Medium (Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) + 10 % Fetal Calf Serum (FCS), PAA Laboratories) mehrere Tage bei 37°C und 5 % CO_2 angezogen, bis eine Zellzahl von ca. 10^5 pro Vertiefung erreicht war. Die Anzucht dieser Zellen erfolgte in der Abteilung Biochemie / Universität Kassel.

Jeder Teststamm wurde in TSBG bei 37°C angezogen, für 15 min bei ca. 2000 rpm abzentrifugiert, in PBS-Puffer gewaschen und die Zellzahl in DMEM + FCS photometrisch auf 10^7 Bakterien / ml eingestellt. Nach Entfernen des Mediums wurde 1 ml der eingestellten Bakteriensuspension in Zellkulturmedium in je ein Well mit HeLa-Zellen gegeben (Ratio 100:1) und 1 h bei 37°C inkubiert. Die exakte Bakterienzellzahl der Inokula wurde durch Ausplattieren auf BHI-Agarplatten nach Anlegen von Verdünnungsreihen in PBS-Puffer bestimmt (je drei Replikate). Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension

entfernt und der Monolayer dreimal mit sterilem PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen, um alle nicht an die HeLa-Zellen adhärenen Bakterien zu entfernen. Nach Zugabe von 1 ml Lyse-Puffer (PBS + 0,5 % Triton X-100) und Inkubation für 10 min bei 37°C wurden die lysierten Zellen gut aus den Vertiefungen abgelöst, jeweils Verdünnungsreihen in PBS-Puffer angelegt, entsprechende Verdünnungsstufen auf BHI-Agar ausplattiert und ÜN bei 37°C bebrütet. Der Anteil an adhärenen Bakterien wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Adhärenz} = (\text{KBE adhärenen Bakterien} \times 100) / \text{KBE Inokulum}$$

Es wurden drei unabhängige Ansätze mit jeweils drei Replikaten pro Teststamm durchgeführt.

3.12 Molekularbiologische Methoden

3.12.1 Präparation der Gesamt-DNA zum Einsatz in die PCR

Die Extraktion der Gesamt-DNA wurde in Anlehnung an Top *et al.* (2004) durchgeführt. Hierzu wurden 3 – 4 Kolonien des Teststamms in 20 µl eines Lyse-Puffers (0,25 % SDS, 0,05 M NaOH) suspendiert und für 5 min bei 95°C erhitzt. Nach anschließender Zugabe von 150 µl Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 8,5) wurde der Ansatz für 5 min bei 16 000 g abzentrifugiert, um die Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Von dieser DNA-Lösung wurde jeweils 2,5 µl pro 25 µl PCR-Ansatz eingesetzt.

3.12.2 Gesamt-DNA-Extraktion

2 ml einer ÜN-Kultur des Teststamms wurden abzentrifugiert (12 000 g, 4°C, 5 min) und 0,5 g Silicatperlen (Ø 0,17-0,18 mm) sowie 500 µl Natriumphosphat-Puffer und 100 µl SDS-Lösung (10 %) zum Pellet gegeben. Im Anschluss an den mechanischen Zellaufschluss (FastPrep: 35 s, 5 m/s) wurde die Probe zur Pelletierung von Zelltrümmern abzentrifugiert (12 000 g, 4°C, 10 min) und der Überstand bzw. die obere wässrige Phase im Verhältnis 1:1 mit Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) zur Entfernung von Proteinen versetzt, kurz geschüttelt und zentrifugiert (12 000 g, 4°C, 2 min). Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, nach der ersten Reinigung wurde 1 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Fällung wurde der DNA-haltige Überstand mit 2,5 VT EtOH (100 %) und 0,1 VT Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5,5) versetzt und ÜN bei -20°C gelagert. Am folgenden Tag wurde das Präzipitat zentrifugiert (12 000 g, 4 °C, 15 min), das DNA-Pellet getrocknet (Speed-Vac, 10 min) und in 50 µl Tris/HCl-Lösung (10 mM, pH 8,0) gelöst. Die DNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

3.12.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Extraktion von Plasmid-DNA zur Untersuchung der Biofilm-Mutantenstämme erfolgte mittels des Plasmid Isolation Midi Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers mit folgenden Modifikationen. Der Teststamm wurde in 100 ml MRS-Bouillon angeimpft (1 %) und für 20 h bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde 15 min bei 3000 g zentrifugiert und das Pellet mit 20 ml Puffer (TE + 0,5 % NaCl) gewaschen. Nach Resuspension des Pellets in 4 ml TERMLS-Puffer erfolgte zur Zell-Lyse eine Inkubation bei 37°C für ca. 2 h. Anschließend wurden 4 ml P2-Puffer zugegeben, durch vier- bis sechsmaliges, vorsichtiges Invertieren der Probe gemischt und bei RT für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml gekühltem Puffer P3 und kurzem Mischen wurde der Ansatz 15 min auf Eis gelagert und schließlich 30 min bei 20 000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals in ein neues Gefäß überführt und erneut bei 20 000 g zentrifugiert (15 min). Nachdem eine Qiagen-Midi-Säule (Tip 100) mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert wurde, konnte der Plasmid-DNA-haltige Überstand zur Reinigung sofort auf die Säule gegeben werden. Die beladenen Säulen wurden zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA schließlich in 5 ml auf 50°C vorgewärmten Puffer QF eluiert. Nach Zugabe von 0,7 VT Isopropanol erfolgte die Fällung der Plasmid-DNA während einer Zentrifugation bei 15 000 g für 45 min (4°C). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, das Pellet mit 70 %igem EtOH (3 ml, 15 min) gewaschen und schließlich bei RT getrocknet. Nach Lösen des Pellets in 50 µl Tris/HCl (10 mM, pH 8,0) wurde die Plasmid-DNA bei 4°C gelagert.

3.12.4 Restriktion von Plasmid-DNA

Die präparierte Plasmid-DNA der Wildtyp- und Mutantenstämme wurde zur Analyse mittels Restriktionsendonukleasen des Typs II in spezifische Fragmente gespalten. Restriktionsenzyme dieser Art erkennen spezifische, palindromische Sequenzen (Tetra- bis Hexanukleotide) und katalysieren eine hydrolytische Spaltung des DNA-Phosphatgerüsts innerhalb dieser Erkennungssequenz, so dass dabei charakteristische 3'- oder 5'-Überhänge („sticky ends“) oder glatte Enden („blunt ends“) entstehen können. In Abhängigkeit von der DNA-Menge sollte dem Ansatz 1 U des Enzyms pro 1 µg DNA sowie die entsprechende Menge des spezifischen, den für das Enzym die optimale Salzkonzentration einstellenden Spaltungspuffers zugegeben werden. Die Inkubation erfolgt bei der für das jeweilige Enzym empfohlenen Temperatur. Bei Restriktionen mehrerer Enzyme pro Ansatz müssen Puffer- und Inkubationsbedingungen entsprechend angepasst werden.

Es wurde eine Doppelrestriktion der Plasmid-DNA mit den zwei Enzymen *EcoRI* (Erkennungssequenz: GAATTC) und *HindIII* (Erkennungssequenz: AAGCTT) nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Ansatz je 20 μ l	
Plasmid-DNA	5-10 μ g
<i>EcoRI</i> und <i>HindIII</i> (10 U/ μ l)	je 0,5-1 μ l
Puffer (MBI, 10 x)	2 μ l
DNase- / RNase-freies Wasser	ad 20 μ l
Inkubation: 37°C / 3 h	

3.12.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde ein Aliquot der Lösung in eine Quarzküvette überführt und die Extinktion bei 260 nm gemessen, da die einzelnen Nukleotide der DNA Absorptionsmaxima zwischen 253 nm und 271 nm (pH 7,0) aufweisen.

Folgende Näherungswerte lagen der Konzentrationsbestimmung zugrunde:

$$1 E_{260} \text{ dsDNA entspricht } 50 \mu\text{g/ml}$$

$$1 E_{260} \text{ ssDNA entspricht } 33 \mu\text{g/ml}$$

Verunreinigungen wurden durch Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm mit anschließender Bildung des Quotienten E_{260} / E_{280} festgestellt. Dabei gelten die Richtwerte (Mülhardt, 2003):

$E_{260} / E_{280} < 1,8$: mögliche Kontamination mit Proteinen und aromatischen Substanzen

$E_{260} / E_{280} < 2,0$: mögliche Kontamination der Probe mit RNA

3.12.6 Nachweis spezifischer Gen-Abschnitte mittels PCR

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) können gezielt einzelne DNA-Fragmente amplifiziert werden. Somit bietet diese Methode die Möglichkeit, bestimmte Gene im Genom eines zu untersuchenden MO nachzuweisen. Das Enzym DNA-Polymerase initiiert die Elongation am 3'-Ende einer kurzen Nukleotidsequenz (Primer), die mit der Ziel-DNA (Template) hybridisiert. Die Ziel-DNA dient somit als Matrize während der PCR, in der die DNA-Polymerase in Anwesenheit von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) das von den Primern (forward und revers) flankierte DNA-Fragment synthetisiert. Bei Ablauf der PCR wird in mehreren Zyklen zunächst bei ca. 95°C die DNA in Einzelstränge getrennt (denaturiert), so dass dann die Primer bei einer für sie spezifischen Temperatur mit der Ziel-Sequenz hybridisieren können (Annealing) und schließlich die Synthese des zu amplifizierenden DNA-Strangs bei 72°C erfolgen kann (Elongation).

Wird anstelle von nur einem mit mehreren Primerpaaren gearbeitet (Multiplex-PCR), ist es insbesondere wichtig, die verwendeten Primer so zu designen, dass sie nicht miteinander hybridisieren können, die Annealing-Temperaturen annähernd gleich sind und die nachzuweisenden Zielsequenzen nicht überlagern. Die in dieser Arbeit durchgeführten Multiplex-PCRs (Kariyama *et al.*, 2000; Vankerckhoven *et al.*, 2004) sind bereits etablierte Verfahren, die von den Autoren in ihrer Durchführung optimiert wurden.

Die hier angewandten PCRs wurden zunächst unter in der Literatur angegebenen Bedingungen auf Funktionalität und Reproduzierbarkeit mittels Referenzstämmen getestet. Alle PCR-Nachweise dieser Arbeit wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter sterilen Bedingungen und mit gefilterten Pipettenspitzen in DNase-/RNase-freien Reaktionsgefäßen durchgeführt. Jeder PCR-Ansatz beinhaltete eine Positivkontrolle sowie eine Negativkontrolle (ohne DNA-Template). Zum Einsatz kamen vornehmlich verschiedene kommerziell verfügbare *Taq*-Polymerasen sowie eine nach etablierten Protokollen (Engelke *et al.*, 1990; Pluthero, 1993) in der Arbeitsgruppe selbst hergestellte *Taq*-Polymerase, die keinerlei Nachteile gegenüber kommerziell erhältlichen Enzymen zeigte und deren Anwendung zuvor jeweils in mehreren Testläufen geprüft wurde. Als Template wurden pro PCR-Ansatz entweder 100 ng der wie unter 3.12.2 beschriebenen aufgereinigten GesamtdNA verwendet oder 2,5 µl der Schnellpräparation (3.12.1).

3.12.6.1 Multiplex-PCR der Vancomycin-Resistenzgene

Zum Nachweis verschiedener Vancomycin-Resistenzgene wurde eine von Kariyama *et al.* (2000) beschriebene Multiplex-PCR durchgeführt, bei der Primerpaare zum Einsatz kommen, mittels derer der gleichzeitige Nachweis von *vanA*, *vanB*, *vanC1* und *vanC2/C3* möglich ist. Des Weiteren sind Spezies-spezifische Primerpaare zum Nachweis von *E. faecalis* (*ddl_{E.fc}* Gen, welches für eine spezifische D-Alanin-D-Alanin Ligase codiert) und *E. faecium* (Cheng *et al.*, 1997) im Ansatz vorhanden. Gleichzeitig liefert die Detektion von *vanC1* bzw. *vanC2* den Spezies-spezifischen Nachweis für *E. gallinarum* bzw. *E. casseliflavus*. Außerdem beinhaltet der Ansatz Primer zur Amplifikation eines konservierten Bereiches der 16S rRNA (*rrs*) zur internen PCR-Kontrolle, was sich in früheren Studien (Rosenstraus *et al.*, 1998; Dutka-Malen *et al.*, 1995) für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse als sehr wichtig erwiesen hat. Der Nachweis von *vanB* wurde allerdings mit von Elsayed *et al.* (2001) verbesserten Primerpaaren, die alle Subtypen (*vanB1*, *vanB2*, *vanB3*) detektieren, sowie daraufhin optimierten Primer-Konzentrationen im Ansatz durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden *E. faecium* BM4147 (*vanA*), *E. faecalis* ATCC 51299 (*vanB*) sowie Wildtypstämme von *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* (Pairan, 2001) mitgeführt.

PCR-Ansatz 25 µl		PCR-Cyclerprogramm		
Puffer (MBI)	1x	initiale Denaturierung	94°C	5 min
dNTPs	je 0,2 mM		94°C	1 min
MgCl ₂	1,5 mM	35 Zyklen	54°C	1 min
Primer-Mix*	0,05-0,5 µM		72°C	1 min
Taq-Polymerase	0,625 U	finale Elongation	72°C	10 min
Elektrophorese: 1,5 %iges Agarosegel (TAE)				
*je 0,5 µM: VanA-for/VanA-rev (1031 bp), E.fc-for/E.fc-rev (941 bp) und je 0,1 µM: VanC1-for/VanC1-rev (822 bp), VanC2/3-for/VanC2/3-rev (484 bp), rrs-for/rrs-rev (320 bp) und je 0,05 µM: VanB1-3-for/VanB1-3-rev (536 bp), E.fm-for/E.fm-rev (658 bp)				

3.12.6.2 Multiplex-PCR der Virulenzfaktoren-Gene

Diese von Vankerckhoven *et al.* (2004) entwickelte und optimierte Multiplex-PCR ist ein einfaches und schnelles Verfahren zum gleichzeitigen Nachweis von fünf Genen, die wichtige Virulenzfaktoren bei *E. faecalis* bzw. *E. faecium* codieren. Der Primer-Mix enthält Primerpaare zur Amplifikation bestimmter Abschnitte der Gene für das Cytolysin (Aktivator, *cyIA*), die Aggregationssubstanz Asa1 (*asa1*), das Enterococcal Surface Protein (*esp*), die Hyaluronidase (*hyl*) und die Gelatinase (*gelE*). Mittels des hier eingesetzten Primerpaars für das *esp* Gen wird ein konservierter Bereich, der für den N-Terminus des Proteins codiert, amplifiziert, so dass der Nachweis sowohl für *E. faecalis* als auch für *E. faecium* angewandt werden kann. Als Positivkontrollen dienten *E. faecalis* MMH594 (*cyIA*⁺, *asa1*⁺, *esp*⁺, *gelE*⁺) und *E. faecium* E734 (*esp*⁺, *hyl*⁺).

PCR-Ansatz 25 µl		PCR-Cyclerprogramm		
Puffer (MBI)	1x	initiale Denaturierung	95°C	5 min
dNTPs	je 0,2 mM		94°C	1 min
MgCl ₂	2,5 mM	30 Zyklen	56°C	1 min
Primer-Mix*	0,1-0,2 µM		72°C	1 min
Taq-Polymerase	2,5 U	finale Elongation	72°C	10 min
Elektrophorese: 2 %iges Agarosegel (TAE)				
*je 0,1 µM: ASA11/ASA12 (375 bp), GEL11/GEL12 (213 bp), HYLn1/HYLn2 (267 bp) und je 0,2 µM: CYT-I/CYT-IIb (688 bp), ESP14F/ESP12R (510 bp)				

3.12.6.3 PCR-Nachweis der Gene *asa373* und *ef0591*

Mittels spezifischer Primerpaare wurde ein Bereich des für die Aggregationssubstanz Asa373 codierenden Gens (*asa373*) gemäß dem PCR-Protokoll (Creti *et al.*, 2004) in der unten aufgeführten Tabelle amplifiziert. Gleiche Durchführung wurde zum Nachweis des Gens *ef0591* (Paulsen *et al.*, 2003) verwendet, welches für ein noch nicht charakterisiertes, putatives Oberflächenprotein codiert (Creti *et al.*, 2004). Als Positivkontrollen wurden *E. faecalis* OG1X:pAM373 (*asa373*⁺) und *E. faecalis* MMH594 (*ef0591*⁺) mitgeführt.

PCR-Ansatz 25 µl		PCR-Cyclerprogramm		
Puffer (MBI)	1x	initiale Denaturierung	95°C	5 min
dNTPs	je 0,2 mM	30 Zyklen	94°C	1 min
MgCl ₂	2 mM		58°C	1 min
Primer*	je 0,4 µM		72°C	1 min
Taq-Polymerase	1 U	finale Elongation	72°C	10 min
Elektrophorese: 1,5 %iges Agarosegel (TAE)				
*asa373-for/asa373-rev (619 bp) bzw. EF0591-for/EF0591-rev (844 bp)				

3.12.6.4 PCR-Nachweis des Gens *ebpA*

Die Amplifikation von *ebpA*, welches ein Gen des *ebp* Operons ist und für ein Pili-Protein bei *E. faecalis* codiert (Nallapareddy *et al.*, 2006), wurde nach dem unten angegebenen PCR-Protokoll durchgeführt. Dieses Primerpaar wurde ebenfalls für den entsprechenden Nachweis des Transkripts mittels RT-PCR verwendet (siehe 3.12.13). Positivkontrolle war der Stamm *E. faecalis* OG1RF.

PCR-Ansatz 25 µl		PCR-Cyclerprogramm		
Puffer (MBI)	1x	initiale Denaturierung	95°C	5 min
dNTPs	je 0,2 mM	30 Zyklen	94°C	1 min
MgCl ₂	2,5 mM		57°C	1 min
Primer*	je 0,4 µM		72°C	1 min
Taq-Polymerase	1 U	finale Elongation	72°C	10 min
Elektrophorese: 2,5 %iges Agarosegel (TAE)				
*EF1091MF1/EF1091MR1 (302 bp)				

3.12.6.5 PCR-Nachweis der Gene des *bee* Locus

Die 150 *E. faecalis* aus verschiedenen klinischen Bereichen (siehe 4.1.1) sowie die 80 Stämme aus Vaginalabstrichen (siehe 4.3.1) wurden auf die Anwesenheit des *bee* Locus mit Hilfe der PCR unter Verwendung der Primer P101D12-1-for und P101D12-2-rev (*bee1-3*) nach Tendolkar *et al.* (2006) wie folgt tabellarisch aufgeführt untersucht.

PCR-Ansatz 25 µl		PCR-Cyclerprogramm		
Puffer (MBI)	1x	initiale Denaturierung	95°C	5 min
dNTPs	je 0,2 mM	30 Zyklen	94°C	1 min
MgCl ₂	2,5 mM		53°C	1 min
Primer*	je 0,5 µM		72°C	2 min
Taq-Polymerase	1 U	finale Elongation	72°C	10 min
Elektrophorese: 1 %- bzw. 2 %iges Agarosegel (TAE)				
*P101D12-2-for/P101D12-1-rev (1398 bp) oder Bee12-for/P101D12-1-rev (539 bp)				

Zur Analyse des Stamms *E. faecalis* 1.10 und dessen BF-Mutante 1.10.16 wurden weitere PCR- und RT-PCR-Nachweise (3.12.13) sowie nachfolgende Sequenzierungen (3.12.9) bzgl. dieses Locus durchgeführt. Hierbei kamen zum einen eigens designte Primer zur Amplifizierung eines Teilbereichs des *bee1* Gens (*bee1-for2267* / *bee1-rev3182* (1016 bp), PCR-Ansatz wie oben mit 54°C Annealing-Temperatur) zum Einsatz, zum anderen wurden

verschiedene Primerkombinationen zur PCR bestimmter Bereiche der *srt-1* und *srt-2* Gene verwendet (Sor1L-for / Sor1R-rev (650 bp), PCR-Ansatz wie oben mit 58°C Annealing-Temperatur und 1 min Elongation; P101D12-11-for / Sor2R-rev (1280 bp) und Sor1L-for / Sor2R-rev (1898 bp), beide PCR-Ansätze wie oben mit 58°C Annealing).

3.12.6.6 PCR-Nachweis des Gens *ace*

Diese PCR diente zum einen des Nachweises des *ace* Gens, zum anderen der Bestimmung der Anzahl der Tandemrepeats der B-Domäne (Nallapareddy *et al.*, 2000a). Bei der Durchführung gemäß unten aufgeführter Tabellenangaben dienten die Stämme *E. faecalis* OG1RF (5,4 B-Repeats), *E. faecalis* JH2-2 (2,4 B-Repeats) oder *E. faecalis* V583 (4,4 B-Repeats) als Positivkontrollen.

PCR-Ansatz 25 µl		PCR-Cyclerprogramm	
Puffer (MBI) 1x dNTPs je 0,2 mM MgCl ₂ 1,5 mM Primer* je 0,5 µM Taq-Polymerase 1 U		initiale Denaturierung	94°C 4 min
		15 Zyklen TD	94°C 30 s
			70°C–1°C 1 min
			72°C 2 min 30 s
		25 Zyklen	94°C 30 s
55°C 1 min			
	72°C 2 min 30 s		
	finale Elongation	72°C 5 min	
Elektrophorese: 1,5-1,8 %iges Agarosegel (TAE)			
*aceB-for/aceB-rev (bp variabel)			

3.12.6.7 PCR-Nachweis der A- und C-Repeats des *esp* Gens

Anzahl der A-Repeats des *esp* Gens von *E. faecalis* und *E. faecium*

Nach Shankar *et al.* (1999) bzw. Eaton & Gasson (2002) wurde die Anzahl der A-Repeats des *esp* Gens bei *E. faecalis* und *E. faecium* wie nachfolgend tabellarisch aufgeführt bestimmt. Als Kontrollstämme wurden stets *E. faecalis* MMH594 (3 A-Repeats) bzw. *E. faecium* E155 (3 A-Repeats) mitgetestet.

PCR-Ansatz 25 µl		PCR-Cyclerprogramm	
Puffer (MBI) 1x dNTPs je 0,2 mM MgCl ₂ 2,5 mM Primer* je 0,2 µM Taq-Polymerase 2 U		initiale Denaturierung	95°C 5 min
		30 Zyklen	94°C 2 min
			63°C 1 min
			72°C 2 bzw. 3 min
	finale Elongation	72°C 8 min	
Elektrophorese: 1 %iges Agarosegel (TAE)			
*esp46/esp47 (bp variabel)			

Anzahl der C-Repeats des esp Gens von *E. faecalis*

Gemäß dem unten dargestellten PCR-Protokoll (Shankar *et al.*, 1999) wurde die C-Repeat-Region des *esp* Gens bei *E. faecalis* amplifiziert und deren Anzahl bestimmt. Positivkontrolle bei jeder Amplifikation war der Stamm *E. faecalis* MMH594 (7 C-Repeats).

PCR-Ansatz 25 µl		PCR-Cyclerprogramm	
Puffer (MBI)	1x	initiale Denaturierung	95°C 5 min
dNTPs	je 0,2 mM	30 Zyklen	94°C 2 min
MgCl ₂	2,5 mM		64°C 1 min
Primer*	je 0,2 µM		72°C 3 min 30 s
<i>Taq</i> -Polymerase	2 U	finale Elongation	72°C 8 min
Elektrophorese: 1 %iges Agarosegel (TAE)			
*esp2/esp5 (bp variabel)			

Anzahl der C-Repeats des esp Gens von *E. faecium*

Die Bestimmung der Anzahl von C-Repeats des *esp* Gens bei *E. faecium* wurde in Anlehnung an ein PCR-Protokoll nach Eaton & Gasson (2002) wie nachfolgend beschrieben durchgeführt.

PCR-Ansatz 25 µl		PCR-Cyclerprogramm	
Puffer (MBI)	1x	initiale Denaturierung	95°C 5 min
dNTPs	je 0,2 mM	30 Zyklen	95°C 2 min
MgCl ₂	3 mM		60°C 1 min
Primer*	je 0,5 µM		72°C 3 min 30 s
<i>Taq</i> -Polymerase	2 U	finale Elongation	72°C 8 min
Elektrophorese: 1 %iges Agarosegel (TAE)			
*TE98/TE103 (bp variabel)			

3.12.6.8 PCR-Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen

Ergänzend zum phänotypischen Nachweis von Antibiotikaresistenzen wurden entsprechende Gene mittels PCR nachgewiesen, die Enterokokken-Stämmen eine Tetrazyklin- (*tetM*), Aminoglykosid- (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*) bzw. Erythromycin-Resistenz (*ermB*) vermitteln. Die Durchführung erfolgte gemäß dem unten aufgeführten PCR-Protokoll nach Strommenger *et al.* (2003) bzw. Jensen *et al.* (1999). Als Positivkontrollen wurden *E. faecalis* V583 (*ermB*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*) und *E. faecium* BM4147 (*tetM*) eingesetzt.

PCR-Ansatz 25 µl		PCR-Cyclerprogramm	
Puffer (MBI)	1x	initiale Denaturierung	94°C 3 min
dNTPs	je 0,2 mM	30 Zyklen	94°C 30 s
MgCl ₂	4 mM		55°C 30 s
Primerpaar*	0,1 µM bzw. 0,05 µM		72°C 30 s
<i>Taq</i> -Polymerase	1 U	finale Elongation	72°C 4 min
Elektrophorese: 2,5 %iges Agarosegel (TAE)			
*je 0,1 µM: tetM1/tetM2 (158 bp); aacA-aphD1/aacA-aphD2 (227 bp) je 0,05 µM: ermB1/ermB2 (425 bp)			

3.12.7 Methoden zur Typisierung von Bakterienstämmen

3.12.7.1 Typisierung mittels rep-PCR von *boxA* Sequenzen

Zur Typisierung der Wildtyp- und hergestellten BF-Mutantenstämme wurde eine rep-PCR mit dem Primer BOXA2R durchgeführt nach Malathum *et al.* (1998). Das Prinzip einer rep-PCR besteht darin, dass mittels eines an spezifische, repetitive Sequenzen bindenden Primers intergenetische Regionen amplifiziert werden, wenn diese Primer-Bindung in der richtigen Orientierung und optimalen Distanz im Genom auftritt. Somit werden PCR-basierte DNA-Fingerprints generiert, die zur Typisierung von Bakterien auf Spezies- oder Subspezies-Ebene verwendet werden können. Diese Methode stellt somit eine stark diskriminierende molekular-epidemiologische Technik dar (Olive & Bean, 1999; Tyler *et al.*, 1997). Mehrere repetitive palindromische Genom-Sequenzen sind mittlerweile bei Gram-negativen sowie Gram-positiven Bakterien bekannt. BOX-Elemente bestehen aus drei DNA-Sequenzen (*boxA*, *boxB* und *boxC*) und sind erstmals in *Streptococcus pneumoniae* beschrieben worden (Martin *et al.*, 1992).

Die Durchführung dieser Fingerprint-PCR erfolgte nach dem in folgender Tabelle dargestellten Protokoll. Die digitalisierten Bilder der entstandenen Fingerprint-Bandenmuster wurden normalisiert und mittels BioNumerics Software (MRI, Karlsruhe; siehe 3.15) ausgewertet. Die Analyse zur Gruppierung (Clustern) der Isolate erfolgte mittels des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (Produkt-Moment-Korrelation) und des UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) Cluster-Algorithmus.

PCR-Ansatz 25 µl		PCR-Cyclerprogramm	
Puffer (NEB)	1x	initiale Denaturierung	95°C 7 min
dNTPs	je 0,6 mM		94°C 30 s
MgCl ₂	2,5 mM	35 Zyklen	40°C 1 min
Primer BOXA2R	2 µM		65°C 8 min
Taq-Polymerase (NEB)	2,5 U		
DNA	100 ng	finale Elongation	65°C 16 min
Elektrophorese: 1,5 %iges Agarosegel (TBE)			

3.12.7.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Um Kontaminationen während der täglichen selektiven Subkultivierung zur Herstellung von BF-Mutanten auszuschliessen, wurden die isolierten *E. faecalis*-Mutanten sowie ihre Wildtypstämme mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) typisiert. Diese Arbeiten wurden im Max-Rubner-Institut (Karlsruhe) nach einer modifizierten Methode nach Graves & Swaminathan (2001) durchgeführt.

Die PFGE von Gesamt-DNA wird, auch für Enterokokken, aufgrund der sehr guten interlaboratorischen Reproduzierbarkeit und hohen Diskriminierungskraft als der „Gold-Standard“ der Typisierungsmethoden angesehen. Nachteilig ist allerdings der relativ hohe Zeitaufwand, der je nach Durchführung etwa vier Tage beträgt. Die Zellen der zu untersuchenden Stämme werden in Agarose eingebettet, zu Blöckchen gegossen und einer (enzymatischen) Zell-Lyse unterzogen. Anschließend wird die Gesamt-DNA je nach Teststamm mit einem selten schneidenden Enzym restringiert und mittels einer Elektrophorese, während der die Polarität des Laufs in bestimmten Intervallen wiederholt geändert wird, separiert. Somit ermöglicht die PFGE eine klare Auftrennung von hochmolekularen DNA-Fragmenten der Größe von 10-800 kb (Olive & Bean, 1999).

Die Stämme wurden ÜN in 10 ml MRS-Bouillon bei 37°C angezogen. 4 ml dieser Kulturen wurden bei 10 000 g für 10 min abzentrifugiert, die Zellen mit 4 ml TE-Puffer gewaschen und das Pellet schließlich in 2 ml dieses Puffers gelöst. Diese Zellsuspensionen wurden mit TE-Puffer so verdünnt, dass eine OD₆₁₀ von 1,87 bis 2,00 erreicht war. Zur Lyse wurden 180 µl der so eingestellten Zellsuspensionen mit jeweils 60 µl Lysozym-Lösung (100 mg/ml), 9 µl Mutanolysin-Lösung (1000 U/ml) und 51 µl TE-Puffer gemischt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Zur Vorbereitung der Herstellung von Agarose-Blöckchen wurde eine entsprechende Menge einer PSP-Lösung, bestehend aus 890 µl einer 1,2 %igen InCert-Agarose-Lösung (Cambrex), 100 µl 10 %iger SDS-Lösung und 10 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml), gemischt und bis zur Zugabe der lysierten Zellen bei 54°C warm gehalten. 300 µl dieser PSP-Lösung wurden schließlich mit je 300 µl der Zellsuspensionen gemischt, in spezielle Formkammern gegossen und die Blöckchen zur Auspolymerisation mindestens 10 min bei 4°C gelagert. Zur weiteren Zell-Lyse in den Agarose-Blöckchen wurden diese ÜN in 4 ml Lyse-Puffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1,05 % N-Laurylsarkosin; pH 8,0) mit 30 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) bei 54°C bei leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Blöckchen zweimal in 15 ml auf 54°C vorgewärmtem sterilen A. bidest für 10 min, und im Anschluss zweimal mit 15 ml vorgewärmten TE-Puffer für 15 min bei 54°C gewaschen. Die so behandelten Blöckchen können dann in TE-Puffer bei 4°C bis zu sechs Monate gelagert werden. Zur enzymatischen Behandlung werden die Blöckchen zuvor je 1 h in frischem TE-Puffer gewaschen und 1 h im jeweiligen Restriktionspuffer äquilibriert. Die Blöckchen wurden anschließend in einem 150 µl-Restriktionsansatz (1 x Restriktionspuffer, 40 U *Sma*I) im Thermomixer bei 37°C für 27 h inkubiert. Nach Entfernen des Restriktionsansatzes wurden die Blöckchen für 1 h in 0,5 x TBE-Puffer bei RT gespült und schließlich der Pulsfeldgelelektrophorese unterzogen. Diese erfolgte für 28 h bei einer Pulszeit von 1 s- 10 s in einem 1,2 %igem Low-Melt-Agarosegel. Die verwendete Elektrophorese-Apparatur sowie Zubehör (PFGE CHEF-DR III System) wurden von der Firma Bio-Rad Laboratories (München) bezogen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 1 h in einer

1 %igen EtBr-Lösung gefärbt, 30 min in A. bidest entfärbt und mittels eines UV-Transilluminators dokumentiert. Die digitalisierten Bilder der entstandenen Fingerprint-Bandenmuster wurden normalisiert und mittels BioNumerics Software (MRI, Karlsruhe; siehe 3.15) ausgewertet. Die Analyse zur Gruppierung (Clustern) der Isolate erfolgte mittels des Dice-Koeffizienten und des UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) Cluster-Algorithmus. Nach dem von Tenover *et al.* (1995) entwickelten standardisierten System zur Interpretation von PFGE-Ergebnissen sind zwei Isolate mit identischen PFGE-Bandenmustern dieselben Stämme, bei Unterschieden von ein bis drei Banden sind die Isolate sehr nah verwandt.

3.12.7.3 Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analyse bei *E. faecium*

Die aus verschiedenen klinischen Bereichen isolierten *E. faecium* Stämme wurden zusätzlich zur Untersuchung von Virulenzeigenschaften mit Hilfe einer VNTR-Methode (Variable-Number Tandem-Repeat) nach Top *et al.* (2004) charakterisiert. Diese Typisierung basiert auf der variablen Anzahl von Tandemrepeats mehrerer bestimmter Loci im Bakterienchromosom, die schnell und leicht mittels spezifischen, diese Regionen flankierenden Primern über PCR detektiert werden können. Im Gegensatz zu verschiedenen anderen Typisierungsmethoden stellt die MLVA (Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analyse) daher ein gut reproduzierbares und kostengünstiges Verfahren dar, wobei somit ein Datenaustausch auch zwischen einzelnen Forschungslaboren möglich ist. Top *et al.* (2004) entwickelten ein Typisierungsschema für *E. faecium*, das auf sechs verschiedenen Tandemrepeat-Loci (VNTR 1, VNTR 2, VNTR 7, VNTR 8, VNTR 9 und VNTR 10) basiert. Jeder Genotyp (MLVA-Typ, MT) besteht somit aus einer Zahlenfolge, die die Anzahl der Tandemrepeats dieser sechs Loci beschreibt (MLVA-Profil). Die Anwendung ermöglicht die Identifizierung wirtsspezifischer Genotypen und Gruppierungen. Eine Web-basierte Datenbank (<http://www.mlva.umcutrecht.nl>) erlaubt außerdem einen internationalen Vergleich von *E. faecium* Isolaten. Die Durchführung erfolgte nach den PCR-Ansätzen und Cyclerprogrammen der unten aufgeführten Tabellen in Anlehnung an Top *et al.* (2004) sowie entsprechende auf der Homepage angegebene Änderungen. Als Kontrollstämme dienten *E. faecium* E155 (Typ 1: 5-7-3-3-2-3) und *E. faecium* E734 (Typ 16: 5-6-3-2-2-3).

PCR-Ansatz 25 µl		PCR-Cyclerprogramm		
Puffer (MBI)	1x	initiale Denaturierung	95°C	15 min
dNTPs	je 0,2 mM	35 Zyklen	94°C	30 s
MgCl ₂	1,5 mM		52°C	30 s
Primer*	je 0,5 µM		72°C	1 min
Taq-Polymerase	1 U	finale Elongation	72°C	5 min
Elektrophorese: 2 %iges Agarosegel (TAE)				
*VNTR1-for/VNTR1-rev (bp variabel)				

PCR-Ansatz 25 µl		PCR-Cyclerprogramm				
			VNTR2		VNTR7/8/9/10	
		initiale Denaturierung	95°C	15 min	95°C	15 min
Puffer (MBI) dNTPs MgCl ₂ Primer* Taq-Polymerase	1x je 0,2 mM 1,5 mM je 0,5 µM 1 U	10 Zyklen TD	94°C	30 s	94°C	30 s
			70°C–1°C	30 s	65°C–1°C	30 s
			72°C	4 min	72°C	4 min
		30 Zyklen	94°C	30 s	94°C	30 s
			60°C	30 s	55°C	30 s
			72°C	4 min	72°C	4 min
		finale Elongation	72°C	5 min	72°C	5 min
Elektrophorese: 1 %iges Agarosegel (TAE)						
*VNTR2-for/VNTR2-rev bzw. VNTR7-for/VNTR7-rev bzw. VNTR8-for/VNTR8-rev bzw. VNTR9-for/VNTR9-rev bzw. VNTR10-for/VNTR10-rev (bp jeweils variabel)						

3.12.8 Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von DNA

DNA-Fragmente als negativ geladene Makromoleküle aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats werden mit Hilfe von Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel abhängig vom Molekulargewicht, der DNA-Konformation (supercoiled oder linear), der Porengröße des Gels sowie der angelegten Spannung ist. Die Laufstrecke linearer, doppelsträngiger DNA verhält sich innerhalb eines bestimmten Größenbereichs umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts bzw. ihrer Länge in Kilobasen (kb).

Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose im jeweiligen Elektrophoresepuffer (TAE oder TBE) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50°C in den mit einem Gelkamm versehenen Gelträger gegossen, so dass die Gele eine Schichtdicke von ca. 3-8 mm hatten. Die Agarose-Konzentration des Gels betrug je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0,8 - 2,5 %. Dabei gilt, je kleiner das Fragment, desto höher die Agarose-Konzentration. Nach Polymerisation des Gels und Entfernen des Kamms wurde dieses in der Elektrophoresekammer mit Puffer überschichtet und die mit Ladepuffer versetzten Proben sowie geeignete DNA-Größenmarker in die Taschen gegeben. Im Vergleich zum TAE- ist TBE-Puffer aufgrund der entstehenden, geringeren Porengröße des Gels besser geeignet zur Auftrennung von Fragmenten < 1 kb, außerdem besitzt TBE-Puffer eine höhere Pufferkapazität. Die Gel-Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von ca. 80 V (Minigele, ca. 10 x 8 cm) bzw. ca. 120 V (Maxigele, ca. 30 x 20 cm). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (1 mg/l Lösung) ca. 10 min angefärbt, im Anschluss etwa 10 min zur Entfernung von Hintergrund-Färbung in A. bidest gewässert. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht auf einem Transilluminator, die Auswertung und Dokumentation des Gels mit Hilfe eines geeigneten Kamera- und Softwaresystems.

3.12.9 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung bestimmter PCR-Fragmente wurde der Service der Firma GATC (Konstanz) in Anspruch genommen. Die Amplifikate wurden mit Hilfe eines PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden oder Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, und die Lösung auf eine Konzentration von ca. 50 ng/ μ l eingestellt. Von diesen Fragmenten wurde mit Hilfe des jeweiligen Primers mittels Fluoreszenz-Technik die Sequenz bestimmt und mittels entsprechender PC-Software (siehe 3.15) ausgewertet.

3.12.10 Gesamt-RNA-Extraktion

Im Umgang mit RNA muss stets auf eine RNase-freie Arbeitsumgebung geachtet werden, da Ribonukleasen als sehr stabile und aktive Enzyme, die zu ihrer Funktion i.d.R. keine Co-Faktoren benötigen, extrahierte RNA schnell und effizient zerstören. Hände und Staubpartikel, die Bakterien und Pilze tragen können, sind die häufigsten Quellen von RNase-Kontaminationen. RNasen sind allerdings schwer zu inaktivieren, so dass neben der Vermeidung des RNase-Eintrags durch steriles Arbeiten und dem Tragen von Handschuhen auch eine besondere Vorbehandlung der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien zur Entfernung von RNasen notwendig ist. Daher wurde bei diesen Arbeiten stets auf die Benutzung von DNase-/RNase-freien und gefilterten Pipettenspitzen, der Verwendung von DEPC-behandeltem Wasser bei der Herstellung bestimmter Lösungen sowie dem sorgfältigen Reinigen von Glaswaren und Elektrophoresekammern (SDS-Lösung, EtOH und H₂O₂-Lösung) geachtet.

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des SV Total RNA Isolation Kits nach Anleitung des Herstellers mit Änderungen bzgl. der Zell-Lyse extrahiert. Die Teststämme wurden 1:100 aus einer Vorkultur in 3 ml TSBG bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,8 inkubiert (mittlere bis späte log-Phase) und 1 ml der Kultur als Ausgangsmaterial für die Gesamt-RNA-Isolierung eingesetzt. Nach Zentrifugation wurde das Pellet (ca. 1x10⁹ Zellen) in TE-Puffer mit Mutanolysin (0,04 mg/ml) und Lysozym (3 mg/ml) resuspendiert und bei 37°C für 1,5 h inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Anweisung des Herstellers. Die RNA-Lösung wurde zur Lagerung bis zu drei Monate bei -70°C aufbewahrt.

Vor Analyse mittels RT-PCRs wurde ein Aliquot der RNA-Lösung mindestens dreimal einer enzymatischen Behandlung mit DNase I (MBI Fermentas) gemäß den Herstellerangaben unterzogen. Nach der Inkubation wurde 1 μ l EDTA-Lösung (25 mM; MBI Fermentas) zur Stabilisierung der RNA während eines folgenden DNase I-Inaktivierungsschritts für 10 min bei 65°C zugegeben. Von der so behandelten RNA-Lösung wurde 1 μ l pro 25 μ l RT-PCR-Ansatz eingesetzt.

3.12.11 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Extinktion eines Aliquots der RNA-Lösung wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung lag folgender Richtwert zugrunde:

$$1 E_{260} \text{ ssRNA entspricht } 40 \mu\text{g/ml}$$

Hochreine RNA lag bei einem Quotienten $E_{260} / E_{280} \geq 2,0$ vor. Werte $< 2,0$ wiesen auf eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen und aromatischen Substanzen hin (Mülhardt, 2003).

3.12.12 Formamid-Gelelektrophorese zum Nachweis von RNA

Zur Durchführung der Formamid-Gelelektrophorese wurde Agarose (1,5 %) in MOPS-Puffer aufgekocht, nach dem Abkühlen Formaldehyd (37 %; Endkonzentration in Gel: 0,66 M) zugegeben und in einen Gelträger gegossen. Die Beladung des Gels erfolgte mit wie in der unten dargestellten Tabelle behandelten Proben.

Ansatz 30 μl	
RNA	10 μg
MOPS-Puffer (10 x)	3 μl
deionisiertes Formamid	10 μl
Formaldehyd (37 %)	4 μl
DEPC-H ₂ O	ad 30 μl
Inkubation: 65°C / 5 min	

Die Proben wurden 5 min bei 65°C denaturiert, auf Eis gekühlt und 3 μl RNA-Ladepuffer zugegeben. Nach Auspolymerisation des FA-Gels und Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese bei ca. 60 V in MOPS-Puffer durchgeführt. Das mit EtBr gefärbte Gel (10 min) wurde dann ÜN in DEPC-H₂O zur Entfernung der Hintergrundfärbung gewässert und zur Dokumentation auf einem UV-Transilluminator betrachtet.

3.12.13 RT-PCR

Zum Nachweis der Transkription bestimmter Gen-Loci wurde das AccessQuick™ RT-PCR System nach Anleitung des Herstellers verwendet. Mit Hilfe dieses Kits können beide Reaktionen einer RT-PCR, Reverse Transkription und PCR-Amplifikation, in einem Ansatz durchgeführt werden („One-Step RT-PCR“). Im zweifach-konzentrierten Master-Mix sind *Tfl*-DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und Reaktionspuffer enthalten, so dass zum Ansatz lediglich Primer, RNA-Template und AMV-Reverse Transkriptase zugegeben werden müssen. Die zur Synthese von cDNA eingesetzte Reverse Transkriptase wird als RNA-abhängige DNA-Polymerase aus dem Vögel befallenden Myoblastose-Virus (Retrovirus AMV, „Avian Myeloblastosis Virus“) isoliert und besitzt zusätzlich eine für RNA-DNA-Heteroduplexmoleküle spezifische Ribonuklease-H-Aktivität. Die separate Haltung des AMV-Enzyms ist insbesondere notwendig zur Durchführung der wichtigen Kontrollreaktionen, bei

denen gleichzeitig zur jeweiligen RT-PCR ein weiterer, identischer Ansatz ohne Reverse Transkriptase mitgetestet wird, um etwaige DNA-Kontaminationen auszuschliessen.

Mit Hilfe der nach unten aufgeführten Tabelle beschriebenen RT-PCR-Ansätze wurde die Transkription verschiedener Virulenzfaktoren-Gene bei den Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen untersucht, die jeweiligen Primer und Cyclothermprogramme sind den Ausführungen unter Abschnitt 3.12.6 zu entnehmen. Bei jeder RT-PCR wurden stets Kontrollreaktionen ohne AMV-Enzym mitgeführt.

RT-PCR-Ansatz 50 µl		RT-PCR-Cyclothermprogramm	
Master-Mix	1x	Reverse Transkription	45°C 45 min
Primer-for	0,5 µM	initiale Denaturierung	abhängig vom eingesetzten Primerpaar
Primer-rev	0,5 µM	PCR-Zyklen	
RNA	ca. 100 ng	finale Elongation	
AMV-Enzym	5 U		
Elektrophorese: abhängig vom nachzuweisenden Fragment, 1-2,5 %iges Agarosegel (TAE)			

3.13 Proteinbiochemische Methoden

3.13.1 Extraktion von Zellwand-assoziierten Proteinen

Um eventuelle Unterschiede in der Expression Biofilm-assoziiierter Zellwandproteine bei Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen festzustellen, wurden eine Extraktionsmethode in Anlehnung an Nallapareddy *et al.* (2006) durchgeführt. Die Teststämmen wurden in 50 ml TSBG-Medium bei 37°C und ca. 100 rpm inkubiert, bis die Kulturen die späte log-Phase ($OD_{600} \sim 0,8$) erreicht hatten. Nach Abzentrifugieren der Kulturen für 15 min bei 3750 rpm wurden die Zellen zweimal mit 15 ml sterilem Puffer W (0,02 M Tris/HCl (pH 7,0), 0,01 M $MgSO_4$) gewaschen und das Pellet in 750 µl Puffer W aufgenommen. Die in diesem Puffer enthaltenen Kat- und Anionen tragen zur Stabilisierung der Proteine bei. Nach Zugabe von 1 mM des Protease-Inhibitors PMSF und 3 mg/ml Lysozym folgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C. Es folgte eine Zentrifugation bei 12 000 g und 4°C für 10 min, danach wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen und einer Aufkonzentrierung mittels Aceton-Fällung unterzogen. Hierzu wurde ein Aliquot des Überstands mit 3 VT Aceton (100 %) versetzt und mindestens 4 h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (12 000 g, 4°C, 15 min) wurde das Protein-Pellet bei RT getrocknet und in sterilem A. bidest (1/5 VT, 45-60 µl) gelöst, davon wurden gemäß Konzentrationsbestimmung (siehe 3.13.2) jeweils gleiche Mengen (ca. 15 µl) auf ein PA-Gel aufgetragen.

3.13.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung wurde die Methode nach Bradford (1976) angewandt. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue reagiert mit basischen Aminosäuren. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum der rötlich-braunen Form von 465 nm hin zu 610 nm bei der blauen Form des Farbstoffs, wobei die Differenz der beiden Formen bei 595 nm am größten ist und somit die optimale Wellenlänge zur OD-Messung des Farbstoff-Protein-Komplexes darstellt. Durch die Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge kann die Konzentration einer unbekanntem Proteinlösung einfach bestimmt werden. Rinderserumalbumin (BSA) hat sich als international anerkannter Standard für die Erstellung einer Eichgeraden durchgesetzt. Zur Ermittlung der in einer Probe enthaltenen Gesamtproteinmenge wurde 100 µl Probenvolumen (evtl. verdünnt) mit 1 ml Bradford-Reagenz gut gemischt, 10 min bei RT inkubiert und dann die OD₅₉₅ gegen eine Blindprobe gemessen. Durch Vergleich mit der mittels BSA erstellten Eichgerade (0,025 - 0,2 mg/ml) konnte eine Konzentrationsbestimmung der Proteine in der Probe erfolgen.

3.13.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteingemischen ermöglicht das diskontinuierliche System nach Lämmli eine schnelle Bestimmung der Molekulargewichte. Während der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden im elektrischen Feld Proteine unter denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt, was dadurch ermöglicht wird, dass das im Puffer und Polyacrylamidgel enthaltene SDS in konstantem Verhältnis an die Proteine bindet. Somit erhalten die Proteine eine gleichartige negative Ladung pro Masseinheit (1,4 g SDS pro g Protein), wodurch die Eigenladung des Proteins unerheblich wird. Das anionische Detergenz SDS führt außerdem zur Auflösung von Tertiär- und Quartärstrukturen. Dieses sogenannte Tris-Glycin-System bewirkt eine Konzentrierung an der Übergangsstelle zwischen Sammel- und Trenngel, so dass zum einen gut definierte Banden entstehen, und zum anderen die Aggregation und Präzipitation der Proben während des Eintritts in die Gelmatrix verhindert wird. Polyacrylamidgele sind durch die Kopolymerisation von Acrylamid und dem quervernetzenden N,N-Methylen-Bisacrylamid chemisch inert und besonders stabil, wobei sich die Porengröße der Gele durch das Verhältnis der Konzentration an Acrylamid bestimmt. Um große Proteine aufzutrennen, werden Gele mit geringem Acrylamid-Anteil benutzt (Rehm, 2002).

Die Komponenten des Trenngels wurden gemäß der unten aufgeführten Tabelle (ausreichend für zwei Gele) zusammengegeben, die Lösung nach Zugabe von APS zwischen die Spacer-Platten gefüllt und mit Isopropanol (100 %) überschichtet, so dass eine glatte Gelfront entstanden ist. Nach Polymerisation des Trenngels wurde die Front mit A. bidest gespült und das Sammelgel in gleicher Weise über das Trenngel gegossen. Zu

untersuchende Protein-Proben wurden mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:4 gemischt, für 5 min bei 95°C denaturiert und im Anschluss nach Auftrag auf das Gel bei 100 V der Elektrophorese unterzogen.

Stammlösungen	Trenngel (12%, 10 ml)	Sammelgel (6%, 5 ml)
Trenn- bzw. Sammelgelpuffer (4 x)	2,5 ml	1,25 ml
Acrylamidlösung (30%)	4 ml	1 ml
TEMED	10 µl	5 µl
APS-Lösung (100 mg/ml)	100 µl	50 µl
A. bidest	3,39 ml	2,7 ml

Da die Größe der Zellwandproteine, die bei den Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen von Interesse waren, im MG-Bereich von > 85 kDa lag, wurden die Proben zusätzlich auf einem kommerziell erwerblichen SDS-Gradientengel (NuPAGE® Novex; Invitrogen, Karlsruhe) mit einer Konzentration von 4 – 12 % analysiert. Die Anfärbung der Gele erfolgte mittels Coomassie-Färbelösung (kolloidal, siehe 3.6.1).

3.13.4 Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie

Die Durchführung der eindimensionalen Gradienten-Gelelektrophorese sowie die Identifizierung differentiell exprimierter Proteinen bei Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen mittels Massenspektrometrie erfolgten in der Abteilung Biochemie / Universität Kassel nach Gesellchen *et al.* (2006). Massenspektrometrie ist eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum, wobei die Empfindlichkeit dieses Verfahrens bis in den femto- (10^{-15}) bis subfemtomolaren Bereich geht (Lottspeich & Engels, 2006). Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator, der die Ionen bzgl. des Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) auftrennt, und einem Detektor. Bei dem hier verwendeten Massenspektrometer handelt es sich um eine lineare Hybrid-Tripelquadrupol-Ionenfalle, welche aus einer nano-Elektrospray-Ionisierungsquelle (nano-ESI, Ionenquelle) und einem linear angeordneten Tripelquadrupol (Massenanalysator) besteht. Die vorherige Auftrennung des Peptidgemisches erfolgte mittels RP-HPLC (reversed phase high performance liquid chromatography, Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie).

