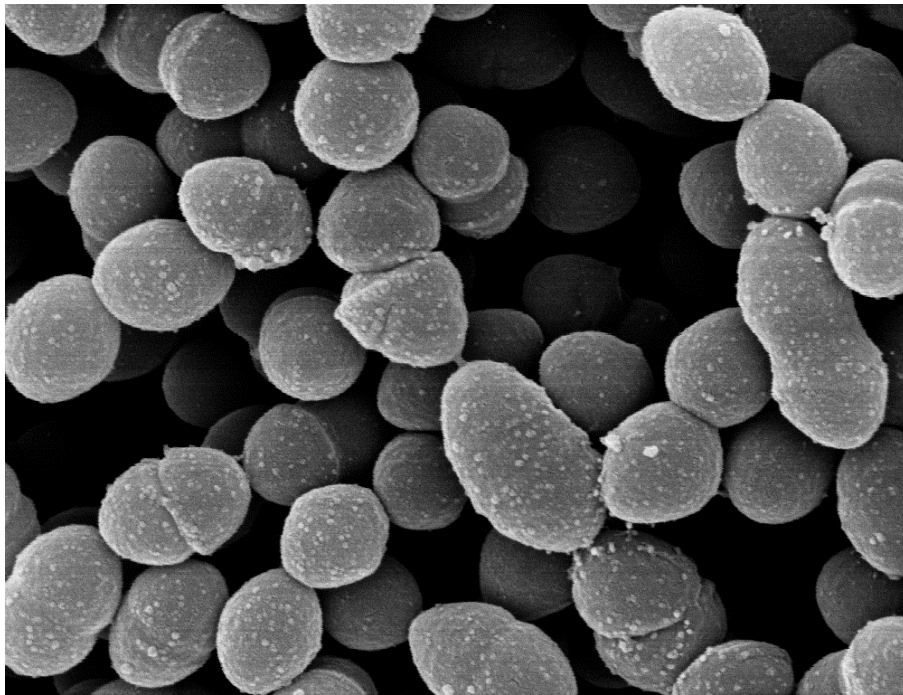


Untersuchungen zur Biofilmbildung
bei dem klinischen Isolat
Enterococcus faecalis 1.10



INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich 10
Mathematik & Naturwissenschaften
der Universität Kassel

Vorgelegt von
Christian Eichler
Kassel, März 2013

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Raffael Schaffrath
2. Gutachter: Herr Dr. Friedrich Schmidt

Disputation: 07.06.2013

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe Dritter angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Dritte waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Dissertation nicht beteiligt; insbesondere habe ich hierfür nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, den 20.03.2013

Christian Eichler

Danksagung

Ich danke zu allererst meinen beiden Betreuern und Gutachtern, Herrn Prof. Dr. Friedrich Schmidt und Herrn Prof. Dr. Raffael Schaffrath für Ihre Unterstützung und Betreuung in den letzten viereinhalb Jahren. Danke, dass ich solange Euer Vertrauen genießen durfte und Ihr mir hilfreich zur Seite standet.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Friedrich Herberg und die gesamte Abteilung Biochemie für Ihre Hilfe und Betreuung in den ersten 2 Jahren meiner Doktorandenzeit. Hierbei möchte ich besonders Herrn Oliver Bertinetti hervorheben, der mir stets eine große Hilfe bei allen Massenspektrometrischen Analysen war.

Ebenso danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie, Herrn Karsten Peters, Frau Birgit Jaeger, Herrn Dr. Christian Bär, Herrn Andre Jüdes, Herrn Dr. Wael Mohamed, Herrn Dr. Roland Klassen, Frau Dr. Susanne Schlüter, Frau Sabine Krolczyk, Herrn Daniel Jablonowski sowie allen Studenten, die mir mehr oder weniger Beiseite standen, für deren Hilfe, Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanke ich mich bei Cindy Brachmann und Sebastian Koch für das Korrekturlesen meiner Arbeit und dass Sie daran nicht verzweifelt sind.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern, möchte ich hiermit für jegliche Hilfen, Unterstützungen, Geduld und den Glauben an mich im Besonderen danken. Meiner verstorbenen Oma kann ich nun endlich zeigen, dass am Ende doch ein Dr. Biomann bei rausgekommen ist.

Liebe Tasje, meinen größten Danke möchte ich Dir aussprechen. Danke, dass du mir die letzten 3 Jahre immer zu Seite standst und mir Kraft, Halt und Liebe gegeben hast. Wahrscheinlich bin ich nur durch Dich so „entspannt“ durch die Zeit gekommen.

Publikationen und wissenschaftliche Beiträge als Auszüge dieser Arbeit:

Poster:

- **Christian Eichler** und Raffael Schaffrath: "The Bee pilus: Biofilm formation in *Enterococcus faecalis*", Zweite Tagung des Molecular Microbiology Meeting Würzburg (M3W2), April 2012
- **Christian Eichler**, R. Schaffrath, F. Herberg und F. Schmidt: „Does the *bee*-locus encode an additional and/or alternative pilus in *Enterococcus faecalis*?“, Zweite Tagung der International Conference on antimicrobial research (II ICAR), November 2012
- **Christian Eichler** & Raffael Schaffrath, „The meaning of pili in *Enterococcus faecalis*“, Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) gemeinsam mit der Koninklijke Nederlandse Vereniging voor Microbiologie (KNVM), März 2013

Buchbeitrag:

- **Christian Eichler**, F. Herberg, F. Schmidt und R. Schaffrath: Does the *bee* locus encode an additional or alternative pilus in *Enterococcus faecalis*? "Worldwide Research Efforts in the Fighting against Microbial Pathogens: From Basic Research to Technological Developments", A. Mendez-Vilas, BrownWalker Press 2013 (134-138) ISBN-13: 978-1-61233-636-7

Errichtung des Gentechniklabors der Sicherheitsstufe 2

Die geplanten Experimente dieser hier vorliegenden Arbeit beinhalteten zum Teil gentechnische Manipulationen an dem Sicherheitsstufe-2 Mikroorganismus *Enterococcus faecalis*. Diese Notwendigkeit ergab sich aus der Veröffentlichung von Schlüter *et al.* (2009), in der die Komplementation eines defekten Gens als abschließender Beweis zur Besätigung der gezeigten Ergebnisse gefordert wurde.

Um diese Folge leisten zu können, waren ausgiebige Recherchen zu den Experimenten, sowie zu den räumlichen Bedingungen und Voraussetzungen für den gentechnischen Umgang mit Mikroorganismen der Sicherheitsstufe 2 nötig. Eine Etablierung eines S2-Labors hatte zuvor noch nie an der Universität Kassel stattgefunden, sodass kein Vorwissen im Kollegenkreis vorhanden war, woraus eine lange und ausgiebige Bearbeitungszeit folgte.

Im einem zeitlichen Umfang von ca. 9 Monaten wurden alle Informationen zu den verwendeten Organismen, Vektoren und den geplanten Experimenten zusammengetragen und schließlich in Ab- und Rücksprache mit dem Regierungspräsidium Gießen der entsprechende Antrag formuliert werden. Des Weiteren mussten für die räumlichen Voraussetzungen neue Geräte bezogen sowie kleinere bauliche Änderungen vorgenommen werden.

Zusätzlich wurden weitere Behörden wie zum Beispiel das Gesundheitsamt, der Brandschutz und die Entwässerungsbetriebe involviert und deren entsprechenden Forderungen und Auflagen für den Betrieb eines S-2 Labors erfüllt.

Erst ab Juli 2010 konnte nach Genehmigung des Antrags mit den Arbeiten begonnen werden. Während des gesamten Prozess war ich, Christian Eichler, neben Herrn Prof. Friedrich Schmidt hauptverantwortlich für den Austausch mit den beteiligten Personen sowie der Anfertigung des Antrags an sich.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Komplementation haben gezeigt, dass das defekte *srt1* Gen in *E. faecalis* 1.10 für die geschwächte Biofilmbildung verantwortlich war. Die mit dem wt-Allel komplementierte Mutante 1.10.16 K wies eine dem Isolat ähnliche Biofilmstärke auf. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Sortase Srt1 den Einbau von Bee2 in den intakten Pilus bewirkt. Ebenfalls lassen die REM-Analysen eine Beteiligung der Sortase 1 am Zusammenbau der Bee1 Untereinheiten vermuten.

Mittels der Experimente zur Oberflächenbiotinylierung konnten vielversprechende Ergebnisse erzielt werden, die neue Faktoren der Biofilmbildung bei Isolat 1.10 erwarten lassen. Hierzu müssen massenspektrometrische Analysen der Proteinbanden erfolgen, um so Aufschlüsse über die Identität der nachgewiesenen Proteine zu ergeben.

Die Analysen zu den beiden für *E. faecalis* beschriebenen Pili zeigten die große Bedeutung dieser am Prozess der Biofilmbildung. Durch Defekte wie Punktmutationen oder Insertionen von IS-Elementen in den jeweiligen Gen-Loci kommt es zu keiner Bildung der entsprechenden Pili. Dieser die Biofilmbildung schwächende Defekt kann durch die Akquirierung eines zweiten Pilus-Locus, wie des *bee*-Locus im Falle von Isolat 1.10 kompensiert werden. Doppelt Pilus-negative *Enterococcus faecalis* Stämme wie die Mutante 1.10.16 zeigen eine deutliche Reduzierung der Biofilmbildungsstärke und zeigt so die große Bedeutung von Pili bei der Biofilmbildung von *Enterococcus faecalis*.