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden diejenigen Banden aus dem zuvor in Wasser äquilibrierten SDS-Gradientengel herausgeschnitten, die in Wildtyp- und Mutantenstamm jeweils Unterschiede aufwiesen. Die in den ausgeschnittenen Banden enthaltenen Proteine wurden nach einem Verfahren nach Rosenfeld *et al.* (1992) mit Unterlassung aller Vorwaschschritte einer Protein-In-Gel-Restriktion mit Trypsin unterzogen. Hierzu wurden die Gel-Blöckchen mittels Zentrifugation (16 000 g) durch eine 10 µl Pipettenspitze zu sehr kleinen Stücken reduziert und nach Zugabe von jeweils 25 µl Puffer (50 mM NH_4HCO_3) und 10 ng/µl Trypsin (Promega, Mannheim) 1 h bei 50°C inkubiert. Die

Überstände wurden mit 40 µl HCOOH verdünnt und anschließend mittels nanoLC-ESI-MS/MS analysiert. Dies erfolgte mit Hilfe des nanoLC-Ultimate HPLC-Systems (LC Packings, Dionex), das mit einem linearen Ion-Trap-Massenspektrometer (4000QTRAP™, Applied Biosystems) verbunden war. Jede Probe (5 µl) wurde in zwei konsekutiven Durchläufen analysiert. Nach einem positiven MS Full Scan (EMS) im linearen Ion-Trap-Modus (400-1400 amu) erfolgte ein Enhanced Resolution Scan (ER) der vier intensivsten Signale des EMS Scans. Der Ladungsstatus, der aus dem ER hervorging, definierte die Kollisionsenergie für den anschließenden Enhanced Product Ion Scan (EPI, 100-1700 amu). Ein Abgleich der MS/MS Spektren mit einer Sequenzdatenbank (MSDB) erfolgte unter Zuhilfenahme der PC-Software MASCOT (Matrix Science, Version 1.9.05). Ein Probanddurchgang dauerte ca. 80 min, die Zykluszeit der MS- und MS/MS-Scans betrug 3,7 sec. Die Identifizierung von Proteinen wurde als gesichert angesehen, wenn die Analyse einen Gesamt-Score von über 50 und mindestens zwei Peptide mit einem minimalen Peptid-Score von 10 ergeben hatte. Die Identifizierung der Proteine jeder Bande wurde mindestens zweimal durchgeführt.

3.14 Mikroskopie

3.14.1 Rasterelektronen-Mikroskopie

Die Rasterelektronen-Mikroskopie (REM) ist eine wichtige Methode zur Oberflächenstrukturanalyse, bei der ein sehr fein gebündelter Elektronenstrahl zeilenweise über die Objekt Oberfläche geführt wird. Die dabei durch die Primärelektronen im Objekt erzeugten Wechselwirkungsprodukte (Sekundärelektronen etc.) werden erfasst und zur Bilddarstellung verwendet. Somit können Strukturen mit einem Auflösungsvermögen von nur wenigen Nanometern mit einer gegenüber dem Lichtmikroskop 1000fach größeren Schärfentiefe untersucht werden. Das REM besteht prinzipiell aus folgenden Komponenten: einem Elektronenstrahlenerzeuger, einem Linsensystem, Ablenkelementen, einem Detektor und dem Bildgebungssystem. Die Sekundärelektronen werden von dem seitlich schräg über der Probe angebrachten Detektor aufgefangen. Dadurch entsteht u.a. die Plastizität der Objekte, da durch die schräge Anordnung dem Detektor zugewandte Details heller erscheinen als abgewandte Strukturen. Des Weiteren ist die Intensität der Sekundärstrahlung vom Neigungswinkel der Objekt Oberfläche abhängig. Mittels REM können nur leitende Oberflächen dargestellt werden, so dass die zu untersuchenden Proben speziell präpariert werden müssen. Da die Abtastung mit dem Elektronenstrahl im Hochvakuum stattfindet, müssen die Objekte zunächst so präpariert werden, dass sie absolut wasserfrei sind. Im Anschluss daran werden durch Aufdampfen eines Metallfilmes (i.d.R. Platin oder Gold) die Oberflächen der biologischen Objekte leitend gemacht. Dabei ist darauf zu achten, dass nicht zu stark bedampft wird, da sonst die feinen Strukturen des Objekts abgedeckt werden.

Das hohe Auflösungsvermögen dieser Methode steht dem großen apparativen und präparativen Aufwand gegenüber, sowie dem Nachteil, dass Untersuchungen an lebenden biologischen Objekten nicht möglich sind (Reimer, 1998; Lottspeich & Engels, 2006).

Eine ÜN-Kultur der zu untersuchenden Stämme wurde 1:10 in TSBG verdünnt und auf einem runden Glasdeckgläschen bei 37°C für 18 h bzw. 4 h angezogen. Als Schutz vor Verdunstung erfolgte dies in einer mit einigen Tropfen A. bidest befüllten Petrischale, so dass eine sog. feuchte Kammer hergestellt wurde. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt, die am Gläschen adhärenen Zellen dreimal mit Soerensen-Puffer (pH 7,2) gewaschen und mindestens 2 h bei RT mit Glutaraldehyd-Lösung (2,5 %) fixiert. Es folgten dreiminütige Waschschrte jeweils mit Soerensen-Puffer, mit Soerensen-Puffer (50 %) und A. bidest, bevor die Zellen mit Osmiumtetroxid-Lösung (1 %) für mindestens 2 h postfixiert wurden. Anschließend wurden die Proben einmal mit A. bidest gewaschen und dann durch die Behandlung mit Ethanol entwässert. Hierzu wurde jeweils 8 min mit Ethanol von aufsteigender Konzentration (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 94 %, 97 %, 100 %) gewaschen. Gegebenenfalls wurden die Proben ÜN in Ethanol (100 %) gelagert. Im Anschluss konnten die Proben einer Trocknung über den Kritischen Punkt unterzogen werden, wobei in mehreren Zyklen das Ethanol bei 10°C und ca. 60 bar gegen flüssiges CO₂ ausgetauscht wurde. Die so getrockneten Proben wurden mittels spezieller selbstklebender, leitender Folie auf Mikroskophalterungen aufgebracht und anschließend mit Platin bedampft. Die Durchführung der Mikroskopie erfolgte bei einer Spannung von 10 kV mit einem REM Hitachi S-4000 in der Abteilung Zellbiologie / Universität Kassel. Die REM der Zellen, die für 18 h angezogen wurden, wurde insgesamt zweimal in unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

3.14.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskope (confocal laser scanning microscope, CLSM) ermöglichen dreidimensionale Abbildungen von Strukturen, da sie in der Lage sind, optische Schnitte von Proben aufzunehmen, die mittels Software zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammengefügt werden. CLSM werden vornehmlich im Fluoreszenzmodus betrieben, da spezifische Probenbestandteile durch verschiedene Techniken selektiv angefärbt und dargestellt werden können. Als Lichtmikroskop hat ein CLSM ein deutlich geringeres Auflösungsvermögen im Vergleich zu einem Elektronenmikroskop, hat aber den großen Vorteil, dass Untersuchungen oder quantitative Messungen von Prozessen zerstörungsfrei im Inneren von Objekten, also auch an lebenden Objekten möglich sind.

Das konfokale Prinzip beruht darauf, dass durch die in konjugierten Ebenen zur Fokusebene des Objektivs „kon“-„fokal“ platzierte Anregungs- und Detektionslochblende das Laserlicht nur aus einem sehr kleinen Probenbereich auf den Detektor gelangt. Zur Abbildung einer

kompletten Objektebene wird die Probe mittels einer Rasteroptik in x-y-Richtung gescannt und so Punkt für Punkt ein Bild erzeugt, das einem optischen Schnitt durch eine frei wählbare Ebene des Objekts entspricht. Dies kann zur Darstellung weiterer Objektebenen für verschiedene axiale Koordinaten wiederholt werden. Als Anregungslichtquelle dienen Laser, aus denen über einen speziellen Filter selektiv die Laserlinien ausgewählt werden, mit der die Probe beleuchtet werden soll (Lottspeich & Engels, 2006).

Zur Betrachtung „lebender“ Biofilme wurden Enterokokken-Stämme mittels konfokaler Laser-Scanning-Technik mikroskopiert. Hierzu wurde eine ÜN-Kultur des Teststamms 1:100 in TSBG verdünnt und in einer mittels eines Silikonrings hergestellten Kammer auf einem Glasobjektträger für 18 h bei 37°C angezogen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Zellen mit einer Acridinorange-Lösung (100 µg/ml) für 10 min bei RT angefärbt. Im Anschluss an einen wiederholten dreimaligen Waschschrift wurden die Biofilme während der Mikroskopie mit 2 ml PBS-Puffer hydriert gehalten. Die Darstellung erfolgte mittels eines CLSM (Leica TCS SP, Abt. Zellbiologie / Universität Kassel) mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm, wobei eine Emission bei ca. 520 nm durch Interkalierung des Farbstoffs in DNA und bei ca. 650 nm durch Komplexbildung des Farbstoffs mit RNA detektiert wird. Die Mikroskopie wurde insgesamt zweimal in unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

3.15 Statistische Auswertung und sonstige verwendete Computer-Software

Statistische Analysen wurden mit dem PC-Programm Prism 4.03 (GraphPad Software: LaJolla, CA) durchgeführt (Abt. Biochemie / Universität Kassel). Der Vergleich und die Alignments von DNA- und Proteinsequenzen und deren Auswertung erfolgte mit dem Programm BioEdit 7.0.8 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) sowie MegAlign 7.0 (DNASTAR Lasergene Software; MRI Karlsruhe). Die Darstellung und Interpretation von rep-PCR- und PFGE-Bandenmuster (DNA-Fingerprints) erfolgte mittels BioNumerics Software 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgien; MRI Karlsruhe). Primer-Design wurde mit Hilfe des Programms GeneFisher 2.0 (BiBiServ, Technische Fakultät / Universität Bielefeld) durchgeführt.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit stellte zunächst die Untersuchung des Vorkommens verschiedener Virulenzfaktoren und der Biofilm-Bildung bei Enterokokken aus unterschiedlichem klinischen Isolierungsmaterial einen Schwerpunkt dar. Insgesamt wurden 150 *E. faecalis* Stämme (siehe 4.1) und 78 *E. faecium* Isolate (siehe 4.2) sowie 80 *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen (siehe 4.3) charakterisiert. Zur Identifizierung der Spezies wurden zunächst biochemische Tests mittels kommerzieller Nachweisverfahren angewandt (siehe 3.10.2). Alle Stämme wurden zusätzlich mit Hilfe einer Multiplex-PCR (siehe 3.12.6) auf Spezies-Ebene identifiziert. Ferner wurden Antibioграмme der Isolate erstellt (siehe Tab. 23 und Tab. 28 im Anhang).

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit stellte die Charakterisierung von Biofilm-Spontanmutanten von *E. faecalis* Isolaten dar (siehe 4.5). Diese Stämme (1.3 und 1.3.7, 1.10 und 1.10.16 sowie 2.11 und 2.11.8) wurden mittels phänotypischer und molekularbiologischer Methoden untersucht, um potenzielle neue Einflussfaktoren der Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* zu identifizieren.

4.1 *E. faecalis* isoliert aus verschiedenem klinischen Material

4.1.1 Phänotypischer und genotypischer Nachweis von Virulenzfaktoren

Die Tab. 11 stellt die Ergebnisse der Nachweise bestimmter Virulenzfaktoren bei den 150 untersuchten *E. faecalis* verschiedener Herkunft dar. Die Betrachtung der Gesamtinzidenzen zeigte, dass von diesen Stämmen 46,0 % zur Gelatinase-Expression und 24,0 % zur β -Hämolyse befähigt waren. Bei 38,7 % wurde das *cyIA* Gen, bei 52,7 % das *esp* Gen, bei 72,0 % das *asa1* Gen und bei 82,0 % das *gelE* Gen nachgewiesen. Außerdem wurde dieses Kollektiv auf das Vorkommen des Genlocus *ef0591* gescreent, welcher für ein noch nicht charakterisiertes putatives Zellwandprotein codiert (Creti *et al.*, 2004). Dieses Gen fand sich insgesamt lediglich bei 18,7 % der 150 Isolate.

Bei Auswertung dieser Inzidenzen in Hinblick auf Isolate, die aus Faeces, Urin, Wunden und invasiver Herkunft stammten, ergaben sich nur in wenigen Fällen geringe Unterschiede in dem prozentualen Auftreten unter den Gruppen. So waren 38,6 % der Urin-Stämme zur Gelatinase-Produktion befähigt, während dieser Nachweis bei 52,6 % der Stämme invasiver Herkunft positiv ausfiel. β -Hämolyse zeigte sich nur bei 10,5 % und 16,2 % der Isolate invasiver Herkunft bzw. Faeces, wohingegen Urin-Stämme zu 29,5 % und Wund-Isolate zu 30,8 % hämolysierend waren. Das Auftreten des *cyIA* Gens variierte zwischen ca. 32 % (*E. faecalis* aus Faeces und invasiver Herkunft) über 40,9 % (Urin-Isolate) und 50,0 % (Stämme aus Wunden). Der Nachweis des *esp* Gens ergab bei allen der vier Gruppen eine Häufigkeit von ca. 53 %, das Vorkommen des *asa1* Gens lag zwischen 67,6 % und 77,3 %. Das *gelE*

Gen konnte in fast allen Gruppen zu ca. 84 % nachgewiesen werden, lediglich bei den Faeces-Isolaten trat das Gen etwas weniger häufig auf (73,0 %). Eine statistische Analyse der Inzidenzen bei den *E. faecalis*, die aus Faeces, Urin, Wunden und invasiver Herkunft isoliert wurden, erbrachte allerdings in keinem der Fälle signifikante Unterschiede zwischen den Verteilungen der Virulenzfaktoren in diesen vier Gruppen (χ^2 -Test, $P < 0,05$).

Tab. 11 Ergebnisse der Nachweise von Virulenzfaktoren bei *E. faecalis* verschiedener klinischer Herkunft

GelE, Gelatinase-Produktion; β -Häm, β -Hämolyse-Nachweis; *cyIA*, *esp*, *asa1*, *gelE*, Nachweis der Gene; Details zur Herkunft und einzelnen Ergebnissen der Isolate siehe 3.9.1 und Anhang; *, Anzahl enthält die aufgeführten Stämme sowie Isolate aus Umweltproben (4 Stämme) und diversem Probenmaterial (20 Stämme); χ^2 -Test zur Feststellung signifikanter Unterschiede zwischen den Verteilungen in den Gruppen Faeces, Urin, Wunden und invasive Herkunft; ns, nicht signifikant.

Herkunft	Anzahl Stämme	GelE	β -Häm	<i>cyIA</i>	<i>esp</i>	<i>asa1</i>	<i>gelE</i>
Faeces	37	15 40,5%	6 16,2%	12 32,4%	20 54,1%	25 67,6%	27 73,0%
Urin	44	17 38,6%	13 29,5%	18 40,9%	23 52,3%	34 77,3%	37 84,1%
Wunden	26	11 42,3%	8 30,8%	13 50,0%	14 53,8%	19 73,1%	22 84,6%
Invasiv	19	10 52,6%	2 10,5%	6 31,6%	10 52,6%	14 73,7%	16 84,2%
Insgesamt	150*	69 46,0%	36 24,0%	58 38,7%	79 52,7%	108 72,0%	123 82,0%
χ^2-Test bzgl. der Gruppen Faeces, Urin, Wunden und Invasive Herkunft							
P-Wert		0,7726	0,2053	0,4749	0,9984	0,8094	0,5387
Signifikanz ($P < 0,05$)		ns	ns	ns	ns	ns	ns

Der Genlocus *ef0591* konnte am häufigsten in Faeces- und Wund-Isolaten detektiert werden (27,0 % und 30,8 %), in Stämmen aus Urin zu 15,9 % und von invasiver Herkunft lediglich zu 5,3 %, wodurch sich eine Gesamtinzidenz von 18,7 % ergab. Auch hier konnte allerdings kein signifikanter Unterschied ($P = 0,1168$) zwischen den einzelnen Gruppen errechnet werden. Darüber hinaus wurde das Vorkommen des *asa373* Gens, das lediglich in einem (Isolat 1.8) von 150 analysierten Stämmen nachgewiesen werden konnte, und des *bee* Locus (*bee1-3*) untersucht. Letzterer kam in acht von 150 *E. faecalis* Isolaten vor (5,3 %), unter diesen fanden sich sieben starke und ein mäßiger (Isolat 5.4) Biofilm-Bildner. Ergänzend wurde die Fähigkeit zur Lipase-Produktion getestet, welche bei keinem der Stämme nachgewiesen werden konnte. Ferner wurden drei Stämme positiv auf die Bildung

von DNase getestet. Das *ace* Gen konnte bei allen Isolaten über den Nachweis der B-Repeats detektiert werden, wobei die überwiegende Anzahl der *E. faecalis* 2,4 (23,3 %), 3,4 (29,3 %) oder 4,4 (42,0 %) Tandemrepeats der B-Domäne aufwies. Ferner wurde die Anzahl der A- und C-Repeats der *esp*-positiven Stämme bestimmt. Hierbei kamen bei der Mehrheit der *esp*-positiven Isolate zwei (57,0 %) oder drei (30,4 %) A-Repeats sowie entweder sechs (20,2 %), sieben (32,9 %) oder acht (22,8 %) C-Repeats vor.

4.1.2 Vorkommen von Biofilm-Bildung

Die unter 4.1.1 aufgeführten 150 *E. faecalis* aus Faeces, Urin, Wunden, invasiver Herkunft, der Umwelt sowie diversem Probenmaterial wurden des Weiteren auf ihre Fähigkeit zur Biofilm-Bildung untersucht. Die Tab. 12 gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse in Hinblick auf das Auftreten von Stämmen, die keinen, einen mäßigen oder einen starken Biofilm (BF) bilden können. Außerdem sind die jeweils berechneten arithmetischen Mittelwerte sowie Mediane einer Herkunftsgruppe aufgeführt. Der Median (oder Zentralwert Z) halbiert die nach der Größe geordnete Folge der Einzelwerte, so dass die gleiche Anzahl an Messwerten (50 %) unterhalb und oberhalb von Z liegen (Köhler *et al.*, 2002).

Von den insgesamt 150 untersuchten *E. faecalis* Isolaten waren etwa die Hälfte (48,0 %) keine BF-Bildner und jeweils ca. ein Viertel mäßige (23,3 %) und starke (28,7 %) BF-Produzenten. Diese Aufteilung variierte allerdings stark unter den jeweiligen Gruppierungen nach Isolierungsmaterial. So fanden sich unter den Stämmen aus Urin sowie aus invasiver Herkunft um die 40 % (38,6 % bzw. 42,1 %) starke BF-Bildner und zu ca. jeweils 30 % mäßige und keine BF-Produzenten (29,5 % und 31,8 % bzw. 26,3 % und 31,6 %). Entsprechend wurden hier auch höhere Mittelwerte (0,318 und 0,455) und Mediane (0,166 und 0,190) im Vergleich zu den anderen Herkunftsgruppen errechnet. Im Gegensatz dazu konnten unter den Isolaten aus Faeces und Wunden jeweils ca. 60 % (56,8 % und 61,5 %) *E. faecalis* ausgemacht werden, die keinen BF bildeten, und zu je etwa 20 % solche Stämme, die eine mäßige (24,3 % und 19,2 %) oder starke (18,9 % und 19,2 %) BF-Bildungsfähigkeit besaßen. Die arithmetischen Mittelwerte der Isolate aus Faeces- und Wunden lagen bei 0,210 und 0,163, die Mediane bei 0,104 und 0,090.

Tab. 12 Vorkommen von Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* verschiedener klinischer Herkunft

OD₅₉₅ < 0,120, kein BF-Bildner; 0,120 ≤ OD₅₉₅ ≤ 0,240, mäßige BF-Bildner; OD₅₉₅ > 0,240, starker BF-Bildner; OD₅₉₅ > 0,5, sehr starker BF-Bildner, diese Stämme sind in der Kategorie der starken BF-Bildner (OD₅₉₅ > 0,240) ebenfalls enthalten; Details zur Herkunft der Isolate siehe 3.9.1 und Anhang; *, Anzahl enthält die aufgeführten Stämme sowie Isolate aus Umweltproben (4 Stämme) und diversem Probenmaterial (20 Stämme).

Herkunft	Anzahl Stämme	OD ₅₉₅ < 0,120	0,120 ≤ OD ₅₉₅ ≤ 0,240	OD ₅₉₅ > 0,240	davon OD ₅₉₅ > 0,500	Mittelwert / Median
Faeces	37	21 56,8%	9 24,3%	7 18,9%	2 5,4%	0,210 / 0,104
Urin	44	14 31,8%	13 29,5%	17 38,6%	7 15,9%	0,318 / 0,166
Wunden	26	16 61,5%	5 19,2%	5 19,2%	1 3,8%	0,163 / 0,090
Invasiv	19	6 31,6%	5 26,3%	8 42,1%	3 15,8%	0,455 / 0,190
Insgesamt	150*	72 48,0%	35 23,3%	43 28,7%	16 10,7%	0,320 / 0,127

4.1.3 Zusammenhang von Biofilm-Bildung mit bestimmten Virulenzfaktoren

Auf Grundlage der in 4.1.1 und 4.1.2 dargestellten Ergebnisse konnten mittels statistischer Auswertung Zusammenhänge zwischen der Menge an gebildetem BF und dem Vorkommen bestimmter Virulenzfaktoren erfasst werden, die in den Abb. 6 bis Abb. 10 dargestellt werden. Dies sollte Aufschluss über den Einfluss eines bestimmten oder mehrerer bekannter Virulenzfaktoren auf die Biofilm-Bildungsfähigkeit bei *E. faecalis* geben.

In Abb. 6 ist der Vergleich von Stämmen, die das *esp* Gen tragen, mit solchen Isolaten, die *esp*-negativ sind, in Abhängigkeit von der jeweils produzierten Menge an BF graphisch dargestellt. Die statistische Analyse mittels Mann-Whitney Test ($P < 0,05$) ergab, dass sich die Mediane der beiden Gruppen signifikant unterscheiden ($P = 0,0019$). Der Median der Gruppe der *esp*-positiven Stämme ($Z = 0,1720$) war somit signifikant höher als der Wert der *esp*-negativen Stämme ($Z = 0,0970$). Dennoch konnten in beiden Gruppen sowohl Isolate ausgemacht werden, die keinen oder nur sehr gering zur Biofilm-Bildung befähigt waren, als auch solche, die seinen sehr starken BF (OD₅₉₅ > 0,5) produzierten.

Die Gegenüberstellung von Gelatinase-positiven und -negativen Stämmen (Abb. 7) zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied ($P = 0,6428$) der Mediane der beiden Gruppen (Mann-Whitney Test, $P < 0,05$). Auch hier fanden sich in beiden Gruppen sehr starke BF-Bildner wie auch *E. faecalis*, die keinen BF *in vitro* produzieren konnten. Die Mediane wiesen sogar annähernd gleiche Werte auf (0,1270 vs 0,1230). Entsprechendes wurde auch beim Vergleich von *asa1*-positiven und -negativen Stämmen beobachtet (Abb. 8; $P = 0,3410$). Allerdings lag der Median der Isolate mit *asa1* Gen leicht über dem der *asa1*-negativen Stämme (0,1035 vs 0,1280).

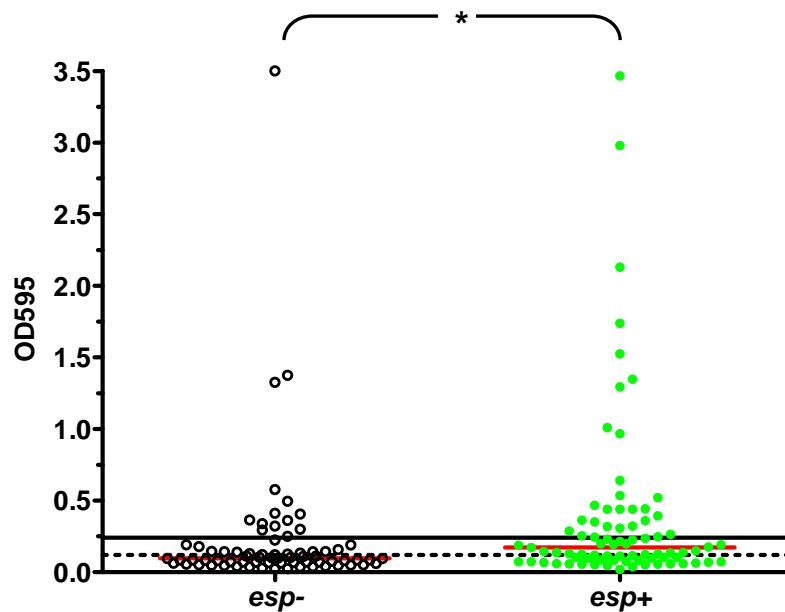


Abb. 6 Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen des *esp* Gens bei *E. faecalis* verschiedener klinischer Herkunft

Dargestellt sind die ermittelten BF-Werte (OD_{595} -Mittelwerte, y-Achse) der insgesamt 150 untersuchten *E. faecalis* aus Faeces, Urin, Wunden, invasiver Herkunft, der Umwelt und diversem Probenmaterial in Korrelation zur Anwesenheit des *esp* Gens (x-Achse). Rote Linien zeigen den Medianwert Z der OD_{595} -Werte der jeweiligen Gruppe an (*esp*-, $Z = 0,0970$; *esp*+, $Z = 0,1720$). *, signifikant; durchgezogene schwarze Linie, $OD_{595} = 0,240$; gestrichelte schwarze Linie, $OD_{595} = 0,120$

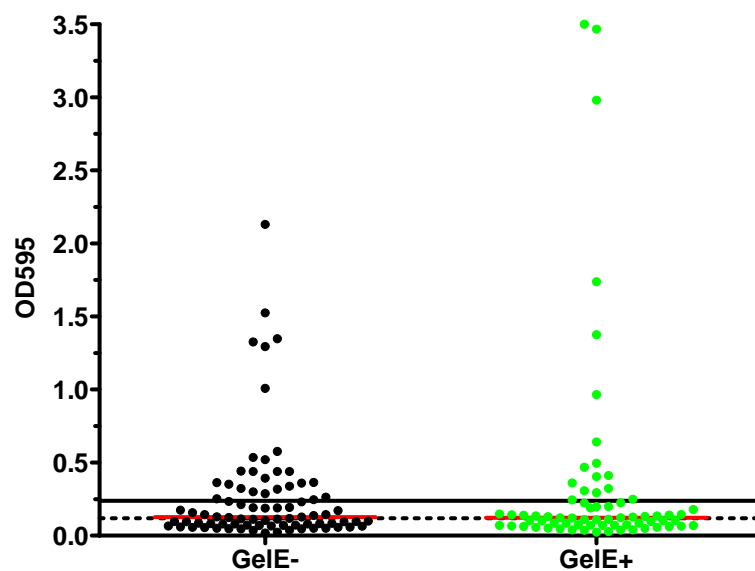


Abb. 7 Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen der Gelatinase-Produktion bei *E. faecalis* verschiedener klinischer Herkunft

Dargestellt sind die ermittelten BF-Werte (OD_{595} -Mittelwerte, y-Achse) der insgesamt 150 untersuchten *E. faecalis* in Korrelation zur Expression von Gelatinase (x-Achse). Rote Linien zeigen den Medianwert Z der OD_{595} -Werte der jeweiligen Gruppe an (GelE-, $Z = 0,1270$; GelE+, $Z = 0,1230$). Die Medianwerte sind nicht signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney Test, $P < 0,05$). Durchgezogene schwarze Linie, $OD_{595} = 0,240$; gestrichelte schwarze Linie, $OD_{595} = 0,120$

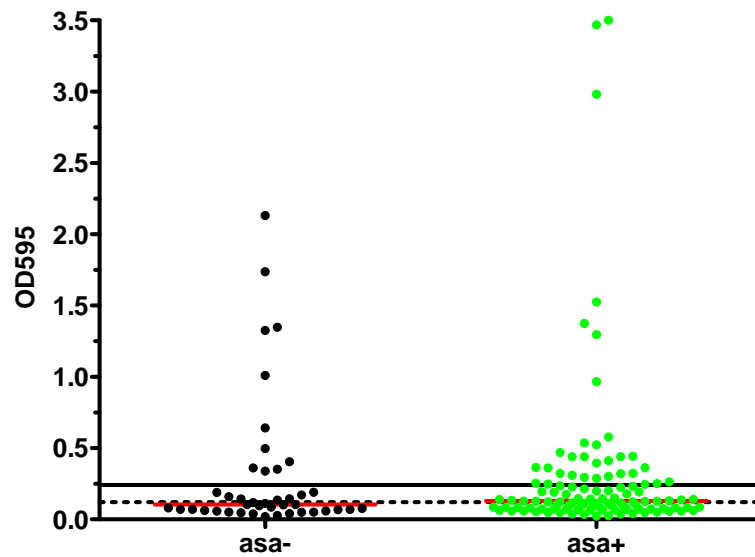


Abb. 8 Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen des *asa1* Gens bei *E. faecalis* verschiedener klinischer Herkunft

Dargestellt sind die ermittelten BF-Werte (OD_{595} -Mittelwerte, y-Achse) der insgesamt 150 untersuchten *E. faecalis* in Korrelation zur Anwesenheit des *asa1* Gens (x-Achse). Rote Linien zeigen den Medianwert Z der OD_{595} -Werte der jeweiligen Gruppe an (*asa1*⁻, $Z = 0,1035$; *asa1*⁺, $Z = 0,1280$). Die Medianwerte sind nicht signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney Test, $P < 0,05$). Durchgezogene schwarze Linie, $OD_{595} = 0,240$; gestrichelte schwarze Linie, $OD_{595} = 0,120$

Die Aufstellung von Korrelationen zwischen der Biofilm-Bildung und dem Vorkommen des *esp* Gens und/oder der Gelatinase-Expression (Abb. 9) zeigte ebenfalls, dass sich die vier Gruppen auf globaler Ebene nicht deutlich voneinander unterscheiden (Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn's Multiple Comparison Test, beides mit $P < 0,05$). Dennoch wiesen die beiden Gruppen, die die *esp*-positiven Stämme umfassen, höhere Mediane (0,1735 bei *esp*⁺/*GelE*⁻ und 0,1490 bei *esp*⁺/*GelE*⁺) im Vergleich zu den Gruppen *esp*⁻/*GelE*⁻ und *esp*⁻/*GelE*⁺ auf (0,0850 und 0,1075).

Die statistische Analyse zum Zusammenhang zwischen der Biofilm-Bildung und der Anwesenheit des *esp* Gens und/oder des *asa1* Gens (Abb. 10) ergab hingegen signifikante Unterschiede der Medianwerte der Gruppen *esp*⁺/*asa1*⁺ und *esp*⁻/*asa1*⁻ (0,1620 vs 0,0710) sowie *esp*⁺/*asa1*⁻ und *esp*⁻/*asa1*⁺ (0,1720 vs 0,0710). Somit konnte auch in dieser Gegenüberstellung erkannt werden, dass die beiden Gruppen der *esp*-positiven Stämme die höheren Medianwerte aufwiesen im Vergleich zu den *esp*-negativen Isolaten.

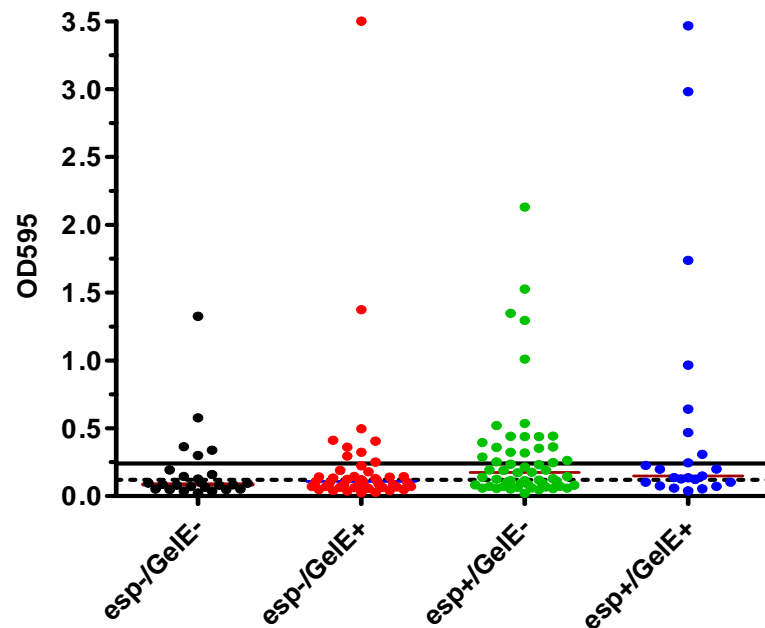


Abb. 9 Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen von *esp* und/oder der Gelatinase-Produktion bei *E. faecalis* verschiedener klinischer Herkunft

Dargestellt sind die ermittelten BF-Werte (OD_{595} -Mittelwerte, y-Achse) der insgesamt 150 untersuchten *E. faecalis* in Korrelation zur An- bzw. Abwesenheit des *esp* Gens und der Gelatinase-Produktion (x-Achse). Rote Linien zeigen den Medianwert Z der OD_{595} -Werte der jeweiligen Gruppe an (*esp*-/GelE-, $Z = 0,0850$; *esp*-/GelE+, $Z = 0,1075$; *esp*+/GelE-, $Z = 0,1735$; *esp*+/GelE+, $Z = 0,1490$). Zwischen keiner der vier Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($P < 0,05$). Durchgezogene schwarze Linie, $OD_{595} = 0,240$; gestrichelte schwarze Linie, $OD_{595} = 0,120$

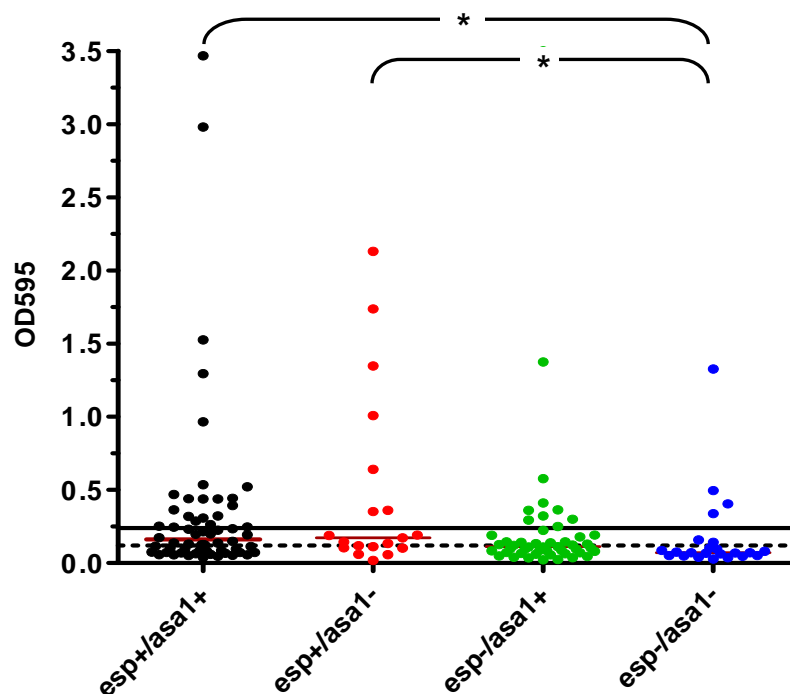


Abb. 10 Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen von *esp* und/oder *asa1* bei *E. faecalis* verschiedener klinischer Herkunft

Dargestellt sind die ermittelten BF-Werte (OD_{595} -Mittelwerte, y-Achse) der insgesamt 150 untersuchten *E. faecalis* in Korrelation zur An- bzw. Abwesenheit des *esp* Gens und des *asa1* Gens (x-Achse). Rote Linien zeigen den Medianwert Z der OD_{595} -Werte der jeweiligen Gruppe an (*esp*+/*asa1*+, $Z = 0,1620$; *esp*+/*asa1*-, $Z = 0,1720$; *esp*-/*asa1*+, $Z = 0,1115$; *esp*-/*asa1*-, $Z = 0,0710$). Angeführt sind jeweils signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) zwischen bestimmten Gruppen, bei keiner Angabe besteht kein signifikanter Unterschied; *, signifikant; durchgezogene schwarze Linie, $OD_{595} = 0,240$; gestrichelte schwarze Linie, $OD_{595} = 0,120$

4.2 *E. faecium* isoliert aus verschiedenem klinischen Material

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 78 *E. faecium* Stämme aus unterschiedlichem klinischen Material auf das Vorkommen von Virulenzfaktoren und Biofilm-Bildung untersucht. Dabei handelte es sich um Isolate aus Faeces (n = 27), Urin (n = 10), Wunden (n = 6), invasiver Herkunft (n = 21), der Umwelt (n = 11) sowie diversem Probenmaterial (n = 3).

Das *esp* Gen konnte in 33,3 % der Faeces-Isolate nachgewiesen werden, wohingegen sich ein höheres Vorkommen bei Stämmen anderer Herkunft gezeigt hat (90,0 %, 66,7 % und 42,9 % bei *E. faecium* aus Urin, Wunden bzw. invasiver Herkunft). Dieser Virulenzfaktor wurde bei keinem Isolat aus der Umwelt detektiert. Es ergab sich eine Gesamtinzidenz von 43,6 % für *esp_{fm}*. Ergänzend wurde ebenfalls die Anzahl der A- und C-Repeats des *esp* Gens bestimmt. Hier wies die Mehrzahl der Isolate vier A-Repeats (73,5 %) und sechs C-Repeats (97,0 %) auf.

Das Auftreten des Hyaluronidase-Gens (*hyl*) konnte insgesamt bei 42,3 % der *E. faecium* festgestellt werden. Auch hier zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der Häufigkeit bei Faeces-Stämmen (14,8 %) und solchen aus Urin, Wunden und invasiver Herkunft (80,0 %, 100,0 % bzw. 66,7 %). Auch dieser Virulenzfaktor konnte bei keinem der *E. faecium* aus der Umwelt nachgewiesen werden.

Weiterhin zeigte kein Isolat DNase-, Lipase-, Gelatinase-Produktion oder β -Hämolyse. Ein hemmender Effekt auf den Indikatorstamm *E. faecalis* JH2-2 wurde bei insgesamt 34,2 % der *E. faecium* festgestellt. Der Indikatorstamm *E. faecium* 64/3 wurde insgesamt von nur 7,7 % der Stämme gehemmt, wobei dies allesamt Faeces-Isolate waren (Bacteriocin-Test). Biofilm-Bildung konnte lediglich bei einem (1,3 %; Isolat 5.7) der 78 untersuchten *E. faecium* Stämme nachgewiesen werden (mäßiger BF-Bildner; *esp*⁺, *hyl*⁺).

4.3 *E. faecalis* isoliert von Patientinnen mit dem Krankheitsbild Bakterielle Vaginose

4.3.1 Phänotypischer und genotypischer Nachweis von Virulenzfaktoren

Alle Enterokokken-Stämme, die aus Vaginalabstrichen isoliert wurden, konnten mittels biochemischer und molekularbiologischer Untersuchung als *E. faecalis* identifiziert werden, außerdem traten keine Vancomycin-Resistenzen auf. In Tab. 13 sind die Ergebnisse der Nachweise verschiedener Virulenzfaktoren für die 80 untersuchten *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen dargestellt. Gelatinase-Produktion und β -Hämolyse wurden bei 57,5 % bzw. 12,5 % der von insgesamt 40 BV-positiven Patientinnen isolierten Stämme nachgewiesen und bei 37,5 % bzw. 30,0 % der aus 40 Patientinnen der Kontrollgruppe isolierten Stämme. Die Gesamthäufigkeit bei 80 untersuchten Isolaten betrug 47,5 % bzgl. der Gelatinase-Produktion und 21,3 % bzgl. der β -Hämolyse. Alle getesteten Stämme von BV-positiven Frauen waren zur Wasserstoffperoxid-Bildung befähigt, während H_2O_2 -Produktion bei 85,0 % der *E. faecalis* der Kontrollgruppe festgestellt wurde. Damit waren 92,5 % der 80 getesteten Isolate aus Vaginalabstrichen H_2O_2 -Produzenten.

Die Untersuchung zur Bacteriocin-Produktion ergab, dass 42,5 % bzw. 25,0 % der Isolate von Patientinnen mit BV eine wachstumshemmende Wirkung auf den Indikatorstamm *E. faecium* 64/3 bzw. *E. faecalis* JH2-2 ausübten. Diese Eigenschaft war im Vergleich dazu ebenfalls bei 42,5 % bzw. 35,0 % der Stämme der Kontrollgruppe zu erkennen. Insgesamt hemmten somit 42,5 % aller vaginalen Isolate den Indikatorstamm *E. faecalis* JH2-2 und 30,0 % den Stamm *E. faecium* 64/3.

Das Vorkommen der Virulenzfaktorengene *gelE*, *cylA*, *esp* und *asa1* lag bei 85,0 % bzw. 42,5 %, 52,5 % und 65,0 % bei *E. faecalis* von BV-positiven Frauen und bei 72,5 % bzw. 52,5 %, 55,0 % und 75,0 % bei Stämmen der Kontrollgruppe. Insgesamt trugen 78,8 % der 80 Stämme das *gelE* Gen, 47,5 % das *cylA* Gen, 53,8 % das *esp* Gen und 70,0 % das *asa1* Gen.

Eine statistische Analyse zum Vergleich der Isolate von Patientinnen mit BV und der *E. faecalis* von Patientinnen der Kontrollgruppe wurde in einem Vierfeldertest mittels Fisher's Exact Test vorgenommen. Hiermit wird getestet, ob signifikante Unterschiede zwischen den nachgewiesenen Häufigkeiten der Virulenzfaktoren der beiden Gruppen vorliegen (signifikante Abweichung der im Versuch beobachteten Häufigkeitsverteilung von der theoretisch erwarteten Häufigkeitsverteilung; Köhler *et al.*, 2002). Die Auswertung ergab, dass bei keiner der untersuchten Virulenzeigenschaften mit Ausnahme der H_2O_2 -Produktion ein signifikanter Unterschied zwischen *E. faecalis* Stämmen von Patientinnen mit BV und Isolaten von Frauen der Kontrollgruppe festgestellt werden konnte.

Tab. 13 Ergebnisse der Nachweise von Virulenzfaktoren bei *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen

BV positiv, *E. faecalis* Stämme aus Abstrichen mit kulturellem Nachweis von *G. vaginalis* und Clue Cells; BV negativ, Kontrollgruppe (siehe 3.9.1); GelE, Gelatinase-Produktion; β -Häm, β -Hämolyse-Nachweis; *gelE*, *cylA*, *esp*, *asa1*, Nachweis der Gene; H₂O₂, H₂O₂-Produktion (schwach und stark); *E.fm* 64/3, *E.fc* JH2-2, Bacteriocin-Produktion (Hemmhöhe > 2 mm) gegenüber des Indikatorstamms *E. faecium* 64/3 bzw. *E. faecalis* JH2-2; ns, nicht signifikant; *, signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen BV positiv und BV negativ

Herkunft	Anzahl Stämme	GelE	<i>gelE</i>	β -Häm	<i>cylA</i>	<i>esp</i>	<i>asa1</i>	<i>E.fm</i> 64/3	<i>E.fc</i> JH2-2	H ₂ O ₂
BV positiv	40	23 57,5%	34 85,0%	5 12,5%	17 42,5%	21 52,5%	26 65,0%	17 42,5%	10 25,0%	40 100%
BV negativ	40	15 37,5%	29 72,5%	12 30,0%	21 52,5%	22 55,0%	30 75,0%	17 42,5%	14 35,0%	34 85,0%
Insgesamt	80	38 47,5%	63 78,8%	17 21,3%	38 47,5%	43 53,8%	56 70,0%	34 42,5%	24 30,0%	74 92,5%
Fisher's Exact Test bzgl. der Gruppen BV positiv und BV negativ										
P-Wert		0,1165	0,2742	0,0993	0,5021	1,0000	0,4647	1,0000	0,4647	0,0255
Signifikanz (P < 0,05)		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*

Bei keinem der Isolate konnten Lipase-Produktion oder das Vorhandensein des *hyl* Gens nachgewiesen werden. Der *bee* Locus wurde lediglich bei einem Stamm (BV20) detektiert. Der DNase-Nachweis war bei nur sechs Isolaten positiv (7,5 %; BV38, BV123, BV146, BV151, BV154, BV165; siehe Tab. 30 und Tab. 32 im Anhang). Außerdem konnte mittels Bacteriocin-Tests bei keinem Isolat eine hemmende Wirkung gegenüber neun *Lactobacillus* spp. (Wildtypstämme) sowie gegenüber *L. acidophilus* DSM 20079 oder *L. crispatus* DSM 20584 festgestellt werden.

4.3.2 Vorkommen von Biofilm-Bildung

In Tab. 14 werden die Anzahlen der *E. faecalis* Isolate aufgeführt, die von insgesamt 80 untersuchten Stämmen nicht zur Bildung eines BF befähigt sind, einen mäßigen oder starken BF bilden können, sowie die daraus jeweils berechneten arithmetischen Mittelwerte und Medianwerte. Von 40 untersuchten *E. faecalis* Stämmen, isoliert von Patientinnen mit BV, waren 27,5 % nicht in der Lage, einen Biofilm *in vitro* zu bilden (Tab. 14). Bei 20,0 % dieser Isolate handelte es sich um mäßige BF-Bildner, 52,5 % produzierten einen starken Biofilm. Unter den 21 starken BF-Bildnern konnten 6 Isolate (15,0 % aller 40 Stämme dieser Gruppe) einen sehr starken Biofilm bilden, wobei sich ein Medianwert von Z von OD₅₉₅ = 2,339 ergab.

Bzgl. der Stämme der Kontrollgruppe wurden 20,0 % als Nicht-BF-Bildner eingestuft, 27,5 % als mäßige BF-Produzenten und 52,5 % als starke BF-Bildner. Unter den starken BF-Bildnern waren 17,5 % der *E. faecalis* zur Bildung eines sehr starken Biofilms *in vitro* befähigt, wobei ein Medianwert Z von OD₅₉₅ = 0,641 resultierte.

Insgesamt konnten von 80 getesteten *E. faecalis* isoliert aus Vaginalabstrichen 23,8 % keinen, 23,8 % einen mäßigen und 52,5 % einen starken Biofilm bilden. Als sehr starke BF-Produzenten erwiesen sich 16,3 % aller untersuchten Stämme aus Vaginalabstrichen.

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der *E. faecalis* von Patientinnen mit BV und den Isolaten der Kontrollgruppe konnte in keiner BF-Kategorie (kein, mäßiger oder starker BF-Bildner) mittels statistischer Auswertung (Fisher's Exact Test, $P < 0,05$) festgestellt werden.

Tab. 14 Vorkommen von Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen

BV positiv, *E. faecalis* Stämme aus Abstrichen mit kulturellem Nachweis von *G. vaginalis* und Clue Cells; BV negativ, Kontrollgruppe (siehe 3.9.1); $OD_{595} < 0,120$, kein BF-Bildner; $0,120 \leq OD_{595} \leq 0,240$, mäßige BF-Bildner; $OD_{595} > 0,240$, starker BF-Bildner; $OD_{595} > 0,5$, sehr starker BF-Bildner, diese Stämme sind in der Kategorie der starken BF-Bildner ($OD_{595} > 0,240$) ebenfalls enthalten; ns, nicht signifikant; nb, nicht bestimmt

Herkunft	Anzahl Stämme	$OD_{595} < 0,120$	$0,120 \leq OD_{595} \leq 0,240$	$OD_{595} > 0,240$	davon $OD_{595} > 0,500$
BV positiv	40	11 27,5%	8 20,0%	21 52,5%	6 15,0%
Mittelwert		0,079	0,191	0,895	2,326
Median Z		0,076	0,191	0,352	2,339
BV negativ	40	8 20,0%	11 27,5%	21 52,5%	7 17,5%
Mittelwert		0,086	0,199	0,468	0,942
Median Z		0,097	0,208	0,414	0,641
insgesamt	80	19 23,8%	19 23,8%	42 52,5%	13 16,3%
Fisher's Exact Test bzgl. der Gruppen BV positiv und BV negativ					
P-Wert		0,6001	0,6001	1,0000	nb
Signifikanz ($P < 0,05$)		ns	ns	ns	nb

4.3.3 Zusammenhang von Biofilm-Bildung mit bestimmten Virulenzfaktoren

Die statistische Auswertung zum Zusammenhang zwischen der Menge an gebildetem Biofilm und dem Vorkommen von *esp* bei den 80 untersuchten *E. faecalis* Stämmen aus Vaginalabstrichen ergab, dass ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zwischen den Medianwerten der *esp*⁻ und *esp*⁺ Isolate besteht (Abb. 11). Mittels Mann-Whitney Test wurde ein P-Wert von 0,0003 ermittelt. Demnach war bei den Stämmen, bei denen das *esp* Gen nachgewiesen werden konnte (*esp*⁺), ein signifikant erhöhter Median der OD₅₉₅-Werte der Biofilm-Bildung festzustellen (0,195 vs 0,330).

Stellt man hingegen Stämme, die Gelatinase produzieren, den Gelatinase-negativen Isolaten gegenüber (Abb. 12), so ergibt sich ein nicht signifikanter Unterschied zwischen den Medianwerten der beiden Gruppen ($P = 0,1728$). Auch die Betrachtung der Korrelation von Biofilm-Bildung und der Anwesenheit des *asa1* Gens (Abb. 13) erbrachte keinen signifikanten Unterschied ($P = 0,4158$) der Medianwerte nach statistischer Analyse mittels Mann-Whitney Test ($P < 0,05$).

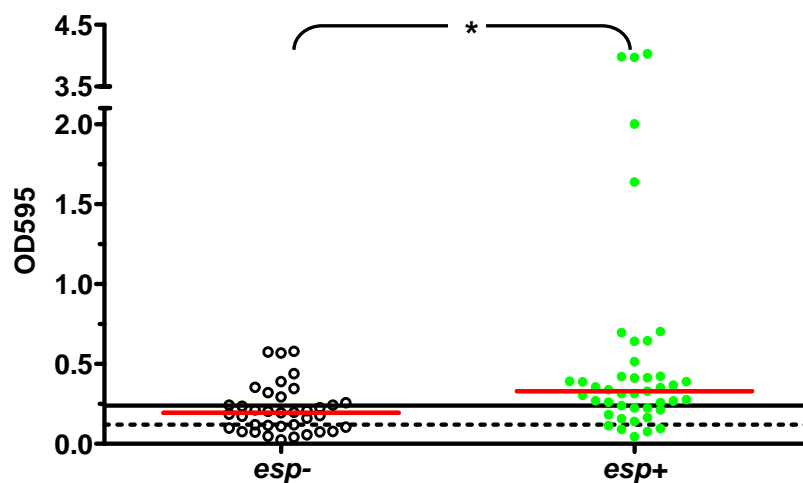


Abb. 11 Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen des *esp* Gens bei *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen

Dargestellt sind die ermittelten BF-Werte (OD₅₉₅-Mittelwerte, y-Achse) der 80 untersuchten *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen in Korrelation zur Anwesenheit des *esp* Gens (x-Achse). Rote Linien zeigen den Medianwert Z der OD₅₉₅-Werte der jeweiligen Gruppe an (*esp*⁻, Z = 0,195; *esp*⁺, Z = 0,330). *, signifikant; durchgezogene schwarze Linie, OD₅₉₅ = 0,240; gestrichelte schwarze Linie, OD₅₉₅ = 0,120

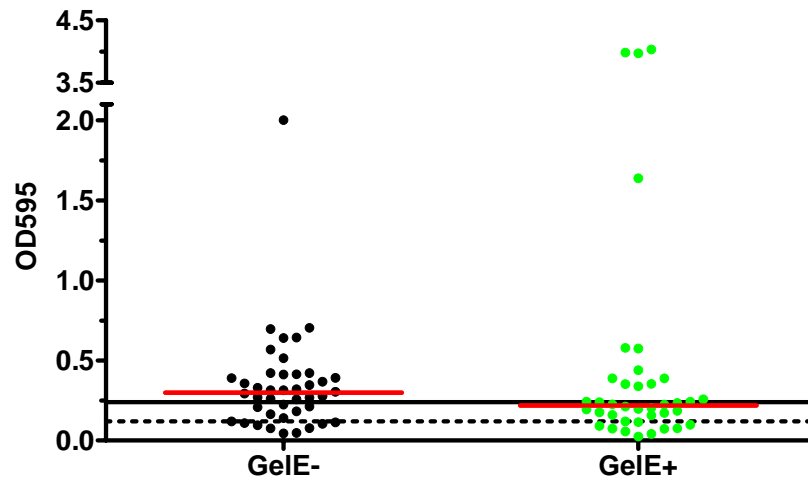


Abb. 12 Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen von Gelatinase-Produktion bei *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen

Dargestellt sind die ermittelten BF-Werte (OD_{595} -Mittelwerte, y-Achse) der 80 untersuchten *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen in Korrelation zur Gelatinase-Produktion (x-Achse). Rote Linien zeigen den Medianwert Z der OD_{595} -Werte der jeweiligen Gruppe an (GelE-, $Z = 0,2985$; GelE+, $Z = 0,2180$). Die Medianwerte sind nicht signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney Test, $P < 0,05$). Durchgezogene schwarze Linie, $OD_{595} = 0,240$; gestrichelte schwarze Linie, $OD_{595} = 0,120$

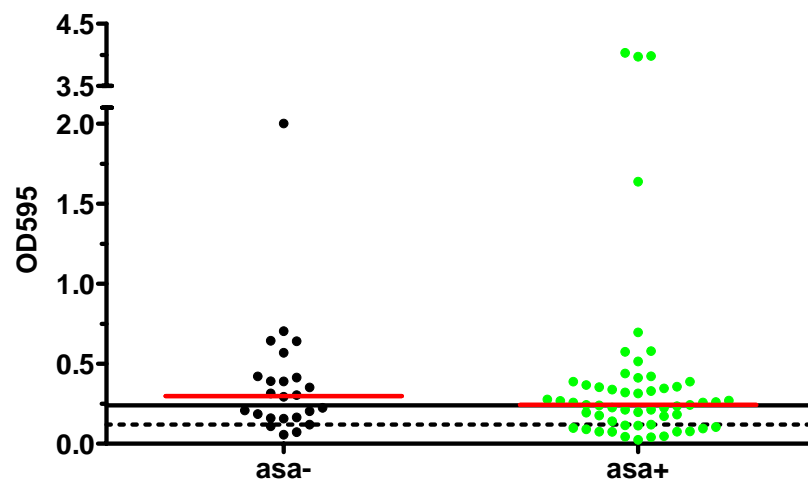


Abb. 13 Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen des *asa1* Gens bei *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen

Dargestellt sind die ermittelten BF-Werte (OD_{595} -Mittelwerte, y-Achse) der 80 untersuchten *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen in Korrelation zur Anwesenheit des *asa1* Gens (x-Achse). Rote Linien zeigen den Medianwert Z der OD_{595} -Werte der jeweiligen Gruppe an (*asa1*-, $Z = 0,2985$; *asa1*+, $Z = 0,2430$). Die Medianwerte sind nicht signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney Test, $P < 0,05$). Durchgezogene schwarze Linie, $OD_{595} = 0,240$; gestrichelte schwarze Linie, $OD_{595} = 0,120$

Nach Gruppierung der Isolate bzgl. der An- bzw. Abwesenheit von zwei Virulenzfaktoren und der Menge an produziertem Biofilm ergaben sich Korrelationen, die in Abb. 14 und Abb. 15 dargestellt werden. Zur statistischen Auswertung wurde zunächst jeweils ein Kruskal-Wallis Test zur Feststellung eines globalen signifikanten Unterschieds ($P < 0,05$) zwischen den vier untersuchten Medianen durchgeführt. Eine Analyse der Unterschiede (Differenzen) in den Rangsummen (Dunn's Multiple Comparison Test) zeigte anschließend, welche Gruppen sich signifikant unterscheiden ($P < 0,05$).

Bei Vergleich der Stämme in Bezug zum Vorkommen des *esp* Gens und/oder der Gelatinase-Produktion (Abb. 14) ergab sich nach der Feststellung eines signifikanten Unterschieds ($P = 0,0040$) zwischen den vier analysierten Medianen, dass sich die Rangsummen der Gruppen *esp*⁻/*GelE*⁺ und *esp*⁺/*GelE*⁻ sowie der Gruppen *esp*⁻/*GelE*⁺ und *esp*⁺/*GelE*⁺ signifikant unterscheiden. Der Vergleich der Rangsummen anderer Gruppierungen (*esp*⁻/*GelE*⁻ vs *esp*⁻/*GelE*⁺; *esp*⁻/*GelE*⁻ vs *esp*⁺/*GelE*⁻; *esp*⁻/*GelE*⁻ vs *esp*⁺/*GelE*⁺; *esp*⁺/*GelE*⁻ vs *esp*⁺/*GelE*⁺) erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

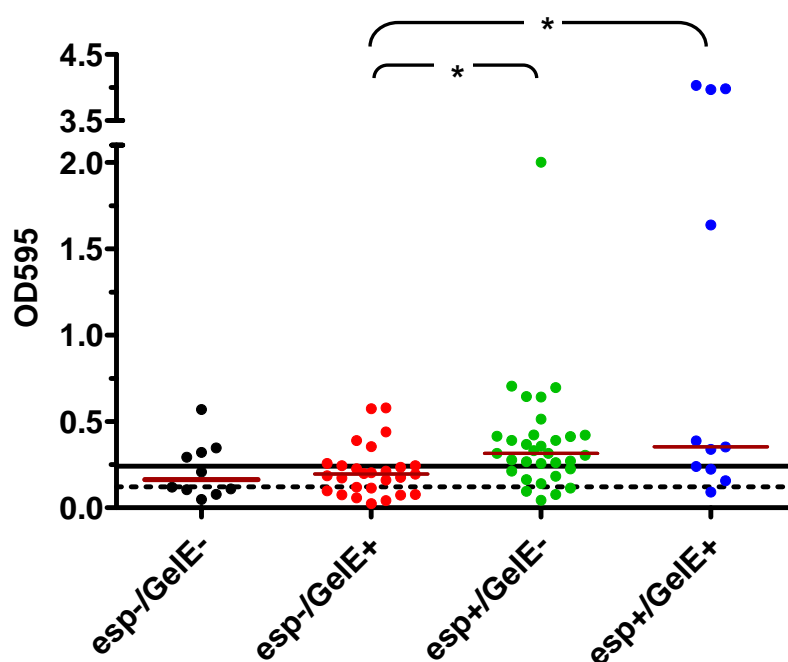


Abb. 14 Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen von *esp* und/oder *GelE* bei *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen

Dargestellt sind die ermittelten BF-Werte (OD₅₉₅-Mittelwerte, y-Achse) der 80 untersuchten *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen in Korrelation zur An- bzw. Abwesenheit des *esp* Gens und der Gelatinase-Produktion (x-Achse). Rote Linien zeigen den Medianwert Z der OD₅₉₅-Werte der jeweiligen Gruppe an (*esp*⁻/*GelE*⁻, Z = 0,1635; *esp*⁻/*GelE*⁺, Z = 0,1950; *esp*⁺/*GelE*⁻, Z = 0,3140; *esp*⁺/*GelE*⁺, Z = 0,3520). Angeführt sind jeweils signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) zwischen bestimmten Gruppen, bei keiner Angabe besteht kein signifikanter Unterschied; *, signifikant; durchgezogene schwarze Linie, OD₅₉₅ = 0,240; gestrichelte schwarze Linie, OD₅₉₅ = 0,120

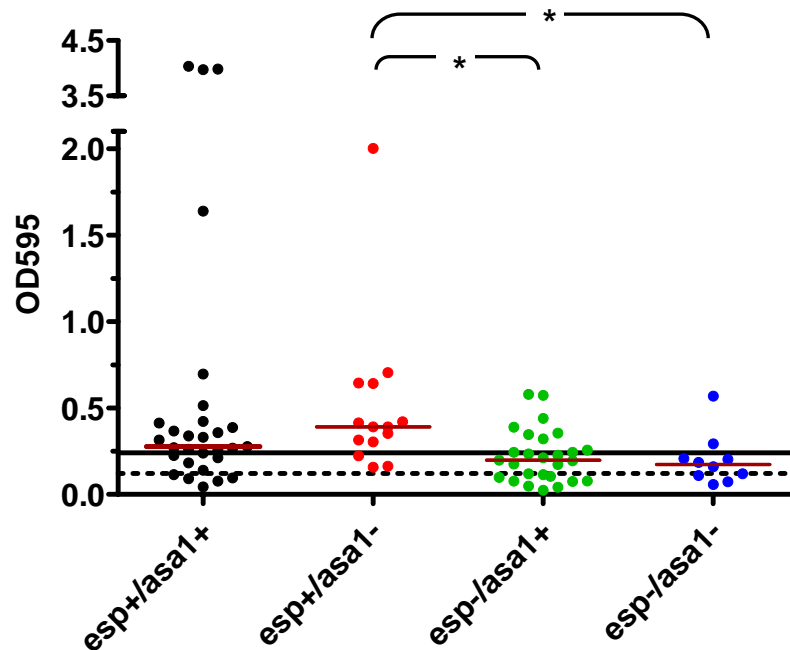


Abb. 15 Zusammenhang zwischen Biofilm-Bildung und dem Vorkommen von *esp* und/oder *asa1* bei *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen

Dargestellt sind die ermittelten BF-Werte (OD₅₉₅-Mittelwerte, y-Achse) der 80 untersuchten *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen in Korrelation zur An-/Abwesenheit des *esp* Gens und des *asa1* Gens (x-Achse). Rote Linien zeigen den Medianwert Z der OD₅₉₅-Werte der jeweiligen Gruppe an (*esp*⁺/*asa1*⁺, Z = 0,2770; *esp*⁺/*asa1*⁻, Z = 0,3905; *esp*⁻/*asa1*⁺, Z = 0,1980; *esp*⁻/*asa1*⁻, Z = 0,1730). Angeführt sind jeweils signifikante Unterschiede (P < 0,05) zwischen bestimmten Gruppen, bei keiner Angabe besteht kein signifikanter Unterschied; *, signifikant; durchgezogene schwarze Linie, OD₅₉₅ = 0,240; gestrichelte schwarze Linie, OD₅₉₅ = 0,120

Die untersuchten Isolate wurden ebenfalls nach der An- bzw. Abwesenheit des *esp* und *asa1* Gens gruppiert und einer statistischen Analyse unterzogen (Abb. 15). Hierbei zeigte sich mittels Durchführung des Kruskal-Wallis Tests wiederum auf globaler Ebene ein signifikanter Unterschied (P = 0,0020) zwischen den untersuchten Medianen. Die anschließende Analyse der Differenz in den Rangsummen ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen *esp*⁺/*asa1*⁻ und *esp*⁻/*asa1*⁺ sowie *esp*⁺/*asa1*⁻ und *esp*⁻/*asa1*⁻. Die Bewertung der Differenz der Rangsummen anderer Gruppierungen erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

4.4 Vergleich der *E. faecalis* Stämme aus Vaginalabstrichen mit Isolaten anderer klinischer Herkunft

Die Untersuchung der Inzidenzen der Virulenzfaktoren bei *E. faecalis* aus verschiedenen klinischen Bereichen ergab keine signifikanten Unterschiede im Vorkommen der nachgewiesenen Gene bzw. phänotypischen Eigenschaften unter den jeweiligen Herkunftsgruppen (Faeces, Urin, Wunden, invasive Herkunft; siehe 4.1.1). Die Abb. 16 stellt zusätzlich einen Vergleich dieser Stämme mit den 80 charakterisierten Isolaten aus Vaginalabstrichen (siehe 4.3.1) bzgl. des Vorkommens von Virulenzfaktoren dar. Dies verdeutlichte ebenfalls, dass keine erkennbaren Unterschiede zwischen den jeweiligen Herkunftsgruppen hinsichtlich des Auftretens von Virulenzfaktoren nachgewiesen werden konnten. Lediglich die Häufigkeiten von *cyIA* und β -Hämolyse bei Isolaten aus Faeces und invasiver Herkunft zeigten sich im Vergleich als leicht erniedrigt, was allerdings keinen signifikanten Unterschied darstellte (siehe 4.1.1).

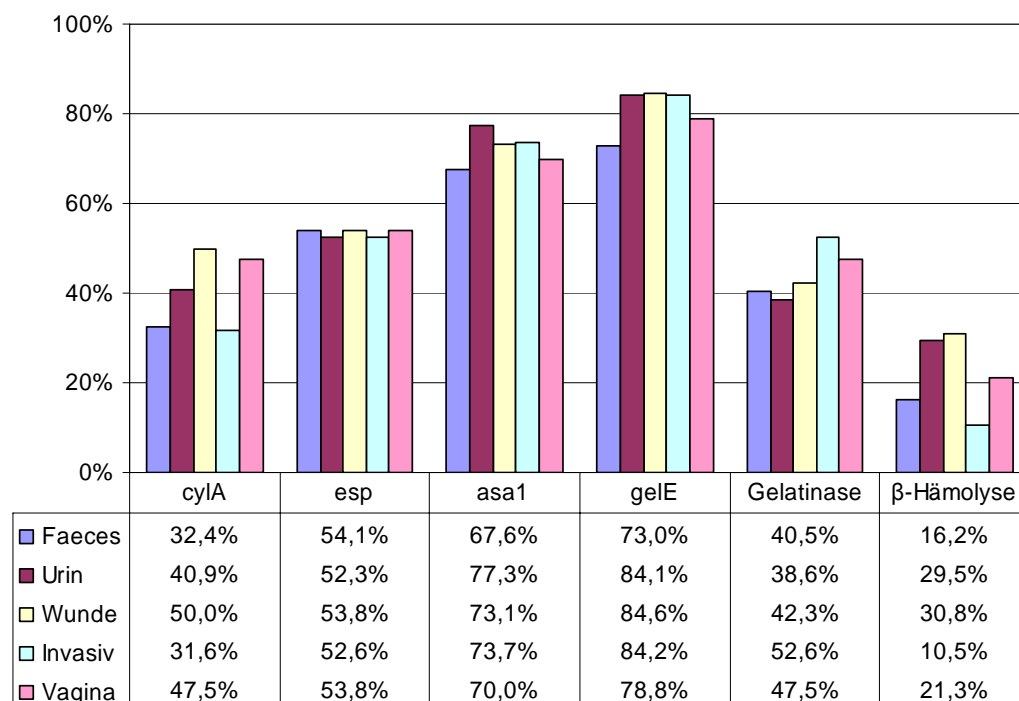


Abb. 16 Vergleich der Inzidenzen bestimmter Virulenzfaktoren bei *E. faecalis* Stämmen unterschiedlicher Herkunft

Dargestellt sind die Häufigkeiten der Virulenzeigenschaften in der jeweiligen Herkunftsgruppe. Gesamtanzahl der aufgeführten Stämme $n = 206$ (Faeces, $n = 37$; Urin, $n = 44$; Wunde, $n = 26$; Invasive Herkunft, $n = 19$; Vaginalabstriche, $n = 80$); *cyIA*, *esp*, *asa1*, *gelE*, Nachweis der Gene; Gelatinase, Nachweis der Gelatinase-Produktion; β -Hämolyse, Nachweis der β -Hämolyse-Aktivität.

Ein Unterschied zwischen den *E. faecalis* Stämmen, die aus Vaginalabstrichen von Patientinnen mit BV isoliert wurden, und solchen der Kontrollgruppe bzgl. ihrer Fähigkeit zur Biofilm-Bildung konnte nicht festgestellt werden (siehe 4.3.2). Werden allerdings alle 80 untersuchten *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen (4.3.2) mit Isolaten aus anderem klinischen Material (4.1.2) hinsichtlich dieses Merkmals gegenübergestellt (Abb. 17), so wurde deutlich, dass die Gruppe der Vaginalabstrich-Isolate den höchsten Median der OD_{595} -Werte ($Z = 0,2500$) im Vergleich zu den Stämmen aus Faeces ($Z = 0,1040$), Urin ($Z = 0,1665$), Wunden ($Z = 0,0905$) und invasiver Herkunft ($Z = 0,1900$) aufwiesen. Die statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis Test (Unterschiede der Mediane) mit anschließender Bewertung der Rangsummen-Differenzen der jeweiligen Gruppen (Dunn's Multiple Comparison Test) ergab einen signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen den Stämmen aus Faeces und Vaginalabstrichen sowie den Isolaten aus Wunden und Vaginalabstrichen.

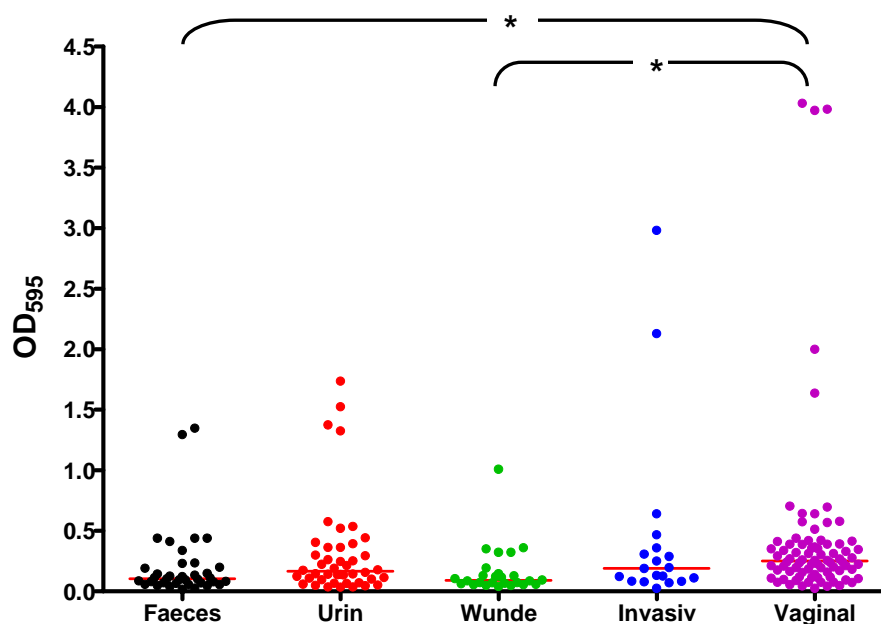


Abb. 17 Vergleich bzgl. der Biofilm-Bildungsfähigkeit der untersuchten *E. faecalis* Stämme verschiedener Herkunft

Dargestellt sind die ermittelten BF-Werte (OD_{595} -Mittelwerte, y-Achse) der untersuchten *E. faecalis* aus Faeces ($n = 37$, schwarze Punkte), Urin ($n = 44$, rot), Wunden ($n = 26$, grün), invasiven Infektionen ($n = 19$, blau) und Vaginalabstrichen ($n = 80$, violett). Rote Linien zeigen den Medianwert Z der OD_{595} -Werte der jeweiligen Gruppe an (Faeces, $Z = 0,1040$; Urin, $Z = 0,1665$; Wunde, $Z = 0,0905$; Invasiv, $Z = 0,1900$; Vaginal, $Z = 0,2500$). Aufgeführt sind jeweils signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) zwischen bestimmten Gruppen, bei keiner Angabe besteht kein signifikanter Unterschied; *, signifikant.

Werden die Verteilungen der Stämme bzgl. der BF-Kategorien (kein, mäßiger und starker bzw. sehr starker BF-Bildner) bei den untersuchten *E. faecalis* Isolaten unterschiedlicher Herkunft verglichen (Tab. 15), so wurde ebenfalls ein sichtbarer Unterschied erkennbar. Während bei den Stämmen aus Urin und invasiver Herkunft zu jeweils ca. 30 % keine sowie mäßige BF-Produzenten und etwa zu 40 % starke BF-Bildner vorkamen, bildeten unter den Faeces- und Wund-Isolaten ca. 60 % der Stämme keinen BF sowie zu jeweils ca. 20 % einen mäßigen bzw. starken BF. Im Gegensatz dazu waren bei den Isolaten aus Vaginalabstrichen insgesamt zu ca. einem Viertel jeweils keine und mäßige sowie etwa zur Hälfte starke BF-Bildner zu verzeichnen. Außerdem wurden unter den Stämmen aus Urin, invasiver Herkunft sowie Vaginalabstrichen je zu ca. 15 % sehr starke BF-Produzenten nachgewiesen, bei Faeces- und Wund-Isolaten lediglich zu 5,4 % bzw. 3,8 %.

Tab. 15 Vergleich des Vorkommens von Biofilm-Bildung bei den untersuchten *E. faecalis* Stämmen verschiedener Herkunft

OD₅₉₅ < 0,120, kein BF-Bildner; 0,120 ≤ OD₅₉₅ ≤ 0,240, mäßige BF-Bildner; OD₅₉₅ > 0,240, starker BF-Bildner; OD₅₉₅ > 0,5, sehr starker BF-Bildner, diese Stämme sind in der Kategorie der starken BF-Bildner (OD₅₉₅ > 0,240) ebenfalls enthalten.

Herkunft	Anzahl Stämme	OD ₅₉₅ < 0,120	0,120 ≤ OD ₅₉₅ ≤ 0,240	OD ₅₉₅ > 0,240	davon OD ₅₉₅ > 0,500
Faeces	37	56,8%	24,3%	18,9%	5,4%
Urin	44	31,8%	29,5%	38,6%	15,9%
Wunden	26	61,5%	19,2%	19,2%	3,8%
Invasiv	19	31,6%	26,3%	42,1%	15,8%
Vagina	80	23,8%	23,8%	52,5%	16,3%

4.5 Charakterisierung von *E. faecalis* Biofilm-Mutantenstämmen

4.5.1 Herstellung und Typisierung von *E. faecalis* Biofilm-Mutantenstämmen

Von den zuvor untersuchten *E. faecalis* Isolaten wurden mehrere Stämme, die sich in ihren bereits bekannten Eigenschaften hinsichtlich ihrer Biofilm-Bildungsfähigkeit und des Vorkommens von Virulenzfaktoren unterschieden, zur Anwendung der unter 3.9.2 beschriebenen Methodik ausgewählt, um von diesen Stämmen BF-Mutanten herzustellen. Die Isolate wurden insgesamt über 42 Tage in der dargestellten Weise kultiviert und jeweils im Abstand von ca. 7 Tagen auf einen veränderten BF-Phänotyp hin untersucht. Letztendlich konnten vier Stämme isoliert werden, die entweder eine erhöhte Fähigkeit zur BF-Bildung im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (Stamm 1.3.7, Wildtyp 1.3) oder eine Verringerung der BF-Produktion (Stamm 1.4.6, Wildtyp 1.4; Stamm 1.10.16, Wildtyp 1.10; Stamm 2.11.8, Wildtyp 2.11) zeigten. Zunächst wurde die Stabilität des veränderten BF-Phänotyps dieser isolierten Mutantenstämmen überprüft. Nach 20 Subkultivierungen zeigten die erzeugten Mutantenstämmen eine quantitativ stabile Erhöhung (1.3.7) bzw. Abnahme (1.4.6, 1.10.16, 2.11.8) der BF-Bildungsfähigkeit.

Da diese Langzeit-Subkultivierung zur Erzeugung von BF-Mutantenstämmen eine erhöhte Gefahr von Kontaminationen in sich birgt, musste vor Beginn weiterer Untersuchungen die Identität der Stämme gesichert werden. Deshalb wurden die Isolate mittels verschiedener Typisierungsverfahren untersucht. Die Stämme wurden zunächst mittels einer rep-PCR mit dem Primer BOX2AR typisiert (Abb. 37 im Anhang). Die Auswertung dieser Typisierung zeigte, dass jeweils Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen eine Gruppe bilden (clustern), so dass zunächst davon ausgegangen werden konnte, dass es sich hier bei allen vier Stämmen um Klone des Ursprungsisolats handelte. Das Fingerprint-Muster des Stamms 1.4 wies allerdings eine deutliche Bande auf, die dem BF-Mutantenstamm 1.4.6 fehlte, so dass bzgl. dieser Isolate mittels der rep-PCR keine endgültige Aussage über deren Identität getroffen werden konnte. Daher wurden die Stämme ebenfalls mit Hilfe der hochdiskriminierenden PFGE typisiert.

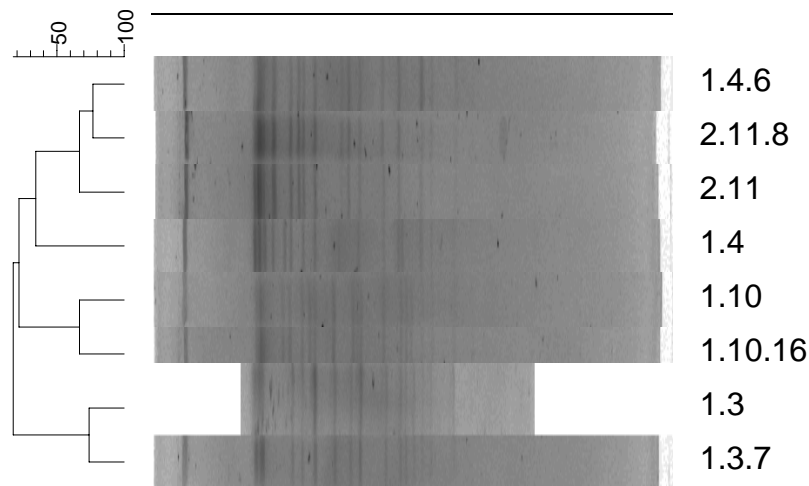
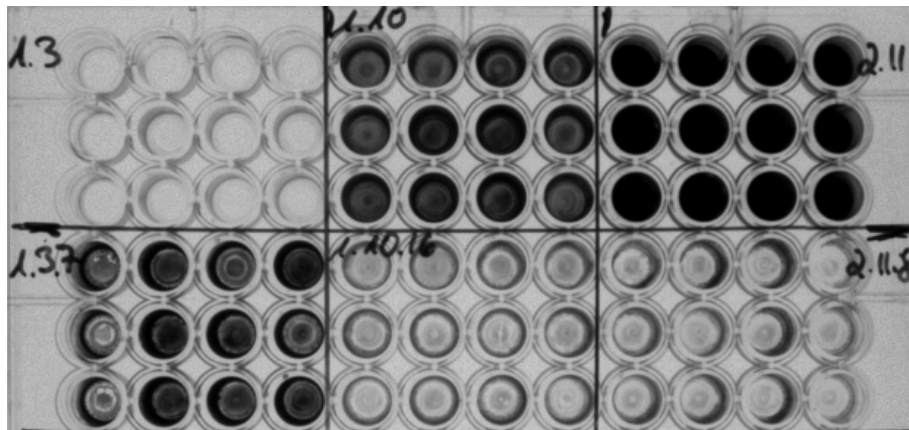


Abb. 18 Dendrogramm zur Typisierung der *E. faecalis* Wildtyp- und BF-Mutantenstämme mittels PFGE

Auswertung der digitalisierten Bilder der entstandenen PFGE-Fingerprint-Bandenmuster mittels BioNumerics Software; Analyse zum Clustering der Isolate mittels des Dice-Koeffizienten und UPGMA Algorithmus (MRI, Karlsruhe).

Die Untersuchung der Stämme mittels PFGE (Abb. 18 sowie Abb. 38 im Anhang) zeigte schließlich, dass das Isolat 1.4 nicht mit dem zugehörigen BF-Mutantenstamm gruppiert. Dies konnte auch durch eine weitere Typisierung der Stämme mittels RAPD-PCR mit dem Primer M13 (Huey & Hall, 1989; Daten nicht dargestellt) bestätigt werden. Auch die Untersuchung der stoffwechselfysiologischen Eigenschaften der Stämme (siehe 4.5.2.3) unterstützt dieses Resultat. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden drei *E. faecalis* BF-Mutantenstämme (1.3.7, 1.10.16, 2.11.8) zur weiteren Untersuchung herangezogen. Deren Wildtypstämme (1.3, 1.10, 2.11) sind im Jahr 2005 aus Vaginalabstrichen isoliert worden. Das *E. faecalis* Isolat 1.3 ist kein BF-Produzent, dessen Mutantenstamm bildet einen starken Biofilm. Die Isolate 1.10 und 2.11 produzieren einen starken Biofilm, deren hergestellte Mutanten sind schwache BF-Bildner (siehe Abb. 19). Diese phänotypische Veränderung der BF-Bildungsfähigkeit war nicht auf ein verringertes bzw. beschleunigtes Wachstum zurückzuführen, was mittels der Untersuchung des Wachstumsverhaltens erkennbar wurde (siehe Abb. 36 im Anhang). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden diese Stämme mittels verschiedener Methoden charakterisiert, um jeweils die genetische Ursache der Spontanmutation und deren Auswirkung auf den Phänotyp zu untersuchen.



Stamm	OD ₅₉₅	Stamm	OD ₅₉₅	Stamm	OD ₅₉₅
1.3	0,012 ±0,005	1.10	0,943 ±0,129	2.11	4,046 ±0,093
1.3.7	0,521 ±0,170	1.10.16	0,159 ±0,069	2.11.8	0,156 ±0,053

Abb. 19 Biofilm-Assay der Wildtyp- und BF-Mutantenstämme

Biofilme nach Anzucht über 18 h in 96well-Mikrotiterplatte (PS), angefärbt mit Hucker's Crystal Violet-Lösung (siehe 3.11.6); OD₅₉₅-Mittelwerte errechnet aus jeweils vier Replikaten von drei ÜN-Vorkulturen pro Teststamm.

Phänotypisch fielen zunächst Unterschiede in der Wachstumscharakteristik der *E. faecalis* Stämme bei der Kultivierung ÜN in TSBG (Biofilm-Medium, siehe 3.11.6) auf (Abb. 20). Die Isolate 1.10 und 2.11 aggregierten unter diesen Bedingungen in so starkem Maße, dass die Zellen im Kulturgefäß zu Boden sanken. Beim Stamm 2.11 konnten relativ große Aggregate beobachtet werden. Die Mutantenstämme hingegen zeigten eine gleichmäßige Trübung des Mediums und bildeten nur leichten Bodensatz. Bzgl. der Stämme 1.3 und 1.3.7 wurden kaum Unterschiede sichtbar, beide Isolate wuchsen homogen unter diesen Bedingungen und wiesen eine gleichmäßige Trübung des Mediums ohne starke Aggregation auf.

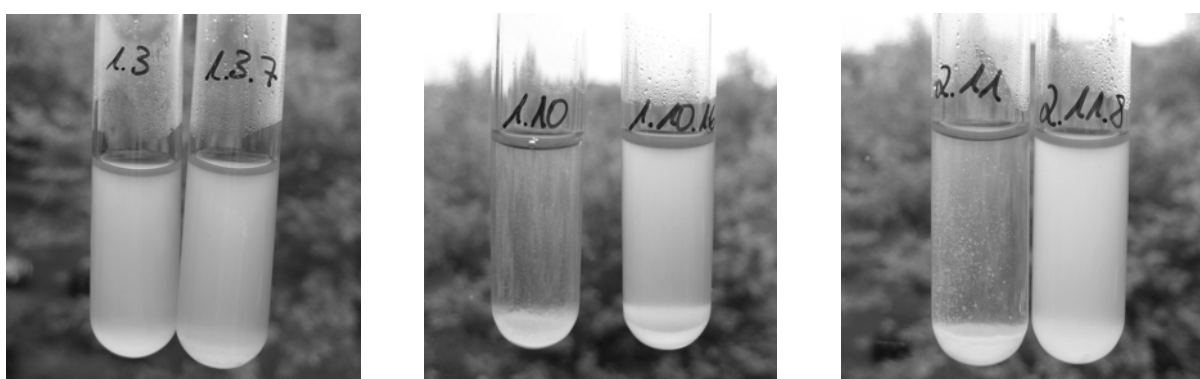


Abb. 20 Wachstumscharakteristik der *E. faecalis* Wildtyp- und BF-Mutantenstämme

Dargestellt sind ÜN-Kulturen der Isolate 1.3 und 1.3.7 (links), 1.10 und 1.10.16 (Mitte) sowie 2.11 und 2.11.8 (rechts) in TSBG (5 ml) bei 37°C.

4.5.2 Charakterisierung der *E. faecalis* Biofilm-Mutantenstämme

4.5.2.1 Darstellung der Biofilme mittels CLSM

Mit Hilfe der Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) wurden die lebenden Zellen und die von diesen auf Glasobjektträgern gebildeten Biofilme der Wildtyp- und BF-Mutantenstämme betrachtet. Die Abb. 21 bis Abb. 23 zeigen beispielhaft repräsentative CLSM-Bilder der Isolate jeweils in der Aufsicht (z-Achse; Bilder a und c) sowie im Querschnitt (x-y-Achse; Bilder b und d). Hierbei wurden zum einen Unterschiede jeweils zwischen Wildtyp- und Mutantenstamm beobachtet, zum anderen konnten aber auch Besonderheiten in der Struktur der gebildeten Biofilme festgestellt werden.

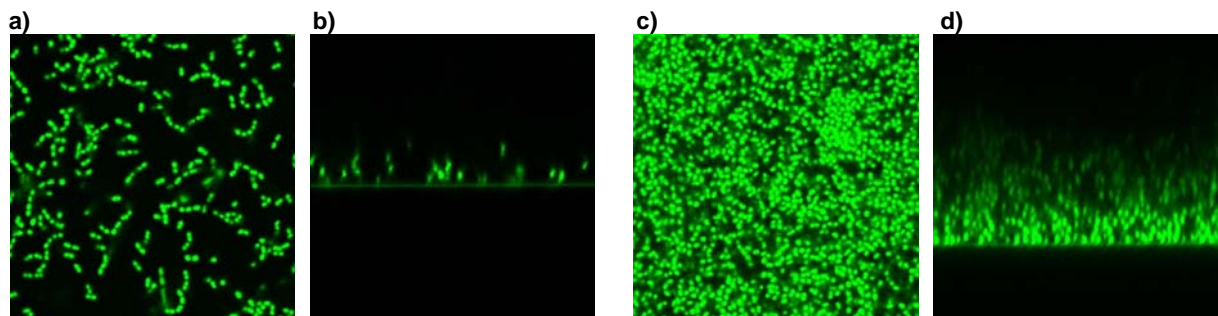


Abb. 21 CLSM der Stämme 1.3 und 1.3.7

Isolate kultiviert in TSBG für 18 h auf Glasobjektträgern, angefärbt mit Acridinorange, während der Mikroskopie mittels PBS-Puffer hydriert gehalten (siehe 3.14.2); a), b), Stamm 1.3; c), d), Stamm 1.3.7; a), c), Darstellung in z-Achsen-Richtung (Aufsicht); b), d), Darstellung in x-y-Achsen-Richtung (Durchsicht); Bildgröße jeweils 50 μm x 50 μm .

Der Stamm 1.3, welcher kein BF-Bildner ist, produzierte dementsprechend keinen Biofilm auf der Glasoberfläche, so dass in der CLSM nur einzelne Zellen zu beobachten waren, von denen nur wenige an das Trägermaterial adhärirt zu sein schienen (siehe Abb. 21 a,b). Die Mutante 1.3.7 bildete einen starken Biofilm, der sich sowohl in der Aufsicht (z-Achse, Abb. 21 c) als auch im Durchsichtsquerschnitt (Abb. 21 d) als sehr dicht und kompakt mit lediglich kleineren, zellfreien Zwischenräumen darstellte. Außerdem schienen die Zellen stark an der Glasoberfläche anzuheften (Abb. 21 d). Die Dicke dieses Biofilms an Stellen mit jeweils maximaler Höhe betrug durchschnittlich etwa 25 μm .

Im Vergleich dazu zeigte die Betrachtung des starken BF-Bildners 1.10, dass dessen Einzelzellen weniger dicht angeordnet, größere Zwischenräume im Biofilm zu erkennen waren, und somit dessen Biofilm insgesamt eine eher lockere Struktur aufwies (siehe Abb. 22 a,b). Der Biofilm besaß eine maximale Dicke von ca. 28 μm . Die Zellen der Mutante 1.10.16 bildeten auf der Glasoberfläche lediglich eine dünne Schicht (ca. ein bis zwei Lagen), in der ebenfalls Zwischenräume zu erkennen waren (siehe Abb. 22 c,d).

Die CLSM-Darstellung des sehr starken BF-Bildners 2.11 ergab, dass dieser Stamm einen zum Isolat 1.3.7 beinahe ähnlichen, kompakten Biofilm auf dem Glasobjektträger produzierte (siehe Abb. 23 b). Allerdings konnten hier im Vergleich deutlich größere Zwischenräume, die kanalähnliche Strukturen aufwiesen, in dem dichten, mehrschichtigen Biofilm beobachtet

werden (siehe Abb. 23 a). Die Dicke dieses Biofilms betrug durchschnittlich etwa 24 μm . Die Betrachtung der Mutante 2.11.8 zeigte ein fast identisches Bild zum Stamm 1.10.16 (vgl. Abb. 22 c,d mit Abb. 23 c,d). Es war lediglich eine dünne Zellschicht auf dem Objektträger mit größeren Zwischenräumen zu erkennen (Abb. 23 c,d).

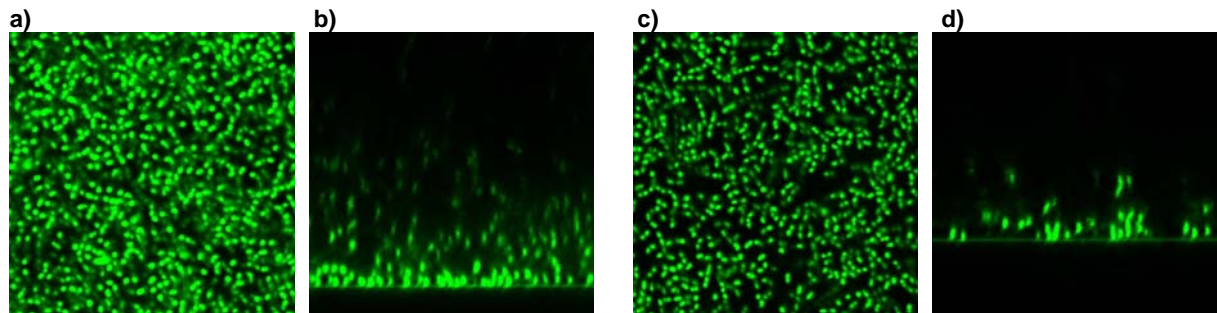


Abb. 22 CLSM der Stämme 1.10 und 1.10.16

Isolate kultiviert in TSBG für 18 h auf Glasobjektträgern, angefärbt mit Acridinorange, während der Mikroskopie mittels PBS-Puffer hydriert gehalten (siehe 3.14.2); a), b), Stamm 1.10; c), d), Stamm 1.10.16; a), c), Darstellung in z-Achsen-Richtung (Aufsicht); b), d), Darstellung in x-y-Achsen-Richtung (Durchsicht); Bildgröße jeweils 50 μm x 50 μm .

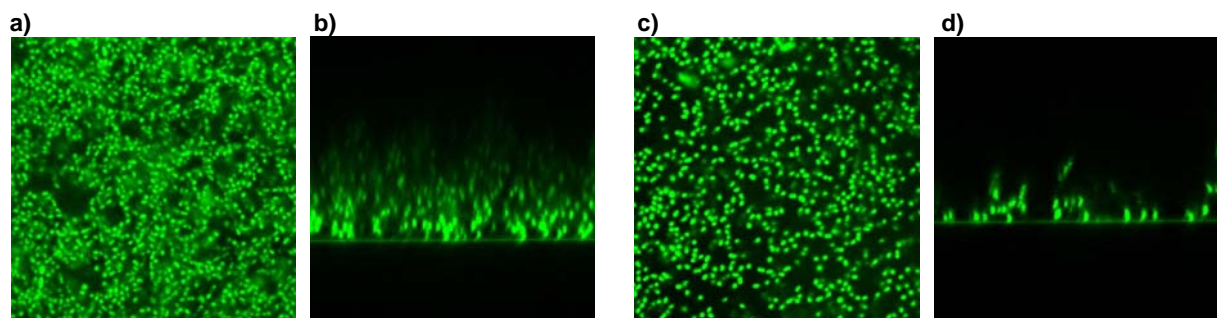


Abb. 23 CLSM der Stämme 2.11 und 2.11.8

Isolate kultiviert in TSBG für 18 h auf Glasobjektträgern, angefärbt mit Acridinorange, während der Mikroskopie mittels PBS-Puffer hydriert gehalten (siehe 3.14.2); a), b), Stamm 2.11; c), d), Stamm 2.11.8; a), c), Darstellung in z-Achsen-Richtung (Aufsicht); b), d), Darstellung in x-y-Achsen-Richtung (Durchsicht); Bildgröße jeweils 50 μm x 50 μm .

4.5.2.2 Darstellung der Biofilme mittels REM

Die Zellen bzw. Biofilme der *E. faecalis* Wildtyp- und Mutantenstämme wurden des Weiteren mittels Rasterelektronen-Mikroskopie (REM) betrachtet. Hierzu wurden die Stämme auf Glasobjektträgern für 18 h angezogen, um die einzelnen Zellen sowie die gebildeten Biofilme in ihrer Form und Struktur zu analysieren (siehe 3.14.1).

Mittels REM konnten keine Unterschiede in der Zellmorphologie der Stämme 1.3 und 1.3.7 festgestellt werden (Abb. 24 a,b). Bei beiden Isolaten erschien die Zelloberfläche glatt, und es war die für Enterokokken typische Anordnung der Zellen in Form von Diplokokken zu beobachten. Der Biofilm des Stamms 1.3.7 konnte im Gegensatz zur CLSM präparationsbedingt (häufige Wasch- und Fixierungsschritte) mittels REM wiederholt nicht deutlich dargestellt werden. Die Zellen lagen lediglich einschichtig auf dem Objektträger vor, was auf eine geringere Stabilität des Biofilms des Isolats 1.3.7 im Vergleich zu den sehr

beständig erscheinenden Biofilmen der Stämme 1.10 und 2.11 hinwies (vgl. Abb. 25 a,b und Abb. 26 a,b,c). Ebenfalls präparationsbedingt wurden bei allen Abbildungen Rückstände (helle Ablagerungen) sichtbar, die sowohl auf den Zellen als auch auf dem Untergrund zu erkennen waren.

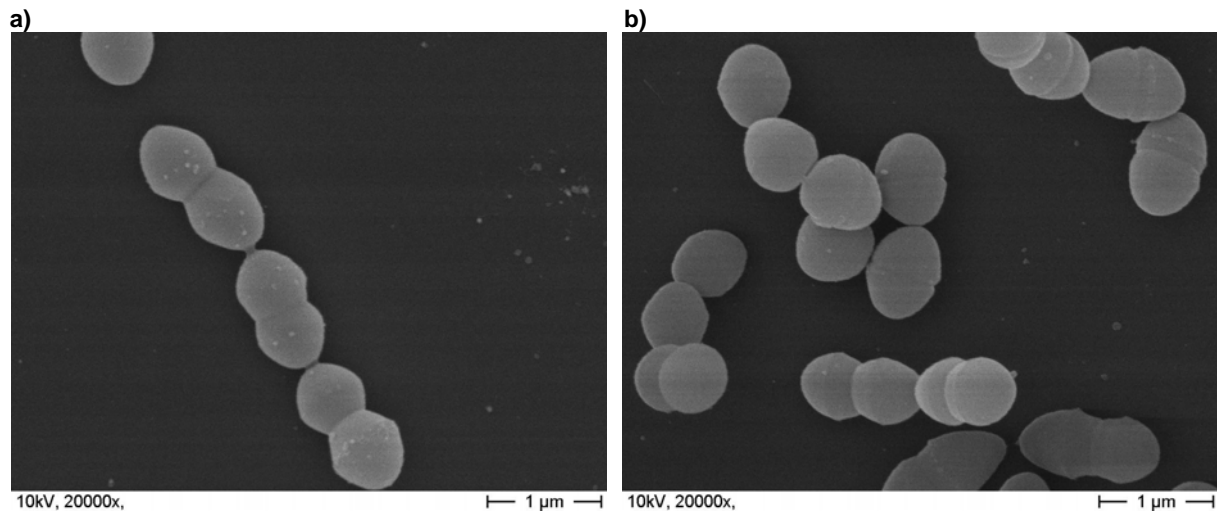


Abb. 24 REM der Stämme 1.3 (a) und 1.3.7 (b)

Isolate kultiviert in TSBG für 18 h auf Glasobjektträgern, nach Präparation mit Platin bedampft, Mikroskopie bei 10 kV (siehe 3.14.1); a) Stamm 1.3; b), Stamm 1.3.7; Vergrößerung und Längenangabe [μm] sind jeweils unterhalb des Bildes aufgeführt.

Bzgl. der Stämme 1.10 und 1.10.16 konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Zelloberfläche oder Zellform beobachtet werden, in der REM erschien die Oberfläche der Zellen beider Isolate glatt (siehe Abb. 25 b,d). Der Biofilm des Stamms 1.10 stellte sich als mehrschichtiges Gebilde mit zum Teil größeren Zwischenräumen dar (Abb. 25 a).

Auch bei den Stämmen 2.11 und 2.11.8 wurden keine sichtbaren Unterschiede zwischen der Zelloberfläche von Wildtyp und Mutante erkennbar, allerdings erschien bei beiden Isolaten die Zellhülle im Gegensatz zu den anderen betrachteten Stämmen zum Teil rau (vgl. Abb. 26 d,e). Ein markanter Unterschied im Vergleich zu den Isolaten 1.3 und 1.3.7 sowie 1.10 und 1.10.16 konnte in der Beobachtung von extrazellulären Substanzen an einigen Stellen der Präparate des Stamms 2.11 erkannt werden, wobei diese Strukturen auch in sehr geringer Menge bei der Mutante 2.11.8 zu sehen waren (vgl. Abb. 26 e,f).

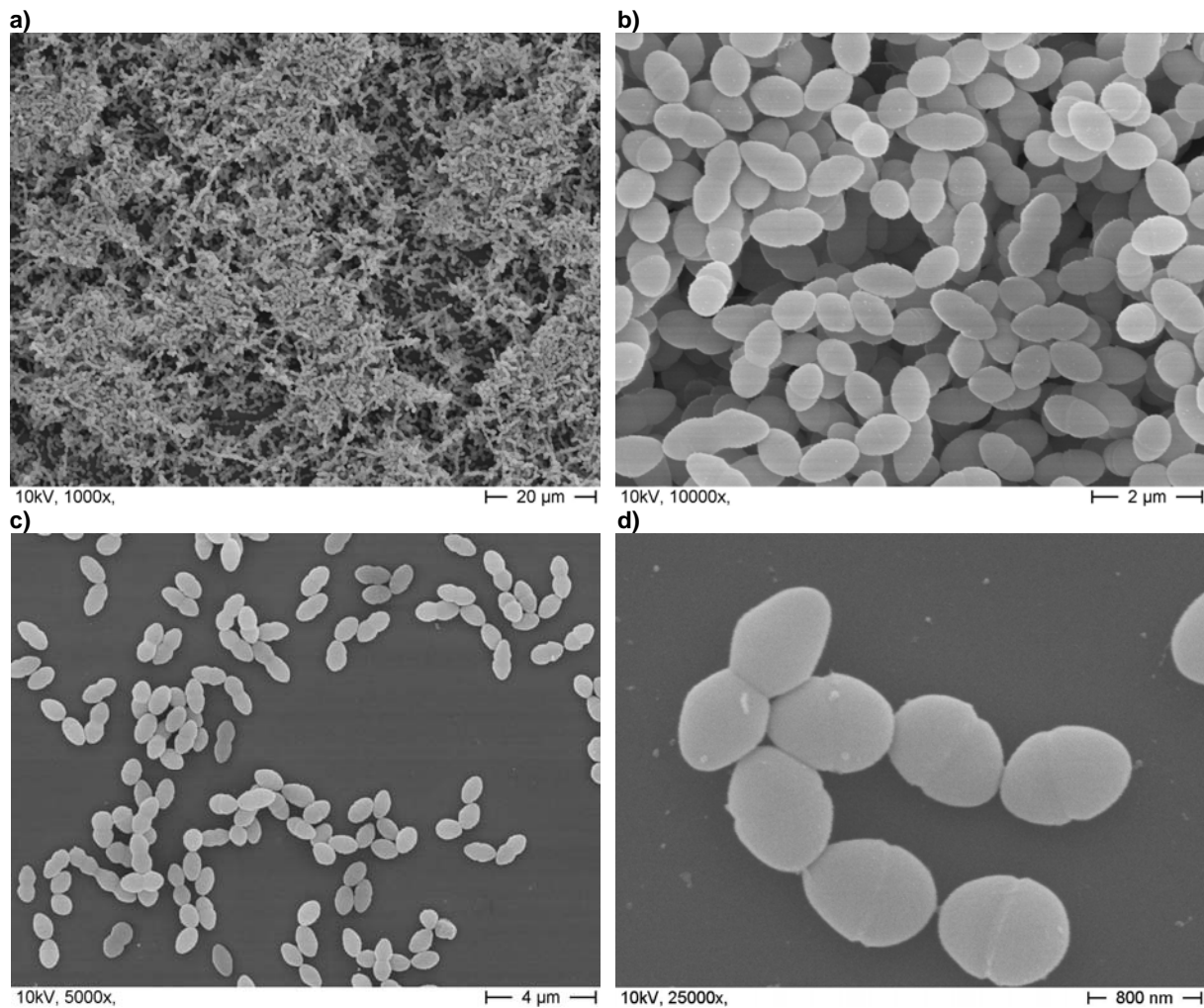


Abb. 25 REM der Stämme 1.10 (a,b) und 1.10.16 (c,d)

Isolate kultiviert in TSBG für 18 h auf Glasobjektträgern, nach Präparation mit Platin bedampft, Mikroskopie bei 10 kV (siehe 3.14.1); a,b) Stamm 1.10; c,d), Stamm 1.10.16; Vergrößerung und Längenangabe [µm] sind jeweils unterhalb des Bildes aufgeführt.

Um mögliche Unterschiede in der Beschaffenheit der Zelloberfläche oder anderer Strukturen der Stämme in der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zu den Zellen, die für 18 h angezogen wurden, zu erkennen, wurde eine REM außerdem von Kulturen durchgeführt, die vier Stunden auf Glasobjektträgern gewachsen waren. Hier konnten allerdings keine Unterschiede in der Beschaffenheit der Zelloberfläche zwischen Wildtyp- und Mutantenstamm festgestellt werden. Im Vergleich zu den Zellen, die für 18 h gewachsen waren, wiesen die BF-Bildner 1.10 und 2.11 auf den Glasobjektträgern lediglich einen dünnen Bewuchs mit wenigen Zellschichten auf. Bei dem Isolat 1.3.7 konnten nur einzelne oder in Ketten angeordnete Zellen einschichtig beobachtet werden. Extrazelluläre Substanzen wurden bei Stamm 2.11 und 2.11.8 kaum entdeckt (Bilder nicht dargestellt).