Die Einflüsse des durch die Insertion wahrscheinlich inaktivierten Transkriptionsregulators PerA können nicht abschließend beurteilt werden. Das Wachstumsverhalten in Standardmedium wird aber nicht negativ beeinflusst. Komplementierung mit dem wt-*perA* Gen würde hier weitere Erkenntnisse liefern.

Der genetische Hintergrund aus vorhandenen Genen und Insertionselementen des Isolats 1.10 lässt auf einen Zusammenhang zum probiotischen Stamm *E. faecalis* Symbioflor-1 vermuten. Dies zu bestätigen, ist Aufgabe weiterer Experimente.

Die Transposonmutagenese mittels Transposom Kit EzTn5 ist für *Enterococcus faecalis* nicht geeignet. Es müssen daher alternative Mutagenesestrategien in Zukunft genutzt werden um neue Biofilmbildungsfaktoren aufzudecken.

Inhalt

Publikationen und wissenschaftliche Beiträge als Auszüge dieser Arbeit:	
Errichtung des Gentechniklabors der Sicherheitsstufe 2	
Zusammenfassung	
I) Abkürzungsverzeichnis.....	V
II) Tabellenverzeichnis.....	VIII
III) Abbildungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung.....	1
1.1 Enterokokken und deren Rolle als Pathogene	1
1.2 Multiresistenz und Biofilmbildung	5
1.3 Biofilmbildung & Struktur	9
1.4 Kriterien einer Biofilminfektion.....	11
1.5 Multiresistenz bei Enterokokken	12
1.6 Virulenz- & Biofilmfaktoren.....	14
1.6.1 Pili und LPxTG Proteine sowie Sortasen.....	15
1.6.1.1 Der <i>ebp</i> -Locus	17
1.6.1.2 Der <i>bee</i> -Locus	18
1.6.1.3 LPxTG Proteine	19
1.6.2 Gene des Stoffwechsels.....	20
1.6.2.1 <i>epa</i> -Operon.....	20
1.6.2.2 <i>bop/mal</i> -Locus	21
1.6.2.3 Weitere Faktoren	21
1.6.3 Regulatorische Gene.....	22
1.6.3.1 Das <i>perA</i> -Gen	22
1.6.3.2 Das <i>ebrA</i> -Gen.....	23
1.6.4 Quorum Sensing/ <i>fsr</i> -Locus.....	23
1.6.5 Autolysine, Cytolysin und Hyaluronidase.....	25

1.6.6 Weitere Faktoren	25
1.7 Isolat 1.10 und Mutante 1.10.16.....	29
2. Zielsetzung	30
3. Material und Methoden	31
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	31
3.2 Nährmedien & Chemikalien	33
3.3 Kits	34
3.4 Antikörper.....	35
3.5 Bakterienstämme und Plasmide	35
3.6 Enzyme & Längenstandards	36
3.7 Primer	37
3.8 Phänotypische Standardmethoden	43
3.8.1 Kultivierung von MO	43
3.8.2 Wachstumskurve	43
3.8.3 Minimale Hemmende Konzentration (MHK)	44
3.8.4 Biofilmassay	44
3.9 Rasterelektronenmikroskopie.....	45
3.10 Plasmid-Transfer und -Eliminierung.....	45
3.10.1 Filtermating.....	45
3.10.2 Curing.....	46
3.11 Transformationen	47
3.11.1 Chemisch kompetente <i>E. coli</i>	47
3.11.2 Elektrisch kompetente <i>E. coli</i>	47
3.11.3 Elektrisch kompetente <i>E. faecalis</i>	48
3.12 Molekularbiologische Experimente.....	49
3.12.1 DNA-Extraktion.....	49
3.12.1.1 Schnellpräparation für PCR.....	49
3.12.1.2 Gesamt-DNA-Isolierung (mechanischer Zellaufschluss).....	49

3.12.1.3 Plasmidextraktion.....	49
3.12.1.4 DNA-Aufreinigung	50
3.12.2 PCRs	51
3.12.2.1 Dream <i>Taq</i> -Polymerase	51
3.12.2.2 Phusion-Polymerase	51
3.12.3 Klonierungen	52
3.12.3.1 Restriktionsanalyse	52
3.12.3.2 BluntEnd mit T4-Polymerase.....	52
3.12.3.3 Phosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase	52
3.12.3.4 Ligation mit T4-Ligase.....	53
3.12.4 Knockout Strategie	54
3.12.5 Komplementationsstudie	57
3.12.6 Transposon-Mutagenese.....	59
3.12.7 RNA-Extraktion.....	60
3.12.8 RT-PCR/cDNA Generierung.....	60
3.13 Proteinbiochemische Experimente.....	61
3.13.1 Gesamtproteinextraktion	61
3.13.2 SDS-PAGE	62
3.13.3 Massenspektrometrie	63
3.13.4 Oberflächenprotein–Biotinylierung & Aufreinigung mittels Dynabeads ...	64
3.13.5 Westernblot-Analyse	66
4. Ergebnisse.....	67
4.1 Wachstumsverhalten des Isolats 1.10 und der Mutante 1.10.16 im Vergleich	67
4.2 Biofilm- & Virulenzfaktoren.....	68
4.3 Komplementationsstudie.....	71
4.3.1 Biofilmassay	71
4.3.2 SDS-PAGE und Massenspektrometrie	73
4.3.3 Transkriptionsanalyse via RT-PCR.....	74
4.3.4 Rasterelektronenmikroskopie	76

4.4 Entdeckung weiterer Oberflächenproteine/Biofilmfaktoren bei Isolat	
<i>E. faecalis</i> 1.10	78
4.4.1 Transposonmutagenese mittels Ez <i>Tn5</i> Transposom Kit	78
4.4.2 Oberflächenprotein Biotinylierung.....	78
4.5 Der Ebp-Pilus von Isolat 1.10.....	79
4.6 Knockout Analysen	84
4.7 Transfer der <i>bee</i> -Locus Gene auf biofilmmnegativen Stamm <i>E. faecalis</i> V583 .	86
5. Diskussion	89
5.1 Komplementation	89
5.2 Neue Biofilmfaktoren.....	92
5.3 Insertionselemente.....	94
5.4 Die zwei Pili von <i>E. faecalis</i>	97
5.5 Inaktivierung der <i>bee</i> -Locus Gene.....	101
5.6 Transfer des <i>bee</i> -Locus	102
5.7 Biofilmbildung- und Virulenzfaktoren.....	103
6. Ausblick	107
7. Literatur	108
8. Anhang	117

I) Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ...	Mikro...
A. bidest	Aqua bidestillata
AB	Antibiotika
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure oder Aggregationssubstanz
ATCC	American Type Culture Collection
<i>bee</i>	Gen-Cluster, biofilm enhancer in <i>Enterococcus</i>
BF	Biofilm
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CFU	Colony Forming Unit
CWSS	Cell Wall Sorting Signal
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. fc</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. fm</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>esp</i>	Gen für das Enterococcal surface protein Esp
<i>et al.</i>	et alii
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
for	forward (Primer)
<i>fsr</i>	QS-kontrollierter Genlocus <i>fsr</i> (<i>E. faecalis</i> regulator)

g	Gramm
GeIE	Gelatinase
GBAP	gelatinase biosynthesis-activating pheromone
h	hour / hours, Stunde / Stunden
HGT	Horizontaler Gen Transfer
HMW	high molecular weight
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPxTG	Leucin, Prolin, variable Aminosäure, Threonin, Glycin
M	Marker
M	Molarität
m...	milli...
MHK	Minimale hemmende Konzentration
min	Minute / Minuten
MSCRAMMs	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
MO	Mikroorganismus / Mikroorganismen
nm	Nanometer
OD ₅₉₅	optische Dichte bei 595 nm
p.a.	per analysis
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis, Pulsfeldgelelektrophorese
PK	Positivkontrolle
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
QS	Quorum Sensing
REM	Rasterelektronen-Mikroskopie
rev	revers (Primer)
RKI	Robert Koch Institut

RNA	Ribonucleicacid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tab.	Tabelle
TAE	Tris acetate acid EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
<i>tetM</i>	Gen für Tetrazyklin-Resistenz über Targetveränderung
THB	Todd Hewitt Broth
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
UTI	urinary tract infection, Harnwegsinfektion
UPEC	Uropathogene <i>Escherichia coli</i>
VF	Virulenzfaktor / -faktoren
V	Volt
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
vs	versus
wt	Wildtyp

II) Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Enterokokkenisolate: Zusammenhang zwischen Isolaten und Biofilmbildung	4
Tab. 2 Antibiotikaresistenzen der beiden wichtigen humanpathogenen Enterokokken Spezies (nach Stock, 2010)	12
Tab. 3 Virulenz- und Biofilmbildungsfaktoren (erweiterte Version nach Paganelli <i>et al.</i> , 2012)	27
Tab. 4 Bakterienstämme	35
Tab. 5 Plasmide	36
Tab. 6a Restriktionsenzyme	36
Tab. 6b Enzyme	36
Tab. 6c Längenstandards	36
Tab. 7 Primerverzeichnis	37
Tab. 8a Dream <i>Taq</i> -Polymerase	51
Tab. 8b Phusion-Polymerase	51
Tab. 9a Restriktionsansatz	52
Tab. 9b Blunting	52
Tab. 9c Dephosphorylierung	53
Tab. 9d Ligationsansatz BluntEnd	53
Tab. 9e Ligationsansatz StickyEnd	53
Tab. 10 Primerkombinationen für KO-Plasmide	54
Tab. 11 Zusammensetzung PAA-Gele	62
Tab. 12 Gene der Biofilmbildung/Virulenz bei <i>E. faecalis</i>	68
Tab. 13 pAT28 Konstrukte der zu transferierenden <i>bee</i> -Locus Gene	86

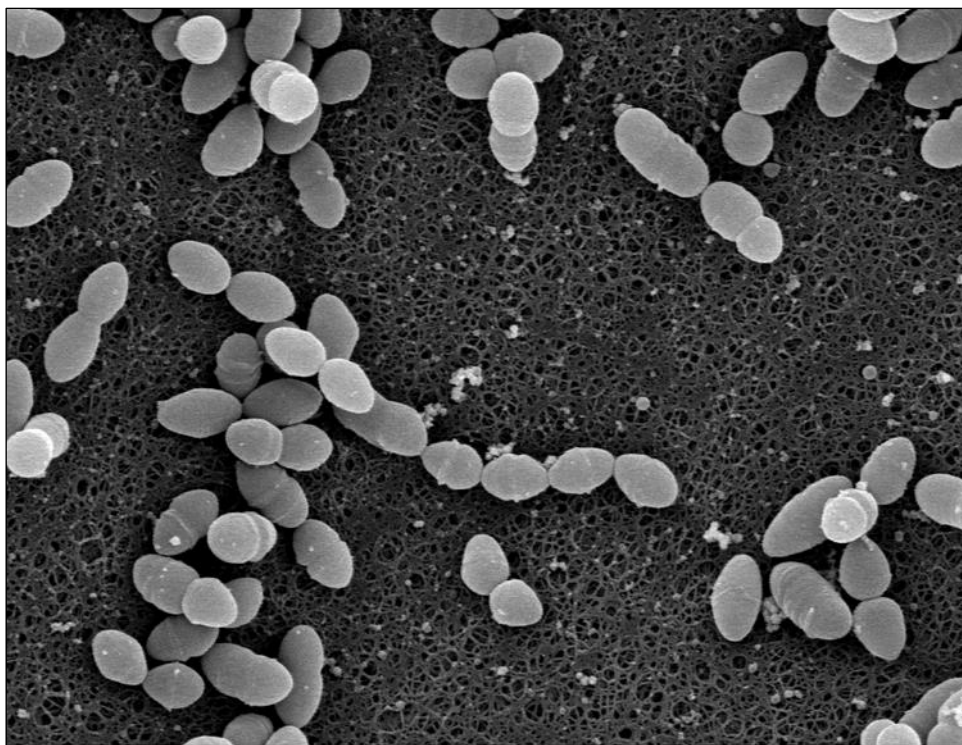
III) Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Rasterelektronenmikroskopie von <i>E. faecalis</i> Isolat 1.10	1
Abb. 2 Mechanismen der verminderten Antibiotika-Wirksamkeit und Immunabwehr	6
Abb. 3 Biofilmbildungsprozess nach Monroe (2007)	9
Abb. 4 Struktur eines Biofilms (Donlan&Costerton, 2002)	10
Abb. 5 Schematische Darstellung der Biofilmfaktoren bei <i>E. faecalis</i> (Paganelli <i>et al.</i> , 2009)	14
Abb. 6 Pili bei Grampositiven MO (Scott & Zahner, 2006)	15
Abb. 7 Pilus-Loci bei Grampositiven MO (Scott & Zahner, 2006)	16
Abb. 8 Aufbau des <i>ebp</i> -Locus (Nallapareddy <i>et al.</i> , 2006)	17
Abb. 9 Aufbau des <i>bee</i> -Locus (Tendolkar <i>et al.</i> , 2006)	18
Abb. 10 HMW Komplex des Bee-Pilus (Schlüter <i>et al.</i> , 2009)	19
Abb. 11 Aufbau des <i>epa</i> -Operons von <i>E. faecalis</i> OG1RF (Teng <i>et al.</i> , 2009)	20
Abb. 12 Aufbau des <i>bop/mal</i> -Operons bei <i>E. faecalis</i>	21
Abb. 13 Pathogenitätsinsel aus <i>E. faecalis</i> MMH594 im Bereich des <i>perA</i> Gens	22
Abb. 14 Quorum Sensing – Der <i>fsr</i> -Locus (Nakayama <i>et al.</i> , 2006)	24
Abb. 15 Shuttlevektor pAT28 (Trieu-Cuot <i>et al.</i> , 1990)	55
Abb. 16 KO-Konstrukt für <i>srt2</i> Gen	55
Abb. 17 Doppel Cross Over	56
Abb. 18 Plasmidkarte pTCV/ <i>lac</i> (Poyart & Trieu-Cuot, 1997)	57
Abb. 19 Komplementation <i>srt1</i>	58
Abb. 20 Ez-Tn5 TM Transposon Mutagenese	59
Abb. 21 Oberflächenproteinbiotinylierung	65
Abb. 22 Wachstumskurve der beiden Stämme im Vergleich	67
Abb. 23 Vergleich der PAI im Bereich des <i>perA</i> Gens	70
Abb. 24 Biofilmassay im Mikrotitermaßstab	72
Abb. 25 Biofilmassay: OD ₅₉₅ -Messungen	72
Abb. 26 SDS-PAGE Gesamtproteinextrakte	73
Abb. 27 mRNA Analyse der Sortase-Gene des <i>bee</i> -Locus	74
Abb. 28 Rasterelektronenmikroskopie	76
Abb. 29 SDS-PAGE Oberflächenbiotinylierung	78
Abb. 30 Westernblot: HMW Ebp-Pilus	80
Abb. 31 Diagnostische PCR zu drei Genen des <i>ebp</i> -Locus	81
Abb. 32 Neuordnung des <i>ebp</i> -Locus bei Isolat 1.10	82
Abb. 33 mRNA Analyse des <i>ebpR</i> Gens	83
Abb. 34 mRNA Analyse des <i>ebpC</i> Gens	84
Abb. 35 Diagnostische PCR zum Nachweis der homologen Rekombination	85
Abb. 36 Westernblot: Einfluss der <i>bee</i> -locus Gene auf Bildung des Ebp-Pilus	87
Abb. 37 Genetischer Pilus Hintergrund bei <i>E. faecalis</i> 1.10, 1.10.16 & 1.10.16K	98

1. Einleitung

1.1 Enterokokken und deren Rolle als Pathogene

Die Gattung der Enterokokken gehört zur Familie der Enterococcaceae, welche innerhalb der Ordnung der Milchsäurebakterien angesiedelt ist. Sie werden auch als Streptokokken der Gruppe D bezeichnet, da sie das für Streptokokken typische Lancefield-Antigen D besitzen (Vu & Carvalho, 2011). Aus diesem Grund wurden sie bis 1984 auch noch zur Gattung *Streptococcus* gezählt, bis sie dann den eigenen Gattungsnamen *Enterococcus* erhielten. Bis heute sind 38 verschiedene Spezies wissenschaftlich beschrieben worden, wobei deren Vorkommen sich wirtsspezifisch unterscheidet und nur diejenigen menschlichen und tierischen Ursprungs detailliert beschrieben wurden (Vu & Carvalho, 2011).



10kV, 7000x,

— 3 µm —

Abb. 1 Rasterelektronenmikroskopie von *E. faecalis* Isolat 1.10.

Für die REM Aufnahmen wurden Zellen auf Agar(Hintergrund) präpariert und analysiert. Die kugelförmigen Zellen treten als Paare und kurze Ketten auf. Häufig befinden sich die etwa 1 µm großen Enterokokkenzellen gerade in Teilung (Septenbildung).

Von besonderem Interesse hierbei waren vor allem die beiden potenziell humanpathogenen Spezies *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) und *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), sowie die beiden natürlich Vancomycin resistenten Spezies

Enterococcus gallinarum und *Enterococcus casseliflavus* (Cetinkaya *et al.*, 2000; Murray, 1990). Zusätzlich werden noch die Spezies *Enterococcus durans* und *Enterococcus raffinosus* diagnostiziert. Die in der als „Non-faecium-non-faecalis“ zusammengefassten Gruppe sind aber nur für 0,2 – 2 % aller Enterokokkeninfektionen verantwortlich (Stock, 2010).