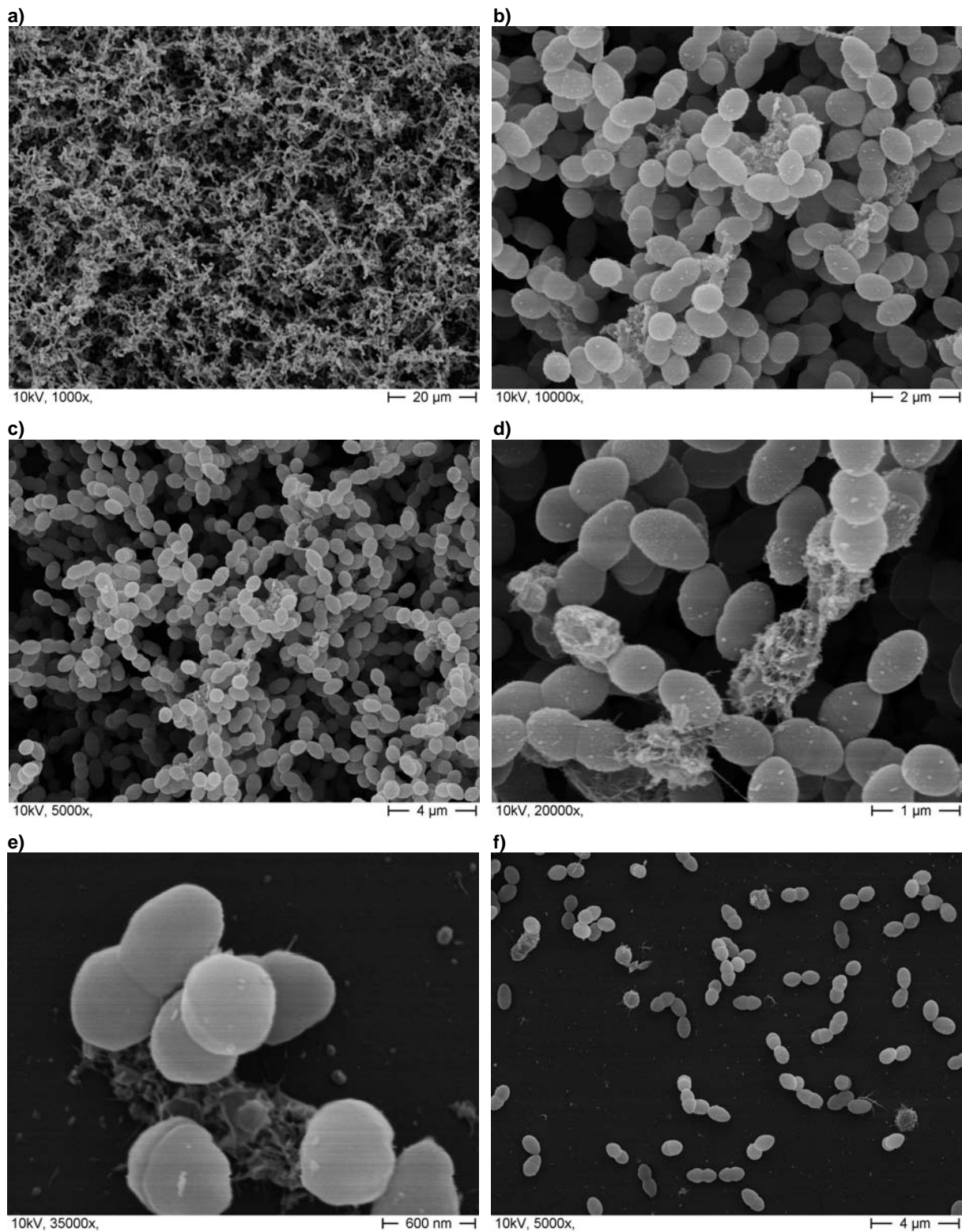


Abb. 26 REM der Stämme 2.11 (a,b,c,d) und 2.11.8 (e,f)

Isolate kultiviert in TSBG für 18 h auf Glasobjektträgern, nach Präparation mit Platin bedampft, Mikroskopie bei 10 kV (siehe 3.14.1); a,b,c,d) Stamm 2.11; e,f), Stamm 2.11.8; Vergrößerung und Längenangabe [μ m] sind jeweils unterhalb des Bildes aufgeführt.

4.5.2.3 Stoffwechselphysiologische Eigenschaften und Antibiotikaresistenzen

Die erzeugten BF-Mutanten und deren Wildtypstämme wurden auf ihre Fähigkeiten zur Verstoffwechslung bestimmter Kohlenhydratsubstrate mittels des API[®]50 CH-Testsystems untersucht. Die Abb. 27 stellt die Ergebnisse schematisch in einem Dendrogramm dar. Die Stämme 1.3 und 1.3.7, 1.10 und 1.10.16 sowie 2.11 und 2.11.8 zeigten jeweils ein gleiches Verwertungsmuster, so dass bzgl. dieser Eigenschaften kein Unterschied jeweils zwischen Wildtyp- und BF-Mutantenstamm zu erkennen war. Der Stamm 1.4 konnte ein Substrat (Kaliumglukonat, Nr. 47) im Gegensatz zum Stamm 1.4.6 nicht verwerten, so dass die beiden Isolate nicht zusammen gruppierten (siehe auch 4.5.1).

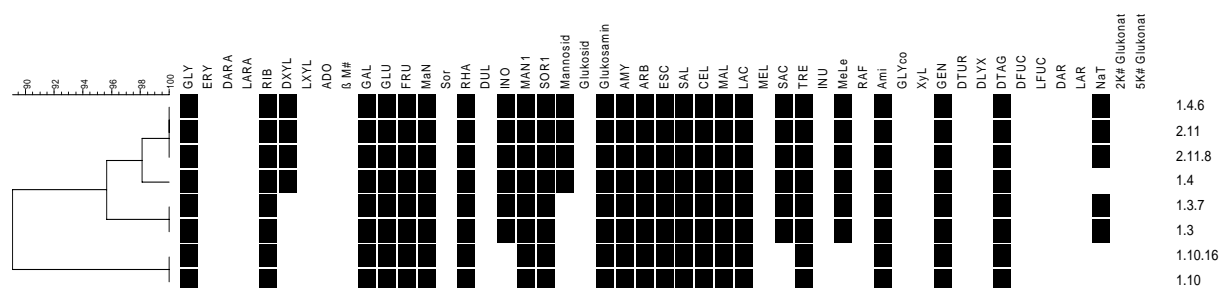


Abb. 27 Dendrogramm der Ergebnisse des API[®] 50 CH von Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen
 ■, positive Reaktion / Verwertung des Substrats; □, negative Reaktion / keine Verwertung des Substrats.

Des Weiteren wurden die Antibiotikaresistenzen und Antibiotikaresistenzgene der Stämme überprüft. Im Mikrodilutions- bzw. Agardiffusionsverfahren konnte jeweils kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Mutantenstamm bzgl. der Antibiotika Vancomycin, Teicoplanin, Ampicillin, Tetrazyklin, Erythromycin, HLR-Gentamicin, HLR-Streptomycin, Ofloxacin, Ciprofloxacin, Rifampicin sowie Chloramphenicol festgestellt werden. Auch der Nachweis der Antibiotikaresistenzgene erbrachte keine Unterschiede (1.3 / 1.3.7, *ermB*⁺, *aac-aph*⁻, *tetM*⁺; 1.10 / 1.10.16, *ermB*⁻, *aac-aph*⁻, *tetM*⁻; 2.11 / 2.11.8, *ermB*⁻, *aac-aph*⁻, *tetM*⁺).

4.5.2.4 Virulenzfaktoren

Die Wildtyp- und BF-Mutantenstämme wurden phänotypisch und genotypisch auf das Vorkommen von verschiedenen Virulenzfaktoren untersucht. Bzgl. der Gelatinase-Bildung, β -Hämolyse und Bacteriocin-Produktion sowie des Vorhandenseins der Gene *gelE*, *cylA*, *esp* (incl. der Anzahl von A- und C-Repeats), *asa1*, *aceB* und des *bee* Locus konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Tab. 16). Offensichtliche Differenzen zwischen Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen zeigten sich jedoch beim phänotypischen Test auf Aggregation (Verklumpung, Agg). Hier reagierte der Stamm 1.3 negativ, während dessen Mutante 1.3.7 eine deutliche Verklumpung in Anwesenheit von Pheromonen des Produzenten *E. faecalis* OG1X aufwies. Die Prüfung auf konstitutive Verklumpung in THB-Medium fiel bei allen Isolaten negativ aus.

Tab. 16 Phänotypische und genotypische Nachweise verschiedener Virulenzfaktoren bei den *E. faecalis* Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen

+, positiver Nachweis bzw. Anwesenheit des Gens; -, negativer Nachweis bzw. Gen nicht vorhanden; GelE, Gelatinase-Produktion; β -Häm, β -Hämolyse-Nachweis; *gelE*, *cylA*, *esp*, *asa1*, *aceB*, *espA*, *espC*, *bee1-3*, Nachweis der Gene bzw. der Anzahl der Tandemrepeats; *E.fm* 64/3, *E.fc* JH2-2, Bacteriocin-Produktion gegenüber des Indikatorstamms *E. faecium* 64/3 bzw. *E. faecalis* JH2-2 (+, Hemmhof \leq 1 mm; ++, Hemmhof 2-4 mm); Agg, Aggregation in Anwesenheit von Pheromonen des Stamms *E. faecalis* OG1X.

Stamm	GelE	β -Häm	<i>E.fm</i> 64/3	<i>E.fc</i> JH2-2	<i>gelE</i>	<i>cylA</i>	<i>esp</i>	<i>asa1</i>	<i>aceB</i>	<i>espA</i>	<i>espC</i>	<i>bee1-3</i>	Agg
1.3	-	+	++	++	-	+	-	+	3,5	-	-	-	-
1.3.7	-	+	++	++	-	+	-	+	3,5	-	-	-	+
1.10	+	-	-	-	+	-	+	+	2,5	1	4	+	+
1.10.16	+	-	-	-	+	-	+	+	2,5	1	4	+	+
2.11	+	+	+	+	+	+	-	+	4,5	-	-	-	-
2.11.8	+	+	+	+	+	+	-	+	4,5	-	-	-	-

Außerdem konnte bei keinem der Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen DNase- oder Lipase-Produktion nachgewiesen werden. Alle Stämme produzierten H_2O_2 . Des Weiteren wurde mittels PCR bei allen Isolaten das *efaA_{fc}* Gen detektiert (MRI, Karlsruhe) und bei keinem Stamm das *asa373* Gen, so dass auch bzgl. dieser Eigenschaften kein Unterschied festzustellen war.

4.5.2.5 Primäre Anheftung an abiotische Oberflächen

Die *E. faecalis* Wildtyp- und BF-Mutantenstämme wurden auf ihre Fähigkeit zur primären Anheftung an abiotische Oberflächen (Polystyrol) untersucht. Alle Mutantenstämme zeigten hierbei einen signifikanten Unterschied zum jeweiligen Wildtyp (siehe Abb. 28). Die Fähigkeit zur primären Anheftung an PS hat sich bei dem Isolat 1.3.7 im Vergleich zum Wildtyp 1.3 um beinahe das Zweifache erhöht ($OD_{595} = 0,110$ vs $OD_{595} = 0,063$; $P = 0,0197$, t-Test mit $P < 0,05$). Bei dem Mutantenstamm 1.10.16 konnte eine signifikante Verringerung ($P = 0,0009$) der Fähigkeit zur primären Anheftung verglichen mit dem starken BF-Bildner 1.10 festgestellt werden ($OD_{595} = 0,090$ vs $OD_{595} = 0,192$). Auch der starke BF-Produzent 2.11 zeigt gegenüber der Mutante 2.11.8 eine leichte, aber dennoch signifikante Abnahme ($P = 0,0214$) dieser Eigenschaft.

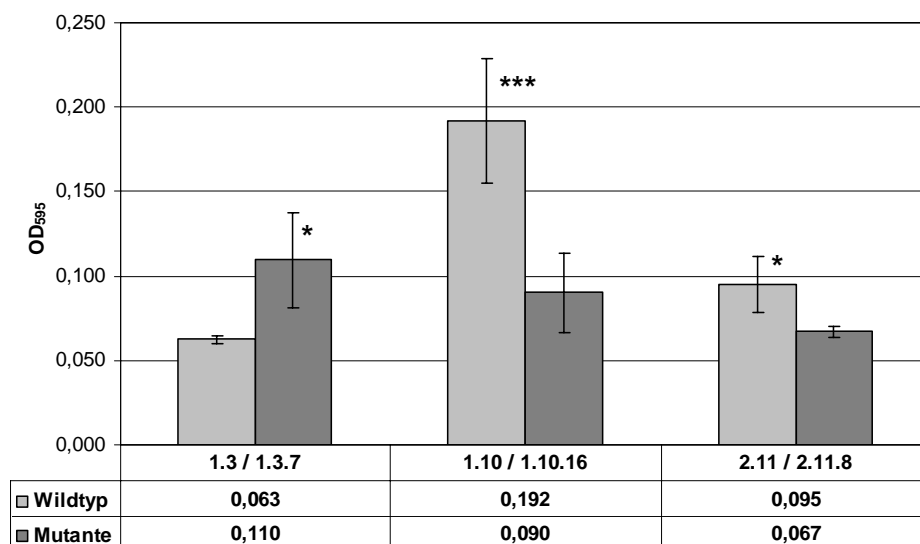


Abb. 28 Primäre Anheftung an abiotische Oberflächen bei Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämmen

Ermittelt auf Polystyrol-Oberfläche (siehe 3.11.7); *, signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen 1.3 und 1.3.7 ($P = 0,0197$) sowie den Stämmen 2.11 und 2.11.8 ($P = 0,0214$); ***, hoch signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen 1.10 und 1.10.16 ($P = 0,0009$); statistische Analyse mittels t-test ($P < 0,05$), bei 1.3 / 1.3.7 und 2.11 / 2.11.8 mit Welch's Korrektur.

4.5.2.6 Hydrophobizität der Zelloberfläche

Unterschiede in der Hydrophobizität der Zelloberfläche der *E. faecalis* Wildtyp- und Mutantenstämme wurden mit Hilfe eines Tests untersucht, bei dem die Verteilung der Bakterienzellen in einer wässrigen und organischen Phase (n-Hexadecan) ermittelt wird. Bzgl. der Stämme 1.3 und 1.3.7 konnte keine Änderung in der Hydrophobizität der Zellen festgestellt werden, beide Isolate zeigten eine etwa gleich hohe Hydrophobizität von 32,94 % bzw. 34,19 %. Der Wildtypstamm 1.10 wies hingegen einen signifikanten Unterschied ($P = 0,0053$, t-Test mit $P < 0,05$) zur Mutante 1.10.16 auf, hier wurde eine etwa zweifach höhere Hydrophobizität der Zellen (43,72 %) im Vergleich zum Mutantenstamm (21,78 %) nachgewiesen. Auch die Zellen des Isolats 2.11 zeigten signifikante Unterschiede ($P = 0,0004$) in der Zellhydrophobizität gegenüber der Mutante 2.11.8 (68,01 % vs 13,42 %; siehe Abb. 29).

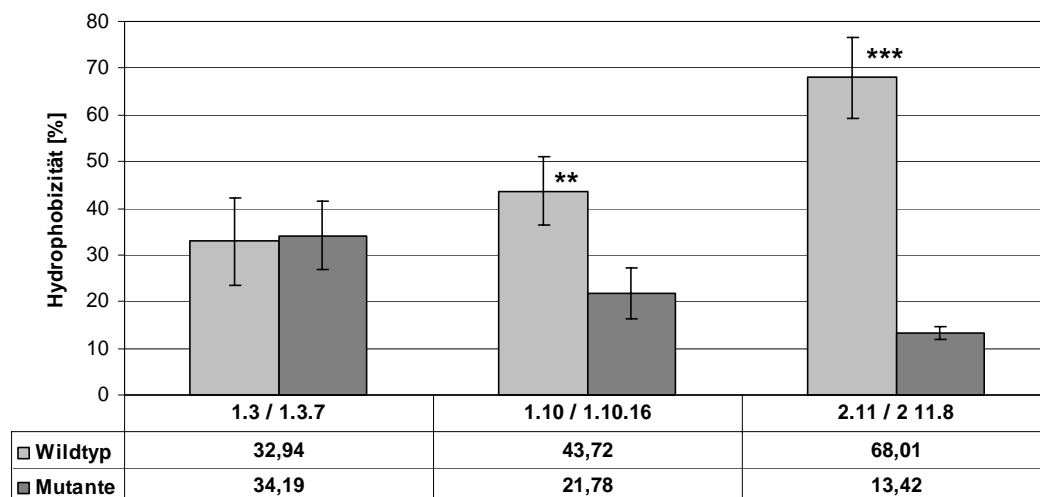


Abb. 29 Hydrophobizität der Zelloberflächen von Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämmen

Ermittelt unter Verwendung von n-Hexadecan (siehe 3.11.8); **, signifikanter Unterschied ($P = 0,0053$) zwischen den Stämmen 1.10 und 1.10.16; ***, hoch signifikanter Unterschied ($P = 0,0004$) zwischen den Stämmen 2.11 und 2.11.8 (t-Test, $P < 0,05$; bei 2.11 / 2.11.8 mit Welch's Korrektur); zwischen den Stämmen 1.3 und 1.3.7 kein signifikanter Unterschied vor.

4.5.2.7 Adhärenz an HeLa-Zellen

In weiteren Untersuchungen wurden die *E. faecalis* Wildtyp- und Mutantenstämme bzgl. ihrer Fähigkeit zur Adhärenz an eukaryotische Zellen, speziell HeLa-Zellen, verglichen. Hier konnte lediglich bei dem starken BF-Bildner 2.11 und dessen Mutante 2.11.8 ein signifikanter Unterschied ($P = 0,0006$; t-Test mit $P < 0,05$) festgestellt werden ($27,01 \pm 4,20$ % vs $2,73 \pm 0,86$ %). Alle anderen getesteten Stämme zeigten sehr geringe Adhärenz an HeLa-Zellen, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Mutantenstamm vorlag. Bzgl. der Stämme 1.3 und 1.3.7 konnte eine Adhärenz von $3,93 \pm 0,75$ % bzw. $3,19 \pm 0,87$ % nachgewiesen werden, hinsichtlich der Isolate 1.10 und 1.10.16 hefteten sich $4,05 \pm 0,10$ % bzw. $2,93 \pm 1,70$ % an die HeLa-Zellen im Adhärenz-Assay an.

4.5.2.8 Nachweis von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmiden sollte eventuelle Unterschiede im Vorkommen von Plasmiden bei den *E. faecalis* Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen aufdecken. Die Plasmid-Isolierung mit anschließender Restriktion mit Hilfe der Enzyme *EcoRI* und *HindIII* ergab bzgl. der Stämme 1.3 und 1.3.7 (siehe Abb. 30, Bahn 1,2,7,8) sowie 1.10 und 1.10.16 (siehe Abb. 30, Bahn 3,4,9,10) keine Unterschiede jeweils zwischen Wildtyp und Mutante, was insbesondere anhand der identischen Restriktionsmuster deutlich wurde. Bei den Stämmen 1.3 und 1.3.7 konnte jeweils ein großes Plasmid (ca. 60 kb) nachgewiesen werden. Bzgl. der Stämme 1.10 und 1.10.16 wurde wiederholt ein Muster detektiert, was auf ein Vorkommen mehrerer Plasmide schließen ließ, die höchstwahrscheinlich in unterschiedlichen Formen (oc-Form oder supercoiled) vorlagen. Die Präparationen der Isolate 2.11 und 2.11.8 (siehe Abb. 30, Bahn 5,6,11,12) hingegen ließen vermuten, dass bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp ein Plasmidverlust aufgetreten war. Hierbei handelte es sich scheinbar um ein Plasmid der Größe von etwa 60 kb, möglicherweise enthielt der Stamm 2.11 weitere Plasmide, die sich in der Agarose-Gelelektrophorese in unterschiedlichen Konformationen darstellten.

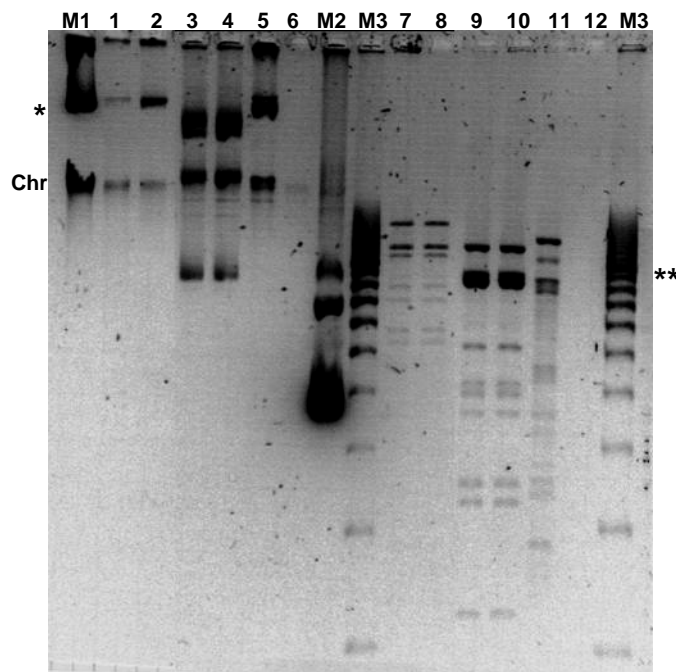


Abb. 30 Nachweis von Plasmiden der *E. faecalis* Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämmen

Bahn 1-6, Plasmide, keine Restriktion; Bahn 7-12, Fragmentmuster nach Restriktion der Plasmide mit *EcoRI/HindIII*; Bahn 1,7, Stamm 1.3; Bahn 2,8, Stamm 1.3.7; Bahn 3,9, Stamm 1.10; Bahn 4,10, Stamm 1.10.16; Bahn 5,11, Stamm 2.11; Bahn 6,12, Stamm 2.11.8; M1, Marker pAD1 (*, 59,3 kb); M2, Marker 2 (pUC19, 2,686 kb); M3, 500-8000 bp DNA Marker (Bio-Rad Laboratories; **, 5000 bp); Chr, chromosomale DNA; 1% TBE Agarosegel

4.5.2.9 Massenspektrometrische Identifizierung von Zellwandproteinen

Proteinextraktionen aus Kulturen der *E. faecalis* Isolate, die in TSBG bis zum Erreichen der späten log-Phase angewachsen waren, ergaben zum Teil prägnante Unterschiede in dem Proteinexpressionsmuster zwischen Wildtyp- und BF-Mutantenstämmen insbesondere im hochmolekularen kDa-Bereich (siehe Abb. 31). Einige dieser sehr markanten, auf einem SDS-Gradientengel aufgetrennten, differentiell exprimierten Proteine wurden mittels LC/MS identifiziert. Die Proteinprofile aller Stämme erschienen hingegen im Massenbereich < ca. 85 kDa kaum verschieden.

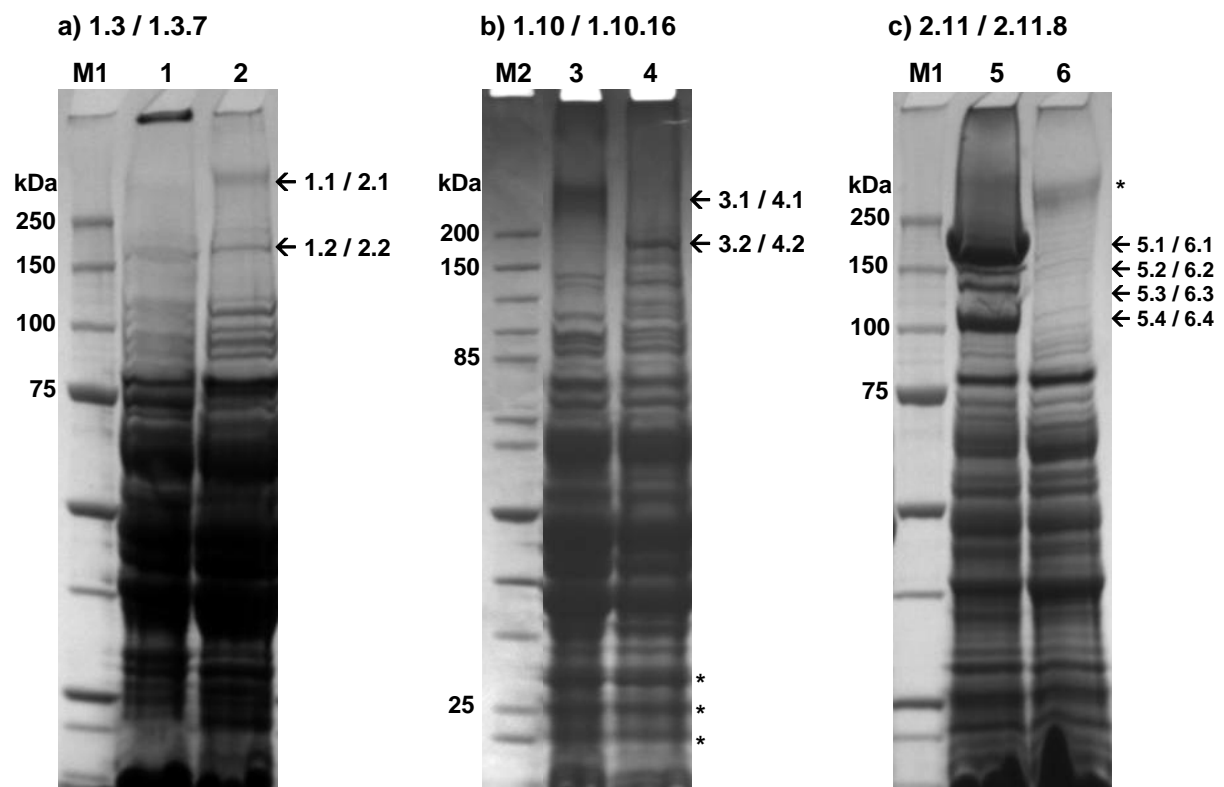


Abb. 31 Proteinexpressionsmuster der *E. faecalis* Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämmen

Pfeile markieren die Banden, deren Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden (siehe Tab. 17); Zellaufschluss mittels Lysozym (siehe 3.13.1; eine Durchführung des Zellaufschlusses mittels Mutanolysin zeigte keine hinreichenden Ergebnisse); Elektrophorese mittels SDS-Gradientengel (4-12%); Bahn 1, Stamm 1.3; Bahn 2, Stamm 1.3.7; Bahn 3, Stamm 1.10; Bahn 4, Stamm 1.10.16; Bahn 5, 2.11; Bahn 6, 2.11.8; M1, Unstained Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad Laboratories); M2, Marker 2, PageRuler™ Protein Ladder (Bio-Rad Laboratories); *, ebenfalls bearbeitete Bande (siehe Text).

Bei den Stämmen 1.3 (Wildtyp, kein BF-Bildner) und 1.3.7 (Mutante, starker BF-Bildner) zeigten sich insbesondere zwei Proteinbanden, die bei dem Mutantenstamm nach der SDS-Gradienten-Gelelektrophorese stärker erschienen als beim Wildtyp (siehe Abb. 31, Bahn 1 und 2). Die massenspektrometrische Identifizierung (Tab. 17, Banden 1.1, 1.2, 2.1, 2.2) ergab zum einen, dass bei beiden Stämmen und auch beiden untersuchten Banden (ca. 300 kDa und ca. 180 kDa) die drei Proteine des *ebp* Locus (EbpA, EbpB, EbpC; siehe auch 1.3.4.4) nachgewiesen werden konnten. Außerdem wurden bei beiden Stämmen das Surface Exclusion Protein der Aggregationssubstanz PrgB (PrgA) detektiert sowie zwei

bisher uncharakterisierte Proteine (EF2505, putatives Zellwand-assoziiertes Protein; EF0109). Damit konnte ein Unterschied bei den Stämmen 1.3 und 1.3.7 nur bzgl. der Stärke der untersuchten Proteinbanden festgestellt werden.

Die Proteinexpressionsprofile der Stämme 1.10 (Wildtyp, sehr starker BF-Bildner) und 1.10.16 (Mutante, schwacher BF-Bildner) zeigten insbesondere zwei unterschiedliche Banden, und zwar eine sehr breite Bande mit der molekularen Masse von ca. 250 kDa, die beim Wildtyp 1.10 stärker erschien, und eine Bande (ca. 180 kDa), die bei der Mutante stärker zu erkennen war (siehe Abb. 31, Bahn 3 und 4). Hinsichtlich dieser Stämme zeigte die Identifizierung der Proteine (siehe Tab. 17 und Tab. 18) eindeutig, dass in beiden untersuchten Banden (ca. 250 kDa und ca. 180 kDa) beim Wildtyp die drei Proteine des *bee* Locus (Bee-1, Bee-2, Bee-3; siehe auch 1.3.4.3) nachgewiesen werden konnten (Banden 3.1 und 3.2), wohingegen in beiden Banden das Protein Bee-2 bei der Mutante nicht detektiert wurde (Banden 4.1 und 4.2). Ferner wurde in beiden untersuchten Proteinbanden des Stamms 1.10.16 die putative Aggregationssubstanz EF0149 sowie das Surface Exclusion Protein der Aggregationssubstanz PrgB identifiziert (Banden 4.1 und 4.2).

Der Unterschied im Proteinexpressionsmuster der Stämme 2.11 (Wildtyp, sehr starker BF-Bildner) und 2.11.8 (Mutante, schwacher BF-Bildner) war sehr markant (siehe Abb. 31, Bahn 5 und 6). Hier wurden insbesondere vier, zum Teil sehr stark erscheinende Banden des Wildtyps mittels Massenspektrometrie untersucht, die bei der Mutante nur höchst schwach zu erkennen waren. Bei Stamm 2.11 wurden in den analysierten Banden 5.2 und 5.3 die putative Aggregationssubstanz EF0149 identifiziert sowie in den Banden 5.3 und 5.4 das Surface Exclusion Protein Sea1 (siehe Tab. 18), wobei in Bande 5.4 ebenfalls das Surface Exclusion Protein der Aggregationssubstanz PrgB (PrgA) eindeutig detektiert wurde (Gesamt-Score 1084 mit 46 identifizierten Peptiden). Bei Stamm 2.11.8 konnte die Aggregationssubstanz EF0149 hingegen nicht nachgewiesen werden (Banden 6.1, 6.2, 6.3, 6.4). Lediglich das Surface Exclusion Protein PrgA wurde identifiziert (Bande 6.4). Überwiegend wurden Proteine des *ebp* Locus, die teilweise beim Wildtyp 2.11 ebenfalls detektiert wurden (Bande 5.2), sowie das uncharakterisierte, putative Zellwand-assoziierte Protein EF2505 nachgewiesen. Die Analyse einer weiteren Bande (*, ca. 300 kDa) brachte keine signifikanten Identifizierungen (Daten nicht aufgeführt).

Des Weiteren wurde eine Identifizierung mehrerer Proteinbanden (*) im Massenbereich von 20 – 30 kDa der Stämme 1.10 und 1.10.16 durchgeführt, um möglicherweise das Protein Bee-2 bei dem Mutantenstamm 1.10.16 einzeln nachzuweisen, d.h. nicht in dem HMW-Bee-Komplex vorliegend. Hierbei wurde eine große Anzahl verschiedenster Proteine (überwiegend Enzyme bestimmter Stoffwechselwege u.a.) identifiziert, Bee-2 konnte jedoch weder beim Wildtyp- noch beim Mutantenstamm detektiert werden (Daten nicht aufgeführt).

Tab. 17 Mittels Massenspektrometrie identifizierte, differentiell exprimierte Proteine der *E. faecalis* Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämme

Angegeben sind Proteine mit signifikanter Übereinstimmung nach Datenbankabgleich (siehe 3.13.4); aufgeführt sind die Akzessionsnummern der NCBI-Datenbank der jeweils codierenden DNA-Sequenz; PrgA, Surface Exclusion Protein der Aggregationssubstanz PrgB; Sea1, Surface Exclusion Protein der Aggregationssubstanz Asa1; PepA, Glutamyl-Aminopeptidase; CarB, Carbamoyl-Phosphat-Synthase (große Untereinheit); IleS, Isoleucyl-tRNA Synthetase.

Stamm	Bande	ca. kDa-Bereich SDS-Gel	Identifizierte Proteine	Akzessionsnr. Gensequenz	Anzahl identifizierter Peptide	Gesamt-Score	Molekulare Masse (kDa)
1.3	1.1	300	EbpA	AAO80891	13	362	122,6
			PrgA	AAO83101	17	493	98,1
			EbpC	AAO80893	9	227	67,9
			EbpB	AAO80892	5	129	53,3
			EF2505	AAO82221	6	119	182,7
1.3	1.2	180	EF2505	AAO82221	16	683	182,7
			EbpA	AAO80891	16	737	122,6
			EF0109	AAM75312	3	98	206,7
			EbpC	AAO80893	14	654	67,9
			Sea1	AAO83047	4	128	98,1
			EbpB	AAO80892	4	164	53,3
1.3.7	2.1	300	EbpA	AAO80891	29	754	122,6
			EbpC	AAO80893	32	660	67,9
			EbpB	AAO80892	9	235	53,3
			EF2505	AAO82221	6	195	182,7
			PrgA	AAO83101	6	170	98,1
1.3.7	2.2	180	EF2505	AAO82221	7	272	182,7
			EbpA	AAO80891	7	270	122,6
			EF0109	AAM75312	8	330	206,7
			EbpC	AAO80893	3	151	67,9
1.10	3.1	250	Bee-3	AAZ68039	91	1544	53,1
			Bee-1	AAZ68037	30	842	117,9
			Bee-2	AAZ68038	4	102	26,8
1.10	3.2	180	Bee-3	AAZ68039	48	1083	53,1
			Bee-1	AAZ68037	26	769	117,9
			PepA	AAO82720	15	224	39,1
			Bee-2	AAZ68038	9	214	26,8

Tab. 18 Mittels Massenspektrometrie identifizierte, differentiell exprimierte Proteine der *E. faecalis* Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämme (Fortsetzung)

*, wiederholte nicht hinreichende Identifizierung, erweiterter Datenbank-Abgleich durchgeführt, der zu keiner Übereinstimmung führte.

Stamm	Bande	ca.kDa-Bereich SDS-Gel	Identifizierte Proteine	Akzessionsnr. Gensequenz	Anzahl identifizierter Peptide	Gesamt-Score	Molekulare Masse (kDa)
1.10.16	4.1	250	Bee-3	AAZ68039	37	896	53,1
			EF0149	AAO80023	14	285	142,8
			PrgA	AAO83101	7	211	98,1
			Bee-1	AAZ68037	5	107	117,9
1.10.16	4.2	180	EF0149	AAO80023	15	359	142,8
			PrgA	AAO83101	8	242	98,1
			PepA	AAO82720	3	94	39,1
			Bee-3	AAZ68039	3	93	53,1
			Bee-1	AAZ68037	4	56	117,9
2.11	5.1	160	EF0109*	AAM75312	1*	70*	206,7
2.11	5.2	140	EF0149	AAO80023	6	424	142,8
			EbpA	AAO80891	2	90	122,6
			EF2505	AAO82221	2	57	182,7
2.11	5.3	130	EF0149	AAO80023	76	1006	142,8
			Sea1	AAO83047	2	118	98,1
2.11	5.4	100	PrgA	AAO83101	46	1084	98,1
			Sea1	AAO83047	53	835	98,1
			CarB	AAO81492	9	146	116,6
2.11.8	6.1	160	EbpA	AAO80891	18	281	122,6
			EbpB	AAO80892	3	129	53,3
			EbpC	AAO80893	5	115	67,9
			EF2505	AAO82221	5	91	182,7
2.11.8	6.2	140	EbpA	AAO80891	13	170	122,6
			EF2505	AAO82221	12	156	182,7
2.11.8	6.3	130	EbpA	AAO80891	9	69	122,6
			EbpB	AAO80892	1	71	53,3
2.11.8	6.4	100	IleS	AAO80809	3	247	105,8
			CarB	AAO81492	5	203	116,6
			PrgA	AAO83101	4	89	98,1

4.5.2.10 RT-PCR-Analysen

Die erzeugten *E. faecalis* BF-Mutanten und deren Wildtypstämme wurden darüber hinaus mittels RT-PCR-Analysen auf eine veränderte Transkription verschiedener, für die Biofilmbildung bedeutsamer Gene untersucht. Bei den Stämmen 1.3 und 1.3.7, 1.10 und 1.10.16 sowie 2.11 und 2.11.8 konnte mittels RT-PCR kein Unterschied (qualitativ) in der Expression auf transkriptioneller Ebene bzgl. der Gene *ebpA*, *asa1*, *gelE*, *esp*, *cylA* und *bopD* nachgewiesen werden.

Aufgrund der Ergebnisse massenspektrometrischer Untersuchungen bzgl. der Stämme 1.10 und 1.10.16 (siehe 4.5.2.9) wurden bei diesen Isolaten weitere PCR- und RT-PCR-Nachweise der Gene des *bee* Locus inkl. der assoziierten Sortase-Gene (siehe auch 1.3.4.3) durchgeführt. Mit Hilfe von Primer Bee12-for und Primer P101D12-1-rev wurde ein Bereich des Gentranskripts von *bee2* und *bee3* (539 bp, Abb. 32 a, Bahn 1 und 2), mittels des Primerpaars *bee1*-for2267 / *bee1*-rev3182 ein Teilbereich (1016 bp) des *bee1* Transkripts (Abb. 32 a, Bahn 3 und 4) sowie mittels der Primer P101D12-2-for und P101D12-1-rev Bereiche des *bee1*, *bee2* und *bee3* Transkripts (1395 bp, Abb. 32 a, Bahn 5 und 6) amplifiziert. Die Abb. 33 verdeutlicht schematisch die Primerpositionen und amplifizierten Bereiche des *bee* Locus.

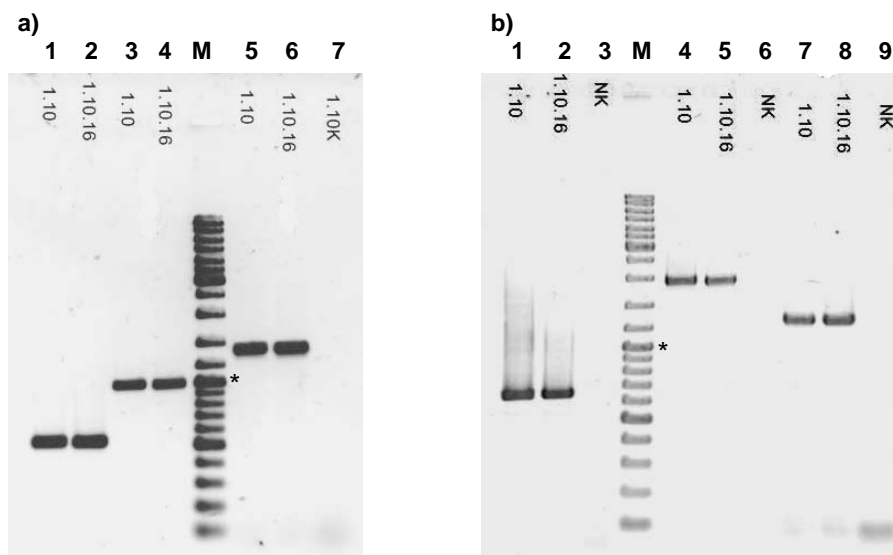


Abb. 32 RT-PCR-Analysen von Bereichen des *bee* Locus der Stämme 1.10 und 1.10.16

a), RT-PCRs von Teilbereichen der *bee-1*, *bee-2* und *bee-3* Gene; Bahn 1,3,5, Stamm 1.10; Bahn 2,4,6, Stamm 1.10.16; Bahn 1,2, 539 bp Fragment mittels Primerpaar Bee12-for/P101D12-1-rev; Bahn 3,4, 1016 bp Fragment mittels Primerpaar *bee1*-for2267/*bee1*-rev3182; Bahn 5,6, 1395 bp Fragment mittels Primerpaar P101D12-2-for/P101D12-1-rev; b), RT-PCRs von Teilbereichen der *srt-1* und *srt-2* Gene des *bee* Locus; Bahn 1,4,7, Stamm 1.10; Bahn 2,5,8, Stamm 1.10.16; Bahn 1,2, 650 bp Fragment mittels Primerpaar Sor1L-for/Sor1R-rev; Bahn 4,5, 1898 bp Fragment mittels Primerpaar Sor1L-for/Sor2R-rev; Bahn 7,8, 1280 bp Fragment mittels Primerpaar P101D12-11-for/Sor2R-rev; M, Marker (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, MBI Fermentas); NK, K, Negativkontrollen; *, 1000 bp Fragment des Markers.

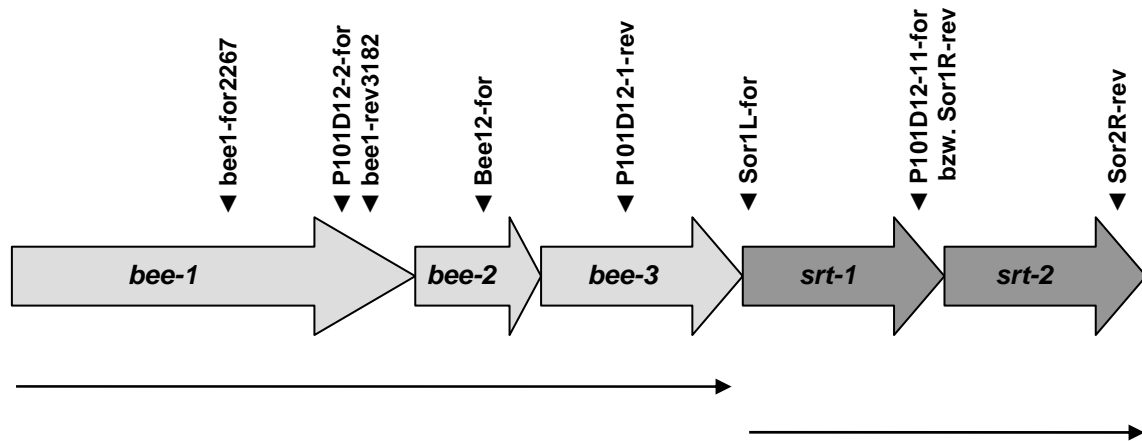


Abb. 33 Untersuchte Abschnitte des *bee* Locus der *E. faecalis* Stämme 1.10 und 1.10.16 mittels PCR und RT-PCR (schematisch)

Der *bee* Locus besteht aus drei Genen, *bee-1*, *bee-2* und *bee-3*, die putative Zellwandproteine codieren, sowie aus zwei Genen (*srt-1* und *srt-2*) für putative Sortasen. Oberhalb sind die Primerpositionen der untersuchten Gen- bzw. Transkriptabschnitte angegeben. Die Linien-Pfeile unterhalb stellen die putativen Transkriptionseinheiten dar (Tendolcar *et al.*, 2006).

Außerdem wurde mit Hilfe der Primerkombination Sor1L-for / Sor1R-rev ein Bereich des *srt-1* Gentranskripts untersucht (650 bp, Abb. 32 b, Bahn 1 und 2), mittels des Primerpaars Sor1L-for / Sor2R-rev (1898 bp, Abb. 32 b, Bahn 4 und 5) sowie P101D12-11-for / Sor2R-rev (1280 bp, Abb. 32 b, Bahn 7 und 8) weitere Bereiche des *srt-1* und *srt-2* Gentranskripts. Keine dieser RT-PCR-Analysen ergab somit einen Unterschied zwischen dem starken BF-Bildner 1.10 und dessen Mutante 1.10.16 in der Transkription der untersuchten Genabschnitte des *bee* Locus.

4.5.2.11 DNA-Sequenzierungen und Alignments

Da massenspektrometrische Untersuchungen Zellwand-assoziiierter Proteine bei den Stämmen 1.10 und 1.10.16 auf eine Mutation in Verbindung mit dem *bee* Locus hinwiesen, mittels RT-PCR-Analysen allerdings keine Veränderung auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden konnte, wurden Teilbereiche dieser Gene beider Stämme sequenziert. Die DNA-Sequenzierungen der PCR-Fragmente, die mit den Primerpaaren P101D12-2-for / P101D12-1-rev (*bee-3*, 1395 bp) und bee1-for2267 / bee1-rev3182 (*bee-1*, 1016 bp) generiert wurden, ergaben vollkommen identische Basenabfolgen jeweils bei Wildtyp und Mutante. Ebenso konnte eine identische DNA-Sequenz des Fragments des *srt-2* Gens, das mit der Primerkombination P101D12-11-for / Sor2R-rev (1280 bp) amplifiziert wurde, bei beiden Stämmen nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).

Die DNA-Sequenzierung des 650 bp großen Fragments des *srt-1* Gens (Primerpaar Sor1L-for / Sor1L-rev) mittels des Primers Sor1L-for zeigte hingegen den Austausch einer Base an Position 751 des *srt-1* Gens (G → T) bei der Mutante 1.10.16 im Vergleich zum Wildtyp 1.10.

Alignments dieser DNA-Sequenzen (siehe Abb. 40 im Anhang) und Translation in die Aminosäuresequenz des Enzyms Sortase-1 (MegAlign 7.0, DNASTAR Lasergene Software; MRI Karlsruhe) ergaben schließlich, dass diese G → T Punktmutation zu einem Austausch der Aminosäure Glutaminsäure (AS 251) in ein Stopp-Codon (siehe Abb. 34) und somit in den Abbruch der Translation resultierte. Diese Punktmutation wurde durch weitere drei unabhängige Sequenzierungen (unterschiedliche DNA-Extraktionen und PCR-Ansätze) bestätigt.

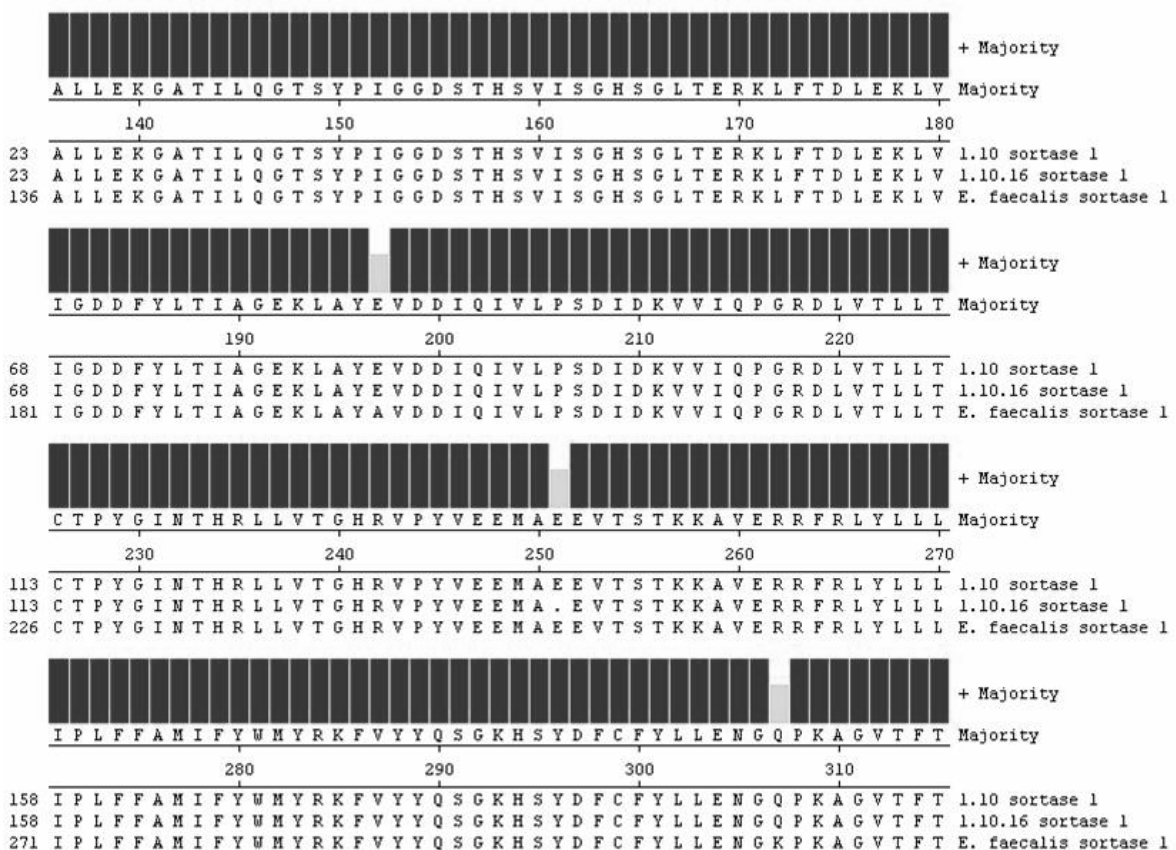


Abb. 34 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen eines Teilbereichs der Sortase-1 des *bee* Locus der *E. faecalis* Stämme 1.10, 1.10.16 und E99

Stopp-Codon an Position 251 bei der Mutante 1.10.16; erkennbar sind weitere Unterschiede zur publizierten Sequenz des Stamms *E. faecalis* E99 (Tendolkar *et al.*, 2006), die jedoch sowohl im Wildtyp 1.10 und der Mutante 1.10.16 auftraten; Alignment durchgeführt mit Hilfe der Software MegAlign 7.0 (DNASTAR Lasergene Software; MRI Karlsruhe); dunkle Balken, Übereinstimmung der Sequenz bei allen drei analysierten Stämmen; helle Balken, Sequenzübereinstimmung bei zwei von drei analysierten Stämmen.

5 Diskussion

In den letzten Jahren ist das Interesse v.a. der medizinischen Forschung an der Untersuchung der Biofilm-Bildung bei den opportunistisch pathogenen Enterokokken stark gestiegen, da diese Fähigkeit als eine wichtige Eigenschaft für die Pathogenese von Infektionen, die die klinisch relevanten Spezies *E. faecalis* und *E. faecium* verursachen, erkannt wurde. Einige Virulenzfaktoren konnten bei Enterokokken in Verbindung mit dem Vorgang der Biofilm-Bildung gebracht werden, dennoch sind die daran beteiligten molekularen Mechanismen bislang weitgehend ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Enterokokken-Stämme verschiedener Herkunft auf ihre Biofilm-Bildungsfähigkeit untersucht und Korrelationen mit phänotypisch und genotypisch nachgewiesenen Virulenzfaktoren erstellt, um mögliche Zusammenhänge und die Bedeutung der einzelnen Faktoren am Vorgang der Biofilm-Bildung zu ergründen. Ein Schwerpunkt lag auf der Untersuchung von *E. faecalis* Isolaten aus Vaginalabstrichen von Patientinnen, die an Bakterieller Vaginose litten, da neuste Ergebnisse auch bzgl. der Pathogenese dieses Krankheitsbildes der Biofilm-Bildung eine entscheidende Bedeutung zumessen. Inwieweit Enterokokken Einfluss auf die Biofilm-Bildung im Fall der Bakteriellen Vaginose nehmen, ist unklar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher das Vorkommen von Virulenzfaktoren und Biofilm-Bildung bei Enterokokken aus Vaginalabstrichen analysiert werden.

5.1 *E. faecalis* isoliert aus verschiedenem klinischen Material

5.1.1 Phänotypischer und genotypischer Nachweis von Virulenzfaktoren

Mehrere Studien wurden bislang zur Erforschung des Vorkommens von Virulenzfaktoren bei *E. faecalis* wie auch *E. faecium* durchgeführt, mit denen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse über die Häufigkeit der Gene *esp*, *asa1*, *gelE*, *cyIA* sowie der Gelatinase-Expression und β -Hämolyse bei Stämmen unterschiedlicher Herkunft (siehe 4.1.1, Tab. 11) im Folgenden verglichen werden.