Es handelt sich bei Enterokokken um grampositive, Katalase-negative, fakultativ anaerobe Kokken, die einzeln, paarweise oder in kurzen Ketten vorkommen (Abb. 1). Aufgrund ihrer hohen Widerstandsfähigkeit können sie gut in der Umwelt überleben. Sie tolerieren sehr hohe Salzkonzentrationen von 6,5 % NaCl und sind außerdem bei Temperaturen zwischen 5 und 50 °C lebensfähig. Des Weiteren widerstehen sie problemlos pH-Werten in Bereichen von 4,5 bis 10. Diese Eigenschaften verleihen ihnen auch den Charakter typischer Indikatorkeime, neben *Escherichia coli* (*E. coli*), für fäkale Verunreinigungen von Gewässern. Ebenso ermöglichen diese breit gefächerten Toleranzeigenschaften die Kolonisierung vielfältiger Lebensnischen (Gilmore *et al.*, 2002; Vu & Carvalho, 2011).

Als Teil der gesunden Darmflora der meisten Säugetiere besiedeln sie die Darmepithelien und verhindern so eine Besiedlung durch coliforme Schadkeime. Dieser Vorgang wird schon durch die Aufnahme der Muttermilch eines Säuglings eingeleitet wie Albesharat *et al.* (2010) gezeigt haben. Ihnen wird eine positive Rolle beim Verdauungsvorgang zugesprochen, weshalb sie auch als probiotische Kulturen in der Lebensmittelindustrie Verwendung finden (Becquet, 2003; Noguchi *et al.*, 2011). Sie normalisieren die Darmflora in diesem Zusammenhang und beugen Durchfallerkrankungen vor bzw. werden bei Behandlung solcher eingesetzt. Die probiotischen Eigenschaften werden schon seit mehreren Jahrzehnten von diversen Firmen genutzt, indem Enterokokkenhaltige Präparate zur Behandlung von Magen-darm-Erkrankungen und chronische Entzündungen der Atemwege verabreicht werden (Symbiopharm, Herborn). Bei probiotisch genutzten Stämmen handelt es sich jedoch um vollkommen andere Stämme, als solche, die bei Enterokokkeninfektionen isoliert wurden (Noguchi *et al.*, 2011).

Neben Stoffwechsellleistungen bei der Kohlenhydrat- und Eiweißverwertung, kommt es durch Enterokokken zu einer Ansäuerung des Darmmilieus, einem Entgegenwirken der Fäulnis-Flora, dem Widerstand gegenüber Pathogenen und einer positiven Beeinflussung des Immunsystems (Informationen Symbioflor-1

Symbiopharm, Herborn). Ein weiterer Einsatzort ist die Fermentation von Lebensmitteln, zum Beispiel bei der Wurst- und Käseproduktion (Franz *et al.*, 2011). Während den oben erwähnten Anwendungen positive Aspekte und nützliche Eigenschaften zugesprochen werden, können Enterokokken allerdings ebenso als humanpathogene Keime auftreten. Dies ist besonders im Zusammenhang mit Immunschwächeerkrankungen, Patienten mit ernsthaften Vorerkrankungen, mit Breitbandantibiotika behandelten Patienten und Patienten mit langen Krankenhausaufenthalten zu beobachten (Stock, 2010; Vu & Carvalho, 2011).

Wie schon erwähnt, sind im Besonderen die beiden Spezies *E. faecalis* und *E. faecium* von humanmedizinischem Interesse, da sie für eine Reihe von Krankheiten verantwortlich sein können. Zu nennen sind hierbei vor allem Harnwegsinfektionen (Urinary tract infections, UTI), Bakteriämie, Endokarditiden, Meningitis, Wundinfektionen und intraabdominale- sowie Beckeninfektionen (Vu & Carvalho, 2011). Oft treten durch Enterokokken bedingte Infektionen im Zusammenhang mit Krankenhausaufenthalten auf, wobei dann von sogenannten nosokomialen Infektionen die Rede ist. Sie stellen mittlerweile den vierthäufigsten Erreger auf Intensivstationen in diesem Zusammenhang dar. Nimmt man alle Stationen zu Grunde, sind sie sogar der dritt- bis zweithäufigste Krankheitskeim (Stock, 2010). Oft sind sie auch bei Mischinfektionen beteiligt, wobei hier Endokarditiden, Cholezystis und ebenfalls Harnwegsinfekte zu nennen sind. Bei ernsthaften Erkrankungen wie Endokarditiden liegt die Sterberate bei angemessener Antibiotikabehandlung bei 20-40 %, ohne Antibiotikabehandlung bei 17-100 % (Vu & Carvalho, 2011).

Die Ursache solcher Krankheitsbilder kann durch normale Infektionen begründet sein, was bedeutet, dass sie durch freischwimmende Bakterien verursacht werden. Gehäuft treten in diesem Zusammenhang aber auch Biofilminfektionen auf. Dies bedeutet, dass das Krankheitsbild nicht allein durch die Anwesenheit des Keims bedingt ist, sondern vielmehr durch die Bildung eines Biofilms an spezifischen Stellen innerhalb des Patienten (Parsek & Singh, 2003; Mohamed & Huang, 2007; Hall-Stoodley & Stoodley, 2009).

Mehrere Studien über verschiedene Zeiträume und unterschiedliche Probenarten haben gezeigt, dass in der Regel über 70 % der untersuchten Enterokokkenisolate zur Biofilmbildung fähig sind (Tab. 1).

Tab. 1 Enterokokkenisolate: Zusammenhang zwischen Isolaten und Biofilmbildung.

Mehrere Studien haben den Zusammenhang zwischen Enterokokkenisolaten aus klinischen Bereichen oder Umweltproben mit dem Auftreten von Biofilmbildung untersucht. Dafür wurden im Zeitraum von 1991 bis 2012 in verschiedenen Ländern Untersuchungen ausgewertet und hier zusammengefasst. *E. fc* = *Enterococcus faecalis*, *E. fm* = *Enterococcus faecium*

Herkunftsland (Jahr)	Untersuchte Isolate insg.	Prävalenz <i>E. fc</i>	Prävalenz <i>E. fm</i>	Probenart	Referenz
Polen (2000-2003)	108 <i>E. fc</i> / 35 <i>E. fm</i>	59,20%	8,60%	Diverse klinische Proben	Dworniczek <i>et al.</i> (2005)
Polen (2007-2008)	53 <i>E. fc</i>	71,70%	x	Diverse klinische Proben	Dworniczek <i>et al.</i> (2012)
Tunesien (?)	17 <i>E. fc</i> / 4 <i>E. fm</i>	71,60%	50,00%	Mundhöhle von Kindern	Kouidhi <i>et al.</i> (2011)
Indien (2004-2009)	200 <i>E. fc</i>	32,50%	x	Klinische Infektionen	Upadhyaya <i>et al.</i> (2011)
Indien (2004-2009)	100 <i>E. fc</i>	16,00%	x	Stuhlproben	Upadhyaya <i>et al.</i> (2011)
Japan (1991-2002)	352 <i>E. fc</i>	100%	x	UTI	Seno <i>et al.</i> (2005)
USA (?)	132 <i>E. fc</i>	93,90%	x	Endocarditis, UTI & weitere klinische Proben	Mohamed <i>et al.</i> (2004)
Italien (2000-2005)	78 <i>E. fc</i> / 28 <i>E. fm</i>	94,90%	10,00%	Diverse klinische Proben	Di Rosa <i>et al.</i> (2006)
China (?)	53 <i>E. fc</i>	75,50%	x	Zahnwurzelbehandlungen	Zheng <i>et al.</i> (2012)
Ägypten (?)	41 <i>E. fc</i>	92,70%	x	Umweltproben (Rinderschlachthäuser)	Elhadidy <i>et al.</i> (2012)
Portugal (?)	11 <i>E. fc</i> / 21 <i>E. fm</i>	72,70%	52,40%	Umweltproben (Hühnerschlachthäuser)	Oliviera <i>et al.</i> (2010)

Ausnahmen bilden hier die Studien in Indien aus dem Jahr 2011, bei der der Anteil nur gut ein Drittel (32,5 %) bei klinischen Proben bzw. 16 % bei Stuhlproben darstellt. Ebenfalls liegt die Studie von Dworniczek *et al.* (2005) mit nur 59,2 % etwas niedriger als die Übrigen. In Tabelle 1 ist zu erkennen, dass *E. faecalis* generell den größeren Anteil unter den Erregern in absoluten Zahlen darstellt. Insgesamt wurden stets immer mehr *E. faecalis* als *E. faecium* in den Studien analysiert, was mit dem Fakt zusammenhängt, dass *E. faecalis* für den deutlich größeren Anteil aller durch Enterokokken verursachter nosokomialer Infektionen verantwortlich ist. Ende des letzten Jahrhunderts lagen die Zahlen noch bei ca. 90 % zu Gunsten von *E. faecalis*. Durch *E. faecium* verursachte Infektionen haben aber im Verlauf der letzten Jahre stark an Bedeutung gewonnen und sind heutzutage regional an bis zu 40 % der Infektionen beteiligt (Stock, 2010). Dies war besonders im Zusammenhang mit der Ausbreitung des sogenannten Clonal Complex 17 (CC17) sowie dem Auftreten von **Vancomycin Resistenten Enterokokken (VRE)** zu beobachten gewesen (Courvalin, 2006; Woodford, 2001).

1.2 Multiresistenz und Biofilmbildung

Die Problematik vermehrt auftretender, bakterieller Resistenzentwicklungen gegenüber Antibiotika hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Oft wird hierbei die Akquirierung von Resistenzgenen durch Horizontalen Gen Transfer (HGT) als treibende Kraft erwähnt, die zur Multiresistenz und der daraus resultierenden erschwerten Behandlungsmöglichkeit führt. Neue Erkenntnisse, die durch Untersuchungen von problematischen Humanerkrankungen erlangt wurden, zeigen, dass die Biofilmbildung alleine eine tragende Rolle im Zusammenhang mit multiresistenten Erregern spielt (Hoiby *et al.*, 2011; Hall-Stoodley & Stoodley, 2009).

Anders als man es vielleicht erwarten würde, ist nämlich nicht die planktonische frei lebende, sondern die innerhalb eines Biofilms, die natürliche Lebensweise von Bakterien (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Jefferson, 2004). Nahezu 99,9 % aller Bakterienspezies leben in dieser gemeinschaftlichen Form (Murphy & Kirkham, 2002), wobei die Fähigkeit zur Biofilmbildung in den verschiedenen Spezies unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Gross *et al.*, 2007). Aktuelle Studien besagen zudem, dass 65 % aller bakteriellen Infektionen beim Menschen mit Biofilmen assoziiert werden können (Frei *et al.*, 2011). Früher wurde Biofilmbildung immer mit der Anheftung an Oberflächen assoziiert, was heute nicht mehr uneingeschränkt gilt. Freischwebende Formen haben die ehemals gültige Definition um diesen Punkt erweitert. Wie es zu diesen freischwimmenden Biofilmen bzw. Aggregaten kommt, ist noch nicht endgültig geklärt. Die Ablösung von Aggregaten aus sessilen Biofilmen oder aber die selbstständige Bildung innerhalb einer Flüssigkeit werden diskutiert (Hall-Stoodley & Stoodley, 2009).

Zumeist sind diese zellulären Gemeinschaften in ihrer natürlichen Umgebung aus mehreren Spezies zusammengesetzt (Elias & Banin, 2012; Dalton *et al.*, 2011), wobei die Forschung im Labor häufig an Monospezies-basierenden Biofilmen stattfindet, unter anderem auch bei klinisch relevanten Biofilmen (Cole *et al.*, 2004). Diese multizelluläre Lebensweise hat mehrere Gründe, wobei zu allererst und generell die verbesserten Überlebenschancen zu nennen sind. Durch die Einbettung in den Biofilm sind die Mikroorganismen (MO) vor Austrocknung geschützt, besser mit Nährstoffen versorgt und durch die unmittelbare Nähe untereinander zu Genaustausch in Form von HGT befähigt (Bordi & de Bentzmann, 2011). Durch

diesen können nützliche Gene allen Mitgliedern zur Verfügung gestellt und somit die Überlebenschancen im Biofilm erhöht werden. Neben diesen Faktoren gibt es weitere wichtige Vorteile der Lebensweise im Biofilm, wobei besonders der Schutz vor mechanischen, physikalischen und auch chemischen Einflüssen zu nennen ist (Burmølle *et al.*, 2010). Gerade letztere sind im Zusammenhang mit Biofilmbedingten Krankheitsbildern sehr gewichtig. Geschützt durch eine Matrix aus „Extrazellulären Polymeren Substanzen“ (EPS) ist eine Bekämpfung der MO mit antimikrobiellen Substanzen wie z.B. Antibiotika oder Antiseptika oft schwierig (Hoiby *et al.*, 2010). Die Minimale Hemmende Konzentration (MHK) kann hierbei um den Faktor 100-1000 (Hoiby *et al.*, 2010) im Vergleich zu planktonischen Zellen desselben Erregers steigen (Abb. 2). Die aktuelle wissenschaftliche Meinung hat sich heute von der früher anerkannten Theorie der verminderten Diffusionsmöglichkeit der Antibiotika abgewandt, wobei dies in Abhängigkeit des jeweiligen Antibiotikums und des zu behandelnden MO zu bewerten ist.

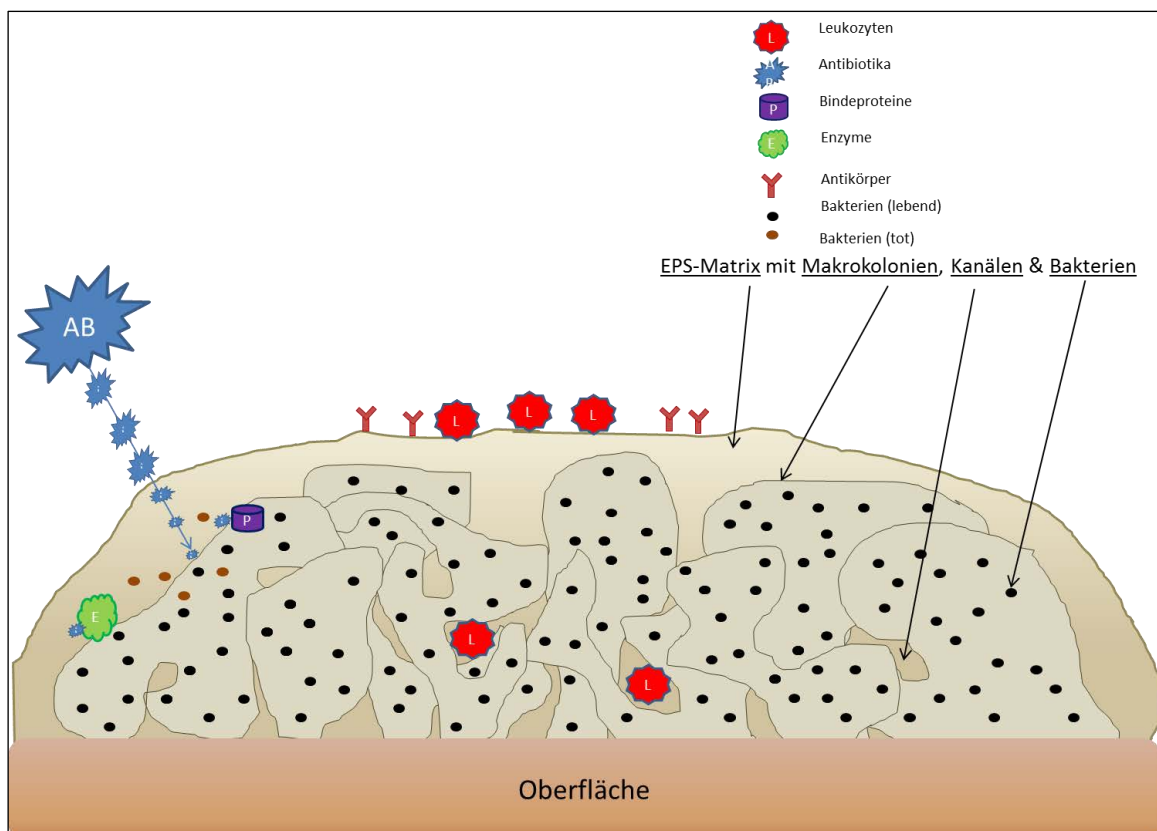


Abb. 2 Mechanismen der verminderten Antibiotika-Wirksamkeit und Immunabwehr.

Bakterien, die sich in Biofilmen befinden, zeigen oftmals eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika (AB) und der Immunabwehr des Patienten. Dies kann durch mehrere Prozesse bzw. Faktoren begründet sein. AB bindende Proteine, AB abbauende Enzyme, geringe metabolische Aktivität der Mikroorganismen, Verdünnungseffekte durch tote Zellen, verzögerte Penetration des AB in den Biofilm sind solche hier beschriebenen Faktoren.

Heutzutage wird angenommen, dass die generelle erhöhte Resistenz auf metabolisch inaktive Zellen in bestimmten Bereichen des Biofilms basieren. Diese Bereiche sind durch Nährstoffarmut gekennzeichnet und die dort lebenden Zellen befinden sich gewissermaßen in einem Zustand der stationären Phase, was Antibiotika unwirksam macht (Hall-Stoodley & Stoodley, 2009).

Zusätzlich wird die Matrix, auch wenn sie die Diffusion nicht komplett inhibiert, eine Verzögerung der Antibiotikapenetration bewirken (Donlan & Costerton, 2002), so dass Resistenzgene induziert werden können. Ebenso wird vermutet, dass es durch Enzyme und andere bakteriell gebildete Polymere zur Bindung und Inaktivierung von Antibiotika in der Matrix kommt (Bagge *et al.*, 2004). Auch könnte es zu einem Verdünnungseffekt der Antibiotikakonzentration pro Zelle durch tote Zellen innerhalb des Biofilms kommen. Es scheint also multiple Mechanismen (Abb. 2) zu geben, die die Widerstandsfähigkeit von MO in Biofilmen bedingen (Hall-Stoodley & Stoodley, 2009). Des Weiteren bedeutet dies auch, dass nicht immer zwingend erworbene Resistenzgene bzw. natürliche Resistenzen für die Unwirksamkeit von Antibiotika verantwortlich sein müssen.