Das *esp* Gen wurde mit einer Gesamtinzidenz von 52,7 % in dieser Arbeit in etwa gleicher Häufigkeit in jeder Gruppe der *E. faecalis* Stämme verschiedener Herkunft nachgewiesen (52,3 % der Urin-Isolate und 54,1 % der Faeces-Stämme). Dieses Ergebnis korreliert relativ gut mit beobachteten Gesamtinzidenzen bei *E. faecalis* von Mohamed *et al.* (2004; 45,0 %), Di Rosa *et al.* (2006; 43,4 %) oder Dworniczek *et al.* (2005; 57,4 %). Auch bestärkten die erhaltenen Daten die Ergebnisse anderer Autoren (Eaton & Gasson, 2002; Waar *et al.*, 2002a; Creti *et al.*, 2004; Di Rosa *et al.*, 2006), die eine Verbreitung von *esp* bei *E. faecalis* Isolaten aus den unterschiedlichsten Bereichen (Infektionen, Normalflora, Umwelt etc.) beschrieben. Dies steht im Gegensatz zum *Esp_{fm}*, das fast ausschließlich mit *E. faecium* Stämmen klinischer Herkunft assoziiert ist (siehe auch 5.2). Die Untersuchungen von

Creti *et al.* (2004), Seno *et al.* (2005) und Mohamed *et al.* (2004) ergaben, dass 66,7 %, 72,2 % bzw. 59,0 % der Stämme aus Harnwegsinfektionen (UTI) *esp*⁺ waren, was die Ergebnisse einer Studie von Shankar *et al.* (2001) bzgl. der Rolle von Esp als Kolonisationsfaktor bei UTI unterstützte. Im Vergleich zu den nachgewiesenen Inzidenzen dieser Arbeit (52,3 %) zeigten die Daten dieser Autoren ein etwas höheres Vorkommen von *esp* bei Urin-Stämmen, was in regionalen Unterschieden begründet sein kann.

Die nachgewiesene Gesamthäufigkeit des *gelE* Gens (82,0 %) war ähnlich zum Auftreten, das andere Autoren beschrieben (74,3 %; Creti *et al.*, 2004). Des Weiteren stellten Creti *et al.* (2004) sowie Seno *et al.* (2005) die im Vergleich zu Stämmen anderer Herkunftsbereiche durchschnittlich höchsten Inzidenzen bei *E. faecalis* Isolaten aus UTI fest (90,9 % bzw. 86,9 %), was ebenfalls gut mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen korrelierte (84,1 %).

Allerdings exprimierten ca. die Hälfte der *E. faecalis* Stämme, bei denen das *gelE* Gen detektiert wurde, das Enzym Gelatinase nicht. Diese sogenannten „stillen Gene“ sind bei der überwiegenden Anzahl der Isolate in einer häufig auftretenden, 23,9 kb-großen Deletion des *fsr* Genclusters begründet, wodurch ein GelE⁻ Phänotyp resultiert (Nakayama *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2004). In der vorliegenden Untersuchung wurde die Produktion der Gelatinase insgesamt bei 46,0 % der *E. faecalis* Isolate nachgewiesen, wobei 38,6 % der Stämme aus Urin, 52,6 % der Isolate invasiver Herkunft und 40,5 % der Faeces-Isolate GelE⁺ waren. Creti *et al.* (2004) stellten bei 45,5 % der Stämme aus invasiven Infektionen und 33,3 % der Urin-Isolate Gelatinase-Produktion fest. Coque *et al.* (1995) konnten eine Gelatinase-Expression bei 53,0 % der untersuchten Urin-Isolate und 62,0 % der Faeces-Isolate bei hospitalisierten Patienten sowie 27,0 % der Faeces-Stämme gesunder Personen nachweisen. Auch in einer Studie von Di Rosa *et al.* (2006) waren lediglich 16,7 % der *E. faecalis* Intestinaltrakt-Stämme GelE⁺. Seno *et al.* (2005) detektierten eine Gelatinase-Produktion bei 47,4 % der von den Autoren untersuchten 352 Urin-Stämme. Somit waren insbesondere die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bzgl. der Stämme aus Faeces (40,5 % GelE⁺) nur bedingt übereinstimmend mit denen anderer Autoren (Coque *et al.*, 1995; Di Rosa *et al.*, 2006), was vermutlich auf die stark heterogene Zusammensetzung der *E. faecalis* dieser Gruppe (stationär und ambulant behandelte Patienten, unterschiedliche Erkrankungen etc.) zurückzuführen war.

Das *cylA* Gen wurde im Rahmen dieser Arbeit bei 40,9 % der *E. faecalis* aus Urin, 31,6 % bei Stämmen invasiver Herkunft und insgesamt bei 38,7 % der Isolate nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse erzielten Seno *et al.* (2005; 46,6 % *cylA*⁺ von 352 Urin-Isolaten) und Creti *et al.* (2004; 41,7 % *cylA*⁺ der Urin-Stämme, 23,0 % der Isolate aus invasiven Infektionen). Im Vergleich dazu wurde β -Hämolyse in nicht allen Stämmen, bei denen das *cylA* Gen nachgewiesen wurde, beobachtet, was wiederum in nicht detektierten Mutationen

innerhalb des Cytolysin-Operons oder regulatorischen Effekten begründet sein kann. β -Hämolyse zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in einer erhöhten Anzahl von Urin- (29,5 %) und Wund-Isolaten (30,8 %) im Vergleich zu Stämmen aus Faeces (16,2 %) und von invasiver Herkunft (10,5 %). Dies war vergleichbar mit Ergebnissen von Dworniczek *et al.* (2005), die bei 19,4 % von 36 *E. faecalis* Isolaten aus Faeces β -Hämolyse nachwiesen, sowie denen von Creti *et al.* (2004; 11,5 % der Isolate aus invasiven Infektionen und 25,0 % der UTI-Stämme β -hämolysierend). Coque *et al.* (1995), Seno *et al.* (2005) und Dworniczek *et al.* (2005) konnten allerdings β -Hämolyse lediglich bei 13,0 %, 17,8 % bzw. 15,0 % der Urin-Isolate detektieren.

Das *asa1* Gen wurde in der vorliegenden Untersuchung in allen Herkunftsgruppen in etwa ähnlicher Häufigkeit nachgewiesen, wobei 67,6 % der Faeces-Isolate und 77,3 % der Urin-Stämme diesen Virulenzfaktor besaßen. Coque *et al.* (1995) und Creti *et al.* (2004) beobachteten leicht geringere Inzidenzen bei *E. faecalis* Isolaten aus Urin von 67,0 % bzw. 66,7 %, Seno *et al.* (2005) detektierten das *asa1* Gen hingegen in 82,7 % der Stämme.

Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Häufigkeit von *ef0591* von insgesamt 18,7 % stimmte gut mit dem Ergebnis von Creti *et al.* (2004; 16,2 %) überein, allerdings ist diesem Faktor aufgrund seines relativ geringen Vorkommens vermutlich eine tendenziell eher untergeordnete Rolle als Virulenzfaktor beizumessen. Dies scheint ebenfalls für die untersuchten Virulenzeigenschaften Lipase- und DNase-Produktion sowie das *asa373* Gen zuzutreffen, die bei keinem Stamm bzw. lediglich bei drei Isolaten sowie einem Isolat detektiert wurden.

Auch wenn zum Teil differierende Inzidenzen eines Virulenzfaktors in den jeweiligen Herkunftsgruppen zu verzeichnen waren, konnten in der statistischen Analyse keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden. Somit konnte in dieser Arbeit kein Virulenzfaktor eindeutig in Verbindung mit einer bestimmten Herkunft bzw. einem bestimmten Entnahmeort gebracht werden, so dass auch keine Mutmaßungen in Bezug auf Korrelationen zu Infektionsgeschehen möglich waren. Es sind leichte Trends erkennbar, z.B. dass *E. faecalis* Stämme aus Urin bzw. Wunden bzgl. bestimmter untersuchter Merkmale (β -Hämolyse, *cylA*) höhere Inzidenzwerte im Vergleich zu Faeces-Isolaten und zu Stämmen invasiver Herkunft aufwiesen. Dies würde tendenziell Ergebnissen von Creti *et al.* (2004) sowie Seno *et al.* (2005) entsprechen, die auf eine Akkumulation von Virulenzgenen bei Isolaten des Herkunftsbereichs Urin hindeuten und somit eine allgemein erhöhte Virulenz dieser Stämme impliziert. Im Hinblick auf gewisse untersuchte Faktoren (*esp*, *asa1*, GelE) könnte ein vermehrtes Auftreten daher mit einer erhöhten Fähigkeit von Isolaten bestimmter Herkunftsbereiche zur Anheftung sowie Kolonisation entsprechender Gewebe und folgedessen auch Biofilm-Bildung an diesen verbunden sein.

5.1.2 Biofilm-Bildung und Zusammenhang mit bestimmten Virulenzfaktoren

Auch hinsichtlich der Biofilm-Bildung liegen mehrere Studien vor, die das Vorkommen dieser Fähigkeit bei *E. faecalis* Stämmen aus unterschiedlichsten Bereichen untersucht haben (siehe auch 1.3.2). Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus hingegen ist bisher nur ansatzweise verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurden die 150 untersuchten *E. faecalis* Isolate daher auf ihre Fähigkeit zur Biofilm-Bildung mittels eines Biofilm-Assays überprüft und diese Ergebnisse mit dem Vorkommen bestimmter Virulenzfaktoren in Korrelation gebracht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass unter den 150 untersuchten *E. faecalis* Isolaten aus verschiedenen Bereichen insgesamt 48,0 % keine, 23,3 % mäßige und 28,7 % starke Biofilm-Bildner waren, wobei sich diese Verteilung zwischen den einzelnen Herkunftsgruppen deutlich unterschied (siehe Tab. 12). Bei den Stämmen aus Urin und invasiver Herkunft kamen zu jeweils ca. 30 % keine sowie mäßige BF-Produzenten vor und etwa zu 40 % starke BF-Bildner (insgesamt ca. 70 % BF-Bildner), worunter jeweils ca. 15 % sehr starke BF-Produzenten nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz dazu bildeten unter den Faeces- und Wund-Isolaten ca. 60 % der Stämme keinen BF sowie zu jeweils ca. 20 % einen mäßigen bzw. starken BF (insgesamt ca. 40 % BF-Bildner), wobei nur wenige sehr starke BF-Produzenten (ca. 5 %) zu verzeichnen waren. Die Ergebnisse bzgl. der Urin-Isolate (ca. 70 % BF-Bildner) stimmen relativ gut mit anderen Studien (Mohamed *et al.*, 2004; Seno *et al.*, 2005; siehe Tab. 19) überein und implizieren somit eine Bedeutung der BF-Bildung bei *E. faecalis* Stämmen dieser Herkunft. Das erhöhte Auftreten von BF-Bildnern bei Isolaten invasiver Herkunft könnte ebenfalls in eingeschränktem Maße mit dem Ergebnis von Mohamed *et al.* (2004) verglichen werden, da in dieser Studie Endokarditis-Isolate signifikant häufiger zur BF-Bildung befähigt waren als Nicht-Endokarditis-Stämme.

Beispiele von in der Literatur vorhandenen Daten zum Vorkommen von BF-Bildung bei *E. faecalis* Stämmen (Tab. 19 sowie Tab. 1) ließen zum Teil auffällige Unterschiede zwischen einzelnen Studien erkennen. So waren in Studien von Baldassarri *et al.* (2001), Di Rosa *et al.* (2006) und Mohamed *et al.* (2004) ca. 80 %, 95,2 % bzw. 78,5 % aller *E. faecalis* Stämme, isoliert aus unterschiedlichem Material (Infektionen, Umwelt, Normalflora) BF-Bildner, während bei Dworniczek *et al.* (2005) ca. zwei Drittel der Stämme keinen BF bildeten. Des Weiteren zeigten insbesondere Ergebnisse von Mohamed *et al.* (2004), dass Unterschiede bei Isolaten verschiedener Herkunft bestanden (siehe Tab. 19). Diese Differenzen sind zum einen sicherlich auf regional bedingte Verschiedenheiten der Stämme zurückzuführen, da diese Studien in Ländern weltweit durchgeführt wurden und somit auch epidemiologische Faktoren eine Rolle spielen könnten. Zum anderen wurde die Bestimmung der Menge an gebildetem Biofilm zum Teil mittels unterschiedlicher Methodik durchgeführt. Während Toledo-Arana *et al.* (2001) oder Mohamed *et al.* (2004) einen modifizierten Assay

nach O'Toole & Kolter (1998) durchführten, bei dem das Kristallviolett vor der OD-Messung in Ethanol-Aceton gelöst wird, kam bei Baldassarri *et al.* (2001) oder Di Rosa *et al.* (2006) eine modifizierte Methode nach Christensen *et al.* (1985) zum Einsatz. Dies führt daher dazu, dass die Studien untereinander zwar tendenziell miteinander verglichen werden können, absolute Gegenüberstellungen jedoch schwierig sind. Bzgl. der Bestimmung der Biofilm-Bildung bei Enterokokken fehlen bisher ausführliche, systematische Vergleiche der verschiedenen Methoden, wie sie z.B. bei *S. epidermidis* (Deighton *et al.*, 2001) oder *S. aureus* (Knoblauch *et al.*, 2002) vorliegen.

Tab. 19 Vorkommen von Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* Stämmen aus verschiedenem Material

Prozentuale Werte und Klassifizierung der Menge an gebildetem Biofilm (kein/wenig BF, mäßiger BF, starker BF) nach jeweils angegebener Literaturstelle, überwiegend gerundete Werte; *, Produktion von keinem und wenig BF; **, Produktion von wenig BF, restliche Stämme kein BF; ***, mäßige und starke BF-Bildner.

Herkunft	Anzahl Stämme	kein/wenig BF	mäßiger BF	starker BF	Referenz	Land
Endokarditiden	79	9%*	52%	39%	Mohamed <i>et al.</i> (2004)	USA
Urin	22	22%*	77%	0%		
Faeces Hospitalisierte	15	47%*	47%	7%		
Faeces Gesunde	16	25%*	63%	13%		
insgesamt	163	21,5%*	56,4%	22,1%		
Urin	40	30,0%**	25,0%	2,5%	Dworniczek <i>et al.</i> (2005)	Polen
Faeces	36	32,5%**	12,5%	2,5%		
insgesamt	108	37,0%**	20,3%	1,8%		
Infektionen (UTI u.a.)	55	96,3%***			Di Rosa <i>et al.</i> (2006)	Italien
Intestinalflora	12	100,0%***				
insgesamt	83	95,2%***				
insgesamt	73	20%	14%	66%	Baldassarri <i>et al.</i> (2001)	Italien
Urin (UTI)	352	37,5%	44,3%	18,2%	Seno <i>et al.</i> (2005)	Japan

In dieser Arbeit wurde die Methodik des Biofilm-Assays entsprechend einer von Baldassarri *et al.* (2001) modifizierten Durchführung nach Christensen *et al.* (1985) angewandt, welche bereits für andere Gram-positive Bakterien (z.B. *S. epidermidis*) optimiert wurde. Dieser Assay erwies sich im Rahmen der Etablierung zur Anwendung in der vorliegenden Arbeit als sehr zuverlässig, was u.a. durch die Mitführung von Referenzstämmen zur Kontrolle bei jedem Ansatz (siehe 3.11.6) gezeigt werden konnte. Somit ließ die Bestimmung der produzierten BF-Menge einen Vergleich der getesteten Isolate untereinander sowie die Erstellung von Korrelationen mit nachgewiesenen Virulenzfaktoren uneingeschränkt zu.

Hierbei ergab sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Biofilm-Bildung (gemessen an dem zugehörigen Medianwert) bei GelE⁻- und GelE⁺-Isolaten (Abb. 7) sowie bei *asa1*⁻- und *asa1*⁺-Stämmen (Abb. 8) nachgewiesen werden konnte, wohingegen sich *esp*⁻-Stämme signifikant von *esp*⁺-Isolaten hinsichtlich der Menge an gebildeten Biofilm unterschieden (Abb. 6). Somit scheint das Vorhandensein des Esp-Proteins einen bedeutsamen Faktor für die Fähigkeit von *E. faecalis* Stämmen zur Biofilm-Bildung darzustellen. Im Gegensatz dazu scheint allein die Anwesenheit des *asa1* Gens oder die Produktion von Gelatinase keine erhöhte Biofilm-Bildungsfähigkeit zu bewirken. Eine Gesamtbetrachtung dieser Einzelergebnisse ließe in Übereinstimmung mit dem derzeitigen Stand der Forschung (siehe auch 1.3.4) daher den Schluss zu, dass insbesondere *esp* eine entscheidende Voraussetzung für diese Fähigkeit bei *E. faecalis* ist, da dieses Zellwandprotein v.a. den ersten Schritt der Biofilm-Bildung, die primäre Anheftung an ein Substrat, fördert (Toledo-Arana *et al.*, 2001). Ohne diesen initialen Vorgang kann die Entstehung eines Biofilms nicht vonstatten gehen. Aggregationssubstanzen wie dem Asa1-Protein fördern während des Vorgangs der Biofilm-Bildung hingegen die Entstehung von Mikrokolonien durch die interzelluläre Interaktion (Galli & Wirth, 1991; Budznik & Schneewind, 2006).

Bei der Untersuchung der *E. faecalis* Stämme wurden aber auch starke und sehr starke BF-Bildner gefunden, die kein *esp* Gen besaßen (siehe Abb. 6). Dies deutete zum einen darauf hin, dass die Anwesenheit von *esp* nicht als alleiniger Faktor zur Biofilm-Bildung führt, zum anderen müssen bei manchen Stämmen andere Determinanten vorhanden sein, insbesondere solche, die Einfluss auf die primäre Anheftung nehmen. Dies bestätigte somit Ergebnisse verschiedener Studien, v.a. Kristich *et al.* (2004), Mohamed *et al.* (2004) oder Mohamed & Murray (2005), dass bei *E. faecalis* Mechanismen einer *esp*-unabhängigen Biofilm-Bildung existieren müssen.

Daher wurde weitergehend die Menge an gebildetem Biofilm der untersuchten 150 *E. faecalis* Isolate in Korrelation von jeweils zwei dieser Faktoren gebracht. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied bzgl. der Menge an produziertem Biofilm jeweils zwischen den Gruppen *esp*⁻/GelE⁻, *esp*⁻/GelE⁺, *esp*⁺/GelE⁻ und *esp*⁺/GelE⁺ (Abb. 9), was konform war zu Daten von Di Rosa *et al.* (2006). Die Autoren konnten ebenfalls keinen statistischen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von *esp* und Gelatinase mit der Höhe der Biofilm-Bildung erkennen. In der vorliegenden Arbeit wurden sogar in der Gruppe *esp*⁻/GelE⁻ mäßige und starke BF-Bildner detektiert, so dass dies den Schluss zuließ, dass weder das *esp* Gen noch die Gelatinase-Expression bei bestimmten Stämmen zur Produktion eines Biofilms erforderlich zu sein scheint.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation der beiden Faktoren *esp* und *asa1* mit der Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* erstellt. Hierzu ergab die statistische Analyse signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen *esp*⁺/*asa1*⁺ und *esp*⁻/*asa1*⁻ sowie *esp*⁺/*asa1*⁻ und *esp*⁻/*asa1*⁺ bzgl. der Menge an gebildetem Biofilm (Abb. 10). Die beiden Gruppen der *esp*⁺ Stämme (*esp*⁺/*asa1*⁺ und *esp*⁺/*asa1*⁻) wiesen außerdem die höchsten ermittelten Medianwerte im Vergleich zu den zwei Gruppen der *esp*⁻ Isolate (*esp*⁻/*asa1*⁺ und *esp*⁻/*asa1*⁻) auf. Somit scheint die Anwesenheit von *esp* und *asa1* die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung unter den hier getesteten Bedingungen deutlich zu erhöhen. Aber auch bei alleiniger Präsenz von *esp* ist dieser Zustand im Vergleich zu Stämmen, denen beide betrachtete Faktoren fehlen, zu erkennen. Dies steht wiederum im Einklang mit den o.g. Ausführungen zum Einfluss des Esp-Proteins. Dennoch wurden auch hier in der Gruppe *esp*⁻/*asa1*⁻ mäßige und starke BF-Bildner ausgemacht, was erneut die Hypothese des Vorhandenseins mehrerer verschiedener Mechanismen zur Biofilm-Bildung bei dieser Spezies untermauerte.

5.2 *E. faecium* isoliert aus verschiedenem klinischen Material

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 78 *E. faecium* Stämme verschiedener Herkunft auf das Vorkommen von Biofilm-Bildung und Virulenzfaktoren untersucht. Das *esp_{fm}* Gen wurde bei insgesamt 43,6 % aller getesteten Stämme nachgewiesen, wobei sich Unterschiede bzgl. der Herkunft zeigten (33,3 % bei Faeces-, 90,0 % bei Urin-, 66,7 % bei Wund-Isolaten oder 42,9 % und 0,0 % bei Isolaten invasiver Herkunft bzw. Umwelt). Sehr ähnliche Inzidenzen konnten ebenfalls von anderen Forschungsgruppen nachgewiesen werden. Dworniczek *et al.* (2005) detektierten das *esp_{fm}* Gen in insgesamt 48,6 % der untersuchten Stämme, wobei 63,6 % der Urin- und 27,8 % der Faeces-Isolate *esp_{fm}*⁺ waren. Werner *et al.* (2008) wiesen das *esp_{fm}* Gen zu 66,7 % bei *E. faecium* Stämmen nach, die in deutschen Krankenhäusern auftraten. In Untersuchungen von Rice *et al.* (2003) waren insgesamt 33,4 % der *E. faecium* Isolate *esp_{fm}*⁺, wobei das Gen überwiegend in klinischen Stämmen auftrat, die nicht aus Faeces isoliert wurden (84 %). Harrington *et al.* (2004) wiesen dieses Gen bei 51,7 % und Raad *et al.* (2005) bei 53,0 % der untersuchten *E. faecium* Stämme nach, die eine Bacteriämie hervorgerufen hatten. Auch Eaton & Gasson (2002) sowie Woodford *et al.* (2001) erkannten ein erhöhtes Vorkommen von *esp_{fm}* bei klinischen Isolaten (68,0 % bzw. 63,0 %), insbesondere bei Stämmen aus Urin (80,0 % bzw. 85,2 %).

Das *hyl* Gen konnte insgesamt bei 42,3 % der *E. faecium* detektiert werden, wobei sich auch hier Unterschiede der Inzidenzen bei Faeces-Stämmen (14,8 %) und Isolaten aus Urin, Wunden und invasiver Herkunft (80,0 %, 100,0 % bzw. 66,7 %) zeigten. Auch bzgl. dieses Faktors wurden übereinstimmende Inzidenzen in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen festgestellt. In einer Studie von Werner *et al.* (2008) wurde das *hyl* Gen insgesamt bei 39,2 % von 51 untersuchten *E. faecium* Isolaten nachgewiesen, die in Krankenhäusern in

Deutschland auftraten. Rice *et al.* (2003) detektierten das *hyl* Gen in 17,7 % aller 577 getesteten Isolate, jedoch dominierte der Faktor in klinischen Stämmen, die nicht aus Faeces kultiviert wurden (91 %).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen wurde auch in der vorliegenden Arbeit das *esp_{fm}* Gen sowie das *hyl* Gen mit einer erhöhten Häufigkeit in Urin- und Wund-Isolaten sowie in *E. faecium* Stämmen invasiver Herkunft im Vergleich zu Faeces- und Umwelt-Isolaten detektiert, was die Bedeutung von *Esp_{fm}* und Hyaluronidase als Virulenzfaktoren bei dieser Spezies hervorhebt. Insbesondere das hohe Vorkommen von *esp_{fm}* in Urin- und Wund-Isolaten (90,0 % und 66,7 %), vergleichbar mit Daten von Eaton & Gasson (2002; 80,0 % und 80,0 %), könnte mit der Fähigkeit der *E. faecium* Stämme zur BF-Bildung assoziiert sein. Mehrere Studien aus unterschiedlichen Ländern konnten die Fähigkeit zur BF-Bildung auch in dieser Spezies nachweisen (siehe 1.3.2), wobei die Häufigkeiten auch hier stark variierten (0,0 % bis 48,0 %). Dies kann in einer regional bedingten Verschiedenheit der Stämme begründet sein, zum Teil möglicherweise auch in den bereits unter 5.1 beschriebenen Einflussfaktoren. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich ein Isolat (1,3 %) als schwacher BF-Bildner charakterisiert, welches auch Träger des *esp_{fm}* und *hyl* Gens war (siehe 4.2). Daher kann neben der generellen Erkenntnis, dass eine geringere Anzahl an *E. faecium* Stämmen im Vergleich zu *E. faecalis* Isolaten zur BF-Bildung befähigt sind, auch die Aussage getroffen werden, dass die Fähigkeit zur BF-Bildung bei *E. faecium* Stämmen in der hier untersuchten Region unter den beschriebenen Bedingungen kaum nachgewiesen werden konnte. Dennoch scheinen einige *E. faecium* Isolate diese Eigenschaft zu besitzen, die daran beteiligten Faktoren sind jedoch weitgehend unbekannt. Lediglich bzgl. des *Esp_{fm}*-Proteins liegen Untersuchungen vor (Van Wamel *et al.*, 2007; Heikens *et al.*, 2007), die den Einfluss dieses Faktors aufgrund der Erhöhung der Fähigkeit zur primären Anheftung an abiotische Oberflächen (Polystyrol) auf das BF-Bildungsvermögen dieser Spezies belegen. Van Wamel *et al.* (2007) konnten auch zeigen, dass die Expression von *esp_{fm}* stark von den Wachstumsbedingungen (Temperatur, Sauerstoffzufuhr) der Stämme abhing. Somit bedarf es zukünftig weiterführender Forschung, ob und welche anderen Virulenzfaktoren und Umweltbedingungen die BF-Bildung bei dieser Spezies beeinflussen.

5.3 *E. faecalis* isoliert von Patientinnen mit dem Krankheitsbild Bakterielle Vaginose

Im Gegensatz zu einer relativ guten Datenbasis, die bzgl. des Vorkommens von Virulenzfaktoren und Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* und *E. faecium* aus verschiedenen klinischen Bereichen (Infektionen, Faeces hospitalisierter Patienten etc.) in der Literatur vorliegt, sind diese Untersuchungen hinsichtlich Enterokokken aus Vaginalabstrichen kaum oder nur vereinzelt vorhanden (z.B. Creti *et al.*, 2004; diese Studie enthielt zwei *E. faecalis* Isolate aus Vaginalinfektionen). Interessant ist hierbei der klinische Aspekt, dass scheinbar die Biofilm-Bildung bei der Bakteriellen Vaginose (BV) eine Rolle zu spielen scheint (Swidsinski *et al.*, 2005), die Pathogenese dieser Erkrankung jedoch noch weitestgehend unklar ist. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit u.a. ein Schwerpunkt auf den Nachweis verschiedener Virulenzfaktoren bei Enterokokken der Vaginalflora gelegt, die von Patientinnen mit Bakterieller Vaginose isoliert wurden.

5.3.1 Phänotypischer und genotypischer Nachweis von Virulenzfaktoren

Mittels statistischem Vergleich der Ergebnisse zum Nachweis von Virulenzfaktoren bei insgesamt 40 *E. faecalis* Stämmen, die von Patientinnen mit Bakterieller Vaginose isoliert wurden, mit 40 Isolaten von Frauen mit negativem Befund bzgl. BV konnten hinsichtlich aller getesteten Merkmale, mit Ausnahme der H₂O₂-Produktion, keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (vgl. Tab. 13). Letztere Differenz schien in der Betrachtung der absoluten Zahlen hingegen als eher weniger von Bedeutung, da die Produktion von H₂O₂ bei allen Isolaten aus BV-positiven Vaginalabstrichen detektiert wurde, bei Stämmen von Patientinnen ohne BV hingegen zu 85 %. Somit konnte in dieser Studie keiner der untersuchten Virulenzfaktoren eindeutig bei *E. faecalis* Stämmen, die mit dem Krankheitsbild der Bakteriellen Vaginose assoziiert waren, bestimmt werden. Ein erkennbarer, wenn auch nicht signifikanter Unterschied ließ sich jedoch in der Gelatinase-Produktion feststellen. In Bezug auf diese Eigenschaft wurden 57,5 % positive Isolate bei Vaginalabstrichen von Frauen mit BV nachgewiesen, hingegen bei Patientinnen ohne BV lediglich 37,5 %. Hierzu müssten weitere, spezifische Untersuchungen zur Rolle dieses Virulenzfaktors sowie beteiligter *E. faecalis* Stämme bzgl. dieses Krankheitsgeschehens durchgeführt werden.

Des Weiteren konnte bei keinem Isolat eine hemmende Wirkung gegenüber neun *Lactobacillus* spp. (Wildtypstämme aus Vaginalabstrichen) sowie gegenüber *L. acidophilus* (DSM 20079) oder *L. crispatus* (DSM 20584) mittels Bacteriocin-Tests festgestellt werden. Eine phänotypische Charakterisierung dieser Wildtypstämme ergab, dass alle Isolate Gram-positive, homofermentative Stäbchen waren, die DL-Laktat produzierten und H₂O₂ bildeten. Von Kelly *et al.* (2003) wurde ein möglicher Einfluss von Enterokokken auf die Vaginalflora und somit eine potenzielle Bedeutung für die Pathogenese der BV für möglich gehalten. Die

Autoren konnten die Beeinflussung des Scheidenmilieus auf die von den Enterokokken produzierten Bacteriocine oder bacteriocin-ähnlichen Substanzen zurückführen, die antagonistisch auf das Wachstum vaginaler *Lactobacillus* spp. wirken und damit zur Etablierung einer BV-assoziierten Mikroflora beitragen. Hierzu müsste diese Hemmung insbesondere auf in der Vaginallflora vorherrschende, Wasserstoffperoxid-produzierende *Lactobacillus* spp. wirken, um das mikrobiologische Gleichgewicht des Scheidenmilieus zu beeinflussen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Bacteriocin-Tests zum Nachweis einer hemmenden Wirkung der *E. faecalis* Stämme gegenüber einer geringen Auswahl an H₂O₂-produzierenden Wildtypisolaten konnten diese von Kelly *et al.* (2003) aufgestellte Annahme zunächst nicht unterstützen.

Überdies ist bei der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse zu beachten, dass die hier verwendete Vergleichsgruppe zwar aus *E. faecalis* Isolaten zusammengestellt wurde, die aus Vaginalabstrichen von Patientinnen mit negativem Befund bzgl. BV stammten, diese Frauen jedoch nicht vollends symptomatisch unauffällig und beschwerdefrei waren. Ob und wenn ja an welchen anderen, nicht betrachteten Erkrankungen der Vaginallflora diese Frauen litten, war nicht bekannt und aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht zu erfassen gewesen. Deshalb wurde diese Vergleichsgruppe gemäß der zusätzlichen mikrobiologischen Befunde der Vaginalabstriche (siehe Tab. 33 im Anhang) zumindest so ausgewählt, dass keine sonstigen Erregernachweise (Mycoplasmen / Ureaplasmen, Pilze etc.) vorlagen. Dennoch ließ die Erfassung der Döderlein-Flora darauf schließen, dass eine mehr oder weniger starke Störung des Scheidenmilieus bei diesen Frauen bestand. Bzgl. einer absoluten Aussage des Vorkommens von Virulenzfaktoren bei Enterokokken assoziiert mit BV wäre eine Kontrollgruppe mit Isolaten von gesunden Frauen besser geeignet, die Erstellung dieser Stammsammlung würde allerdings einen mit medizinischen Studien verbundenen, erheblichen Aufwand darstellen. Nichtsdestotrotz können die in dieser Arbeit erstmals bei einer größeren Anzahl von Isolaten erhobenen Daten, v.a. die hinsichtlich des Vorkommens bestimmter Virulenzfaktoren und des Auftretens von Biofilm-Bildung gewonnenen Ergebnisse (siehe 5.4), als Ausgangspunkt für Folgestudien dienen.

5.3.2 Biofilm-Bildung und Zusammenhang mit bestimmten Virulenzfaktoren

Der Vergleich zum Vorkommen von Biofilm-Bildung bei den untersuchten 80 *E. faecalis* Isolaten aus Vaginalabstrichen ergab, dass ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Stämme von Patientinnen mit BV und den Isolaten der Vergleichsgruppe in den einzelnen BF-Kategorien (kein, mäßiger, starker BF-Bildner) bestand (siehe Tab. 14). Insofern konnte auch in Bezug auf dieses Merkmal keine Aussage zum Unterschied von *E. faecalis* Isolaten von Frauen mit BV und Stämmen von Patientinnen, deren Befund negativ bzgl. BV war, getroffen werden. Dennoch bestanden Auffälligkeiten bzgl. der

Gesamtinzidenzen beim Vergleich dieser Daten mit den Ergebnissen der Stämme aus anderen klinischen Bereichen (siehe Tab. 15 und 5.4).

Die statistischen Analysen zur Korrelation bestimmter Virulenzfaktoren mit der Menge an gebildetem Biofilm bei den *E. faecalis* Isolaten aus Vaginalabstrichen zeigten, dass ein signifikanter Unterschied zwischen esp^- und esp^+ Stämmen bestand (siehe Abb. 11), wohingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen $GelE^-$ und $GelE^+$ (siehe Abb. 12) sowie $asa1^-$ und $asa1^+$ (siehe Abb. 13) zu verzeichnen waren. Die Medianwerte der Gruppen $GelE^-$ und $asa1^-$ wiesen sogar jeweils einen höheren Wert auf als die der Gruppen, bei denen der Virulenzfaktor detektiert wurde. Dieses Ergebnis ist somit konform mit den erzielten Resultaten hinsichtlich der *E. faecalis* Stämme aus verschiedenem anderen Material (siehe 4.1.3) und untermauert die hierzu dargestellten Ausführungen (siehe 5.1.2).

Bei Vergleich der Stämme in Bezug zum Vorkommen des esp Gens und/oder der Gelatinase-Produktion (siehe Abb. 14) ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen $esp^-/GelE^+$ und $esp^+/GelE^-$ sowie der Gruppen $esp^-/GelE^+$ und $esp^+/GelE^+$, wobei die beiden Gruppen der esp^+ Isolate die höchsten Medianwerte im Verhältnis zu den beiden esp^- Gruppen aufwiesen. Außerdem ergab die statistische Analyse signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen $esp^+/asa1^-$ und $esp^-/asa1^+$ sowie $esp^+/asa1^-$ und $esp^-/asa1^-$, wobei ebenfalls wiederum die zwei Gruppen der esp^+ Isolate die höchsten Medianwerte zeigten (siehe Abb. 15). Die Gruppen, bei denen keine der beiden Determinanten detektiert wurde ($esp^-/GelE^-$ und $esp^-/asa1^-$), wiesen jeweils stets die geringsten Medianwerte auf, was für einen gewissen Einfluss der Virulenzfaktoren sprach. Andererseits konnten aber wiederum auch in diesen Gruppen Isolate gefunden werden, die starke oder sogar sehr starke BF-Produzenten waren. Gleichfalls gab es aber auch Stämme, bei denen beide Faktoren detektiert wurden, die keine BF-Bildung unter den getesteten Bedingungen zeigten.

Anhand dieser wie auch der Auswertung der Korrelationen bei den *E. faecalis* Stämmen aus verschiedenen anderen Bereichen (siehe Abb. 9 und Abb. 10 sowie 5.1.2) wurde unmissverständlich deutlich, dass das Vorhandensein der untersuchten Faktoren, insbesondere des Esp-Proteins, die Wahrscheinlichkeit einer verstärkten Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* Isolaten erhöhte. Jedoch scheinen auch andere als die betrachteten Determinanten zur Ausprägung eines Biofilms beizutragen, so dass unterschiedliche Mechanismen zur Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* existieren müssen.

5.4 Vergleich der *E. faecalis* Stämme aus Vaginalabstrichen mit Isolaten anderer klinischer Herkunft

Die Gegenüberstellung der Nachweise von Virulenzfaktoren bei den 80 *E. faecalis* Isolaten aus Vaginalabstrichen mit denen aus anderen Herkunftsbereichen (siehe Abb. 16) ließ keine sichtbaren Unterschiede erkennen. Somit konnte kein bestimmter Virulenzfaktor mit einem Herkunftsbereich in Zusammenhang gebracht werden. Im Umkehrschluss bedeutet dies aber auch, dass die aus Vaginalabstrichen isolierten *E. faecalis* Stämme im Durchschnitt eine gleich hohe Anzahl an Virulenzfaktoren aufwiesen wie Isolate aus anderen klinischen Bereichen, was ein entsprechend hohes Virulenzpotential implizierte. Da es sich bei den Isolaten um Stämme aus auf unterschiedlichste Weise und in unterschiedlichstem Maße gestörten Vaginalflora handelte, wäre ein Vergleich bzgl. des Vorkommens von Virulenzfaktoren mit Stämmen eines gesunden Scheidenmilieus interessant. Bei *E. faecalis* Isolaten der vaginalen Normalflora könnte der Nachweis einer geringeren Anzahl an Virulenzfaktoren vermutet werden, zumal einige Studien dieses Ergebnis zumindest für die humane Intestinalflora gesunder Probanden belegen (Coque *et al.*, 1995; Mohamed *et al.*, 2004; Di Rosa *et al.*, 2006).

Auffällig war weiterhin, dass die Gruppe der Vaginalabstrich-Isolate im Vergleich mit den untersuchten *E. faecalis* Stämmen aus anderem klinischen Material den höchsten Median der OD₅₉₅-Werte zur Bestimmung der Menge an gebildetem Biofilm zeigte (siehe Abb. 17). Die statistische Auswertung ergab diesbezüglich außerdem einen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen aus Faeces und Vaginalabstrichen sowie den Isolaten aus Wunden und Vaginalabstrichen. Damit wiesen die Stämme aus Vaginalabstrichen mit solchen *E. faecalis* Isolaten aus Urin und invasiver Herkunft Ähnlichkeit bzgl. der Fähigkeit zur BF-Bildung auf. Auch die Betrachtung der Verteilung der Stämme hinsichtlich der BF-Kategorien (kein, mäßiger, starker BF-Bildner) zeigte, dass die Häufigkeiten bei den Vaginalabstrich-Isolaten eher vergleichbar waren mit denen von Stämmen aus Urin und invasiver Herkunft als mit denen von Faeces- oder Wund-Isolaten (siehe Tab. 15). Auch aufgrund des Ergebnisses, dass die *E. faecalis* Isolate aus Vaginalabstrichen eine ähnlich hohe Anzahl an Virulenzfaktoren wie die Stämme aus anderem klinischen Material aufwiesen, könnte dies zum einen auf eine Herkunft und Besiedlung der derzeit gestörten Vaginalflora mit Enterokokken aus anatomisch angrenzenden Körperbereichen (Harntrakt bei gleichzeitiger Harnwegsinfektion oder Anus der Frau) hinweisen. Um diesen Zusammenhang und den vermeintlichen Übertragungsweg nachzuweisen, könnten Typisierungen der Stämme aus den besagten Bereichen zur Feststellung klonaler Verwandtschaftsverhältnisse Aufschluss geben. Zum anderen schien die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung bei den untersuchten Isolaten der Vaginalflora verstärkt verbreitet zu sein, was auf eine Bedeutung dieses Merkmals für Stämme aus diesem Körperbereich hinwies. Denkbar wäre ein daraus entstehender

Standortvorteil, möglicherweise aufgrund erhöhter Adhäsionseigenschaften oder symbiontischer Beziehungen zu anderen Stämmen der Vaginalflora.

Abschließend ist unbedingt in Betracht zu ziehen, dass die gesunde wie auch die gestörte Vaginalflora ein sehr komplexes Ökosystem darstellt, bestehend aus mehreren Bakterienstämmen, zum Teil aus Vertretern verschiedener Gattungen (Eschenbach *et al.*, 1989; Tamrakar *et al.*, 2007). Insofern gestalten sich Analysen zum Verständnis der auftretenden Wechselwirkungen in diesem System stets schwierig, dennoch können wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchungen einzelner Isolate Anhaltspunkte oder Hinweise auf mögliche Zusammenhänge bieten.

5.5 Charakterisierung von *E. faecalis* Biofilm-Mutantenstämmen

Die vorherigen Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass bei *E. faecalis* mehrere Faktoren an der Biofilm-Bildung beteiligt zu sein scheinen und daher verschiedene molekulare Mechanismen existieren müssen. Jüngste Forschungen ließen die Komplexität dieses Vorgangs bei Enterokokken erst erkennen und somit vermuten, dass im *E. faecalis* Genom weitere, noch nicht identifizierte Determinanten enthalten sein müssen. Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit konzentrierte sich deshalb auf die Herstellung und Charakterisierung von *E. faecalis* Biofilm-Spontanmutanten, um weitergehende Erkenntnisse über den Vorgang der Biofilm-Bildung zu erhalten und eventuell neue, potenzielle Einflussfaktoren bei *E. faecalis* zu identifizieren.

Mehrere Forschergruppen (z.B. Hufnagel *et al.*, 2004) wandten bereits konventionelle Methoden zur Mutagenese mit Hilfe von Transposons (Tn916 oder Tn917) an, um neue Faktoren der Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* zu identifizieren. Diese Transposon-basierten Verfahren können jedoch Nachteile bei Analysen aufweisen, die das gesamte Genom betreffen. Diese zeigen sich beispielsweise in stark präferierten Insertionsstellen und verhindern somit ein zufälliges Ereignis einer Mutation im Genom (Scott *et al.*, 1994; Garsin *et al.*, 2004). Daher erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Herstellung von Spontanmutanten mittels einer selektiven Langzeitkultivierung, was auf eine höhere Wahrscheinlichkeit einer zufällig auftretenden Mutation in noch uncharakterisierten Genen oder Genloci hoffen ließ.

Als überaus wichtig erwies sich die anfängliche Typisierung der isolierten BF-Mutanten mit unterschiedlichen Methoden. Die Anwendung von rep- oder RAPD-PCR-Verfahren kann in einigen Fällen in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Spezies, aber auch von einer Vielzahl methodischer Faktoren (Tyler *et al.*, 1997; Malathum *et al.*, 1998) anderen Typisierungsmethoden deutlich überlegen sein, insbesondere hinsichtlich der Einfachheit der Durchführbarkeit, Zeit- und Kostenintensität sowie Diskriminierungsfähigkeit (Olive & Bean, 1999). Nachteile können jedoch intra- sowie interlaboratorische Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Anwendungen darstellen, da die Interpretation v.a. schwacher oder

inkonsistent auftretender Banden problematisch sein kann (Tyler *et al.*, 1997). Dies konnte Malathum *et al.* (1998) bei wenigen *E. faecalis* Isolaten ebenfalls für die in dieser Arbeit durchgeführte BOXA2R-PCR beobachten und verwies in solchen Fällen auf die Anwendung einer PFGE zur Verifizierung der mittels rep-PCR erhaltenen Resultate. Auch andere Studien zeigten für Enterokokken eine gute Korrelation von rep-PCR Ergebnissen mit denen der PFGE (Barbier *et al.*, 1996), dennoch generell mit einer leicht geringeren Diskriminierungsfähigkeit, so dass geringe Unterschiede / Mutationen zuverlässiger mittels einer PFGE detektiert werden können (Liu & Wu, 1997). Die Durchführung dieser beiden Methoden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab schließlich, dass drei stabile *E. faecalis* Spontanmutanten hergestellt werden konnten, die darauf folgend mittels phänotypischer und molekularbiologischer Verfahren charakterisiert wurden. Der Vergleich von Wildtyp- und Mutantenstämmen bzgl. der Verwertung verschiedener Kohlenhydratsubstrate und des Vorhandenseins von Antibiotikaresistenzen bzw. Resistenzgenen (siehe 4.5.2.3) zeigte keine Unterschiede, ebenso wie der Nachweis bestimmter Virulenzfaktorengene und weiterer phänotypischer Virulenzeigenschaften mit Ausnahme der Verklumpung hinsichtlich der Stämme 1.3 und 1.3.7 (siehe 4.5.2.4 und 5.5.1). Somit konnte in Bezug auf diese Merkmale geschlossen werden, dass die vorhandenen Mutationen keine Beeinflussung dieser Eigenschaften der Isolate bewirkten.

5.5.1 Untersuchung der *E. faecalis* Stämme 1.3 und 1.3.7

Die Stämme 1.3 (kein BF-Bildner) und 1.3.7 (starker BF-Bildner) zeigten nach Kultivierung ÜN in TSBG keine sichtbaren Unterschiede der Wachstumscharakteristik, da bei beiden Stämmen eine gleichmäßige Trübung der Bouillon beobachtet werden konnte (siehe Abb. 20). Dies ließ annehmen, dass im Gegensatz zu den anderen zwei untersuchten Mutantenstämmen die erhöhte BF-Bildungsfähigkeit des Isolats 1.3.7 nicht oder nur in sehr geringem Maße auf veränderte Mechanismen der (Auto-) Aggregation unter diesen Bedingungen zurückzuführen war. Die Ergebnisse des Tests auf primäre Anheftung (4.5.2.5) zeigten hingegen, dass der Stamm 1.3.7 eine signifikant erhöhte Fähigkeit zur Adhärenz an abiotische Oberflächen (PS) im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Allerdings schien diese Eigenschaft nicht mit einer stärkeren Hydrophobizität der Zelloberfläche der Mutante einherzugehen (siehe 4.5.2.6). Eine erhöhte Zelloberflächen-Hydrophobizität resultiert in höheren Anziehungskräften, in erhöhtem Maße zur Adhäsion (Van Loosdrecht *et al.*, 1987; Marín *et al.*, 1997) und kann somit zu einer erhöhten Fähigkeit der Biofilm-Bildung führen. Daraus kann geschlossen werden, dass Faktoren bei der hier stattgefundenen Mutation betroffen waren, die die Hydrophobizität und damit die Netto-Ladung der Oberfläche nicht grundlegend beeinflusst haben.

Im CLSM stellte sich der vom Stamm 1.3.7 produzierte Biofilm als sehr dicht und kompakt mit lediglich kleineren, zellfreien Zwischenräumen dar (siehe Abb. 21), woraus geschlossen werden könnte, dass eine erhöhte Fähigkeit zur Zell-Zell-Interaktion bei der Mutante vorliegen könnte. Diese interzellulären Verbindungen schienen jedoch von geringer Stärke zu sein, da insbesondere bei der Durchführung der REM (siehe 4.5.2.2) deutlich wurde, dass der Biofilm im Vergleich zu den Biofilmen der anderen zwei untersuchten Stämme sehr viel leichter beschädigt werden konnte (Waschschritte etc.).

Die massenspektrometrischen Analysen der Isolate 1.3 und 1.3.7 ergaben, dass bei beiden Stämmen und in beiden untersuchten Banden die Proteine des *ebp* Locus (EbpA, EbpB, EbpC; siehe auch 1.3.4.4) exprimiert wurden (siehe Tab. 17). Dieser Locus codiert für Pili-Proteine bei *E. faecalis*, wobei die großen und kleinen Pili-Untereinheiten zu einem High-Molecular-Weight (HMW)-Komplex polymerisiert werden (Nallapareddy *et al.*, 2006; siehe auch 1.3.4.4). Dieser kovalent verknüpfte Komplex war somit im hochmolekularen Bereich des SDS-Gels (ca. 300 kDa, siehe Abb. 31, Bande 1.2) sichtbar. Ebenfalls sehr deutlich identifiziert wurde bei beiden Stämmen ein putatives Zellwand-assoziiertes Protein (EF2505, 182,7 kDa). Dieses war ebenso in der Bande der Masse von ca. 300 kDa zu finden, was eventuell durch Dimer-Bildung des Proteins zu erklären war.

Die Identifizierung des Surface Exclusion Proteins PrgA (Masse des reifen Proteins: 98,1 kDa) der Aggregationssubstanz PrgB in Banden dieses Massenbereichs war vermutlich auf den hohen Gehalt an kleinen Aminosäureresten (Glycin, Prolin, Alanin) zurückzuführen, welcher eine langsame Migration im SDS-Gel bewirken (Kao *et al.*, 1991). Die Surface Exclusion Proteine PrgA und Sea1 spielen in der Bildung von Aggregaten keine direkte Rolle, sie verhindern ein Self-Mating der Donorzellen und werden konstitutiv exprimiert (Dunny *et al.*, 1985; Galli *et al.*, 1992). Das Vorkommen von PrgA und Sea1 ließ jedoch auf die Anwesenheit der Sexpheromon-Plasmide pCF10 (ca. 67,6 kb; Kao *et al.*, 1991) und / oder pAD1 (ca. 59,3 kb; Tomich *et al.*, 1979) schließen, was in Übereinstimmung mit den Resultaten der Plasmid-Isolierung stände (siehe Abb. 30, Bahn 1 und 2). Der Gehalt von zwei bis drei Sexpheromon-Plasmiden ist bei *E. faecalis* sehr verbreitet (Wirth, 1994). In Bezug auf die Identifizierung mittels der massenspektrometrischen Analyse der von Sexpheromon-Plasmiden codierten Aggregationssubstanzen Asa1, Asp1 (Plasmid pPD1) und PrgB (Asc10) sowie der Surface Exclusion Proteine Sea1, Sep1 und PrgA (Galli & Wirth, 1991; Galli *et al.*, 1992; Hirt *et al.*, 1996; siehe auch 1.2.2) kann es wegen der hohen Sequenzhomologien jedoch beim Datenbankabgleich zu mehrfachen Übereinstimmungen kommen, insbesondere wenn nur wenige für das jeweilige Protein spezifische Peptide gefunden wurden. Daher sind bei der Auswertung dieser Daten nicht nur der Gesamt-Score, sondern auch einzelne Peptid-Scores eines identifizierten Proteins zu beachten.

Somit bestand ein Unterschied zwischen Wildtyp- und Mutantenstamm scheinbar lediglich in der Expressionsstärke der detektierten Proteine. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ließen bis hierher vermuten, dass die Regulation des *ebp* Locus von der Mutation beim Stamm 1.3.7 betroffen sein könnte. Das könnte andeuten, dass der Mutantenstamm im Vergleich zum Wildtyp in erhöhtem Maße Ebp-Pili an seiner Oberfläche bildete. In diesem Zusammenhang wäre vermutlich insbesondere der kürzlich beschriebene positive Regulator von *ebpABC* (Bourgogne *et al.*, 2007) von Bedeutung. Die regulatorischen Wege sowie die Signale, die *ebpR* beeinflussen oder die von *ebpR* beeinflusst werden, sind jedoch noch vollkommen unklar. Interessant war auch die Identifizierung des putativen Zellwandproteins EF2505, dessen Expression ebenfalls betroffen sein könnte. Dieses bisher uncharakterisierte Protein könnte entweder direkten Einfluss auf die Biofilm-Bildung des Stamms genommen haben oder eventuell sogar in Verbindung mit der Funktion des *ebpR* bzw. des *ebp* Locus stehen.

Denkbar als Ursache der erhöhten BF-Bildungsfähigkeit des *E. faecalis* Stamms 1.3.7 wäre auch die (zusätzliche) Beeinflussung der Regulation einer Aggregationssubstanz, worauf die starke Verklumpungsreaktion des Isolats nach Induzieren mit Pheromonen hingewiesen hat (siehe 4.5.2.4). Der Wildtyp zeigte die Verklumpung nicht oder nur in sehr geringem, nicht wahrnehmbarem Maße. Der Sexpheromon-Plasmidtransfer bei *E. faecalis* ist ein hoch kompliziertes System, wobei viele Faktoren an dessen Kontrolle involviert sind. Das Phänomen der Verklumpung beruht darauf, dass Donorzellen von Rezipienten ins Medium entlassene Sexpheromone wahrnehmen und als Reaktion darauf die plasmid-codierte, Zelloberflächen-assoziierte Aggregationssubstanz synthetisieren. Dieses Adhäsins vermittelt den Kontakt zur Rezipientenzelle zum konjugativen Plasmidtransfer. Nach der Übertragung wird die Synthese des Adhäsins gestoppt, und die Zellaggregate zwischen Donor und Rezipient lösen sich auf (Wirth, 1994). Eine Verklumpung zeigt sich nicht, wenn beide Stämme einzeln inkubiert werden, die Zellen sind dann gleichmäßig im Medium verteilt. Der Verklumpungs-Assay (siehe 3.11.3) stellt den phänotypischen Nachweis von Aggregationssubstanz dar, allerdings ist die Erkennung insbesondere sehr kleiner Mating-Aggregate nicht immer einfach, so dass der molekularbiologische Nachweis der AS-codierenden Gene meist zuverlässiger ist (Waar *et al.*, 2002a).