Erhöhte Antibiotikaresistenz ist aber nicht der einzige Abwehrmechanismus von Biofilm assoziierten Zellen. Auch die durch die Immunabwehr des Wirtes eingeleitete Phagozytose kann in Biofilmen gestört sein. Schon 1980 wurde von Lam *et al.* gezeigt, dass Antikörper und Immunabwehrzellen nicht in Biofilme eindringen können, sondern sich lediglich an diese anlagern (Abb. 2). Auch die Immunabwehr durch Leukozyten ist blockiert, da diese zwar die Wasserkanäle der Biofilme (Abb. 4) penetrieren, jedoch nicht die Mikroorganismen an sich erreichen (Hall-Stoodley & Stoodley, 2009).

Unterschiede im Metabolismus, das heißt die metabolische Aktivität einzelner Subpopulationen innerhalb eines Biofilms beeinflussen sich aber auch generell gegenseitig. So wird eine schneller wachsende Spezies unter gegebenen Milieubedingungen immer eine langsamere dominieren (Moons *et al.*, 2009). Ändert sich das Nährstoffangebot, kann es zu einer Verschiebung dieses Verhältnisses kommen und ehemals unterdrückte Spezies im Biofilm die dominante Rolle übernehmen. Diese Variabilität der Nährstoffe wird auch durch die Mikroorganismen selbst beeinflusst, indem sie die gegebenen metabolisch umsetzen und die entstehenden Abbauprodukte für andere MO zur Verfügung stellen.

Es kann aber auch zu einer aktiven Unterdrückung einer konkurrierenden Spezies im Biofilm kommen, indem Mikroorganismen Bakteriocine bilden, die andere Bakterien abtöten und sich so einen Vorteil zu verschaffen (Moons *et al.*, 2009). Andere Arbeitsgruppen berichteten im Zusammenhang von Bacteriocinproduktion von andersartigen Effekten. Sie konnten eine Koexistenz zweier toxinproduzierender Bakterienspezies innerhalb eines Biofilms zeigen, der sich aus getrennten Mikrokolonien aufbaute. Innerhalb dieser Mikrokolonien waren die Bakterien vor dem gegnerischen Toxin geschützt (Rao *et al.*, 2005; Moons *et al.*, 2006).

Genau das Gegenteil zu diesem Antagonismus kommt bei synergetischem Verhalten mehrerer Spezies vor. Hier helfen sich unterschiedliche Spezies, die ein gleiches Interesse teilen und so im Vorteil gegenüber weiteren MO sind (Buckling & Brockhurst, 2008). Ein Beispiel lieferten Thiele *et al.* (1988), als sie das Zusammenspiel von acetogenen und methanogenen Bakterien aufführten.

Des Weiteren ist anzumerken, dass die generelle Genexpression innerhalb eines Biofilms markant von der planktonisch lebender Zellen abweicht bzw. abweichen kann. Sie ähnelt häufig der von Zellen in der stationären Phase. Andere Gene können jedoch auch hochreguliert sein, wie z.B. Gene des anaeroben Stoffwechsels, wenn sich die Zellen in entsprechenden Nischen befinden (Hoiby *et al.*, 2011).

Durch die räumliche Nähe zueinander kann es in Biofilmen auch leichter zu Zell-Zellkommunikation, dem sogenannten Quorum Sensing (QS) kommen. Durch diesen Vorgang kommt es ebenfalls zu einer Regulation der Expression bestimmter Gene, in diesem Fall jedoch in Abhängigkeit von der Zelldichte. Diese kann sowohl positiv wie auch negativ sein (Moons *et al.*, 2009). Außerdem kann dieser Vorgang der Zellkommunikation, gefolgt von Genregulation, nicht nur innerhalb einer Spezies, sondern auch unter verschiedenen Arten stattfinden (Moons *et al.*, 2009).

1.3 Biofilmbildung & Struktur

Die Biofilmbildung ist ein mehrstufiger Prozess, der in 4 bis 5 charakteristische Phasen unterteilt werden kann (Abb. 3) und den Übergang von frei lebender/schwimmender in die sessile Lebensform darstellt (Dunne, 2002; Stoodley *et al.*, 2003). Planktonische Zellen haben durch ihre Oberflächenstrukturen bzw. segregierte Substanzen die Möglichkeit, sich an Oberflächen anzuheften (Phase 1). Dies wird unter anderem durch Adhäsine und auch Pili vermittelt (Murphy & Kirkham, 2002). In diesem Zustand sind die Bakterien, sofern sie keine Resistenzgene besitzen bzw. intrinsisch resistent sind, noch empfindlich gegenüber Antibiotika (Hoiby *et al.*, 2011). Auf diesen noch reversiblen Schritt, kommt es durch vermehrte Zellteilung der Zellen zur Bildung sogenannter Mikrokolonien (Phase 2).

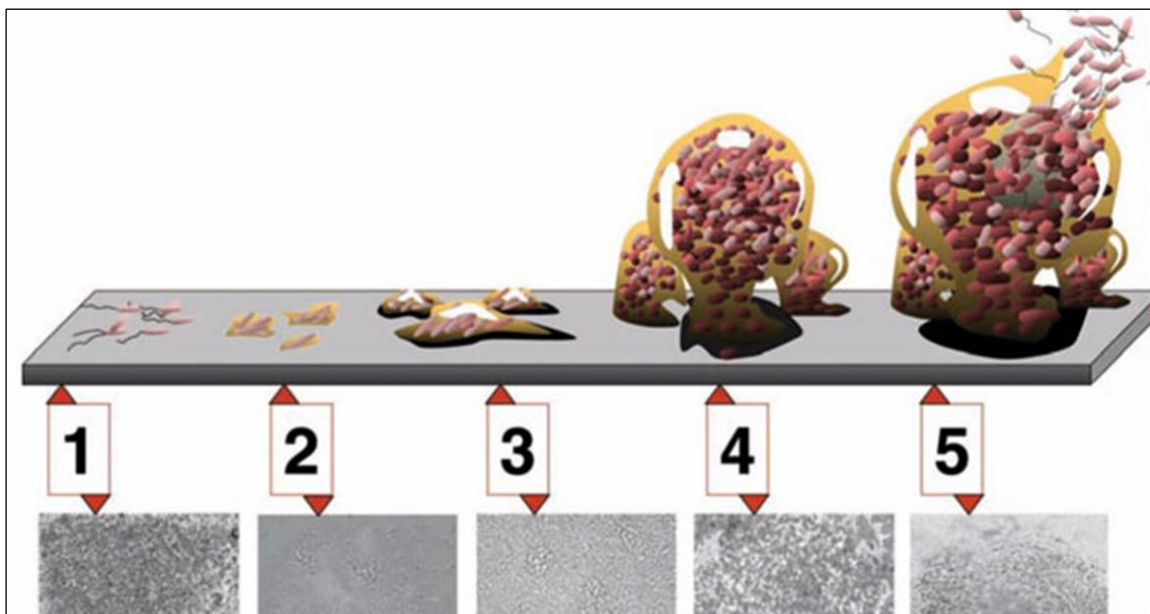


Abb. 3 Biofilmbildungsprozess nach Monroe (2007).

Der Reifungsprozess eines Biofilms in 5 Schritten beginnt mit der reversiblen, durch Pili vermittelten Anheftung einzelner Zellen an einer Grenzschicht/Oberfläche. Durch Zellteilung und Ausbildung von Adhäsinen kommt es zu einer sogenannten Mikrokoloniebildung, auf die die eigentliche Biofilmbildung folgt. Erst durch die Produktion und Ausschüttung von Proteinen, Zuckern und DNA wird ein die Bakterien umgebender Schleim gebildet, der mit diesen den reifen Biofilm darstellt. Durch Ablösen von Zellen bzw. Fragmenten des Films kommt es zu einer Ausbreitung und Verteilung des Biofilms und Kolonisierung neuer Flächen.

Nach diesem nun irreversiblen Schritt, kommt es nach und nach zu vermehrtem Wachstum und der Bildung von EPS. Diese Matrix besteht aus Proteinen, Polysacchariden und DNA (Flemming *et al.*, 2007). Ebenso können tote Zellen, sowie weiteres organisches und anorganisches Material in den Biofilm eingebaut werden

(Flemming *et al.*, 2007). Ab diesem Zeitpunkt spricht man von einem reifen Biofilm (Phase 3), da erst jetzt die gültige Definition erfüllt wird. Diese besagt, dass ein Biofilm aus Mikroorganismen besteht, die von einer durch sie selbst gebildeten Matrix umgeben sind und an einer Grenzschicht gebildet wird (Frei *et al.*, 2011; Donlan & Costerton, 2002; Hall-Stoodley & Stoodley, 2009; Monds & O'Toole, 2009). Im Zuge von weiterem Wachstum in die Höhe und Anlagerung zusätzlicher Zellen bilden sich turm- und pilzartige Strukturen, die den reifen Biofilm ausmachen (Phase 4) (Donlan & Costerton, 2002). Im letzten Schritt kommt es durch Ablösung von Zellen bzw. Biofilmkompartimenten zu einer Ausbreitung und Neukolonialisierung durch die MO (Phase 5).

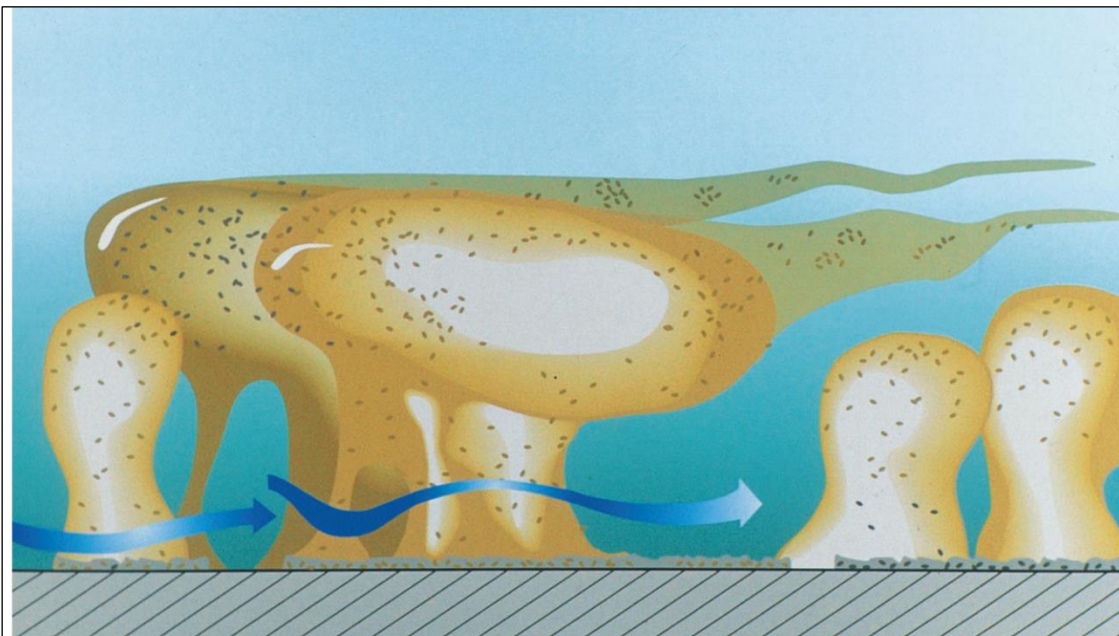


Abb. 4 Struktur eines Biofilms (Donlan&Costerton, 2002).

Ein reifer Biofilm besteht aus mehreren Schichten, die in Zusammensetzung und Struktur variieren können. Zusätzlich können sich Turm- und Pilzähnlichen Strukturen (EPS, Matrix) bilden, in denen die Bakterien (dunkle Punkte) eingebettet sind. Durchzogen werden diese Gebilde von Wasserkanälen (blaue Pfeile), die der Nährstoffversorgung dienen. Außerdem beeinflussen diese Kanäle die dynamische Struktur des Biofilms.

Ein reifer Biofilm besteht aus locker verpackten Einzel- oder Makrokolonien, die durch eine EPS-Matrix zusammengehalten werden (Abb. 4). Durchzogen werden diese Gebilde von Wasserkanälen, die die Nährstoffversorgung innerhalb des Biofilms verbessern. Die unterschiedlichen Schichten bewirken eine differenzierte Umgebung und spezifische Nischen für die unterschiedlichen MO (Hoiby *et al.*, 2011). So kommt es durch die Struktur zum Beispiel zu sauerstoffarmen Regionen im Bodenbereich, wohingegen andere Regionen gerade diesem Sauerstoff ausgesetzt

sind (Hoiby *et al.*, 2011). Ebenso können bewegliche Bakterien in solch einem Biofilm ihre Position aktiv verändern und auf diese Weise an für sie bessere Standorte gelangen (Hoiby *et al.*, 2011).

1.4 Kriterien einer Biofilminfektion

Die Diagnose einer humanen Erkrankung bedingt durch Biofilme ist aufgrund der Eigenschaften der Zellen im Biofilm nur schwer möglich. Um derartige besser erkennen zu können, wurden bestimmte Kriterien gesammelt und von Parsek & Singh (2003) zusammengefasst. Hall-Stoodley & Stoodley (2009) ergänzten bzw. überarbeiteten diese zu der derzeit gültigen Form. Die Kriterien beinhalten neben den zwei allgemein gültigen Definitionen für Biofilme (Oberflächenassoziation und EPS-Matrix) vier weitere essentielle Bestandteile. Diese sind (i) die begrenzte Infektionsstelle im menschlichen Körper, (ii) die höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber Antibiotikabehandlung im Vergleich zu planktonischen Zellen, (iii) negative Kulturergebnisse in klinischen Untersuchungen trotz Verdacht auf eine Infektion sowie (iv) eine uneffektive Wirtsabwehr aufgrund von Makrokolonien in diskreten Stellen des Wirtsgewebes, welches assoziiert mit Immunabwehrzellen vorliegt.

Basierend auf diesen insgesamt sechs Punkten, können die Koch'schen Postulate, wenn auch schwierig, eingehalten werden (Hall-Stoodley & Stoodley, 2009). Diese besagen nämlich unter anderem, dass ein Erreger aus dem kranken Organismus zu isolieren sein muss. Da dies wie unter Punkt (iii) beschrieben bei Biofilminfektionen nicht immer der Fall ist, die Koch'schen Postulate aber eingehalten werden sollen, wurden die erwähnten Ergänzungen getätigt.

Einen interessanten Punkt im Zusammenhang mit der Oberflächenassoziation/Biofilmbildung stellen die Untersuchungen an uropathogenen *E. coli* (UPEC) dar. Die Annahme, dass Keime stets extrazellulär in Biofilmen vorliegen und so Krankheiten auslösen, konnte widerlegt werden. Es wurde von Anderson *et al.* (2003) und Justice *et al.* (2006) gezeigt, dass bei wiederkehrenden Blasenentzündungen nicht eine Neuinfektion aus dem Gastrointestinaltrakt stattfindet, sondern, dass sich UPEC intrazellulär im Blasenepithel befinden.

1.5 Multiresistenz bei Enterokokken

Viele durch Enterokokken verursachte Infektionen erschweren die Behandlung durch das Auftreten von Antibiotikaresistenzen. Dies liegt zum einen am relativ großen Anteil an intrinsischen Resistenzen der Enterokokken, zum anderen an den vielfältig erworbenen Resistenzgenen über HGT oder schlichtweg an Mutationen (Stock, 2010). Zu den natürlichen Resistenzen gehören z.B. solche gegen Cephalosporine, Penicilline, Sulphonamide und low-level Aminoglykoside bzw. Beta-Laktam-Antibiotika (Tab. 2).

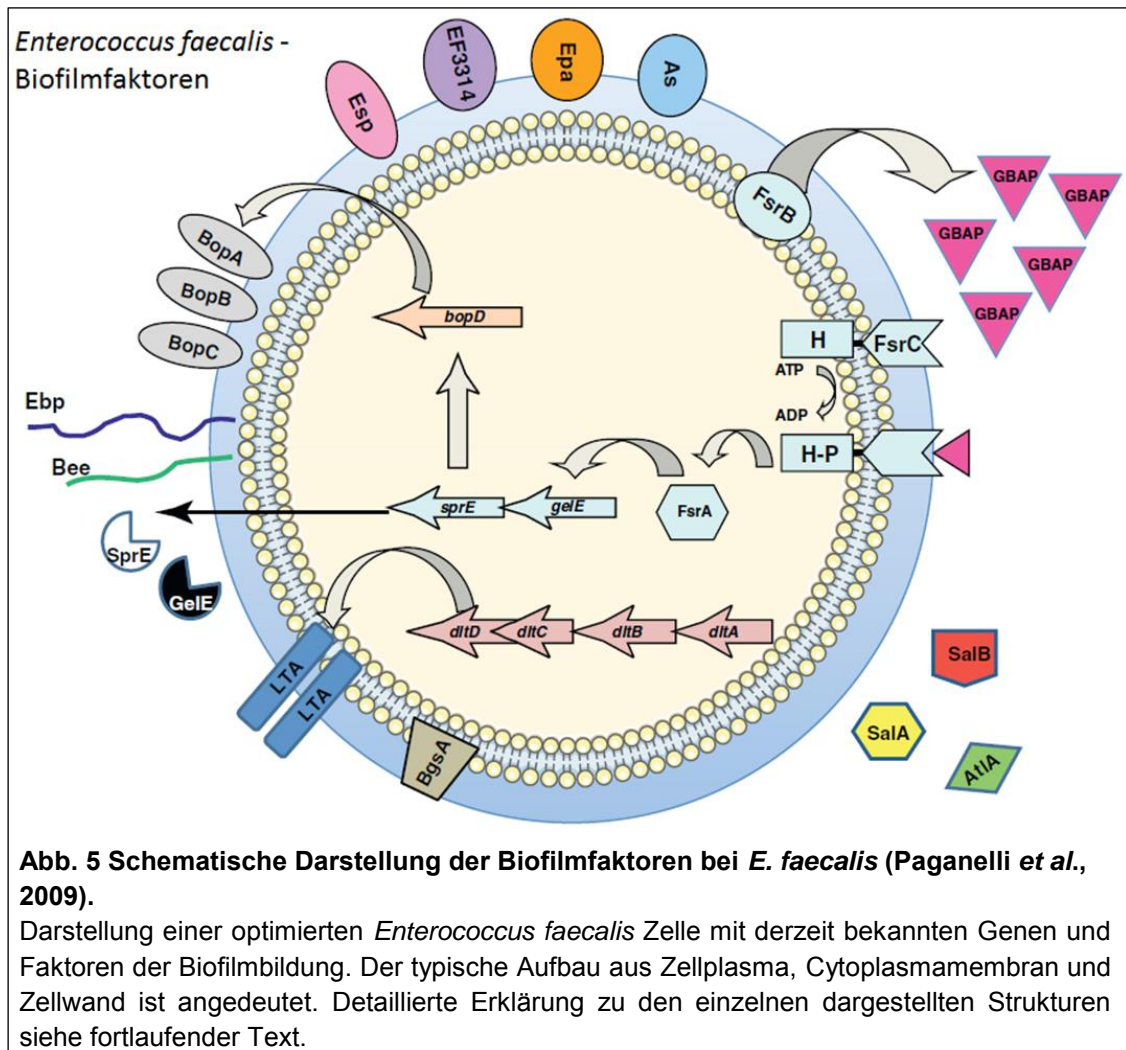
Tab. 2 Antibiotikaresistenzen der beiden wichtigen humanpathogenen Enterokokken Spezies (nach Stock 2010). Dargestellt sind die natürlichen und erworbenen Resistenzen bei <i>Enterococcus faecalis</i> und <i>Enterococcus faecium</i> . X: resistent; -: sensibel; (X): nach Resistenzgenotyp wahrscheinlich auch resistent		
Antibiotika-Gruppe	Vorkommen	
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Natürliche Resistenzen		
Cephalosporine	X	X
Isoxazolylpenicilline	X	X
Monobactame	X	X
Aminoglykoside (low-level)	X	X
Polymyxine	X	X
Lincosamide	X	-
Streptogramine	X	-
Mupirocin	X	-
Chinolone	(X)	X
Glykopeptide	-	-
Erworbene Resistenzen		
Aminopenicilline	selten	häufig
Aminoglykoside (high-level)	häufig	häufig
Glykopeptide	selten	regional häufig
Chinolone (high-level)	häufig	häufig
Makrolide	häufig	häufig
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	häufig	häufig
Rifampicin	häufig	häufig
Fosfomycin	häufig	häufig
Fusidinsäure	häufig	häufig
Tetrazykline	relativ häufig	relativ häufig
Chloramphenicol	selten	selten
Streptogramine	-	relativ häufig
Linezolid	Einzelfälle	Einzelfälle
Tigezyklin	Einzelfälle	Einzelfälle