Diese Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen, insbesondere der massenspektrometrischen Analyse, sind jedoch bis hierher eher von hypothetischer Natur und bedürfen weiterer Untersuchungen bzw. Verifizierungen. Insofern bietet die Herstellung und grundlegende Charakterisierung dieses *E. faecalis* BF-Mutantenstamms überaus interessante Ansatzpunkte mit hohem Potenzial zur Erkenntnis weiterer, essentieller Mechanismen der Biofilm-Bildung dieser Bakterienspezies.

5.5.2 Untersuchung der *E. faecalis* Stämme 1.10 und 1.10.16

Die massenspektrometrische Identifizierung differentiell exprimierter Zellwandproteine sowie molekularbiologische Untersuchungen der Stämme 1.10 (sehr starker BF-Bildner) und der Mutante 1.10.16 (schwacher BF-Bildner) ließen den Schluß zu, dass beim Isolat 1.10.16 vermutlich eine Punktmutation im *srt-1* Gen des *bee* Locus zu dessen herabgesetzten Fähigkeit zur BF-Bildung im Vergleich zum Wildtyp 1.10 führte (siehe 4.5.2.9 und 4.5.2.11). Die Ursache der verminderten BF-Bildung der Mutante lag somit höchstwahrscheinlich darin, dass aufgrund des Defekts in der Produktion der Sortase-1 die drei Bee-Proteine nicht korrekt zu einem hochmolekularen Zellwandprotein-Komplex verknüpft werden konnten. Dennoch wurden offensichtlich die Proteine Bee-1 und Bee-3 miteinander verlinkt, was sich in dem Auftreten einer deutlichen Bande von geringerer Masse (ca. 180 kDa) bei der Mutante zeigte und mittels der massenspektrometrischen Analyse der Proteine des Stamms 1.10.16 nachgewiesen wurde (siehe Abb. 31 b, Bande 4.2 und Tab. 18). Somit schien die Verknüpfung dieser beiden Proteine vermutlich nicht beeinflusst zu sein.

Im Rahmen dieser Arbeit lieferte die LC/MS-Analyse erstmals den phänotypischen Nachweis eines hochmolekularen Bee-Komplexes bestehend aus den drei Proteinen Bee-1, Bee-2 und Bee-3 (siehe Abb. 31 b, Bande 3.1) beim Stamm 1.10. Tendolkar *et al.* (2006) gaben zwar eine erste molekularbiologische Beschreibung des *bee* Operons (siehe auch 1.3.4.3), jedoch keine weiterführenden proteinbiochemischen Erkenntnisse bzgl. dieses Locus. Die Autoren hielten es für möglich, dass aufgrund des Aufbaus des *bee* Operons, vergleichbar mit dem bereits charakterisierten *ebp* Locus, die codierten Proteine Pilus-ähnliche Strukturen darstellen. Pili-Strukturen spielen bei vielen Bakterien eine entscheidende Rolle im Prozess der Biofilm-Bildung, was beispielsweise auch für *Streptococcus pyogenes* (Manetti *et al.*, 2007) oder Oral-Streptokokken bekannt ist (Kolenbrander, 2000). Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit zuvor erzielten Ergebnisse wurde daher des Weiteren ein Sequenzvergleich der Bee-Proteine durchgeführt (MegAlign 7.0, DNASTAR Lasergene Software, ClustalW alignment; MRI Karlsruhe), um konservierte Motive bei Pilus-Proteinen Gram-positiver Bakterien zu identifizieren und so die Vermutung zu untermauern, dass auch die vom *bee* Locus codierten Proteine Pilus-Strukturen bilden (siehe Abb. 35). Neben den konservierten LPxTG-Motiven im C-Terminus der Zellwand-Proteine Gram-positiver Bakterien (Marraffini *et al.*, 2006), die ebenfalls bei den drei Bee-Proteinen detektiert wurden (Tendolkar *et al.*, 2006), enthalten Pili-Proteine weitere zwei Motive. Dies sind die sogenannte E-Box (YxLxETxAPxGY) mit konservierter Glutaminsäure (E) sowie das Pilin-Motiv (WxxxVxVY**PKN**), das ein konserviertes Lysin (K) enthält (Mandlik *et al.*, 2008). Diese konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals in den Bee-Proteinen mittels Sequenzvergleichen identifiziert werden (siehe Abb. 35), sodass hiermit weitere Ergebnisse

a) E-Box-Motiv

Bee-1 (AAZ68037)	972	SDTNVFKFTGLKPGGEYELIETVTPDGY
Bee-3 (AAZ68039)	401	DDKSELKVI GLKNGDYQLLEEKATSSDKY
EbpB (AAO80892)	374	NQAGEFSVKGLKDGQYFLEEISAPKGY
EbpC (AAO80893)	529	TADGLVDITGLKYGTYYLEETVAPDDY
RrgB (A7KT25)	540	NTDGQFQISGLAAGTYKLEEKAPEGF
RrgC (A7KT26)	311	GKDGFRFVEGLEYGTYYLWELQAPTGY
Consensus		XXXGXXXXXXGLKXGTYXLEEXXAPXG

b) Pilin-Motiv

Bee-1 (AAZ68037)	394	VQETTTYFPYYKINVPYGVGNF
Bee-2 (AAZ68038)	174	DKELATVHLYPKNVGTIVEKPV
Bee-3 (AAZ68039)	175	DTINTNVQVYPKNETKTDKKEVA
EbpC (AAO80893)	176	TEELAVVHIYPKNVANDGSLKK
SpaA (CAE50544)	179	DGWLQDVHVYPKHQALSEPVKTA
Consensus		DXELXXVHXYPKNV

Abb. 35 Alignment der Sequenzen verschiedener Pili-Proteine: Vergleich und Identifizierung konservierter Motive bei den Proteinen Bee-1, Bee-2 und Bee-3

Konservierte Glutaminsäurereste (E) in E-Box-Motiven (a; E-Box: YxLxETxAPxGY) und Lysinreste (K) in Pili-Motiven (b; Pilin-Motiv: WxxxVxVYPKN) wurden ebenfalls in den Bee-Proteinen des Stamms *E. faecalis* E99 (Tendolkar *et al.*, 2006) identifiziert. Ähnliche Motive beinhalten die Pilus-bildenden Spa-Proteine bei *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129 (Ton-That & Schneewind, 2003), Rrg-Proteine bei *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (LeMieux *et al.*, 2006) und Ebp-Proteine von *E. faecalis* OG1RF (Nalladareddy *et al.*, 2006). In Klammern sind jeweilige Akzessionsnummern angegeben. Konservierte Aminosäuren sind in fettgedruckten Buchstaben dargestellt sowie schwarz unterlegt, diese wurden mittels ClustalW Alignment (MRI Karlsruhe) identifiziert.

dieser Arbeit und damit die Hypothese untermauert wurden, dass der *bee* Locus Pili-Proteine codiert.

Damit würde der *bee* Locus neben dem bereits charakterisierten *ebp* Gencluster bei *E. faecalis* ein zweites Pili-Operon darstellen. Auch bei anderen Gram-positiven Bakterien konnten mehrere verschiedene Gencluster und damit Pili-Strukturen entdeckt werden, z.B. sind bei *Corynebacterium diphtheriae* (*spaABC*, *spaDEF*, *spaHIG*; Swierczynski & Ton-That, 2006). Allerdings müssten diese Resultate mittels weiterer Experimente bestätigt werden, die auf den phänotypischen Nachweis der Pili-Strukturen abzielen (z.B. mit Hilfe der TEM nach Immunogold-Markierung).

Sortasen verankern Zellwandproteine an deren LPxTG-Motiv über einen spezifischen Mechanismus kovalent mit den Peptidoglykan-Querverbindungen der Zellwand (siehe auch 1.3.4.3). Die Sortase A (SrtA), auch Housekeeping-Sortase genannt, wurde bisher mit wenigen Ausnahmen in allen vollständig sequenzierten Genomen Gram-positiver Bakterien gefunden. Sortasen der Klasse C-Familie sind zusammen mit ihren Substraten im jeweiligen Gencluster codiert und an der Bildung von Pili-Strukturen bei vielen pathogenen Bakterien

beteiligt (Pili-spezifische Sortasen; Marraffini *et al.*, 2006). Bei einigen Bakterien, u.a. *Corynebacterium diphtheriae*, sind bereits genauere Mechanismen der Pili-Bildung sowie der Aufbau der Pili bekannt, wenn auch noch nicht vollständig geklärt (Mandlik *et al.*, 2008). Für *E. faecalis* sind die spezifischen molekularen Mechanismen der Zellwandverankerung und Pili-Biogenese an der Zellwand für die Ebp-Proteine nicht bekannt, die Proteinsequenzen und die Struktur des Operons geben jedoch Hinweise hierzu (Nallapareddy *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals beschrieben werden, dass vermutlich aufgrund des Verlusts von Bee-2 innerhalb des HMW-Bee-Komplexes die Sortase-1 spezifisch dieses Protein mit Bee-1 und / oder Bee-3 verlinkt. Unklar bleibt die Funktion von Sortase-2, jedoch wäre denkbar, dass aufgrund des Vorkommens des E-Box-Motivs Bee-1 und Bee-3 Substrate dieser Sortase darstellen und somit ein ähnlicher Mechanismus vorliegt wie im Falle der SpaDEF-Pili bei *Corynebacterium diphtheriae* (Gaspar & Ton-That, 2006). Außerdem könnte das Bee-2 Protein aufgrund seiner geringen Größe (ca. 27 kDa) homolog zu EbpB sein, welches die kleine Pili-Untereinheit darstellt, wohingegen Bee-1 und Bee-3 Schaft und Spitze der Pili bilden würden (siehe auch Abb. 39). Dies müsste in Folgestudien verifiziert werden. Überaus wichtig wären dabei zunächst Komplementierungsexperimente des *srt-1* Gens, um eindeutig den veränderten Phänotyp (reduzierte BF-Bildungsfähigkeit) des Stamms 1.10.16 auf die Mutation in diesem Gen und somit auf den Verlust der Sortase-1 zurückzuführen. Dies ist insofern von Bedeutung, dass es sich bei der Erzeugung dieser Mutantenstämme nicht um eine gerichtete Mutagenese gehandelt hat. Somit ist derzeit nicht absolut auszuschliessen, dass auch weitere Mutationsereignisse während der Subkultivierung stattgefunden haben, die Einfluss auf den veränderten Phänotyp nehmen. Unterschiedliche vergleichende Untersuchungen von Wildtyp und Mutante zeigten verschiedenste Auswirkungen der Mutation auf den Phänotyp des Stamms 1.10.16. Zunächst wurde mittels REM (siehe 4.5.2.2, Abb. 25) und CLSM (siehe 4.5.2.1, Abb. 22) der vom Wildtyp 1.10 gebildete Biofilm als ein festes, mehrschichtiges Gebilde mit einer eher lockeren, flockigen Struktur dargestellt, die größere Zwischenräume enthielt. Die Mutation schien somit die Fähigkeit der Zellen zu verringern, sich auf diese Art zusammenzulagern. Extrazelluläre Substanzen konnten jedoch nicht entdeckt werden, so dass deutlich wurde, dass es sich hier im Vergleich zu dem Biofilm des untersuchten Stamms 2.11 um eine andere Form von Biofilm und damit um einen anderen Mechanismus der BF-Bildung handeln musste.

Anhand der Wachstumscharakteristik in TSBG-Flüssigkultur nach einer ÜN-Inkubation wurde deutlich, dass die Zellen des Stamms 1.10.16 offensichtlich in sehr viel geringerem Maße eine Bildung von Zellaggregaten zeigten als der Wildtyp 1.10 (Abb. 20). Dies implizierte eine Rolle des Bee-Proteinkomplexes für die Biofilm-Bildung evtl. aufgrund von Autoaggregation

und Zell-Zell-Interaktionen. Eine ähnliche Funktion wurde für Pilus-Strukturen anderer Bakterien schon beschrieben (Tomich & Mohr, 2003; Schembri *et al.*, 2001). Auch schien der Bee-Komplex signifikant die initiale Anheftung an abiotische Oberflächen zu beeinflussen (siehe 4.5.2.5). Dennoch war der Stamm 1.10.16 nicht gänzlich negativ bzgl. der BF-Bildungsfähigkeit (siehe 4.5.1), was vermutlich auf das Vorhandensein anderer Faktoren zurückzuführen war. Beispielsweise wurde bei Wildtyp und Mutante das *esp* Gen nachgewiesen, welches die primäre Anheftung des Stamms beeinflussen könnte (Toledo-Arana *et al.*, 2001). Ebenso könnten die Fähigkeit zur Gelatinase-Produktion und die Aggregationssubstanz Asa1 zu einer schwachen BF-Bildung der Mutante beigetragen haben (siehe 4.5.2.4). Des Weiteren zeigte der Stamm 1.10.16 eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte, aber nicht vollkommen herabgesetzte (ca. 22 %) Hydrophobizität der Zelloberfläche (siehe 4.5.2.6), was in Einklang stand mit den Ergebnissen der verminderten Fähigkeit zur primären Anheftung. Somit könnte die Mutation im *srt-1* Gen und folglich der Verlust des Bee-2 Proteins in dem HMW-Bee-Komplex auch die Hydrophobizität der Zelloberfläche zu erniedrigen, andere Faktoren wie das Esp-Protein beeinflussen jedoch möglicherweise ebenfalls diese Eigenschaft. So konnten Tendolkar *et al.* (2004) zeigen, dass die Expression von Esp bei zwei *E. faecalis* Stämmen deren Hydrophobizität der Zelloberfläche signifikant erhöhte. Dies stand allerdings nicht in einem proportionalen Verhältnis zur Menge an produziertem Biofilm, sodass die Autoren eine nicht alleinige Beeinflussung der BF-Bildung durch *esp* schlussfolgerten.

Die Gesamtinzidenz des *bee* Locus bei den 150 getesteten *E. faecalis* Isolaten lag bei 5,3 % (acht von 150), was mit Ergebnissen von Tendolkar *et al.* (2006) übereinstimmt (5,0 % bei geographisch unabhängigen Stämmen). Sieben der *bee*⁺ Isolate der vorliegenden Arbeit bildeten einen starken Biofilm, ein Stamm war ein mäßiger BF-Bildner (siehe Tab. 20 im Anhang). Außerdem konnte bei diesen Isolaten ein dem Stamm 1.10 sehr ähnliches Plasmid-Muster (Abb. 30, Bahn 3) beobachtet werden (Daten nicht aufgeführt). Dieses war höchstwahrscheinlich auf unterschiedliche Konformationen (oc-Form, supercoiled) eines 80 kb-großen, konjugativen Plasmids zurückzuführen, auf dem u.a. der *bee* Locus lokalisiert ist (Tendolkar *et al.*, 2006). Somit ist das Vorkommen des *bee* Locus im Vergleich zum ubiquitär auftretenden *ebp* Operon insgesamt als sehr gering anzusehen. Allerdings waren nach Ergebnissen von Nallapareddy *et al.* (2006) bei nur ca. 20 % aller Zellen des Stamms OG1RF Ebp-markierte Pili zu beobachten. Dies ist vermutlich auf den Einfluss des Transkriptionsregulators *ebpR* zurückzuführen (Bourgogne *et al.*, 2007; siehe auch 1.3.4.4). Dieser stark BF-bildende Phänotyp sowie das Potenzial des *bee* Locus zum Transfer auf andere Stämme mit einer hohen Frequenzrate (Tendolkar *et al.*, 2006) impliziert trotz des geringen Vorkommens des *bee* Locus eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor.

5.5.3 Untersuchung der *E. faecalis* Stämme 2.11 und 2.11.8

Der *E. faecalis* Stamm 2.11 (Wildtyp, sehr starker BF-Bildner) zeigte nach einer ÜN-Inkubation in TSBG im Gegensatz zu seiner Mutante 2.11.8 (schwacher BF-Bildner) einen sehr stark aggregierenden Phänotyp (siehe Abb. 20). Insofern ließ sich allein aufgrund dieser Beobachtung vermuten, dass die veränderte BF-Bildungsfähigkeit verursachende Mutation einen Faktor betrifft, der die Aggregation / Zell-Zell-Interaktion der Zellen während des Prozesses der Biofilm-Bildung beeinflusst. Die Ergebnisse des Tests auf primäre Anheftung verdeutlichen zwar eine leicht signifikante Erniedrigung zwischen den Stämmen 2.11 und 2.11.8 (siehe Abb. 28), im Vergleich zu den anderen untersuchten starken bzw. sehr starken BF-Bildnern zeigte sich die Fähigkeit zur initialen Anheftung beim Stamm 2.11 jedoch weniger ausgeprägt. Somit konnte geschlussfolgert werden, dass die Fähigkeit zur BF-Bildung bei diesem Stamm vornehmlich auf seiner Eigenschaft der starken Aggregation beruht.

In der CLSM zeigte sich der Biofilm des Isolats 2.11 als ein zum Isolat 1.3.7 fast ähnlicher, kompakter Biofilm (siehe Abb. 23 b), der allerdings im Vergleich deutlich größere Zwischenräume und kanalähnliche Strukturen in dem mehrschichtigen Biofilm aufwies (siehe Abb. 23 a). Diese Strukturen waren in der REM ebenfalls zu erkennen (Abb. 26 a,c), ebenso wie extrazelluläre Substanzen an einigen Stellen der Präparate des Stamms 2.11, welche auch in sehr geringer Menge bei der Mutante 2.11.8 zu sehen waren (vgl. Abb. 26 e,f). Diese Beobachtungen ließen den Schluss zu, dass es sich bei diesem Stamm um eine, von den anderen untersuchten Isolaten sich grundlegend unterscheidende Gestalt des Biofilms und damit um einen andersartigen Prozess der Biofilm-Bildung handelte. Diese Schlussfolgerung betraf insbesondere die Entdeckung von extrazellulärem Material, allerdings schien diese Fähigkeit zumindest qualitativ durch die Mutation beim Stamm 2.11.8 nicht beeinflusst worden zu sein. Ferner könnte die insgesamt eher spärliche Beobachtung dieser extrazellulären Strukturen im REM präparationsbedingt gewesen sein (Waschschritte etc.), was nachdrücklich den Nachteil dieser mikroskopischen Methode widerspiegelt. Über die Art der Substanzen (Exopolysaccharide o.ä.) konnte keine Aussage getroffen werden, jedoch ist die Expression von Exopolysacchariden, welche verschiedene neutrale Hexosen enthalten, bei Enterokokken bekannt, z.B. Glukose-Glycerol-Phosphatpolymere (Huebner *et al.*, 1999). Auch ein putatives Polysaccharid-Biosynthese Gencluster (Epa) wurde in *E. faecalis* beschrieben (Xu *et al.*, 1998; siehe auch 1.2.6). Weiterführende Untersuchungen der Biofilm-Ultrastruktur des *E. faecalis* Stamms OG1RF von Erlandsen *et al.* (2004) beschrieben ebenfalls derartige Substanzen. Die Autoren mutmaßten, dass diese Strukturen Exopolysaccharide waren. Mittels diesen schienen sich die Zellen mit dem Substrat zu verankern, außerdem stellten die Autoren eine Abhängigkeit der Biofilm-Bildung von der Art des Substrats fest (siehe auch 1.3.1). In der vorliegenden Arbeit wurden die Biofilme mittels

REM und CLSM durchführungsbedingt auf Glasobjektträgern dargestellt. Interessant wären auch hier experimentell aufwendigere Versuche, die auf die Untersuchung der Biofilmbildungsfähigkeit bzw. die Ultrastruktur der Biofilme der hergestellten *E. faecalis* Mutantenstämme im Vergleich zu ihren Wildtyp-Isolaten auf anderen Substraten abzielen.

In der Analyse der differentiell exprimierten Proteine der Stämme 2.11 und 2.11.8 fielen mehrere starke Banden des Stamms 2.11 nach der Gradienten-Gelelektrophorese auf, die bei der Mutante 2.11.8 nicht oder nur äußerst schwach zu erkennen waren (siehe Abb. 31, Bahn 5 und 6). Die Identifizierung der Proteine ergab in jeweils zwei Banden des Stamms 2.11 die Anwesenheit der Aggregationssubstanz EF0149 sowie des Surface Exclusion Proteins Sea1, weiterhin wurde sicher das Surface Exclusion Protein PrgA der Aggregationssubstanz PrgB identifiziert (siehe Tab. 18). Diese Ergebnisse deuteten auf das Vorkommen der Plasmide pAD1 und pCF10 beim Stamm 2.11 hin. Das Protein EF0149 ist eine putative Aggregationssubstanz, die im Chromosom des Isolats *E. faecalis* V583 in einer Region identifiziert wurde, welche einen integrierten Plasmidrest enthält (Paulsen *et al.*, 2003). Diese putative Aggregationssubstanz zeigt ebenfalls eine starke Homologie zu Asa1 (Burrus *et al.*, 2002). Beim Stamm 2.11.8 konnte diese Aggregationssubstanz hingegen nicht nachgewiesen werden. Überwiegend wurden Proteine des *ebp* Locus, die zum Teil beim Wildtyp 2.11 ebenfalls detektiert wurden, sowie das uncharakterisierte, putative Zellwand-assoziierte Protein EF2505 nachgewiesen.

Insofern schien bei dem Stamm 2.11.8 der Mechanismus der Aggregation durch die Mutation beeinflusst zu sein, die in diesem Fall vermutlich durch eine oder mehrere Aggregationssubstanzen vermittelt wurde. Mittels LC/MS-Analyse wurde die AS EF0149 nachgewiesen, bzgl. der anderen, vermeintlich involvierten Adhäsine (PrgB, Asa1) deren Surface Exclusion Proteine PrgA und Sea1. Somit wurden diese AS unter diesen Kulturbedingungen (nicht induziert) nicht synthetisiert (siehe auch 5.5.1), hingegen schien die AS EF0149 konstitutiv exprimiert zu werden. Dies könnte auch die Ursache des extrem stark klumpenden Phänotyps des Wildtyps 2.11 in TSBG (siehe Abb. 20) gewesen sein. Unklar war in diesem Zusammenhang allerdings die Reaktion der Stämme nach Induzieren mit Pheromonen, da hier die Verklumpungsreaktion zumindest augenscheinlich ausblieb (siehe Tab. 16).

Die Mutante 2.11.8 zeigte im Vergleich zum Wildtypstamm 2.11 außerdem eine stark signifikant erniedrigte Oberflächen-Hydrophobizität (siehe Abb. 29) sowie Anheftung an HeLa-Zellen im Adhärenz-Assay (siehe 4.5.2.7). Diese Resultate wären ein zusätzlicher Hinweis auf den Verlust oder eine herabgesetzte Expression von Aggregationssubstanzen bei der Mutante, da bereits in mehreren Studien die Erhöhung der Adhärenz durch AS bei

E. faecalis an unterschiedliche eukaryotische Zellen gezeigt werden konnte (Kreft *et al.*, 1992; Saringen *et al.*, 2000; Süßmuth *et al.*, 2000; siehe auch 1.2.2).

Die Plasmid-Isolierungen der Stämme ergaben weiterhin, dass im Vergleich zum Wildtyp beim Stamm 2.11.8 keine Plasmide nachweisbar waren (siehe Abb. 30). Insofern konnte ein Verlust eines oder mehrerer Plasmide des Stamms 2.11, die diese Aggregationssubstanzen codieren, vermutet werden. Scheinbar wurde aber auch die chromosomal codierte AS EF0149 davon beeinflusst, da eine Expression bei der Mutante mittels LC/MS-Analyse ebenfalls nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Zugrundeliegende Ursachen können bis hierher nur spekulativ betrachtet werden. Denkbar wäre, dass bei der Mutante a) ein genetisches Element vom Plasmid, ein gesamtes Plasmid oder eine andere mobile Sequenz (Transposon, IS-Element) in den Locus EF0149 oder an eine andere Stelle integriert hatte, die diesen Locus beeinflusst, und damit die Funktion der AS beeinträchtigte, b) der Genlocus EF0149 selbst aus dem Chromosom verloren gegangen war, da er auf einem mobilen genetischen Element codiert war (integrierter Plasmidrest), oder c) diese AS von Genen reguliert wurde, die auf dem / den verloren gegangenen Plasmiden lagen. Damit bietet auch diese hergestellte *E. faecalis* BF-Mutante interessante Ansatzpunkte, deren weiterführende Untersuchung insbesondere die Rolle von Aggregationssubstanzen bei der Biofilm-Bildung spezifizieren könnte (vgl. auch 1.3.4.5).

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine größere Anzahl an *E. faecalis* Isolaten aus Vaginalabstrichen, erstmals insbesondere von Patientinnen, die an Bakterieller Vaginose litten, untersucht und mit 150 *E. faecalis* Stämme aus verschiedenen anderen klinischen Bereichen auf das Vorkommen von Virulenzfaktoren verglichen. Weiterhin wurden Korrelationen bestimmter Faktoren zu der Menge an produziertem Biofilm erstellt, um mögliche Zusammenhänge zum Mechanismus der Biofilm-Bildung zu erfassen.

Mittels statistischer Analysen konnte hinsichtlich der 150 untersuchten *E. faecalis* Isolate nachgewiesen werden, dass keine signifikanten Unterschiede der Inzidenzen von Virulenzfaktoren (*esp*, *asa1*, *gelE*, GelE, *cylA*, β -Hämolyse) zwischen den Stämmen der verschiedenen Herkunftsbereiche bestanden. In Bezug auf das Auftreten von Biofilm-Bildung zeigte sich ein erhöhtes Vorkommen bei Stämmen aus Urin sowie invasiver Herkunft (insgesamt jeweils ca. 70 % mäßige und starke Biofilm-Bildner) im Vergleich zu *E. faecalis* Isolaten aus Wunden oder Faeces (je ca. 40 %). Statistische Auswertungen bzgl. des Zusammenhangs eines oder einer Kombination von Virulenzfaktoren mit der Menge an gebildetem Biofilm wiesen darauf hin, dass Isolate, die das *esp* Gen besaßen, in erhöhtem Maße zur Biofilm-Bildung befähigt waren. Dies zeigte einen gewissen Einfluss des Zellwandproteins auf die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung bei *E. faecalis*. Allerdings wurden stets auch Stämme ausgemacht, die die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung trotz des Fehlens der jeweils untersuchten genetischen Determinante bzw. der Determinanten aufwiesen, so dass auf das Vorhandensein weiterer, unbekannter Einflussfaktoren auf den Mechanismus der Biofilm-Bildung geschlossen werden konnte.

Unter 78 untersuchten *E. faecium* Isolaten aus verschiedenen klinischen Bereichen konnte lediglich ein Stamm (1,3 %) als mäßiger Biofilm-Bildner charakterisiert werden, so dass diese Fähigkeit bei *E. faecium* Stämmen in der hier untersuchten Region unter diesen Bedingungen kaum nachgewiesen werden konnte.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die Untersuchung zum Vorkommen von Virulenzfaktoren und Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* Isolaten aus Vaginalabstrichen. Bzgl. des Auftretens von Virulenzfaktoren und Biofilm-Produktion konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Stämmen assoziiert mit Bakterieller Vaginose und Isolaten einer Vergleichsgruppe festgestellt werden. Allerdings zeigte eine Gegenüberstellung mit den 150 untersuchten *E. faecalis* Stämmen aus anderen klinischen Bereichen, dass die 80 Isolate aus Vaginalabstrichen eine ähnlich hohe Anzahl an Virulenzfaktoren sowie eine mit den Isolaten aus Urin und invasiver Herkunft vergleichbar hohe Fähigkeit zur Biofilm-Bildung aufwiesen (ca. 75 % mäßige und starke Biofilm-Bildner). Dies deutete auf eine Verbreitung der Biofilm-Bildungsfähigkeit bei *E. faecalis* Stämmen der Vaginalflora und somit auf eine große Bedeutung der Eigenschaft für Isolate dieser Herkunft hin. Die statistische Auswertung der

Korrelationen von Virulenzfaktoren mit der Menge an gebildetem Biofilm war vergleichbar zu den Ergebnissen der Analysen bzgl. der 150 *E. faecalis* Isolate aus anderen klinischen Bereichen und untermauerte die Annahme, dass zusätzliche Faktoren zu den hier untersuchten Determinanten bei *E. faecalis* vorhanden sein müssen, die Einfluss auf den Mechanismus der Biofilm-Bildung nehmen.

Deshalb konzentrierte sich ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit auf die Herstellung und Charakterisierung von *E. faecalis* Biofilm-Spontanmutanten, um bisher noch ungeklärte Mechanismen oder neue Faktoren zu erkennen, die Einfluss auf die Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* nehmen. Die Untersuchung einer Mutante (1.10.16) und ihres Wildtypstamms lieferte erstmals einen phänotypischen Nachweis des HMW-Komplexes der drei Bee-Proteine sowie die Beschreibung konservierter Pili-Motive dieser Proteine. Des Weiteren schien die in diesem Cluster ebenfalls codierte Sortase-1 dasjenige Enzym zu sein, das höchstwahrscheinlich die Bindung des Proteins Bee-2 innerhalb dieses HMW-Komplexes katalysiert. Insofern lieferten diese Untersuchungen neue, konkrete Hinweise zur Rolle des *bee* Genclusters bei der Biofilm-Bildung von *E. faecalis*.

Bei einem weiteren Biofilm-Mutantenstamm (1.3.7) konnte aufgrund veränderter Profile in der Proteinexpression vermutet werden, dass der veränderte Biofilm-Phänotyp auf eine beeinflusste Regulation der Expression des Pili-Genclusters *ebp* und/oder von Aggregationssubstanzen zurückzuführen war. Der Mechanismus der Aggregation schien auch bei einer anderen hergestellten Biofilm-Mutante (2.11.8) im Vergleich zu ihrem Wildtypstamm beeinflusst gewesen zu sein, was Hinweise auf die Rolle dieser Adhäsine für die Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* lieferte.

7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit bietet vielfältige interessante Ansatzpunkte zur Bearbeitung verschiedenster Aspekte, die zu weiterführenden Erkenntnissen bzgl. der Biofilm-Bildung und Virulenzeigenschaften bei Enterokokken beitragen könnten.

Das im Rahmen dieser Arbeit zusammengestellte und charakterisierte Kollektiv von insgesamt 230 *E. faecalis* und 78 *E. faecium* Isolaten aus unterschiedlichsten klinischen Bereichen bietet für zukünftige Studien die Möglichkeit, eine große Anzahl von Stämmen auf das Vorkommen und die Verbreitung weiterer Merkmale in Verbindung mit der Virulenz und der Biofilm-Bildung zu überprüfen, um Zusammenhänge zu bestimmten Herkunftsbereichen oder andere Beziehungen zu untersuchen.

Hinsichtlich der 80 untersuchten *E. faecalis* Isolate aus Vaginalabstrichen wäre zum einen der Vergleich des Vorkommens von Virulenzfaktoren und Biofilm-Bildung mit Stämmen interessant, die in einer gesunden Vaginalflora auftreten. Zum anderen könnten Typisierungen dieser *E. faecalis* Stämme sowie von Isolaten anderer Bereiche, insbesondere aus intestinaler Normalflora und Urin (Harnwegsinfektionen), Aufschluss über eventuelle klonale Verwandtschaftsbeziehungen und Herkunft der Stämme der Vaginalflora geben.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit bzgl. der Stämme 1.10 und 1.10.16 wären weitere Untersuchungen zum Mechanismus der Verknüpfung der einzelnen Bee-Proteine untereinander sowie der Verankerung mit der Zellwand interessant. Des Weiteren wären Experimente von Bedeutung, die die Bildung von Pili durch die vom *bee* Locus codierten Proteine eindeutig belegen. Hierzu sollten zunächst Komplementierungsversuche des *srt-1* Gens zur zusätzlichen molekularbiologischen Verifizierung des Defekts der Sortase-1 bei dem Mutantenstamm durchgeführt werden. Weitere Analysen würden den Nachweis der drei Bee-Proteine mittels gegen sie gerichteter Antikörper und die Darstellung markierter Proteine an der Zelloberfläche im Transmissionselektronen-Mikroskop (TEM) erfordern.

Bzgl. der *E. faecalis* Stämme 1.3 und 1.3.7 sowie 2.11 und 2.11.8 könnten weiterführende Untersuchungen zu bestimmten Genen / Genloci sinnvoll sein, zu denen die vorliegende Arbeit Hinweise auf mögliche Mutationsereignisse liefern konnte (quantitative Expressionsanalysen mittels real-time PCR, Konjugationsexperimente etc.). Vielversprechend, jedoch methodisch aufwendig, könnte hinsichtlich aller der in dieser Arbeit hergestellten *E. faecalis* Biofilm-Mutantenstämme die Analyse mittels einer Differential-Display Methode sein (Shepard & Gilmore, 1999; Breton *et al.*, 2007). Diese Anwendung würde die Möglichkeit bieten, durch die vergleichende Analyse von Wildtyp und Mutante Einblicke in die differentielle Genexpression des gesamten Genoms zu bekommen. Hiermit könnten die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Faktoren, regulatorische Pfade und andere molekulare Zusammenhänge bzgl. des Mechanismus der Biofilm-Bildung bei *E. faecalis* erkannt werden.

8 Literaturverzeichnis

- Aarestrup F. M., Butaye P., Witte W.** (2002) Nonhuman reservoirs of enterococci. In: Gilmore M. S., Clewell D. B., Courvalin P., Dunny G. M., Murray B. E., Rice L. B. (Eds.) *The Enterococci – pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press, Washington, DC: 55-100
- Anukam K. C. & Reid G.** (2007) Organisms associated with bacterial vaginosis in Nigerian women as determined by PCR-DGGE and 16S rRNA sequence. *Afr Health Sci* 7: 68-72
- Amsel R., Totten P. A., Spiegel C. A., Chen K. C. S., Eschenbach D. A., Holmes K. K.** (1983) Nonspecific vaginitis: Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 74: 14-22
- Archimbaud C., Shankar N., Forestier C., Baghdayan A., Gilmore M. S., Charbonné F., Joly B.** (2002) *In vitro* adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res Microbiol* 153: 75-80
- Arciola C. R., Baldassarri L., Campoccia D., Creti R., Pirini V., Huebner J., Montanaro L.** (2008) Strong biofilm production, antibiotic multi-resistance and high *gelE* expression in epidemic clones of *Enterococcus faecalis* from orthopaedic implant infections. *Biomaterials* 29: 580-586
- Arthur M., Molinas C., Depardieu F., Courvalin P.** (1993) Characterization of Tn 1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* 175: 117-127
- Baldassarri L., Cecchini R., Bertuccini L., Ammendolia M. G., Iosi F., Arciola C. R., Montanaro L., Di Rosa R., Gherardi G., Dicuonzo G., Orefici G., Creti R.** (2001) *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med Microbiol Immunol* 190: 113-120
- Baldassarri L., Creti R., Montanaro L., Orefici G., Arciola C. R.** (2005a) Pathogenesis of implant infections by enterococci. *Int J Artif Organs* 28: 1101-1109
- Baldassarri L., Bertuccini L., Creti R., Filippini P., Ammendolia M. G., Koch S., Huebner J., Orefici G.** (2005b) Glycosaminoglycans mediate invasion and survival of *Enterococcus faecalis* into macrophages. *J Infect Dis* 191: 1253-1262
- Baldassarri L., Creti R., Recchia S., Pataracchia M., Alfarone G., Orefici G., Campoccia D., Montanaro L., Arciola C. R.** (2006) Virulence factors in enterococcal infections of orthopedic devices. *Int J Artif Org* 29: 402-406
- Barbier N., Saulnier P., Chachaty E., Dumontier S., Andreumont A.** (1996) Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 34: 106-109
- Beloin C. & Ghigo J. M.** (2005) Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends Microbiol* 13: 16-19
- Bonten M. J., Hayden M. K., Nathan C., van Voorhis J., Matushek M., Slaughter S., Rice T., Weinstein R. A.** (1996) Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 348: 1615-1619
- Bonten M. J., Willems R., Weinstein R. A.** (2001) Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *The Lancet Inf Dis* 1: 314-325
- Bourgogne A., Hilsenbeck S. G., Dunny G. M., Murray B. E.** (2006) Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the *Fsr* system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. *J Bacteriol* 188: 2875-2884
- Bourgogne A., Singh K. V., Fox K. A., Pflughoeft K. J., Murray B. E., Garsin D. A.** (2007) EbpR is important for biofilm formation by activating expression of Endocarditis and Biofilm-associated Pilus operon (*ebpABC*) of *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol* 189: 6490-6493
- Bradford M.** (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Bradshaw C. S., Tabrizi S. N., Fairley C. K., Morton A. N., Rudland E., Garland S. M.** (2006) The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. *J Inf Dis* 194: 828-836
- Branda S. S., Vik A., Friedman L., Kolter R.** (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13: 20-26
- Breton Y. L., Muller C., Auffray Y., Rincé A.** (2007) New insights into the *Enterococcus faecalis* CroRS two-component system obtained using a Differential-Display random arbitrarily primed PCR approach. *Appl Environm Microbiol* 73: 3738-3741
- Bruckner R. & Titgemeyer F.** (2002) Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett* 209: 141-148
- Budzik J. M. & Schneewind O.** (2006) Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis. *J Clin Invest* 116: 2582-2584

- Burrus V., Pavlovic G., Decaris B., Guédon G.** (2002) Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* 46: 601-610
- Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C. G.** (2000) Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Reviews* 13: 686-707
- Cheng S., McCleskey F. K., Gress M. J., Petroziello J. M., Lui R., Namdari H., Beninga K., Salmen A., DelVecchio V. G.** (1997) A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 35: 1248-1250
- Cherpes T. L., Hillier S. L., Meyn L. A., Busch J. L., Krohn M. A.** (2008) A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex Transm Dis* 35: 78-83
- Chow J. W., Thal L. A., Perri M. B., Vazquez J. A., Donabedian S. M., Clewell D. B., Zervos M. J.** (1993) Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2474-2477
- Christensen G. D., Simpson W. A., Younger J. J., Baddour L. M., Barrett F. F., Melton D. M., Beachey E. H.** (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22: 996-1006
- Christensen G. D., Baddour L. M., Simpson W. A.** (1987) Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun* 55: 2870-2877
- Clark N. C., Cooksey R. C., Hill B. C., Swenson J. M., Tenover F. C.** (1993) Characterization of glycopeptides-resistance enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2311-2317
- Clewell D. B., An F. Y., White B. A., Gawron-Burke C.** (1985) *Streptococcus faecalis* sex pheromone (cAM373) also produced by *Staphylococcus aureus* and identification of a conjugative transposon (Tn918). *J Bacteriol* 162: 1212-1220
- Clewell D. B. & Dunny G. M.** (2002) Conjugation and genetic exchange in enterococci. In: Gilmore M. S., Clewell D. B., Courvalin P., Dunny G. M., Murray B. E., Rice L. B. (Eds.) *The Enterococci – pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press, Washington, DC: 265-300
- Cobo Molinos A., Abriouel H., Omar N. B., López R. L., Galvez A.** (2008) Detection of *ebp* (endocarditis- and biofilm-associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non-clinical origin. *Int J Food Microbiol* 126: 123-126
- Coburn P. S. & Gilmore M. S.** (2003) The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol* 5: 661-669
- Coburn P. S., Pillar C. M., Jett B. D., Haas W., Gilmore M. S.** (2004) *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin. *Science* 306: 2270-2272
- Coque T. M., Patterson J. E., Steckelberg J. M., Murray B. E.** (1995) Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis* 171: 1223-1229
- Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P.** (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322
- Cox C. R., Coburn P. S., Gilmore M. S.** (2005) Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Curr Protein Pept Sci* 6: 77-84
- Creti R., Imperi M., Bertuccini L., Fabretti F., Orefici G., Di Rosa R., Baldassarri L.** (2004) Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol* 53: 13-20
- Creti R., Koch S., Fabretti F., Baldassarri L., Hübner J.** (2006) Enterococcal colonization of the gastrointestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *BMC Microbiol* 6: 60-68
- Dautle M. P., Wilkinson T. R., Gauderer M. W.** (2003) Isolation and identification of biofilm microorganisms from silicone gastrostomy devices. *J Petiatr Surg* 38: 216-220
- De Backer E., Verhelst R., Verstraelen H., Alqumber M. A., Burton J. P., Tagg J. R., Temmerman M., Vanechoutte M.** (2007) Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus* species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. *BMC Microbiol* 7: 115-128
- Deighton M. A., Capstick J., Domalewski E., van Nguyen T.** (2001) Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Enzymol* 336: 177-195
- De Kwaadsteniet M., Fraser T., Van Reenen C.A., Dicks L. M. T.** (2006) Bacteriocin T8, a novel class IIa sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children with Human Immunodeficiency Virus. *Appl Environ Microbiol* 72: 4761-4766
- Del Papa M. F., Hancock L. E., Thomas V. C., Perego M.** (2007) Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a c-terminal proteolytic cleavage. *J Bacteriol* 189: 8835-8843

- De Vuyst L., Foulquié M. R., Revets H.** (2003) Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int J Food Microbiol* 84: 299-318
- Devillard E., Burton J. P., Reid G.** (2005) Complexity of vaginal microflora as analysed by PCR denaturing gradient gel electrophoresis in a patient with recurrent bacterial vaginosis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 13: 25-31
- Deutsches Institut für Normung e.V., DIN 58940, Teil 3.** Medizinische Mikrobiologie: Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika: Agar-Diffusionstest
- Deutsches Institut für Normung e.V., DIN 58940, Teil 3, Beiblatt 1.** Medizinische Mikrobiologie: Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika: Agar-Diffusionstest – Angaben für die Bewertung der Hemmhofdurchmesser
- Deutsches Institut für Normung e.V., DIN 58940, Teil 4.** Medizinische Mikrobiologie: Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika: Bewertungsstufen für die minimale Hemmkonzentration
- Deutsches Institut für Normung e.V., DIN 58940, Teil 4, Beiblatt 1.** Medizinische Mikrobiologie: Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika: Bewertungsstufen für die minimale Hemmkonzentration – MHK-Grenzwerte von antimikrobiellen Wirkstoffen
- Deutsches Institut für Normung e.V., DIN 58940, Teil 8.** Medizinische Mikrobiologie: Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika: Mikrodilution – Allgemeine methodenspezifische Anforderungen
- Deutsches Institut für Normung e.V., DIN 58940, Teil 81.** Medizinische Mikrobiologie: Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika: Mikrodilution – Spezielle Anforderungen an die Testung von nicht anspruchsvollen Bakterien
- Di Rosa R., Creti R., Venditti M., Damelio R., Arciola C. R., Montanaro L., Baldassarri L.** (2006) Relationship between biofilm formation, the Enterococcal Surface Protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 256: 145-150
- Donlan R. M. & Costerton J. W.** (2002) Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167-193
- Dowidar N., Moesgaard F., Matzen P.** (1991) Clogging and other complications of endoscopic biliary endoprotheses. *Scand J Gastroenterol* 26: 1132-1136
- Dunne W. M. Jr** (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15: 155-166
- Dunny G. M., Brown B. L., Clewell D. B.** (1978) Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 3479-3483
- Dunny G. M., Zimmermann D. L., Tortorello M. L.** (1985) Induction of surface exclusion by *Streptococcus faecalis* sex pheromones: use of monoclonal antibodies to identify an inducible surface antigen involved in the exclusion process. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8582-8586
- Duggan J. M. & Sedgley C. M.** (2007): Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 33 (7): 815-818
- Dupre I., Zanetti S., Schito A. M., Fadda G., Sechi L. A.** (2003) Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol* 52: 491-498
- Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P.** (1995) Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 33: 24-27
- Dworniczek E., Wojcicich L., Sobieszczanska B., Senuik A.** (2005) Virulence of *Enterococcus* isolates collected in Lower Sillesia (Poland). *Scand J Infect Dis* 37: 630-636
- Eaton T. J. & Gasson M. J.** (2002) A variant enterococcal surface protein Esp(fm) in *Enterococcus faecium*: distribution among food, commensal medical and environmental isolates. *FEMS Microbiol Lett* 216: 269-275
- Elsayed S., Hamilton N., Boyd D., Mulvey M.** (2001) Improved primer design for multiplex PCR analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. *J Clin Microbiol* 39: 2367-2368
- Elsner P. & Hartmann A. A.** (1987) *Gardnerella vaginalis* in the male upper genital tract: a possible source of reinfection of the female partner. *Sex Transm Dis* 14: 122-123
- Engelbert M., Mylonakis E., Ausubel F. M., Calderwood S. B., Gilmore M. S.** (2004) Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun* 72: 3628-2633
- Engelke D. R., Krikos A., Bruck M. E., Ginsburg D.** (1990) Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Analytical Biochem* 191: 369-400

- Erlandsen S. L., Kristich C. J., Dunny G. M.** (2004) Ultrastructure of *Enterococcus faecalis* biofilms. *Biofilms* 1: 131-137
- Eschenbach D. A., Hillier S., Crichlow C., Stevens C., DeRouen T., Holmes K. K.** (1988) Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 158: 819-828
- Eschenbach D. A., Davick P. R., Williams B. L., Young-Smith K., Critchlow C. M., Holmes K. K.** (1989) Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 27: 251-256
- Fabretti F., Theilacker C., Baldassarri L., Kaczynski Z., Kropec A., Holst O., Huebner J.** (2006) Alanine esters of Enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 74: 4164-4171
- Facklam R. R., Carvalho M. G. S., Teixeira L. M.** (2002) History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: Gilmore M. S., Clewell D. B., Courvalin P., Dunny G. M., Murray B. E., Rice L. B. (Eds.) *The Enterococci – pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press, Washington, DC: 1-54
- Felten A., Barreau C., Bizet C., Lagrange P. H., Philippon A.** (1999) *Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *J Clin Microbiol* 37: 729-733
- Foley I. & Gilbert P.** (1997) *In vitro* studies of the activity of glycopeptide combinations against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 40: 667-672
- Francia M. V., Haas W., Wirth R., Samberger E., Muscholl-Silberhorn A., Gilmore M. S., Ike Y., Weaver K. E., An F. Y., Clewell D. B.** (2001) Completion of the nucleotide sequence of the *Enterococcus faecalis* conjugative virulence plasmid pAD1 and identification of a second transfer origin. *Plasmid* 46: 117-127
- Franz C. M. A. P., van Belkum M. J., Holzapfel W. H., Abrioul H., Gálvez A.** (2007) Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* 31: 293-310
- Fredricks D. N., Fiedler T. L., Marrazzo J. M.** (2005) Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *New Engl J Med* 353: 1899-1911
- Galli D., Lottspeich F., Wirth R.** (1990) Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol Microbiol* 4: 895-904
- Galli D. & Wirth R.** (1991) Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* sex pheromone plasmids identifies a single homologous DNA region which codes for aggregation substance. *J Bacteriol* 173: 3029-3033
- Galli D., Friesenegger A., Wirth R.** (1992) Transcriptional control of sex-pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis* and sequence analysis of a third structural gene for (pPD1-encoded) aggregation substance. *Mol Microbiol* 6: 1297-1308
- Gardner H. L. & Dukes C. D.** (1955) *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified "nonspecific vaginitis". *Am J Obstet Gynecol* 69: 962-976
- Garsin D. A., Urbach J., Huguet-Tapia J. C., Peters J. E., Ausubel F. M.** (2004) Construction of an *Enterococcus faecalis* Tn917-mediated-gene-disruption library offers insight into Tn917 insertion patterns. *J Bacteriol* 186: 7280-7289
- Gaspar A. H. & Ton-That H.** (2006) Assembly of distinct pilus structures on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol* 188: 1526-1533
- Gesellchen F., Bertinetti O., Herberg F. W.** (2006) Posttranslational modifications in proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764: 1788-1800
- Gilmore M. S., Coburn P. S., Nallapareddy S. R., Murray B. E.** (2002) Enterococcal virulence. In: Gilmore M. S., Clewell D. B., Courvalin P., Dunny G. M., Murray B. E., Rice L. B. (Eds.) *The Enterococci – pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press, Washington, DC: 301-354
- Graves L. M. & Swaminathan B.** (2001) PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulse-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 65: 55-62
- Greenwood J. R. & Pickett M. J.** (1980) Transfer of *Haemophilus vaginalis* (Gardner and Dukes) to Genus *Gardnerella*. *Int J System Bacteriol* 30: 170
- Hancock L. E. & Perego M.** (2004) The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J Bacteriol* 186: 5629-5639
- Harrington S. M., Ross T. L., Gebo K. A., Merz W. G.** (2004) Vancomycin resistance, *esp*, and strain relatedness: a 1-year study of enterococcal bacteremia. *J Clin Microbiol* 42: 5895-5898
- Heikens E., Bonten M. J. M., Willems R. J. L.** (2007) Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol* 189: 8233-8240

- Hirt H., Wirth R., Muscholl A. (1996) Comparative analysis of 18 sex pheromone plasmids from *Enterococcus faecalis*: detection of a new insertion element on pPD1 and implications for the evolution of this plasmid family. *Molec Gen Genet* 252: 640-647
- Huebner J., Wang Y., Krueger W. A., Madoff L. C., Martirosian G., Boisot S., Goldmann D. A., Kaspar D. L., Tzianobos A. O., Pier G. B. (1999) Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Inf Immun* 67: 1213-1219
- Huey B. & Hall J. (1989) Hypervariable DNA Fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *J Bacteriol* 171: 2528-2532
- Hufnagel M., Koch S., Creti R., Baldassarri L., Huebner J. (2004) A putative sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. *J Infect Dis* 189: 420-430
- Huycke M. M., Spiegel C. A., Gilmore M. S. (1991) Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1626-1634
- Huycke M. M., Joyce W., Wack M. F. (1996) Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis* 173: 743-746
- Huycke M. M., Moore D., Joyce W., Wise P., Shepard L., Kotake Y., Gilmore M. S. (2001) Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Mol Microbiol* 42: 729-740
- Hynes W. L. & Walton S. L. (2000) Hyaluronidases of gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Letters* 183: 201-207
- Ike Y., Craig R. A., White B. A., Yagi Y., Clewell D. B. (1983) Modification of *Streptococcus faecalis* sex pheromones after acquisition of plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5369-5373
- Jacob A. E. & Hobbs S. J. (1974) Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J Bacteriol* 117: 360-372
- Jefferson K. K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 236: 163-173
- Jensen L. B., Frimodt-Moller N., Aarestrup F. M. (1999) Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol Letters* 170: 151-158
- Johnson J. L., Phleps C. F., Cummins C. S., London J., Gasser F. (1980) Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *Int J Syst Bacteriol* 30: 53-68
- Jones M. E., Draghi D. C., Thornsberry C., Karlowsky J. A., Sahn D. F., Wenzel R. P. (2004) Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit – a European and North American Surveillance study (2000-2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 3: 14
- Joyanes P., Pascual A., Martinez-Martinez L., Hevia A., Perea E. J. (1999) *In vitro* adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to plastic biomaterials. *Clin Microbiol Infect* 5: 382-386
- Joyanes P., Pascual A., Martinez-Martinez L., Hevia A., Perea E. J. (2000) *In vitro* adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to urinary catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 124-127
- Kao S.-M., Olmsted S. B., Viksnins A. S., Gallo J. C., Dunny G. M. (1991) Molecular and genetic analysis of a region of plasmid pCF10 containing positive control genes and structural genes encoding surface proteins involved in pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 173: 7650-7664
- Kariyama R., Mitsuhata R., Chow J. W., Clewell D. B., Kumon H. (2000) Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 38: 3092-3095
- Keane P. F., Bonner M. C., Johnston S. R., Zafar A., Gorman S. P. (1994) Characterization of biofilm and encrustation on ureteric stents *in vivo*. *Br J Urol* 73: 687-691
- Kelly M. C., Mequio M. J., Pybus V. (2003) Inhibition of vaginal lactobacilli by a bacteriocin-like inhibitor produced by *Enterococcus faecium* 62-6: potential significance for Bacterial Vaginosis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 11: 147-156
- Kemp K. D., Singh K. V., Nallapareddy S. R., Murray B. E. (2007) Relative contributions of *Enterococcus faecalis* OG1RF sortase-encoding genes, *srtA* and *bps* (*srtC*), to biofilm formation and a murine model of urinary tract infection. *Infect Immun* 75: 5399-5404
- Kjelleberg S., Molin S. (2002) Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr Opin Microbiol* 5: 254-258
- Klare I., Konstabel C., Badstübner D., Werner G., Witte W. (2003) Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol* 88: 269-290

- Klare I., Konstabel C., Mueller-Bertling S., Werner G., Kettlitz C., Borgmann S., Schulte B., Jonas D., Serr A., Fahr A. M., Eigner U., Witte W.** (2005) Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24: 815-825
- Klebanoff M. A., Schwebke J. R., Zhang J., Nansel T. R., Yu K.-F., Andrews W. W.** (2004) Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 104: 267-272
- Knoblauch J. K. M., Horstkotte M. A., Rohde H., Mack D.** (2002) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 191: 101-106
- Kobayakawa S., Jett B. D., Gilmore M. S.** (2005) Biofilm formation by *Enterococcus faecalis* on intraocular lens material. *Curr Eye Res* 30: 741-745
- Koch S., Hufnagel M., Theilacker C., Huebner J.** (2004) Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22: 822-830
- Koeuth T., Versalovic J., Lupski J. R.** (1993) Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res* 5: 408-418
- Köhler W., Schachtel G., Voleske P.** (2002) *Biostatistik*. 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Kolenbrander P. E.** (2000) Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 54: 413-437
- Kowalski W. J., Kasper E. L., Hatton J. F., Murray B. E., Nallapareddy S. R., Gillespie M. J.** (2006) *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. *J Endod* 32: 634-637
- Kreft B., Marre R., Schramm U., Wirth R.** (1992) Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun* 60: 25-30
- Kristich C. J., Li Y., Cvitkovitch D. G., Dunny G. M.** (2004): Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 186: 154-163
- Larsson P.-G., Bergström M., Forsum U., Jacobsson B., Strand A., Wölner-Hanssen P.** (2005) Bacterial Vaginosis. Transmission, role in genital infection and pregnancy outcome: an enigma. *APMIS* 113: 233-245
- Larsson P.-G., Stray-Pedersen B., Rytting K. R., Larsen S.** (2008) Human lactobacilli as supplementation of clindamycin to patients with bacterial vaginosis reduce the recurrence rate; a 6-month, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *BMC Women's Health* 8: 3-10
- Lauer P., Rinaudo C. D., Soriani M., Margarit I., Rosini R., Taddei A. R., Mora M., Rappuoli R., Grandi G., Telford J. L.** (2005) Genome analysis reveals pili in Group B *Streptococcus*. *Science* 309: 105
- Lawrence J. R., Korber D. R., Hoyle B. D., Costerton J. W.** (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 173: 6558-6567
- Leavis H., Top J., Shankar N., Borgen K., Bonten M., van Embden J., Willems R. J. L.** (2004) A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol* 186: 672-682
- LeMieux J., Hava D. L., Basset A., Camilli A.** (2006) RrgA and RrgB are components of a multisubunit pilus encoded by the *Streptococcus pneumoniae* *rlrA* pathogenicity islet. *Infect Immun* 74: 2453-2456
- Lewis K.** (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 999-1007
- Liu P. Y.-F. & Wu W.-L.** (1997) Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaetics-Acinetobacter baumannii* complex. *Diagn Microbiol Infect* 28: 19-28
- Lleo M., Bonato B., Tafi M. C., Caburlotto G., Benedetti D., Canepari P.** (2007) Adhesion to medical device materials and biofilm formation capability of some species of enterococci in different physiological states. *FEMS Microbiol Lett* 274: 232-237
- Losikoff P., Fichorova R., Snyder B., Rodriguez I., Cu-Uvin S., Harwell J., Mayer K. H.** (2007) Genital tract Interleukin-8 but not Interleukin-1 β or Interleukin-6 concentration is associated with bacterial vaginosis and its clearance in HIV-infected and HIV-uninfected women. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2007: 92307
- Lottspeich F. & Engels J. W.** (2006) *Bioanalytik*. 2. Auflage, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München; Kapitel 15
- Lowe A. M., Lambert P. A., Smith A. W.** (1995) Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun* 63: 703-706
- Mack D., Fischer W., Krokotsch A., Leopold K., Hartmann R., Egge H., Laufs R.** (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 178: 175-183

- Macones G. A., Parry S., Elkousy M., Clothier B., Ural S. H., Strauss J. F.** (2004) A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 190: 1504-1508
- Maekawa S., Yoshioka M., Kumamoto Y.** (1992) Proposal of a new scheme for serological typing of *Enterococcus faecalis*. *Microbiol Immunol* 36: 671-681
- Magi G., Capretti R., Paoletti C., Pietrella M., Ferrante L., Biavasco F., Varaldo P. E., Facinelli B.** (2003) Presence of a vanA-carrying pheromone response plasmid (pBRG1) in a clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1571-1576
- Malami P. N., Kauffman C. A., Zervos M. J.** (2002) Enterococcal disease, epidemiology, and treatment. In: Gilmore M. S., Clewell D. B., Courvalin P., Dunny G. M., Murray B. E., Rice L. B. (Eds.) *The Enterococci – pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press, Washington, DC: 385-408
- Malathum K., Singh K. V., Weinstock G. M., Murray B. E.** (1998) Repetitive sequence-based PCR versus pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level. *J Clin Microbiol* 36: 211-215
- Mandlik A., Swierczynski A., Das A., Ton-That H.** (2008) Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *TRENDS Microbiol* 16: 33-40
- Manero A. & Blanch A. R.** (1999) Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol* 65: 4425-4430
- Manetti A. G., Zingaretti C., Falugi F.** (2007) *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol Microbiol* 64: 968-983
- Marín M. L., Benito Y., Oin C., Fernández M. F., García M. L., Selgas M. D., Casas C.** (1997) Lactic acid bacteria: hydrophobicity and strength of attachment to meat surfaces. *Lett Appl Microbiol* 24: 14-18
- Marraffini L. A., DeDent A. C., Schneewind O.** (2006) Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 192-221
- Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T., Andrew P., Prudhomme M., Alloing G., Hakenbeck R., Morrison D. A., Boulnois J. G., Claverys J. P.** (1992) A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 20: 3479-3483
- Martius J. & Hoyme U. B.** (2006) Bakterielle Vaginose in Gynäkologie und Geburtshilfe. Arbeitsgemeinschaft Infektiologie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (DGGG) - Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen. AWMF 015/028
- Mascini E. M. & Bonten M. J.** (2005) Vancomycin-resistant enterococci: consequences for therapy and infection control. *Clin Microbiol Infect* 11: 43-56
- Mayr-Harting A., Hedges A. J., Berkeley R. C. W.** (1972) Methods for studying bacteriocins. In: Bergen T. & Norris J. R. (Eds.) *Methods in Microbiology*. Academic Press, London: 315-422
- Mending W., Swidsinski A., Swidsinski S.** (2006) Adhärenter Biofilm bei Bakterieller Vaginose: Hatte Gardner doch Recht? *Frauenarzt* 47:308-313
- Mohamed J. A., Huang W., Nallapareddy S. R., Teng F., Murray B. E.** (2004) Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 72: 3658-3663
- Mohamed J. A. & Murray B. E.** (2005) Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol* 43: 5405-5407
- Mohamed J. A., Teng F., Nallapareddy S. R., Murray B. E.** (2006) Pleiotrophic effects of 2 *Enterococcus faecalis* *sagA*-like genes, *salA* and *salB*, which encode proteins that are antigenic during human infection, on biofilm formation and binding to collagen type I and fibronectin. *J Infect Dis* 193: 231-240
- Mohamed J. A. & Murray B. E.** (2006) Influence of the *fsr* locus on biofilm formation by *Enterococcus faecalis* lacking *gelE*. *J Med Microbiol* 55: 1747-1750
- Mohamed J. A. & Huang D. B.** (2007) Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol* 56: 1581-1588
- Mülhardt C.** (2003) *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin
- Mylonakis E., Engelbert M., Qin X., Sifri C. D., Murray B. E., Ausubel F. M., Gilmore M. S., Calderwood S. B.** (2002) The *Enterococcus faecalis* *fsrB* gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model. *Infect Immun* 70: 4678-4681
- Nakayama J. Y., Cao Y., Horii T., Sakuda S., Akkermans D., de Vos W. M., Nagasawa H.** (2001) Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum-sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* 41: 145-154

- Nakayama J., Kariyama R., Kumon H.** (2002) Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Appl Environ Microbiol* 68: 3152-3155
- Nakayama J., Chen S., Oyama N., Nishiguchi K., Azab E. A., Tanaka E., Kariyama R., Sonomoto K.** (2006) Revised model for *Enterococcus faecalis* *fsr* quorum-sensing system: the small open reading frame *fsrD* encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal AgrD. *J Bacteriol* 188: 8321-8326
- Nallapareddy S. R., Singh K. V., Duh R.-W., Weinstock G. M., Murray B. E.** (2000a) Diversity of *ace*, a gene encoding a Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of Ace during human infections. *Infect Immun* 68: 5210-5217
- Nallapareddy S. R., Qin X., Weinstock G. M., Hook M., Murray B. E.** (2000b) *Enterococcus faecalis* adhesin, *ace*, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun* 68: 5218-5224
- Nallapareddy S. R., Weinstock G. M., Murray B. E.** (2003) Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol* 47: 1733-1747
- Nallapareddy S. R., Wenxiang H., Weinstock G. M., Murray B. E.** (2005) Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. *J Bacteriol* 187: 5709-5718
- Nallapareddy S. R., Singh K. V., Sillanpää J., Garsin D. A., Höök M., Erlandsen S. L., Murray B. E.** (2006): Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest* 116: 2799-2807
- Nallapareddy S. R. & Murray B. E.** (2006) Ligand-signaled upregulation of *Enterococcus faecalis* *ace* transcription, a mechanism for modulaton of host-*E. faecalis* interaction. *Infect Immun* 74: 4982-4989
- Nallapareddy S. R., Singh K. V., Okhuysen P. C., Murray B. E.** (2008a) A functional collagen adhesin gene, *acm*, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infect Immun*
- Nallapareddy S. R., Singh K. V., Murray B. E.** (2008b) Contribution of the collagen adhesin, Acm, to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. *Infect Immun*
- Neuhaus F. C. & Baddiley J.** (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichonic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 686-723
- Nugent R. P., Krohn M. A., Hillier S. L.** (1991) Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 29: 297-301
- Oancea C., Klare I., Witte W., Werner G.** (2004) Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother* 54: 232-235
- Okamoto T., Akaike T., Suga M., Tanase S., Horie H., Miyajima S., Ando M., Maeda H.** (1997) Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. *J Biol Chem* 272: 6059-6066
- Olive D. M. & Bean P.** (1999) Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37: 1661-1669
- Olmsted S. B., Dunny G. M., Erlandsen S. L., Wells C. L.** (1994) A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *J Infect Dis* 170: 1549-1556
- O'Toole G. A. & Kolter R.** (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28: 449-461
- Otto M.** (2004) Quorum-sensing control in Staphylococci – a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiol Lett* 241: 135-141
- Pairan A.** (2001) Charakterisierung eines Enterokokken-Kollektivs auf ausgewählte Antibiotika-Resistenzen. Diplomarbeit am Fachbereich 19 – Biologie/Chemie der Universität Gesamthochschule Kassel.
- Patterson J. L., Girerd P. H., Karjane N. W., Jefferson K. K.** (2007) Effect of biofilm phenotype on resistance of *Gardnerella vaginalis* to hydrogen peroxide and lactic acid. *Am J Obstet Gynecol* 197: 170.e1-170.e7
- Paulsen I. T., Banerjee L., Myers G. S. A., Nelson K. E., Seshadri R., Read T. D., Eisen J. A., Gill S. R., Heidelberg J. F., Tettelin H., Umayan L., Brinkac L., Beanan M., Daugherty S., DeBoy R. T., Durkin S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., Tran B., Upton J., Hansen T., Shetty J., Khouri H., Utterback T., Radune D., Ketchum K. A., Dougherty B. A., Fraser C. M.** (2003) Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299: 2071-2074
- Peciuliene S. K., Balcuniene I., Eriksen H. M., Haapasalo M.** (2000) Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 26: 593-595

- Pillai S. K., Sakoulas G., Eliopoulos G. M., Moellering R. C., Murray B. E., Inouye R. T.** (2004) Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis* 190: 967-970
- Pluthero F. G.** (1993) Rapid purification of high-activity *Taq* DNA polymerase. *Nucleic Acids Research* 21: 4850-4851
- Prakash V. P.** (2005) Clinical prevalence, identification and molecular characterization of enterococci. Doktorarbeit Pondicherry Universität, Indien
- Prokesova L., Potuznikova B., Potempa J., Zikan J., Radl J., Hachova L., Baran K., Porwit-Bohr Z., John C.** (1992) Cleavage of human immunoglobulins by serine proteinase from *Staphylococcus aureus*. *Immunol Lett* 31: 259-265
- Pultz N. J., Shankar N., Baghdayan A. S., Donskey C. J.** (2005) Enterococcal surface protein Esp does not facilitate intestinal colonization or translocation of *Enterococcus faecalis* in clindamycin-treated mice. *FEMS Microbiol Lett* 242: 217-219
- Qin X., Singh K. V., Weinstock G. M., Murray B. E.** (2000) Effects of *Enterococcus faecalis fsr* on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun* 68: 2579-2586
- Qin X., Singh K. V., Weinstock G. M., Murray B. E.** (2001) Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis*. *J bacteriol* 183: 3372-3382
- Raad I. I., Hanna H. A., Boktour M., Chaiban G., Hachem R. Y., Dvorak T., Lewis R., Murray B. E.** (2005) Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: catheter colonization, *esp* gene, and decreased susceptibility to antibiotics in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 5046-5050
- Rakita R. M., Vanek N. N., Jacques-Palaz K., Mee M., Mariscalco M. M., Dunny G. M., Snuggs M., Van Winkle W. B., Simon S. I.** (1999) *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect Immun* 67: 6067-6075
- Ramadhan A. A. & Hegedus E.** (2005) Biofilm formation and *esp* gene carriage in enterococci. *J Clin Pathol* 58: 685-686
- Rehm H.** (2002) *Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics*. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin
- Reimer L.** (1998) *Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis*. Springer-Verlag Berlin, 2nd completely reviewed and updated edition
- Rice L. B., Carias L., Rudin S., Vael C., Goosens H., Konstabel C., Klare I., Nallapareddy S. R., Huang W., Murray B. E.** (2003) A potential virulence gene, *hyl_{Em}*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Inf Dis* 187: 508-512
- Robert Koch Institut** (2005) Zum Auftreten und zur Verbreitung glycopeptidresistenter Enterokokken. *Epidemiologisches Bulletin* 17/2005: 149-155
- Roberts J. C., Singh K. V., Okhuysen P. C., Murray B. E.** (2004) Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol* 42: 2317-2320
- Rodriguez-Jovita M., Collins M. D., Sjöden B., Falsen E.** (1999) Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: Description of *Atopobium vaginae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49: 1573-1576
- Rosenfeld J., Capdevielle J., Guillemot J. C., Ferrara P.** (1992) In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* 203: 173-179
- Rosenstrauss M., Wang Z., Chang S.-Y., DeBonville D., Spadaro J. P.** (1998) An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. *J Clin Microbiol* 36: 191-197
- Rozdzinski E., Marre R., Susa M., Wirth R., Muscholl-Silberhorn A.** (2001) Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extra-cellular matrix proteins. *Microb Pathog* 30: 211-220
- Sahm D. F., Kissinger J., Gilmore M. S., Murray P. R., Mulder R., Solliday J., Clarke B.** (1989) *In vitro* susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1588-1591
- Sandoe J. A., Witherden I. R., Cove J. H., Heritage J., Wilcox M. H.** (2003) Correlation between enterococcal biofilm formation *in vitro* and medical-device-related infection potential *in vivo*. *J Med Microbiol* 52: 547-550
- Sartingen S., Rozdzinski E., Muscholl-Silberhorn A., Marre R.** (2000) Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells *in vitro*. *Infect Immun* 68: 6044-6047
- Satake S., Clark N., Rimland D., Nolte F. S., Tenover F. C.** (1997) Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol* 35: 2325-2330

- Scherer W. F., Syverton J. T., Gey G. O.** (1953) Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97: 695-710
- Schembri M. A., Christiansen G., Klemm P.** (2001) FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 41: 1419-1430
- Scott J. R., Bringel F., Marra D., Van Alstine G., Rudy C. K.** (1994) Conjugative transposition of Tn917: preferred targets and evidence for conjugative transfer of a single strand and for a double-stranded circular intermediate. *Mol Microbiol* 11: 1099-1108
- Seno Y., Kariyama R., Mitsuhashi R., Monden K., Kumon H** (2005) Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama* 59: 79-87
- Shankar V., Baghdayan A. S., Huycke M. M., Lindahl G., Gilmore M. S.** (1999) Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 67: 193-200
- Shankar N., Lockett C. V., Baghdayan A. S., Drachenberg C., Gilmore M. S., Johnson D. E.** (2001) Role of *Enterococcus faecalis* Surface Protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 69: 4366-4372
- Shankar N., Baghdayan A. S., Gilmore M. S.** (2002) Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 417: 746-750
- Shepard B. D. & Gilmore M. S.** (1999) Identification of aerobically and anaerobically induced genes in *Enterococcus faecalis* by random arbitrarily primed PCR. *Appl Environ Microbiol* 65: 1470-1476
- Sifri C. D., Mylonakis E., Singh K. V., Qin X., Garsin D. A., Murray B. E., Ausubel F. M., Calderwood S. B.** (2002) Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infect Immun* 70: 5647-5650
- Sillanpää J., Xu Y., Nallapareddy S. R., Murray B. E., Höök M.** (2004) A family of putative MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology* 150: 2069-2078
- Singh K. V., Coque T. M., Weinstock G. M., Murray B. E.** (1998) Generation and testing of mutants of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunol Med Microbiol* 21: 323-331
- Singh K. V., Nallapareddy S. R., Murray B. E.** (2007) Importance of the *ebp* (Endocarditis- and Biofilm-associated Pilus) locus in the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* ascending urinary tract infection. *J Infect Dis* 195: 1671-1677
- Strommenger B., Kettlitz C., Werner G., Witte W.** (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 41: 4089-4094
- Styriak I., Laukova A., Fallgren C., Wadstrom T.** (1999) Binding of selected extracellular matrix proteins to enterococci and *Streptococcus bovis* of animal origin. *Curr Microbiol* 39: 327-335
- Süßmuth S. D., Muscholl-Silberhorn A., Wirth R., Susa M., Marre R., Rozdzinski E.** (2000) Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect Immun* 68: 4900-4906
- Swenson J. M., Clark N. C., Sahm D. F., Ferraro M. J., Doern G., Hindler J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Reller L. B., Weinstein M. P., Zabransky R. J., Tenover F. C.** (1995) Molecular characterization and multilaboratory evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for quality control of screening tests for vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 33: 3019-3021
- Swidsinski A., Mendling W., Loening-Baucke V., Ladhoff A., Swidsinski S., Hale L. P., Lochs H.** (2005) Adherent biofilms in Bacterial Vaginosis. *Obstet Gynecol* 106: 1013-1023
- Swidsinski A., Mendling W., Loening-Baucke V., Swidsinski S., Dörffel Y., Scholze J., Lochs H., Verstraelen H.** (2008) An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. *Am J Obstet Gynecol* 198: 97.e1-6
- Swierczynski A. & Ton-That H.** (2006) Type III pilus of Corynebacteria: pilus length is determined by the level of its major pilin subunit. *J Bacteriol* 188: 6318-6325
- Tamrakar R., Yamada T., Furuta I., Cho K., Morikawa M., Yamada H., Sakuragi N., Minakami H.** (2007) Association between *Lactobacillus* species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. *BMC Infect Dis* 7: 128-135
- Tendolkar P. M., Baghdayan A. S., Shankar N.** (2003) Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci* 60: 2622-2636
- Tendolkar P. M., Baghdayan A. S., Shankar N.** (2004) Enterococcal Surface Protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 72: 6032-6039

- Tendolkar P. M., Baghdayan A. S., Shankar N.** (2005) The N-terminal domain of Enterococcal Surface Protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 187: 6213-6222
- Tendolkar P. M., Baghdayan A. S., Shankar N.** (2006) Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 188: 2063-2072
- Teng F., Jacques-Palaz K. D., Weinstock G. M., Murray B. E.** (2002) Involvement of PhoP-PhoS homologs in *Enterococcus faecalis* virulence. *Infect Immun* 70: 2010-2015
- Teng F., Kawalec M., Weinstock G. M., Murray B. E.** (2003) An *Enterococcus faecium* secreted antigen, SagA, exhibits broad-spectrum binding to extracellular matrix proteins and appears essential for *E. faecium* growth. *Infect Immun* 71: 5033-5041
- Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H., Swaminathan B.** (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239
- Titze-de-Almeida R., Willems R. J. L., Top J., Rodrigues I. P., Boelens H., Brandileone M. C. C., Zanella R. C., Felipe M. S. S., Van Belkum A.** (2004) Multilocus variable-number tandem-repeat polymorphism among Brazilian *Enterococcus faecalis* strains. *J Clin Microbiol* 42: 4879-4881
- Toledo-Arana A., Valle J., Solano C., Arrizubieta M. J., Cucarella C., Lamata M., Amorena B., Leiva J., Penades J. R., Lasa I.** (2001) The Enterococcal Surface Protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 67: 4538-4545
- Tomich P. K., An F. Y., Damle S. P., Clewell D. B.** (1979) Plasmid related transmissibility and multiple drug resistance in *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* strain DS16. *Antimicrob Agents Chemother* 15: 828-830
- Tomich M. & Mohr C. D.** (2003) Adherence and autoaggregation phenotypes of a *Burkholderia cenocepacia* cable pilus mutant. *FEMS Microbiol Lett* 21: 287-297
- Ton-That H., Schneewind O.** (2003) Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol* 50: 1429-1438
- Ton-That H., Marraffini L. A., Schneewind O.** (2004) Sortases and pilin elements involved in pilus assembly of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol* 53: 251-261
- Top J., Schouls L. M., Bonten M. J. M., Willems R. L. J.** (2004) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol* 42: 4503-4511
- Treitman A. N., Yarnold P. R., Warren J., Noskin G. A.** (2005) Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993-2002). *J Clin Microbiol* 43: 462-463
- Tsigrelis C., Singh K. V., Coutinho T. D., Murray B. E., Baddour L. M.** (2007) Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* endocarditis: linezolid failure and strain characterization of virulence factors. *J Clin Microbiol* 45: 631-635
- Tyler K. D., Wang G., Tyler S. D., Johnson W. M.** (1997) Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* 35: 339-346
- Vanek N. N., Simon S. I., Jacques-Palaz K., Mariscalco M. M., Dunny G. M., Rakita R. M.** (1999) *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. *FEMS Immunol Med Microbiol* 26: 49-60
- Van der Mei H. C., Cox S. D., Geertsema-Doornbusch G. I., Doyle R. J., Busscher H. J.** (1993) A critical appraisal of positive cooperativity in oral streptococci adhesion: scatchard analyses of adhesion data versus analyses of spatial arrangement of adhering bacteria. *J Gen Microbiol* 139: 937-948
- Vankerckhoven V., Van Autgaerden T., Vael C., Lammens C., Chapelle S., Rossi R., Jabes D., Goossens H.** (2004) Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 42: 4473-4479
- Van Loosdrecht M. C. M., Lyklema J., Norde W., Schraa G., Zehnder A. J. B.** (1987) Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl Environ Microbiol* 53: 1898-1901
- van Merode A. E. J., Van der Mei H. C., Busscher H. J., Krom B. P.** (2006a) Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 188: 2421-2426
- van Merode A. E. J., Van der Mei H. C., Busscher H. J., Waar K., Krom B. P.** (2006b) *Enterococcus faecalis* strains show culture heterogeneity in cell surface charge. *Microbiology* 152: 807-814

- Van Wamel W. J. B., Hendickx A. P. A., Bonten M. J. M., Top J., Posthuma G., Willems R. J. L.** (2007) Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect Immun* 75: 924-931
- Vergis E. N., Shankar N., Chow J. W., Hayden M. K., Snyderman D. R., Zervos M. J., Wagener M. M., Muder R. R.** (2002) Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and Enterococcal Surface Protein and the mortality among patients with Bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis* 35: 570-575
- Waar K., Muscholl-Silberhorn A. B., Willems R. J. L., Slooff M., Harmsen H. J. M., Degener J. E.** (2002a) Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates. *J Infect Dis* 185: 1121-1127
- Waar K., Van der Mei H. C., Harmsen H. J. M., Degener J. E., Busscher H. J.** (2002b) *Enterococcus faecalis* surface proteins determine its adherence mechanism to bile drain materials. *Microbiology* 148: 1863-1870
- Waar K., Van der Mei H. C., Harmsen H. J. M., Degener J. E., Busscher H. J.** (2002c) Adhesion to bile drain materials and physicochemical surface properties of *Enterococcus faecalis* strains grown in the presence of ox bile. *Appl Environ Microbiol* 68: 3855-3858
- Waters C. M., Antiporta M. H., Murray B. E., Dunny G. M.** (2003) Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol* 185: 3613-3623
- Werner G., Klare I., Strommenger B., Witte W.** (2007) Vancomycin-resistente Enterokokken – Epidemiologie, Diagnostik, Typisierung, Trends. *Mikrobiologie* 17: 57-73
- Werner G., Klare I., Fleige C., Witte W.** (2008) Increasing rates of vancomycin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from German hospitals between 2004 and 2006 are due to wide clonal dissemination of vancomycin-resistant enterococci and horizontal spread of *vanA* clusters. *Int J Med Microbiol* 298: 515-527
- Willems R. J. L., Top J., van Santen-Verheuevel M., Tribe D., Manziros X., Gaillard C., Vandembroucke-Grauls C. M. J. E., Mascini E. M., van Kregten E., van Embden J. D. A., Bonten M. J. M.** (2001) Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet* 357: 853-855
- Wirth R.** (1994) The sex pheromone system of *Enterococcus faecalis*: More than just a plasmid-collection mechanism? *Eur J Biochem* 222: 235-246
- Woodford N., Soltani M., Hardy K. J.** (2001) Frequency of *esp* in *Enterococcus faecium* isolates. *Lancet* 358: 584
- Xiao J., Hook M., Weinstock G. M., Murray B. E.** (1998) Conditional adherence of *Enterococcus faecalis* to extracellular matrix proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 21: 287-295
- Xu Y., Murray B. E., Weinstock G. M.** (1998) A cluster of genes involved in polysaccharide biosynthesis from *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Infect Immun* 66: 4313-4323
- Xu Y., Singh K. V., Qin X., Murray B. E., Weinstock G. M.** (2000) Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis. *Infect Immun* 68: 815-823
- Zareba T. W., Pascu C., Hryniewicz W., Wadstrom T.** (1997) Binding of extracellular matrix proteins by enterococci. *Curr Microbiol* 34: 6-11
- Zeng J., Teng F., Murray B. E.** (2005) Gelatinase is important for translocation of *Enterococcus faecalis* across polarized enterocyte-like T84 cells. *Infect Immun* 73: 1606-1612

9 Anhang

Tab. 20 Daten *E. faecalis* Isolate aus verschiedenem klinischen Material – Virulenzfaktoren

Bei allen Isolaten kein Nachweis von *asa373*, außer 1.8 (*asa373*⁺); alle Isolate Lipase-negativ; alle Isolate DNase-negativ, außer 6.39, 6.41, 6.42.

+, positiver Nachweis des Gens bzw. der phänotypischen Eigenschaft; -, kein Nachweis des Gens bzw. des Phänotyps; *cyIA*, *esp*, *asa1*, *gelE*, *ef0591*, *bee*, Nachweis der Gene bzw. des *bee* Locus (*bee1-3*); *espA*, *espC*, *aceB*, Anzahl der Repeats des *esp* bzw. *ace* Gens; GelE, Gelatinase-Produktion; β -Häm, β -Hämolyse-Nachweis; *E.fm* 64/3, *E.fc* JH2-2, Bacteriocin-Produktion gegenüber des Indikatorstamms *E. faecium* 64/3 bzw. *E. faecalis* JH2-2, + (≤ 1 mm), ++ (2-4 mm), +++ (> 4 mm); BF, Biofilm-Bildung, angegeben als OD₅₉₅-Mittelwerte aus mindestens drei Messungen mit jeweils vier Replikaten; K, Herkunft Krankenhaus; A, Herkunft niedergelassener Arzt; Umw, Herkunft Umwelt; S, Stuhl; U, Urin; Abz, Abszess; W, Wunde; Pan, Pankreas; V, Vagina; P, Penis-Abstrich; Vul, Vulva-Abstrich; Cer, Cervix; Dia, Dialysewasser; VKat, Venenkatheter; PEG, Perikutane endoskopische Gastrostomie; Rach, Rachenabstrich; H op, Hüftgewebe operativ; AbzZ, Zahnabszess; TEP, Totalendoprothese; Asc, Aszites; B op, Bauchhöhlenabstrich operativ; G, Geflügelkot; Ra, Rattenkot; Gew, Gewässer

Isolat	K/A/ Umw	Ma- terial	<i>cyIA</i>	<i>esp</i>	<i>asa1</i>	<i>gelE</i>	<i>ef0591</i>	<i>bee</i>	<i>espA</i>	<i>espC</i>	<i>aceB</i>	GelE	β - Häm	<i>E.fc</i> JH2-2	<i>E.fm</i> 64/3	BF
8	K	S	-	-	+	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	0,046
30	K	S	-	+	+	+	-	-	2	4	3,5	-	-	+	-	0,231
47	A	S	-	+	-	+	-	-	2	6	2,5	-	-	-	-	0,059
63	K	S	+	+	+	-	+	-	3	7	3,5	-	+	+	++	0,439
73	A	S	-	-	-	+	-	-	-	-	5,5	+	-	-	++	0,071
77	A	S	+	-	-	+	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	0,338
79	A	S	-	+	-	+	-	-	2	6	2,5	-	-	-	-	0,104
82	A	S	-	-	-	+	-	-	-	-	3,5	+	-	-	++	0,028
84	A	S	-	-	+	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	0,066
*2	K	S	-	-	+	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	0,081
*4	K	S	-	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	-	-	++	0,057
*5	K	S	-	+	+	+	-	-	1	5	2,5	-	-	++	-	0,440
*6	K	S	+	+	+	+	-	-	2	5	4,5	+	-	+	+	0,199
*7	K	S	+	+	+	-	+	-	3	11	3,5	-	+	++	++	0,080
*8	K	U	+	+	+	+	-	-	2	8	4,5	+	-	+	+	0,136
*9	K	U	-	+	+	+	+	-	1	7	4,5	-	-	-	-	0,253
*10	K	U	-	-	-	+	-	-	-	-	3,5	+	-	-	-	0,038
1.1	A	V	+	-	+	+	-	-	-	-	3,5	+	+	+	+	0,086
1.2	A	W	-	-	-	+	-	-	-	-	3,5	+	-	-	++	0,063
1.3	A	V	+	-	+	-	+	-	-	-	3,5	-	+	++	++	0,023
1.4	A	P	+	+	+	+	-	-	2	8	4,5	+	+	+	+	3,467
1.6	K	W	-	+	-	+	-	-	2	8	3,5	-	-	+	-	0,058
1.7	A	Vul	-	+	-	+	-	-	1	7	2,5	-	-	+	-	0,189
1.8	A	V	-	-	-	+	-	-	-	-	4,5	+	-	-	++	0,103
1.9	A	V	-	+	+	+	-	-	2	6	4,5	+	-	-	++	0,103
1.10	A	V	-	+	+	+	-	+	1	4	2,5	+	-	-	-	0,966
2.2	K	W	+	+	+	+	+	-	3	7	5,5	-	+	-	-	0,057
2.3	A	Dia	-	-	+	+	-	-	-	-	2,5	+	-	-	-	0,062
2.4	A	W	+	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	+	+	++	0,323
2.6	A	U	-	+	-	+	-	-	2	8	4,5	+	-	-	++	0,102
2.7	K	U	+	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	+	+	+	1,375
2.8	A	U	-	-	-	+	-	+	-	-	2,5	+	-	-	-	0,405
2.9	A	U	-	-	+	+	-	-	-	-	2,5	+	-	-	-	0,179
2.10	A	U	+	+	+	+	-	-	2	8	4,5	+	+	++	+	0,072
2.11	A	V	+	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	+	+	+	3,500
2.12	A	V	-	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	-	-	++	0,040
3.2	K	U	+	+	+	+	+	-	3	7	3,5	-	+	++	+	0,394
3.5	K	U	+	+	+	+	-	+	2	7	2,5	-	+	++	++	0,536
3.6	A	U	-	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	-	-	++	0,142
3.7	K	U	+	+	+	+	+	-	3	7	3,5	-	+	++	++	0,214
3.8	K	U	-	-	-	+	-	+	-	-	2,5	-	-	-	-	1,326

Tab. 21 Daten *E. faecalis* Isolate aus verschiedenem klinischen Material – VF (Fortsetzung)

Isolat	K/A/ Umw	Ma- terial	cyIA	esp	asa1	gelE	ef0591	bee	espA	espC	aceB	GelE	β- Häm	E.fc JH2-2	E.fm 64/3	BF
3.9	A	Cer	-	+	+	+	-	-	2	8	3,5	-	-	-	-	0,070
3.10	A	U	-	+	+	+	-	-	2	5	2,5	-	-	-	-	0,115
3.14	K	VKat	-	-	+	+	-	-	-	-	5,5	-	-	-	-	0,083
4.1	A	V	-	-	-	+	-	+	-	-	2,5	+	-	+	+	0,496
4.2	K	U	+	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	-	+	+	0,224
4.3	K	U	-	+	+	-	-	-	2	7	4,5	-	-	-	-	0,125
4.4	K	Abz	-	-	+	+	-	+	-	-	1,5	+	-	+++	+++	0,250
4.5	K	PEG	-	+	-	-	-	-	2	7	4,5	-	-	-	-	0,360
4.6	A	V	+	+	+	+	-	-	2	8	4,5	+	+	+	+	0,226
4.7	K	V	-	+	-	+	-	-	2	3	2,5	-	-	-	-	0,172
4.8	A	Rach	+	+	+	+	-	-	2	8	4,5	-	+	++	++	0,097
4.9	A	V	-	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	-	-	++	0,111
4.10	K	H op	-	-	+	+	+	-	-	-	4,5	+	-	-	+	0,025
4.11	K	W	-	+	+	+	-	-	2	6	2,5	-	-	++	-	0,086
4.12	A	AbzZ	-	-	-	+	-	-	-	-	2,5	+	-	++	++	0,047
4.13	K	W	+	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	-	+	+	0,072
4.14	K	W	-	-	-	+	-	-	-	-	4,5	+	-	-	+	0,041
4.15	A	W	+	+	+	-	+	-	3	7	3,5	-	+	++	++	0,073
4.16	K	VKat	+	+	+	+	-	-	4	7	4,5	+	-	+	+	0,123
4.17	A	W	-	-	-	+	-	-	-	-	4,5	+	-	-	++	0,049
4.18	A	Hoden	+	+	+	+	-	-	2	8	4,5	-	+	++	++	0,319
4.19	A	W	+	-	+	+	+	-	-	-	4,5	+	-	++	+	0,105
4.20	A	W	+	+	+	+	+	-	3	7	4,5	-	+	++	+++	0,067
4.22	A	W	-	+	-	+	-	-	1	8	2,5	-	-	++	-	0,118
4.23	K	W	-	+	+	+	-	-	2	8	3,5	-	-	+	-	0,056
4.24	A	W	+	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	-	+	+	0,130
4.25	K	W	-	-	+	+	-	-	-	-	4,5	-	-	++	-	0,095
4.26	K	W	-	+	+	+	-	-	2	6	2,5	-	-	++	-	0,193
4.27	K	U	+	-	+	+	-	-	-	-	4,5	-	+	+++	++	0,037
4.28	A	U	-	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	-	-	-	0,065
4.29	K	U	-	-	+	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	0,300
4.30	A	U	+	+	+	+	-	-	2	9	4,5	-	-	-	-	0,443
4.31	A	U	-	-	-	-	-	-	-	-	3,5	-	-	-	-	0,051
4.32	A	U	-	+	+	-	-	-	-	-	4,5	-	-	-	-	0,175
4.33	K	U	+	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	-	+	+	0,140
4.34	K	U	+	+	+	+	-	-	2	8	4,5	-	+	++	++	1,525
4.35	K	U	+	+	+	+	+	-	3	7	4,5	-	+	+++	++	0,263
4.36	A	U	+	-	+	+	-	-	-	-	3,5	+	+	+++	++	0,110
5.2	K	Gewebe	+	+	+	-	-	-	2	8	4,5	-	-	-	-	0,065
5.4	K	Blut	-	-	+	+	-	+	-	-	2,5	-	-	-	-	0,127
5.5	K	PEG	-	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	-	-	-	0,190
5.6	K	W	+	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	-	+	+	0,122
5.10	K	Blut	+	+	+	+	-	-	2	8	4,5	+	(+)	+	++	0,198
5.11	K	Pleura	+	+	+	+	-	-	3	9	4,5	+	-	+	+	0,308
5.12	K	Asc	-	+	+	+	-	-	2	6	3,5	-	-	-	-	0,288
5.15	K	Asc	-	-	+	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	0,071
5.16	K	Serom	-	+	-	+	-	-	2	6	2,5	-	-	-	-	0,112
5.17	K	Blut	+	-	+	+	-	-	-	-	4,5	+	(+)	+	+	0,133
806	K	S	-	+	-	+	-	-	2	1	4,5	-	-	-	-	0,019
812	K	S	-	+	+	-	-	-	2	8	2,5	-	-	-	-	0,439
815	K	S	+	+	+	+	+	-	3	7	3,5	+	-	-	++	0,058
817	K	S	+	-	+	+	-	-	-	-	3,5	-	-	++	++	0,192
827	K	S	-	-	+	+	-	+	-	-	2,5	+	-	-	-	0,412
842	K	S	-	+	-	+	-	-	2	9	3,5	-	-	++	-	0,144
926	K	S	-	+	-	+	-	-	2	1	3,5	+	-	-	-	0,135

Tab. 22 Daten *E. faecalis* Isolate aus verschiedenem klinischen Material – VF (Fortsetzung)

Isolat	K/A/ Umw	Ma- terial	cyIA	esp	asa1	gelE	ef0591	bee	espA	espC	aceB	GelE	β- Häm	E.fc JH2-2	E.fm 64/3	BF
927.3	K	S	-	-	-	+	-	-	-	-	3,5	-	-	-	-	0,096
941.2	K	S	-	-	+	+	-	-	-	-	3,5	+	-	-	-	0,097
950	K	S	+	+	+	+	+	-	3	8	3,5	+	-	+	+	0,127
951	K	S	-	-	+	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	0,100
964.2	K	S	+	+	+	-	+	-	3	7	3,5	-	+	++	++	0,083
968.2	K	S	+	+	+	-	+	-	3	10	3,5	-	+	++	++	1,295
975	K	S	-	-	-	+	+	-	-	-	4,5	+	-	-	-	0,086
981	K	S	+	+	+	+	-	-	2	7	3,5	-	+	++	++	0,114
982.1	K	S	-	-	+	+	+	-	-	-	4,5	+	-	-	-	0,123
983	K	S	+	-	-	+	-	-	-	-	2,5	+	+	+	-	0,070
986	K	S	-	+	-	+	-	-	2	10	3,5	-	-	-	-	1,348
988	K	S	-	+	+	+	-	-	1	7	2,5	-	-	++	-	0,235
996.2	K	S	-	-	+	-	-	-	-	-	1,5	-	-	++	-	0,048
999	K	S	+	+	+	+	+	-	3	8	3,5	+	-	+	++	0,039
1000	K	S	-	+	+	+	-	-	2	6	4,5	+	-	-	++	0,149
1001.1	K	S	-	-	+	+	+	-	-	-	4,5	+	-	-	-	0,112
1/3	Umw	G	-	-	-	+	-	-	-	-	5,5	+	-	-	-	0,071
2e	Umw	Gew	-	-	-	-	-	-	-	-	4,5	-	-	-	-	0,051
R1	Umw	Ra	-	+	+	+	-	-	3	-	3,5	+	-	-	-	0,075
R2	Umw	Ra	-	-	-	+	-	-	-	-	4,5	+	-	-	-	0,076
6.3	K	U	+	-	+	+	-	-	nb	nb	4,5	-	+	+++	++	0,036
6.4	K	W	-	-	+	+	-	-	nb	nb	4,5	+	-	-	++	0,086
6.5	K	U	-	-	+	+	+	-	nb	nb	4,5	-	-	-	-	0,577
6.6	K	W	+	+	+	-	+	-	3	7	3,5	-	+	++	++	0,051
6.8	K	U	-	+	-	+	-	-	2	6	3,5	+	-	+	++	1,738
6.9	K	W	-	-	+	+	-	-	nb	nb	2,5	+	-	-	++	0,146
6.12	K	W	+	+	+	-	+	-	3	7	3,5	-	+	++	++	0,073
6.14	K	Galle	-	-	+	+	-	-	nb	nb	2,5	-	-	++	-	0,085
6.15	K	W	+	+	+	-	+	-	3	7	3,5	-	+	++	++	0,129
6.16	K	U	-	-	+	+	-	-	nb	nb	4,5	+	-	-	-	0,294
6.17	K	U	+	+	+	-	+	-	3	2	3,5	-	+	++	++	0,047
6.18	K	Blut	-	-	-	-	-	-	nb	nb	3,5	-	-	++	+	0,080
6.19	K	U	-	-	+	+	-	-	nb	nb	4,5	-	-	++	-	0,364
6.20	K	U	-	+	+	+	-	-	2	6	4,5	+	-	-	++	0,053
6.21	K	U	-	-	+	-	-	-	nb	nb	2,5	-	-	-	-	0,145
6.23	K	U	-	+	-	+	-	-	1	7	3,5	-	-	-	-	0,191
6.25	K	U	+	+	+	+	-	-	2	6	4,5	-	-	++	-	0,521
6.26	K	U	-	+	+	+	-	-	2	4	2,5	-	-	++	++	0,138
6.27	K	W	-	+	-	+	-	-	2	6	3,5	-	-	-	-	1,009
6.29	K	U	-	+	+	+	-	-	1	7	5,5	-	-	-	-	0,060
6.30	K	U	-	-	-	+	-	-	nb	nb	4,5	+	-	-	-	0,143
6.31	K	U	+	+	+	-	+	-	3	7	3,5	-	+	+	++	0,097
6.32	K	U	-	+	+	+	-	-	2	7	2,5	-	-	-	-	0,363
6.33	K	U	+	+	+	+	-	-	3	6	3,5	-	+	+++	++	0,247
6.34	K	U	-	-	-	+	-	-	nb	nb	4,5	-	-	-	-	0,158
6.36	K	W	+	-	+	+	-	-	nb	nb	4,5	+	-	+	+	0,361
6.37	K	B op	-	+	-	+	-	-	2	8	4,5	+	-	-	++	0,641
6.38	K	W	+	+	+	+	+	-	3	7	4,5	-	+	++	++	0,323
6.39	K	W	-	+	-	+	-	-	2	6	2,5	-	-	++	-	0,352
6.40	K	TEP	+	+	+	+	+	-	3	7	4,5	+	-	+	-	0,246
6.41	K	Blut	+	+	+	+	-	-	2	6	3,5	+	-	+	-	2,981
6.42	K	Pericard	-	+	-	+	-	-	2	6	3,5	-	-	++	-	2,130
6.45	K	Asc	+	+	+	+	-	-	3	10	3,5	+	-	-	+	0,468
S1	K	U	-	-	-	+	-	-	-	-	3,5	+	-	-	+	0,067

Tab. 23 Zusätzliche Daten *E. faecalis* Isolate aus verschiedenem klinischen Material – Antibiotogramme und Antibiotikaresistenzgen-Nachweise

Alle Isolate VA und TEC sensibel, außer Isolat S1 (VA⁺, TEC⁺, *vanA*⁺); alle Isolate AMP sensibel, außer Isolate 982.1 und 1001.1 AMP⁽⁺⁾.

+, Ab-Resistenz bzw. Nachweis des Gens; -, Ab-Sensitivität bzw. kein Nachweis des Gens; (+), intermediäres Verhalten gegenüber dem Ab; K, Herkunft Krankenhaus; A, Herkunft niedergelassener Arzt; Umw, Herkunft Umwelt; TC, Tetracyclin; E, Erythromycin; HLR-GM/SM, High-Level-Resistenz Gentamicin bzw. Streptomycin; CIP, Ciprofloxacin; OFX, Ofloxacin; RD, Rifampicin; *ermB*, *aac-aph*, *tetM*, Nachweis der Gene; S, Stuhl; U, Urin; Abz, Abszess; W, Wunde; Pan, Pankreas; V, Vagina; P, Penis-Abstrich; Vul, Vulva-Abstrich; Cer, Cervix; Dia, Dialysewasser; VKat, Venenkatheter; PEG, Perikutane endoskopische Gastrostomie; Rach, Rachenabstrich; H op, Hüftgewebe operativ; AbzZ, Zahnabszess; TEP, Totalendoprothese; Asc, Aszites; B op, Bauchhöhlenabstrich operativ; G, Geflügelkot; Ra, Rattenkot; Gew, Gewässer

Isolat	Herkunft	Material	TC	E	HLR-GM	HLR-SM	CIP	OFX	RD	<i>ermB</i>	<i>aac-aph</i>	<i>tetM</i>
8	K	S	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-
30	K	S	+	-	-	-	-	(+)	+	-	-	+
47	A	S	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
63	K	S	+	+	+	+	-	(+)	+	+	+	+
73	A	S	+	+	-	-	-	(+)	(+)	+	-	+
77	A	S	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
79	A	S	-	+	-	-	-	(+)	-	+	-	-
82	A	S	+	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	+
84	A	S	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-
*2	K	S	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-
*4	K	S	-	(+)	-	-	-	+	-	-	-	-
*5	K	S	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-
*6	K	S	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
*7	K	S	+	+	+	-	-	(+)	-	+	+	+
*8	K	U	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
*9	K	U	+	-	-	-	-	(+)	-	-	-	+
*10	K	U	-	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-
1.1	A	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.2	A	W	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1.3	A	V	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
1.4	A	P	+	-	-	-	-	-	(+)	-	-	+
1.6	K	W	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
1.7	A	Vul	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
1.8	A	V	+	(+)	-	-	-	-	+	-	-	+
1.9	A	V	+	-	-	-	-	-	(+)	-	-	+
1.10	A	V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2.2	K	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.3	A	Dia	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
2.4	A	W	-	+	-	-	-	-	(+)	+	-	-
2.6	A	U	+	-	-	-	-	+	(+)	-	-	+
2.7	K	U	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
2.8	A	U	-	+	-	-	-	-	(+)	+	-	-
2.9	A	U	-	-	-	-	+	+	(+)	-	-	-
2.10	A	U	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
2.11	A	V	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
2.12	A	V	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
3.2	K	U	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
3.5	K	U	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
3.6	A	U	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
3.7	K	U	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
3.8	K	U	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
3.9	A	Cer	+	+	-	-	-	(+)	-	+	-	+
3.10	A	U	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
3.14	K	VKat	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
4.1	A	V	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-

Tab. 24 Zusätzliche Daten *E. faecalis* Isolate aus verschiedenem klinischen Material – Antibiogramme und Antibiotikaresistenzgen-Nachweise (Fortsetzung)

Isolat	Herkunft	Material	TC	E	HLR-GM	HLR-SM	CIP	OFX	RD	ermB	aac-aph	tetM
4.2	K	U	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4.3	K	U	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+
4.4	K	Abz	+	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	+
4.5	K	PEG	+	(+)	-	+	-	(+)	+	-	-	+
4.6	A	V	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+
4.7	K	V	+	-	-	-	-	(+)	-	-	-	+
4.8	A	Rach	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
4.9	A	V	+	(+)	-	-	(+)	+	-	-	-	+
4.10	K	H op	-	(+)	-	-	-	+	+	-	-	-
4.11	K	W	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-
4.12	A	AbzZ	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-
4.13	K	W	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4.14	K	W	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
4.15	A	W	+	+	+	+	-	(+)	-	+	+	+
4.16	K	VKat	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4.17	A	W	+	(+)	-	-	-	+	+	-	-	+
4.18	A	Hoden	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
4.19	A	W	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
4.20	A	W	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
4.22	A	W	+	-	-	-	-	(+)	+	-	-	+
4.23	K	W	+	(+)	-	+	-	(+)	-	-	-	+
4.24	A	W	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4.25	K	W	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	-
4.26	K	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.27	K	U	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
4.28	A	U	+	(+)	-	-	+	+	(+)	-	-	+
4.29	K	U	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-
4.30	A	U	+	(+)	-	-	+	+	-	-	-	+
4.31	A	U	+	+	-	+	-	(+)	-	+	-	+
4.32	A	U	+	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	+
4.33	K	U	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4.34	K	U	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
4.35	K	U	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
4.36	A	U	+	(+)	-	-	-	-	+	-	-	+
5.2	K	Gewebe	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
5.4	K	Blut	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
5.5	K	PEG	+	(+)	-	+	+	+	+	-	-	+
5.6	K	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5.10	K	Blut	+	-	-	+	-	(+)	+	-	-	+
5.11	K	Pleura	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5.12	K	Asc	+	-	-	+	(+)	+	+	-	-	-
5.15	K	Asc	-	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-
5.16	K	Serom	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
5.17	K	Blut	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
806	K	S	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-
812	K	S	+	+	-	+	+	(+)	(+)	+	-	+
815	K	S	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
817	K	S	+	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	+
827	K	S	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	-
842	K	S	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
926	K	S	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
927.3	K	S	-	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-
941.2	K	S	-	-	-	-	(+)	+	+	-	-	-
950	K	S	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+

Tab. 25 Zusätzliche Daten *E. faecalis* Isolate aus verschiedenem klinischen Material – Antibiotogramme und Antibiotikaresistenzgen-Nachweise (Fortsetzung)

Isolat	Herkunft	Material	TC	E	HLR-GM	HLR-SM	CIP	OFX	RD	ermB	aac-aph	tetM
951	K	S	-	(+)	-	-	(+)	+	(+)	-	-	-
964.2	K	S	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
968.2	K	S	+	+	+	+	-	(+)	+	+	+	+
975	K	S	-	(+)	-	-	-	+	+	-	-	-
981	K	S	+	+	-	-	-	(+)	-	+	-	+
982.1	K	S	-	+	-	-	+	+	(+)	+	-	-
983	K	S	+	+	-	-	-	(+)	-	+	-	+
986	K	S	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
988	K	S	+	(+)	-	-	(+)	+	-	-	-	+
996.2	K	S	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-
999	K	S	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
1000	K	S	+	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	+
1001.1	K	S	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
1/3	Umw	G	+	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-
2e	Umw	Gew	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
R1	Umw	Ra	-	(+)	-	-	-	(+)	+	-	-	+
R2	Umw	Ra	-	(+)	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-
6.3	K	U	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
6.4	K	W	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
6.5	K	U	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
6.6	K	W	+	+	+	-	-	(+)	+	+	+	+
6.8	K	U	+	-	-	-	-	(+)	+	-	-	+
6.9	K	W	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
6.12	K	W	+	+	-	+	-	(+)	+	+	-	+
6.14	K	Galle	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
6.15	K	W	+	+	-	+	-	(+)	+	+	-	+
6.16	K	U	+	+	+	-	+	+	(+)	+	+	+
6.17	K	U	+	-	-	-	-	(+)	+	-	-	+
6.18	K	Blut	+	+	-	+	-	(+)	+	+	-	-
6.19	K	U	+	+	+	-	+	-	(+)	+	+	+
6.20	K	U	+	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-
6.21	K	U	-	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-
6.23	K	U	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
6.25	K	U	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
6.26	K	U	+	-	-	-	-	(+)	+	-	-	+
6.27	K	W	-	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-
6.29	K	U	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6.30	K	U	+	-	-	-	(+)	(+)	+	-	-	+
6.31	K	U	+	+	+	+	-	(+)	+	+	+	+
6.32	K	U	+	-	-	-	-	(+)	+	-	-	+
6.33	K	U	+	+	+	-	-	(+)	+	+	+	+
6.34	K	U	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
6.36	K	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.37	K	B op	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
6.38	K	W	+	+	-	+	+	+	(+)	+	-	+
6.39	K	W	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
6.40	K	TEP	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
6.41	K	Blut	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
6.42	K	Pericard	+	+	-	+	-	(+)	+	+	-	+
6.45	K	Asc	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
S1	K	U	+	nb	nb	nb	-	nb	+	+	-	+

Tab. 26 Daten *E. faecium* aus verschiedenem klinischen Material – Virulenzfaktoren

+, positiver Nachweis; -, kein Nachweis des Gens bzw. des Phänotyps; *esp*, *hyl*, Nachweis der Gene; *espA*, *espC*, Anzahl der A- bzw. C-Repeats des *esp* Gens; *E.fm* 64/3, *E.fc* JH2-2, Bacteriocin-Produktion gegenüber des Indikatorstamms *E. faecium* 64/3 bzw. *E. faecalis* JH2-2, + (≤ 1 mm), ++ (2-4 mm), +++ (> 4 mm); BF, Biofilm-Bildung, angegeben als OD₅₉₅-Mittelwerte aus mindestens drei Messungen mit jeweils vier Replikaten; VNTR, Variable-Number Tandem-Repeat; nb, nicht bestimmt; nbb, nicht bestimmbar; MT, MLVA-Typ; K, Herkunft Krankenhaus; A, Herkunft niedergelassener Arzt; Umw, Herkunft Umwelt; S, Stuhl; U, Urin; Abz, Abszess; W, Wunde; Pan, Pankreas; V, Vagina; VKat, Venenkatheter; Per, Peritonitis; Asc, Ascites; Li, Liquor; PB, Punktat Bauch; B op, Bauchhöhlenabstrich operativ; Mi, Milz; TS, Trachealsekret; G, Geflügelkot; Ri, Rinderkot; B, Boden; Gew, Gewässer;

Isolat	K/A/ Umw	Ma- terial	<i>esp</i>	<i>hyl</i>	<i>espA</i>	<i>espC</i>	<i>E.fc</i> JH2-2	<i>E.fm</i> 64/3	BF	VNTR 1-2-7-8-9-10						MT
5	K	S	-	+	-	-	-	-	0,016	5	7	3	3	2	3	1
10	K	S	+	-	6	6	-	-	0,023	5	7	3	3	2	3	1
11	K	S	+	+	4	6	-	-	0,012	5	7	3	3	2	3	1
29	K	S	+	-	6	6	-	-	0,023	5	7	3	3	2	3	1
45	A	S	-	-	-	-	-	-	0,032	3	6	1	4	1	1	86
72	A	S	-	-	-	-	-	-	0,018	6	4	3	1	1	1	89
83	A	S	-	-	-	-	-	-	0,011	3	5	1	4	1	3	292
85	A	S	-	-	-	-	+++	-	0,015	6	7	2	4	2	3	59
88	K	S	+	-	6	6	-	++	0,015	5	7	3	3	2	3	1
*11	K	S	+	+	1	6	-	-	0,011	5	7	3	2	2	3	5
*12	K	S	-	+	-	-	-	-	0,031	5	7	3	3	2	3	1
*13	K	S	+	-	4	5	+++	+++	0,066	5	7	3	3	2	3	1
*14	K	S	+	-	1	6	-	-	0,013	5	7	3	2	2	3	5
*15	K	S	-	-	-	-	+++	++	0,038	5	6	6	2	1	3	nbb
*16	K	U	+	+	4	6	-	-	0,019	5	7	3	3	2	3	1
*17	K	Abz	-	+	-	-	-	-	0,016	5	7	3	3	2	3	1
1.5	K	Blut	-	-	-	-	+++	+	0,012	5	7	2	4	2	3	53
2.1	K	W	+	+	4	6	+++	-	0,007	5	7	3	3	2	2	7
2.13	K	Pan	+	-	4	6	-	-	0,012	5	7	3	3	2	2	7
3.1	A	U	+	-	4	6	+++	-	0,026	5	7	3	3	1	2	159
3.3	K	V	+	+	4	6	+++	-	0,020	5	7	3	3	1	2	159
3.4	K	U	+	+	4	6	+++	-	0,018	5	7	3	3	1	2	159
3.11	A	U	+	+	4	6	+++	-	0,021	5	7	3	3	1	2	159
3.12	K	U	+	-	4	6	+++	-	0,023	5	7	3	3	1	2	159
3.13	K	VKat	+	+	4	6	+++	-	0,013	5	7	3	3	1	2	159
4.21	A	W	+	+	6	6	-	-	0,023	5	7	3	3	2	3	1
5.1	K	VKat	+	+	4	6	+	-	0,012	5	7	3	3	1	3	12
5.3	K	Blut	-	-	-	-	-	-	0,015	5	7	3	3	2	3	1
5.7	K	W	+	+	4	6	-	-	0,237	5	7	3	3	2	3	1
5.8	K	Per	-	+	-	-	-	-	0,021	5	7	3	3	2	3	1
5.13	K	Blut	+	+	4	6	-	-	0,012	5	7	3	3	1	2	159
5.14	K	Asc	+	+	4	6	++	-	0,015	5	7	3	3	1	2	159
5.18	K	Blut	+	+	4	6	++	-	0,020	5	7	3	3	1	2	159
814	K	S	-	-	-	-	-	-	0,015	6	4	3	1	1	1	89
822	K	S	-	-	-	-	-	-	0,032	5	7	3	3	2	3	1
853	K	S	-	-	-	-	-	-	0,014	5	7	3	3	2	3	1
874	K	S	-	-	-	-	+++	++	0,012	6	7	5	4	1	3	58
888	K	S	+	-	-	6	+++	-	0,049	5	7	3	3	1	3	12
892	K	S	-	-	-	-	-	-	0,026	5	4	1	3	1	2	121
894	K	S	-	-	-	-	+++	+++	0,018	6	7	5	4	1	3	58
909	K	S	-	-	-	-	-	-	0,054	5	7	3	3	2	3	1
913	K	S	-	-	-	-	-	-	0,056	6	4	3	1	1	1	89
917.1	K	S	-	-	-	-	-	-	0,017	5	7	3	3	2	3	1
947	K	S	+	-	-	6	+++	+++	0,032	5	7	3	3	1	3	12
954	A	S	-	-	-	-	-	-	0,031	6	4	3	1	1	1	89
984	K	S	-	-	-	-	-	-	0,019	5	7	3	3	2	3	1
1/2	Umw	G	-	-	-	-	-	-	0,013	5	7	5	6	1	3	nbb

Tab. 27 Daten *E. faecium* aus verschiedenem klinischen Material – VF (Fortsetzung)

Isolat	K/A/ Umw	Ma- terial	esp	hyl	espA	espC	E.fc JH2-2	E.fm 64/3	BF	VNTR 1-2-7-8-9-10						MT
1/11	Umw	G	-	-	-	-	-	-	0,016	3	nbb	4	2	1	3	nbb
2i	Umw	G	-	-	-	-	-	-	0,023	3	nbb	4	2	1	3	nbb
6K1	Umw	Ri	-	-	-	-	-	-	0,008	3	nbb	4	2	1	2	nbb
6H2	Umw	G	-	-	-	-	-	-	0,015	6	nbb	4	2	1	2	nbb
6H3	Umw	G	-	-	-	-	-	-	0,015	3	nbb	4	2	1	2	nbb
A(3)	Umw	B	-	-	-	-	-	-	0,014	5	nbb	7	3	1	5	nbb
D(1)	Umw	B	-	-	-	-	+++	-	0,038	nbb	6	5	4	2	4	nbb
A(1)	Umw	G	-	-	-	-	-	-	0,022	5	8	4	2	1	1	nbb
D(8)	Umw	G	-	-	-	-	-	-	0,013	5		4	2	1	1	nbb
H(6)	Umw	Gew	-	-	-	-	-	-	0,014	5	7	5	5	1	3	nbb
B3	K	Asc	-	-	-	-	-	-	0,017	5	7	3	3	2	3	1
B4	K	U	-	+	-	-	+++	-	0,023	5	7	3	3	2	2	7
B5	K	Asc	-	+	-	-	+++	-	0,013	5	7	3	3	2	2	7
B7	K	Li	-	-	-	-	-	-	0,089	5	7	3	3	2	2	7
T1	K	Per	-	-	-	-	-	-	0,036	5	7	3	3	2	2	7
6.1	K	U	+	+	4	6	++	-	0,014	5	7	3	3	1	2	159
6.2	K	Blut	+	+	5	6	-	-	0,024	5	3	3	3	2	2	nbb
6.7	K	PB	+	+	4	6	-	-	0,016	5	7	3	3	1	2	159
6.10	K	W	-	+	nb	nb	-	-	0,023	5	7	3	3	2	3	1
6.11	K	B op	+	+	4	6	++	-	0,012	5	7	3	3	1	2	159
6.22	K	U	+	+	4	6	++	-	0,022	5	7	3	3	1	2	159
6.24	K	U	+	+	4	6	-	-	0,022	5	7	3	3	1	2	159
6.35	K	U	+	+	4	6	-	-	0,021	5	7	3	3	2	2	7
6.43	K	Mi	-	-	-	-	-	-	0,025	5	7	3	3	2	2	7
6.44	K	Per	-	+	-	-	-	-	0,026	5	7	3	3	2	3	1
6.46	K	Per	-	+	-	-	-	-	0,015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
6.47	K	W	+	+	4	6	++	-	0,018	5	7	3	3	2	2	7
B9	K	VKat	-	+	-	-	+++	+	0,012	5	7	3	3	2	2	7
S3	K	W	-	+	-	-	-	-	0,010	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
S4	K	TS	+	-	4	6	+++	-	0,010	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
S5	K	TS	+	-	4	6	+++	-	0,013	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb

Tab. 28 Zusätzliche Daten *E. faecium* Isolate aus verschiedenem klinischen Material – Antibiotogramme und Antibiotikaresistenzgen-NachweiseNur Isolat S3 *vanB*⁺.

+, Ab-Resistenz bzw. Nachweis des Gens; -, Ab-Sensitivität bzw. kein Nachweis des Gens; (+), intermediäres Verhalten gegenüber dem Ab; K, Herkunft Krankenhaus; A, Herkunft niedergelassener Arzt; U, Herkunft Umwelt; S, Stuhl; U, Urin; Abz, Abszess; W, Wunde; Pan, Pankreas; V, Vagina; VKat, Venenkatheter; Per, Peritonitis; Asc, Aszites; Li, Liquor; PB, Punktat Bauch; B op, Bauchhöhlenabstrich operativ; Mi, Milz; TS, Trachealsekret; G, Geflügelkot; Ri, Rinderkot; B, Boden; Gew, GewässerVA, Vancomycin; TEC, Teicoplanin; AMP, Ampicillin; TC, Tetracyclin; E, Erythromycin; HLR-GM/SM, High-Level-Resistenz Gentamicin bzw. Streptomycin; CIP, Ciprofloxacin; OFX, Ofloxacin; QD, Quinupristin-Dalfopristin; RD, Rifampicin; *vanA*, *ermB*, *aac-aph*, *tetM*, Nachweis der Gene, +, positiver Nachweis des Gens, -, Gen nicht detektiert.

Isolat	K/A/ Umw	Ma- terial	VA	TEC	AMP	TC	E	HLR- GM	HLR- SM	CIP	OFX	QD	RD	<i>vanA</i>	<i>ermB</i>	<i>aac- aph</i>	<i>tetM</i>
5	K	S	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
10	K	S	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	(+)	-	+	-	-
11	K	S	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
29	K	S	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
45	A	S	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
72	A	S	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
83	A	S	-	-	-	-	(+)	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
85	A	S	-	-	-	-	(+)	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
88	K	S	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	(+)	-	+	+	-
*11	K	S	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
*12	K	S	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
*13	K	S	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	(+)	-	+	-	-
*14	K	S	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
*15	K	S	-	-	-	+	(+)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
*16	K	U	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
*17	K	Abz	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
1.5	K	Blut	-	-	-	+	+	-	-	+	(+)	-	+	-	-	-	+
2.1	K	W	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
2.13	K	Pan	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
3.1	A	U	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
3.3	K	V	-	-	+	-	+	+	+	+	+	(+)	+	-	+	+	-
3.4	K	U	-	-	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	-	+	+	+
3.11	A	U	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
3.12	K	U	-	-	+	+	+	-	+	+	+	(+)	+	-	+	-	-
3.13	K	VKat	-	-	+	-	+	+	+	+	+	(+)	+	-	+	+	-
4.21	A	W	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
5.1	K	VKat	-	-	+	-	+			+	+	(+)	+	-	+	+	-
5.3	K	Blut	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
5.7	K	W	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
5.8	K	Per	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
5.13	K	Blut	-	-	+	-	+	+	-	+	+	(+)	+	-	+	+	-
5.14	K	Asc	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
5.18	K	Blut	-	-	+	-	+	+	+	+	+	(+)	+	-	+	+	-
814	K	S	+	+	-	+	+	-	-	-	(+)	(+)	-	+	+	-	+
822	K	S	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
853	K	S	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
874	K	S	-	-	+	+	+	-	+	(+)	+	(+)	(+)	-	+	-	+
888	K	S	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
892	K	S	-	-	(+)	-	(+)	-	-	(+)	+	(+)	-	-	-	-	-
894	K	S	-	-	+	+	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	+	-	+
909	K	S	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
913	K	S	+	+	-	+	+	-	-	-	(+)	(+)	-	+	+	-	+
917.1	K	S	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
947	K	S	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
954	A	S	+	+	-	+	+	-	-	-	+	(+)	-	+	+	-	+
984	K	S	-	-	+	-	+	-	+	(+)	+	(+)	+	-	+	-	-

Tab. 29 Zusätzliche Daten *E. faecium* Isolate aus verschiedenem klinischen Material – Antibiotogramme und Antibiotikaresistenzgen-Nachweise (Fortsetzung)

Isolat	K/A/ Umw	Ma- terial	VA	TEC	AMP	TC	E	HLR- GM	HLR- SM	CIP	OFX	QD	RD	vanA	ermB	aac- aph	tetM
1/2	Umw	G	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	(+)	-	+	-	-	-	-
1/11	Umw	G	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	+	-	-	-	-	-	-
2i	Umw	G	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	+	-	-	-	-	-	-
6K1	Umw	Ri	-	-	(+)	-	(+)	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
6H2	Umw	G	-	-	-	+	(+)	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	+
6H3	Umw	G	-	-	-	+	-	-	-	(+)	+	-	-	-	-	-	+
A(3)	Umw	B	-	-	-	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-
D(1)	Umw	B	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	+	-	+	-	-	-	-
A(1)	Umw	G	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	+	-	-	-	-	-	-
D(8)	Umw	G	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	+	-	-	-	-	-	-
H(6)	Umw	Gew	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	+	-	(+)	-	-	-	-
B3	K	Asc	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
B4	K	U	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
B5	K	Asc	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
B7	K	Li	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
T1	K	Per	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
6.1	K	U	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
6.2	K	Blut	-	-	+	-	(+)	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
6.7	K	PB	-	-	+	-	+	-	+	+	+	(+)	+	-	+	-	-
6.10	K	W	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
6.11	K	B op	-	-	+	-	+	+	+	+	+	(+)	+	-	+	+	-
6.22	K	U	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
6.24	K	U	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
6.35	K	U	-	-	+	-	+	+	+	+	+	(+)	+	-	+	+	-
6.43	K	Mi	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
6.44	K	Per	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
6.46	K	Per	-	-	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	-	+	+	+
6.47	K	W	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
B9	K	VKat	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
S3	K	W	+	-	+	+	nb	nb	nb	+	nb	-	+	-	+	+	+
S4	K	TS	+	+	+	+	+	nb	nb	+	+	-	+	+	+	+	+
S5	K	TS	+	+	+	+	+	nb	nb	+	+	-	+	+	+	+	+

Tab. 30 Daten *E. faecalis* Isolate aus Vaginalabstrichen - BV positiv

Bei allen Stämmen wurde keine Lipase-Produktion oder der *bee* Locus (*bee1-3*) nachgewiesen.

+, positiver Nachweis; -, kein Nachweis des Gens bzw. des Phänotyps; GelE, Gelatinase-Produktion; β -Häm, β -Hämolyse-Nachweis; *gelE*, *cyIA*, *esp*, *asa1*, Nachweis der Gene; H₂O₂, H₂O₂-Produktion, +, schwach, ++, stark; *E.fm* 64/3, *E.fc* JH2-2, Bacteriocin-Produktion gegenüber des Indikatorstamms *E. faecium* 64/3 bzw. *E. faecalis* JH2-2, + (≤ 1 mm), ++ (2-4 mm), +++ (> 4 mm); BF, Biofilm-Bildung, angegeben als OD₅₉₅-Mittelwerte aus mindestens drei Messungen mit jeweils vier Replikaten

BV Nr.	Labor-Code	GelE	β -Häm	DNase	<i>E.fm</i> 64/3	<i>E.fc</i> JH2-2	H ₂ O ₂	<i>cyIA</i>	<i>esp</i>	<i>asa1</i>	<i>gelE</i>	BF
157	GB HC20 420	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	4,033
163	GB HC26 361	+	-	-	+++	+++	+	+	+	+	+	3,983
154	GB HCO6 496	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	3,973
53	GB GF13 5273	-	-	-	-	-	++	-	+	-	+	0,704
141	GB GH11 5188	-	-	-	-	-	++	-	+	+	+	0,696
142	GB GJ17 5153	-	-	-	+	++	+	-	-	-	-	0,568
152	GB HC01 33	-	-	-	-	-	++	-	+	+	+	0,412
10	GB GF01 5272	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	0,391
109	GB GG18 5141	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	0,388
149	GB HB16 5049	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	0,367
138	GB GH04 23	+	-	-	+	+	++	-	+	-	+	0,352
153	GB HB26 587	+	-	-	+++	+	++	+	+	+	+	0,339
114	GB GG21 539	-	-	-	-	-	++	-	+	+	-	0,330
147	GB GJ24 5161	-	+	-	+++	+++	+	+	-	+	+	0,321
156	GB HC16 5263	-	-	-	-	+	++	-	+	+	+	0,314
158	GB HC20 5002	-	-	-	-	-	++	-	+	-	+	0,314
43	GB GF17 7	-	+	-	+++	+++	++	+	-	-	+	0,293
123	GB GG26 538	-	-	+	-	-	++	-	+	+	+	0,261
150	GB HB16 60	-	+	-	+++	+++	++	+	+	+	-	0,257
12	GB GF01 5020	+	-	-	+	++	+	+	-	+	+	0,257
161	GB HC22 31	+	-	+	+	++	++	+	-	+	+	0,243
100	GB GG14 5280	+	-	-	++	+	++	+	+	+	+	0,239
145	GB GJ23 456	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	0,226
139	GB GH08 360	+	-	-	++	-	++	-	-	-	+	0,203
146	GB GJ24 760	+	-	+	+++	+++	++	-	-	+	+	0,195
151	GB HC01 569	+	-	-	-	+	++	-	-	-	+	0,186
164	GB HF13 6005	-	-	-	-	-	++	-	+	-	+	0,164
133	GB GG31 115	+	-	-	++	+	++	+	-	-	+	0,160
160	GB HC21 5007	+	-	-	++	-	++	-	+	-	+	0,157
132	GB GG28 316	-	+	-	++	+++	++	+	-	+	-	0,119
131	GB GG27 24	+	-	-	++	+	++	-	-	-	+	0,119
165	GB HF19 6012	+	-	+	-	-	++	-	-	+	+	0,115
162	GB HC26 223	+	-	-	+	+	++	+	+	+	+	0,091
80	GB GG11 592	-	-	-	-	-	++	-	-	+	+	0,078
75	GB GG10 629	+	-	-	++	-	++	-	-	+	+	0,076
148	GB GJ27 433	+	-	-	++	+	++	+	-	+	+	0,075
155	GB HCO6 839	+	-	-	-	-	++	-	-	-	+	0,073
111	GB GG19 384	+	-	-	++	-	++	-	-	-	+	0,057
140	GB GH08 310	-	+	-	++	++	++	+	+	+	-	0,044
137	GB GH03 440	+	-	-	++	-	++	-	-	+	+	0,025

Tab. 31 Zusätzliche Daten *E. faecalis* Isolate aus Vaginalabstrichen – BV positiv

G.vg, *Gardnerella vaginalis*; *E.fc*, *E. faecalis*; -, negativer Befund; +, vereinzelter Nachweis; ++, mäßiges Vorkommen; +++, reichliches Vorkommen; *E. coli*, *Escherichia coli*; *M. morgani*, *Morganella morgani*; *E. aerogenes*, *Enterobacter aerogenes*; *K. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*; *U. urealyticum*, *Ureaplasma urealyticum*; *M. hominis*, *Mycoplasma hominis*; *C.*, *Candida* spp.; CC, Clue Cells

Nr. BV	Labor-Code		an-aerob	Döderlein-Flora	Anzahl <i>E.fc</i>	Weitere MO aerob	Mycoplasmen/Ureaplasmen	Pilze	Mikroskopie
157	GB HC20	420	<i>G.vg</i>	-	++	-	-	-	CC
163	GB HC26	361	<i>G.vg</i>	-	++	<i>Citrobacter</i> spp.	-	-	CC
154	GB HCO6	496	<i>G.vg</i>	-	+	-	-	-	CC
53	GB GF13	5273	<i>G.vg</i>	+	++	-	-	-	CC
141	GB GH11	5188	<i>G.vg</i>	+	++	-	-	<i>C. albicans</i>	CC
142	GB GJ17	5153	<i>G.vg</i>	-	++	<i>E. coli</i>	-	-	CC
152	GB HC01	33	<i>G.vg</i>	+	++	-	-	-	CC
10	GB GF01	5272	<i>G.vg</i>	-	++	<i>E. coli</i>	-	<i>C. glabrata</i>	CC
109	GB GG18	5141	<i>G.vg</i>	-	++	-	-	-	CC
149	GB HB16	5049	<i>G.vg</i>	-	++	<i>M. morgani</i>	-	-	CC
138	GB GH04	23	<i>G.vg</i>	-	++	<i>E. coli</i>	-	-	CC
153	GB HB26	587	<i>G.vg</i>	-	+	-	<i>U. urealyticum</i>	-	CC
114	GB GG21	539	<i>G.vg</i>	-	++	-	-	<i>C. albicans</i>	CC
147	GB GJ24	5161	<i>G.vg</i>	+	++	-	Mycoplasmen/Ureaplasmen	-	CC
156	GB HC16	5263	<i>G.vg</i>	-	++	-	Mycoplasmen	-	CC
158	GB HC20	5002	<i>G.vg</i>	-	++	-	-	-	CC
43	GB GF17	7	<i>G.vg</i>	-	++	-	<i>U. urealyticum</i>	-	CC
123	GB GG26	538	<i>G.vg</i>	-	+++	<i>E. coli</i>	-	-	CC
150	GB HB16	60	<i>G.vg</i>	-	++	-	-	-	CC
12	GB GF01	5020	<i>G.vg</i>	-	++	<i>E. aerogenes</i>	-	-	CC
161	GB HC22	31	<i>G.vg</i>	-	++	-	-	-	CC
100	GB GG14	5280	<i>G.vg</i>	-	++	-	-	<i>C. albicans</i>	CC
145	GB GJ23	456	<i>G.vg</i>	-	++	-	<i>M. hominis</i>	-	CC
139	GB GH08	360	<i>G.vg</i>	-	++	<i>E. coli</i>	-	-	CC
146	GB GJ24	760	-	-	++	-	<i>U. urealyticum</i>	-	CC
151	GB HC01	569	<i>G.vg</i>	-	++	-	<i>U. urealyticum</i>	-	CC
164	GB HF13	6005	<i>G.vg</i>	-	++	-	-	-	CC
133	GB GG31	115	<i>G.vg</i>	-	++	<i>E. coli</i>	-	-	CC
160	GB HC21	5007	<i>G.vg</i>	-	++	<i>Citrobacter</i> spp.	-	-	CC
132	GB GG28	316	<i>G.vg</i>	-	++	<i>E. coli</i>	<i>U. urealyticum</i>	-	CC
131	GB GG27	24	<i>G.vg</i>	-	++	<i>E. coli</i>	-	-	CC
165	GB HF19	6012	<i>G.vg</i>	-	++	-	-	-	CC
162	GB HC26	223	<i>G.vg</i>	-	++	<i>E. coli</i>	-	-	CC
80	GB GG11	592	<i>G.vg</i>	-	++	-	-	-	CC
75	GB GG10	629	<i>G.vg</i>	-	++	<i>E. coli</i>	<i>U. urealyticum</i>	-	CC
148	GB GJ27	433	<i>G.vg</i>	-	++	-	-	<i>C. albicans</i>	CC
155	GB HCO6	839	<i>G.vg</i>	-	++	-	Mycoplasmen	-	CC
111	GB GG19	384	<i>G.vg</i>	-	++	-	-	<i>C. albicans</i>	CC
140	GB GH08	310	<i>G.vg</i>	+	++	-	-	-	CC
137	GB GH03	440	<i>G.vg</i>	-	++	<i>K. pneumoniae</i>	<i>U. urealyticum</i>	<i>C. albicans</i>	CC

Tab. 32 Daten *E. faecalis* aus Vaginalabstrichen – BV negativ

Bei allen Stämmen wurde keine Lipase-Produktion nachgewiesen.

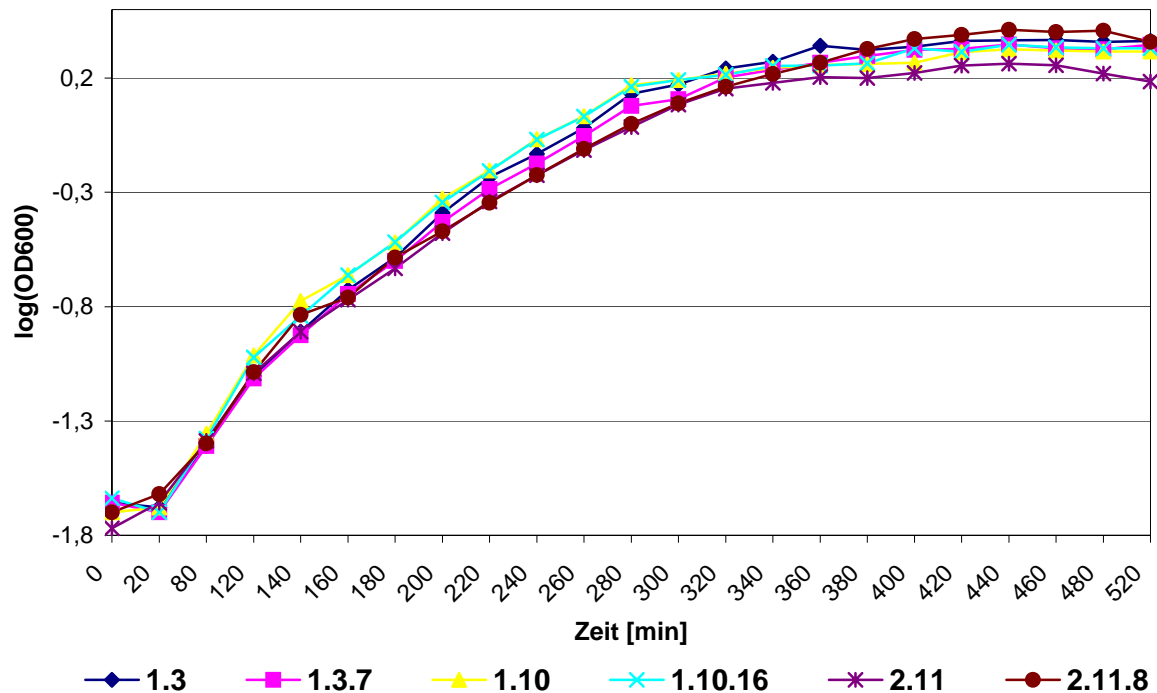
+, positiver Nachweis; -, kein Nachweis des Gens bzw. des Phänotyps; GelE, Gelatinase-Produktion; β -Häm, β -Hämolyse-Nachweis; *cyIA*, *esp*, *asa1*, *gelE*, *bee*, Nachweis der Gene/Loci; H₂O₂, H₂O₂-Produktion, +, schwach, ++, stark; *E.fm* 64/3, *E.fc* JH2-2, Bacteriocin-Produktion gegenüber des Indikatorstamms *E. faecium* 64/3 bzw. *E. faecalis* JH2-2, + (\leq 1 mm), ++ (2-4 mm), +++ (> 4 mm); BF, Biofilm-Bildung, angegeben als OD₅₉₅-Mittelwerte aus mindestens drei Messungen mit jeweils vier Replikaten

Nr. BV	Labor-Code	GelE	β -Häm	DNase	<i>E.fm</i> 64/3	<i>E.fc</i> JH2-2	H ₂ O ₂	<i>cyIA</i>	<i>esp</i>	<i>asa1</i>	<i>gelE</i>	<i>bee</i>	BF
2	GB GE31 5298	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	0,641
3	GB GE31 5341	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	0,414
4	GB GE31 5058	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	2,001
6	GB GE31 358	-	+	-	++	++	-	+	+	+	-	-	0,076
11	GB GF01 5085	-	-	-	-	-	++	-	+	-	+	-	0,644
30	GB GF13 5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	0,105
19	GB GF13 627	-	+	-	++	++	++	+	+	+	-	-	0,095
21	GB GF13 669	-	-	-	-	-	++	-	+	-	+	-	0,304
32I	GB GF13 759	-	+	-	++	++	++	+	+	+	-	-	0,514
32II	GB GF13 759	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	1,638
20	GB GF13 5019	+	-	-	+	++	++	+	-	+	+	+	0,574
52	GB GF13 5021	+	-	-	-	+	++	-	-	+	+	-	0,579
51	GB GF13 5198	-	+	-	++	++	++	+	+	+	+	-	0,212
50	GB GF13 5199	+	-	-	++	+	+	+	-	+	+	-	0,212
39	GB GF13 5217	-	-	-	++	+	+	+	+	+	+	-	0,277
34	GB GF13 5237	+	-	-	++	+	++	+	-	+	+	-	0,099
31	GB GF13 5267	-	+	-	++	++	++	+	+	+	-	-	0,225
33	GB GF13 5269	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	0,208
58	GB GF14 5204	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	0,172
44	GB GF17 5013	+	-	-	++	-	++	-	+	-	+	-	0,224
57	GB GF19 342	-	+	-	++	++	++	+	+	+	-	-	0,114
64	GB GF19 605	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	0,235
56	GB GF19 5007	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	0,389
55	GB GF19 5013	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	0,421
65	GB GF19 5026	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	0,176
29	GB GF21 5114	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+	-	0,109
66	GB GF23 5058	+	-	-	++	++	+	+	-	+	+	-	0,354
41	GB GF27 5010	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	0,439
22	GB GF30 40	-	+	-	++	++	++	+	+	+	-	-	0,182
24	GB GG03 5006	-	-	-	-	-	++	-	+	+	-	-	0,140
25	GB GG03 5015	-	+	-	++	++	+	+	-	+	+	-	0,346
35I	GB GG03 5215	-	-	-	-	++	++	-	+	-	+	-	0,390
35II	GB GG03 5215	-	-	-	-	++	++	-	+	+	+	-	0,357
70	GB GG04 698	+	-	-	++	-	++	-	-	+	+	-	0,198
71	GB GG04 773	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	0,422
38	GB GG04 5006	-	-	+	-	+	++	-	+	+	+	-	0,268
36	GB GG04 5208	-	+	-	++	+++	+	+	+	+	-	-	0,270
61	GB GG05 5253	+	-	-	++	+	++	+	-	+	+	-	0,243
15	GB GG06 607	-	+	-	++	++	++	+	-	+	-	-	0,048
17	GB GG06 5014	+	-	-	-	-	++	-	-	+	+	-	0,042

Tab. 33 Zusätzliche Daten zu den *E. faecalis* Isolaten aus Vaginalabstrichen – BV negativ

E.fc., *E. faecalis*; -, negativer Befund; +, vereinzelter Nachweis; ++, mäßiges Vorkommen; +++, reichliches Vorkommen

Nr. BV	Labor-Code		an-aerob	Döderlein-Flora	Anzahl <i>E.fc.</i>	Weitere MO aerob	Mycoplasmen/Ureaplasmen	Pilze	Mikroskopie
2	GB GE31	5298	-	++	++	-	-	-	-
3	GB GE31	5341	-	+	++	-	-	-	-
4	GB GE31	5058	-	-	++	-	-	-	-
6	GB GE31	358	-	++	++	-	-	-	-
11	GB GF01	5085	-	+	+++	-	-	-	-
30	GB GF13	5	-	+	++	-	-	-	-
19	GB GF13	627	-	+	++	-	-	-	-
21	GB GF13	669	-	+	++	-	-	-	-
32I	GB GF13	759	-	+	+++	-	-	-	-
32II	GB GF13	759	-	+	+++	-	-	-	-
20	GB GF13	5019	-	+	++	-	-	-	-
52	GB GF13	5021	-	+	++	-	-	-	-
51	GB GF13	5198	-	+	++	-	-	-	-
50	GB GF13	5199	-	+	++	-	-	-	-
39	GB GF13	5217	-	+	++	-	-	-	-
34	GB GF13	5237	-	+	++	-	-	-	-
31	GB GF13	5267	-	+	+++	-	-	-	-
33	GB GF13	5269	-	+	++	-	-	-	-
58	GB GF14	5204	-	-	+++	-	-	-	-
44	GB GF17	5013	-	+	++	-	-	-	-
57	GB GF19	342	-	-	+++	-	-	-	-
64	GB GF19	605	-	+	++	-	-	-	-
56	GB GF19	5007	-	+	+++	-	-	-	-
55	GB GF19	5013	-	-	+++	-	-	-	-
65	GB GF19	5026	-	-	++	-	-	-	-
29	GB GF21	5114	-	+	+++	-	-	-	-
66	GB GF23	5058	-	-	+++	-	-	-	-
41	GB GF27	5010	-	-	+++	-	-	-	-
22	GB GF30	40	-	+	+++	-	-	-	-
24	GB GG03	5006	-	+	+++	-	-	-	-
25	GB GG03	5015	-	-	+++	-	-	-	-
35I	GB GG03	5215	-	+	+++	-	-	-	-
35II	GB GG03	5215	-	+	+++	-	-	-	-
70	GB GG04	698	-	-	+++	-	-	-	-
71	GB GG04	773	-	-	+++	-	-	-	-
38	GB GG04	5006	-	+	+++	-	-	-	-
36	GB GG04	5208	-	-	+++	-	-	-	-
61	GB GG05	5253	-	-	+++	-	-	-	-
15	GB GG06	607	-	-	+++	-	-	-	-
17	GB GG06	5014	-	+	+++	-	-	-	-



	1.3	1.3.7	1.10	1.10.16	2.11	2.11.8
μ [1/min]	0,013	0,013	0,014	0,014	0,011	0,011
t_d [min]	53,3	53,3	48,4	49,1	63,3	62,3

Abb. 36 Wachstumskurven der *E. faecalis* Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämmen

Halblogarithmische Darstellung der Wachstumskinetiken, ermittelt durch OD₆₀₀-Messungen einer Kultur in TSBG, inkubiert bei 37°C und 100 rpm; μ , Wachstumskonstante; t_d , Generationszeit; μ und t_d jeweils berechnet aus linearem Abschnitt der exponentiellen Phase der Wachstumskurve.

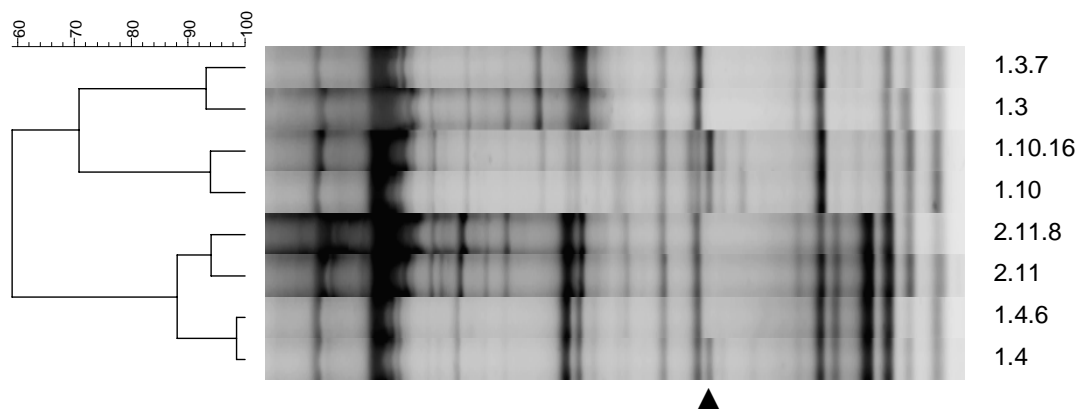


Abb. 37 Dendrogramm der BOXA2R-PCR zur Typisierung der *E. faecalis* Wildtyp- und Biofilm-Mutanten

Auswertung der digitalisierten Bilder der entstandenen Fingerprint-Bandenmuster mittels BioNumerics Software; Analyse zum Clustering der Isolate mittels des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (Produkt-Moment-Korrelation) und des UPGMA Algorithmus (MRI, Karlsruhe); ▲, Hinweis auf eine deutliche Bande im Fingerprint-Muster des Stamms 1.4, die im Profil des 1.4.6 nicht auftrat.

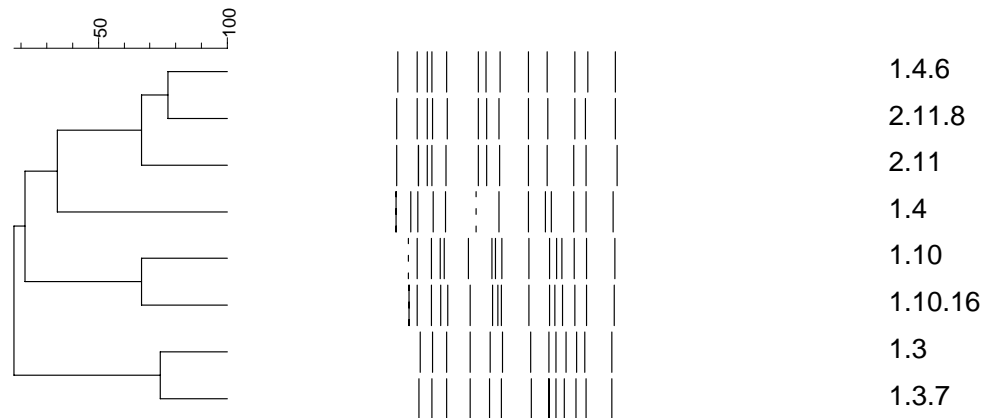


Abb. 38 Dendrogramm (schematisches Cluster) der PFGE-Fingerprintmuster zur Typisierung der *E. faecalis* Wildtyp- und Biofilm-Mutantenstämme

Auswertung der digitalisierten Bilder der entstandenen PFGE-Bandenmuster mittels BioNumerics Software; Analyse zum Clustering der Isolate mittels des Dice-Koeffizienten und des UPGMA Algorithmus (MRI, Karlsruhe).

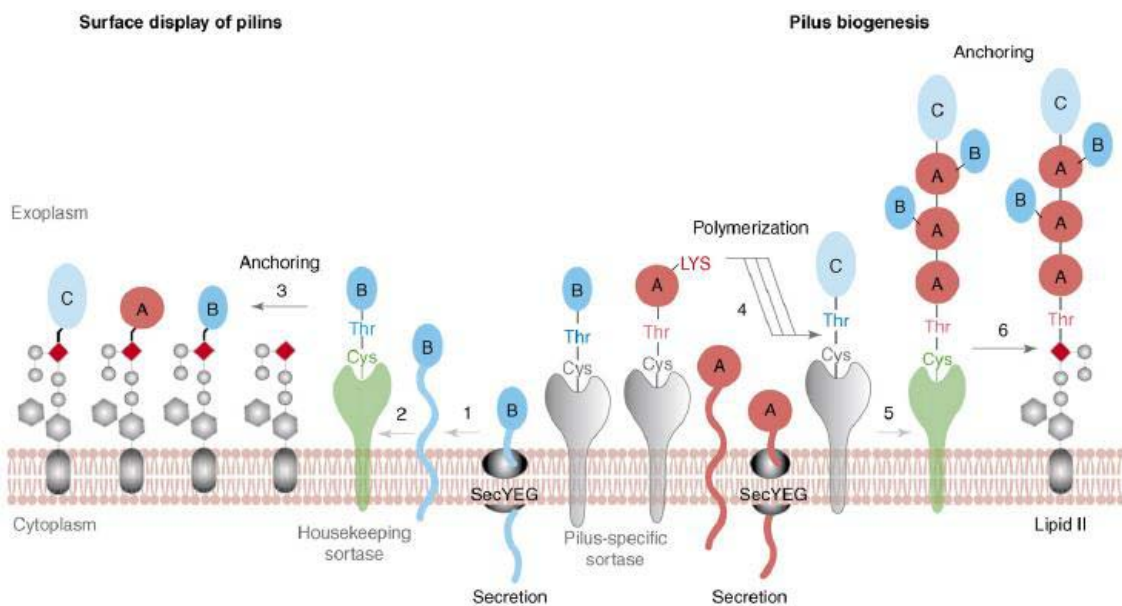


Abb. 39 Modell der Biogenese von Pili (Mandlik *et al.*, 2008)

Dargestellt am Beispiel der SpaABC-Pili bei *Corynebacterium diphtheriae* (Ton-That & Schneewind, 2003; Ton-That *et al.*, 2004); Vorläufer der Pili-Proteine (SpaA, hellrot; SpaB, dunkelblau; SpaC, hellblau) werden im Cytoplasma synthetisiert und durch die Membran über den Sec-Komplex translokalisiert (Schritt 1); die Vorläufer bilden daraufhin Acyl-Enzym-Intermediate mit Housekeeping-Sortasen (grün, Schritt 2) oder Pili-spezifischen Sortasen (grau); diese Vorläufer können dann an Lipid II Vorläufern transferiert werden, so dass Pili-Monomere mit der Zellwand verankert werden (Schritt 3); Pili-spezifische Sortasen katalysieren die Pilus-Polymerisation (Schritt 4); die Pilus-Polymerisation endet mit dem Transfer auf Lipid II, was auf zwei verschiedenen Wegen vonstatten gehen kann: entweder wird das Pili-Polymer von der Sortase auf die Housekeeping-Sortase, die ein SpaA-Monomer bindet, übertragen (Schritt 5) und diese überträgt dann das Polymer auf das Lipid II (Schritt 6); oder die Pili-spezifische Sortase überträgt das Polymer direkt auf das Lipid II (nicht dargestellt); rote Quadrate stellen den D-Diaminopimelinsäure-Rest der Pentapeptide der Zellwand dar.

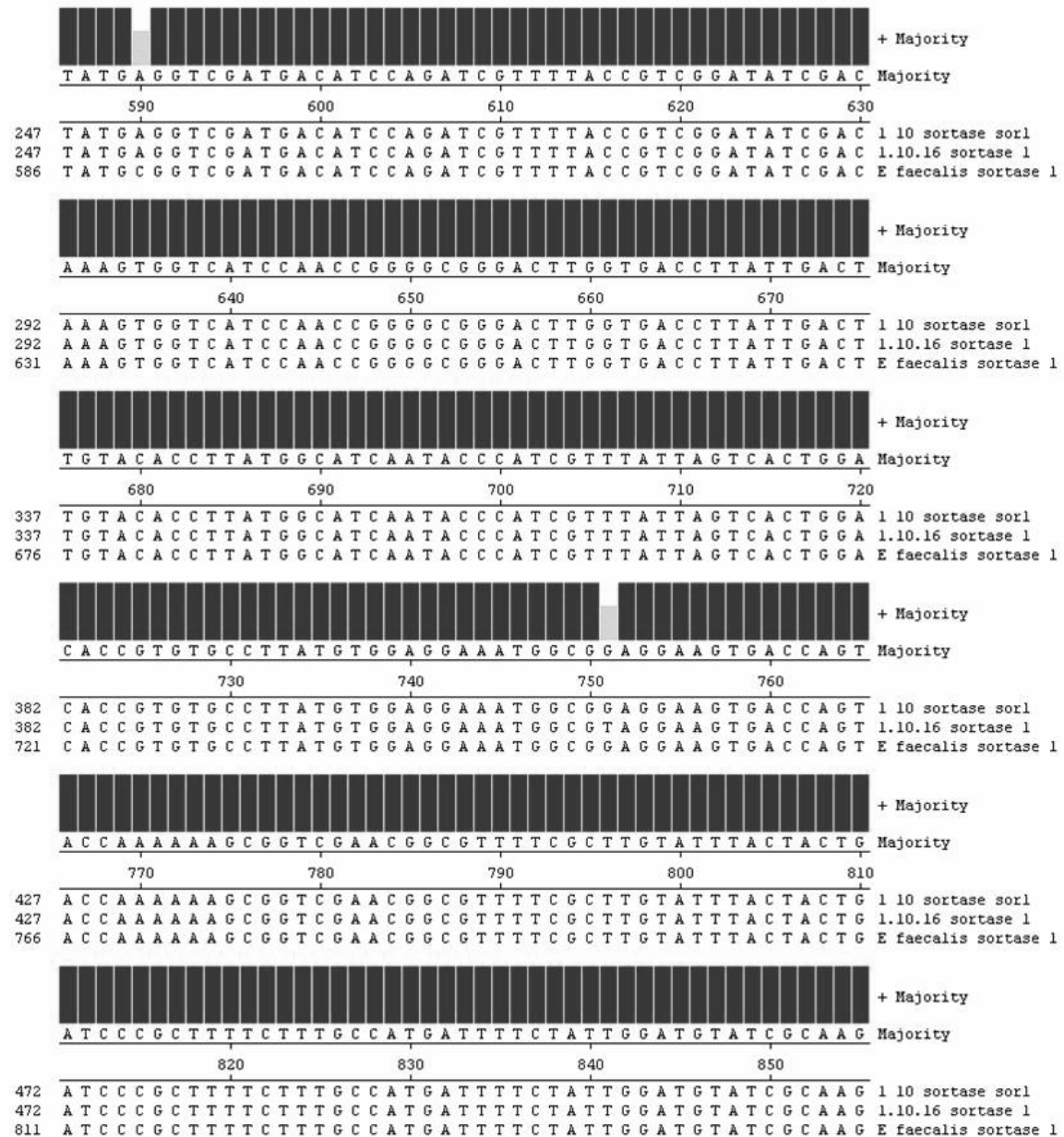


Abb. 40 Vergleich der DNA-Sequenzen eines Teilbereichs der Sortase-1 des *bee* Locus der *E. faecalis* Stämme 1.10, 1.10.16 und E99

Punktmutation an Position 751 (G→T) bei der Mutante 1.10.16; erkennbar sind weitere Unterschiede zur publizierten Sequenz des Stamms *E. faecalis* E99 (Tendolkar *et al.*, 2006), die jedoch sowohl im Wildtyp 1.10 und der Mutante 1.10.16 auftraten; Alignment durchgeführt mit Hilfe der Software MegAlign 7.0 (DNASTAR Lasergene Software; MRI Karlsruhe); dunkle Balken, Übereinstimmung der Sequenz bei allen drei analysierten Stämmen; helle Balken, Sequenzübereinstimmung bei zwei von drei analysierten Stämmen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt sowie keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß anderen veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, 20.12.2008

Susanne Schlüter

Tag der Disputation: 31.03.2009
1. Gutachter: Prof. Dr. F. Schmidt
2. Gutachter: Prof. Dr. K. Baczko

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Schmidt und Prof. Dr. Baczko für die Begutachtung dieser Dissertation sowie ihre freundliche und kooperative Unterstützung. Weiterhin möchte ich Dr. Seewald vom Institut für Labormedizin des Klinikums Kassel, der Laborgemeinschaft Hülsmann/Baczko/Becker in Kassel (jetzt MVZ Kassel) sowie PD Dr. Koch vom Labor WagnerStibbe in Göttingen gebührenden Dank für ihre Unterstützung zukommen lassen, durch die diese Arbeit ermöglicht wurde.

Mein unsagbar großer Dank gilt PD Dr. Charles M.A.P. Franz (Max Rubner-Institut in Karlsruhe) für unzählige Anregungen und weiterführende Diskussionen, wertvolle Hilfestellungen und sonstige fachliche Unterstützung, durch die diese Arbeit immer wieder enorm vorangetrieben wurde.

Bei Prof. Dr. Herberg (Abteilung Biochemie der Universität Kassel) möchte ich mich für die Unterstützung bedanken, die mir über die Förderung im Rahmen des Promotionskollegs Proteomics zugekommen ist. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Frank Gesellchen für das fortwährende Interesse an meiner Arbeit und die fruchtbaren Diskussionen sowie seine große Hilfe bei statistischen Auswertungen. Ebenso danke ich Oliver Bertinetti für seine Hilfsbereitschaft zur Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Vielen Dank möchte ich ebenfalls Prof. Dr. Maniak und den Mitarbeitern der Abteilung Zellbiologie der Universität Kassel für ihre Unterstützung während der Durchführungen zur CLSM und REM aussprechen.

Mein herzlicher Dank geht an alle Arbeitskollegen der Abteilung Mikrobiologie für die stets gute Kooperation und angenehme Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders danke ich Dr. Cornelia Janusch, Christian Eichler, Sebastian Koch und Karsten Peters für ihre ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich von Herzen bei meiner Arbeitskollegin und Freundin Conny Pfeiffer, geb. Schniebs, die zwischenzeitlich leider verstorben ist. Niemals werde ich die Zeit, die ich mit ihr im Labor und privat verbringen konnte, ihre Herzlichkeit, positive Denkweise und überragende Stärke vergessen.

Ein liebes Dankeschön gilt Frank und meiner Familie für ihre Hilfen jeglicher Art und ihr großes Verständnis, ermutigende Worte sowie zahlreiche Entbehren während dieser Zeit.