Bei den erworbenen Resistenzen spielen speziell die High-Level-Aminoglykosid und die High-Level-Glykopeptidresistenz eine wichtige Rolle (Chow, 2000; Sujatha & Praharaj, 2012). High-Level bedeutet in diesem Zusammenhang, dass eine sehr hohe Konzentration des jeweiligen Antibiotikums zur Abtötung des Erregers nötig ist. Diese erhöhte Resistenz unterscheidet sich von intrinsischen durch die Aufnahme spezieller Resistenzgene. Die Resistenzwerte steigen hierbei von Bereichen um 256 µg/ml auf über 2000 µg/ml für Aminoglykoside (Chow, 2000) und auf Werte von 64-1000 µg/ml für Glykopeptide (Sujatha & Praharaj, 2012).

Besonders unter den nosokomialen Erkrankungen ist das Auftreten von diesen beiden Resistenzen zu beobachten. Bei *E. faecalis* gilt dies insbesondere für Aminoglykoside, während die Glykopeptidresistenz vermehrt zusätzlich bei *E. faecium* im Zusammenhang mit VRE beschrieben wird (Stock, 2010). Da diese beiden Antibiotika wichtige Reserve-antibiotika darstellen, verstärkt diese Problematik die Gefahr von Enterokokken-Infektionen (Stock, 2010). Neuere Antibiotika (Linezolid, Tigecyklin) zeigen hier zum Glück noch eine bessere Wirksamkeit und bieten daher eine alternative Behandlungsmöglichkeit. Generell ist die Problematik von multiresistenten Enterokokken eher im Zusammenhang mit *E. faecium* bekannt, während bei *E. faecalis* die Biofilmbildung den Schwerpunkt der Behandlungsschwierigkeiten einnimmt (siehe auch Tab. 1). Da diese aber wie beschrieben auch zur Antibiotikaresistenz beiträgt, kommt es hierbei also zu einem additiven Effekt.

1.6 Virulenz- & Biofilmfaktoren

Enterokokken besitzen eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren, die zur Pathogenität beitragen. Diese sind von Paganelli *et al.* (2012) beschrieben und zusammengefasst worden und in Tab. 3 und Abb. 5 dargestellt. Sie werden in diesem Kapitel einzeln beschrieben und erläutert.



Die Biofilmbildung ist ein Prozess, der von einer großen Anzahl von Faktoren abhängt. Diese Faktoren bauen sich zum einen aus direkt erkennbaren Genen und Zusammenhängen, wie Adhäsine, Pili oder Aggregationssubstanzen, auf. Andere zelluläre Vorgänge sind hingegen nicht immer direkt erkennbar mit der Biofilmbildung verbunden. Hierzu gehören unter anderem die Gene zum Kohlenstoffmetabolismus, wie z.B. *bopA-D* und das *epa*-Operon (Tab. 12) oder bestimmte Enzyme wie Synthetasen und Dehydrogenasen (z.B. *selD*, *xdh*; siehe auch Tab. 12).

1.6.1 Pili und LPxTG Proteine sowie Sortasen

Charakteristikum für Oberflächen assoziierte Proteine bei Grampositiven Bakterien sind spezifische C-terminale Aminosäuresequenzen, die hoch konserviert sind (Scott & Zahner, 2006), so auch unter den Enterokokken (Hendrickx *et al.*, 2009). Das Motiv dieser Aminosäuren lautet LPxTG (Leucin, Prolin, variable Aminosäure, Threonin, Glycin) und dient als CellWallSortingSignal (CWSS) speziellen Enzymen, sogenannten Sortasen, als Erkennungsstelle Marraffini *et al.*, (2006). Zusätzlich besitzen Oberflächenproteine eine Transmembrandomäne und einen positiv geladenen Schwanz als weitere charakteristische Bereiche (Ton-That & Schneewind, 2003; Ton-That *et al.*, 2004; Scott & Barnett, 2006). Nach Sekretion der Proteine über das Sec-System, kommt es zu einer kovalenten Verankerung der Proteine an die Peptidbrücken der Zellwände bzw. an andere Proteine (NH₂-Gruppen). Dieser in Abb. 6 dargestellte Vorgang unter protolytischer Abspaltung des terminalen Glycin des LPxTG Motivs wird Transpeptidierung genannt (Gaspar & Ton-That, 2005; Scott & Zahner, 2006).

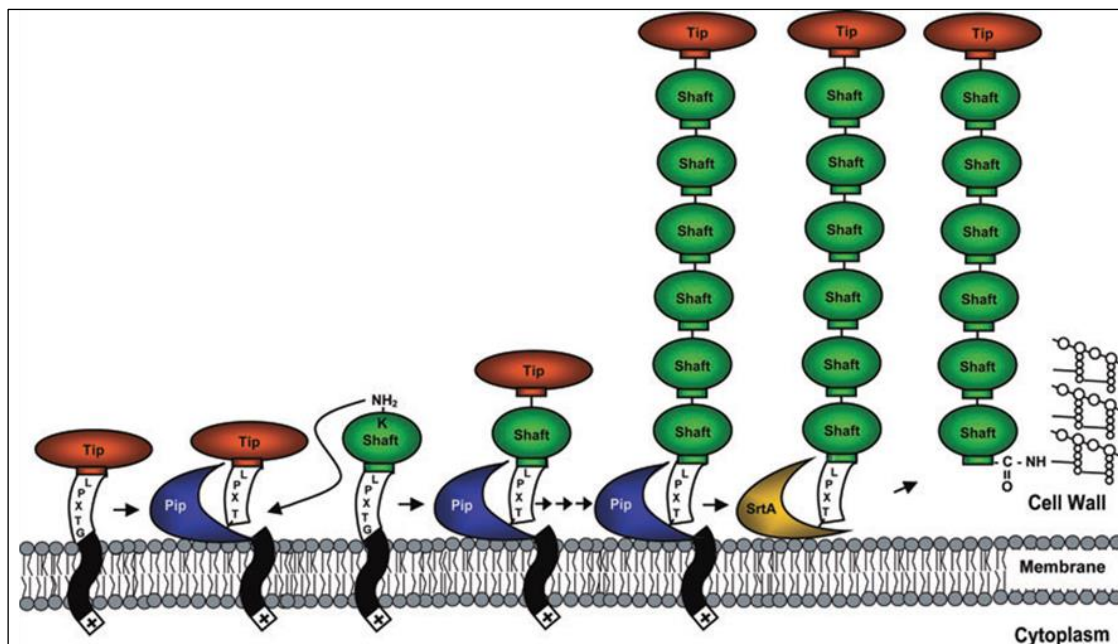
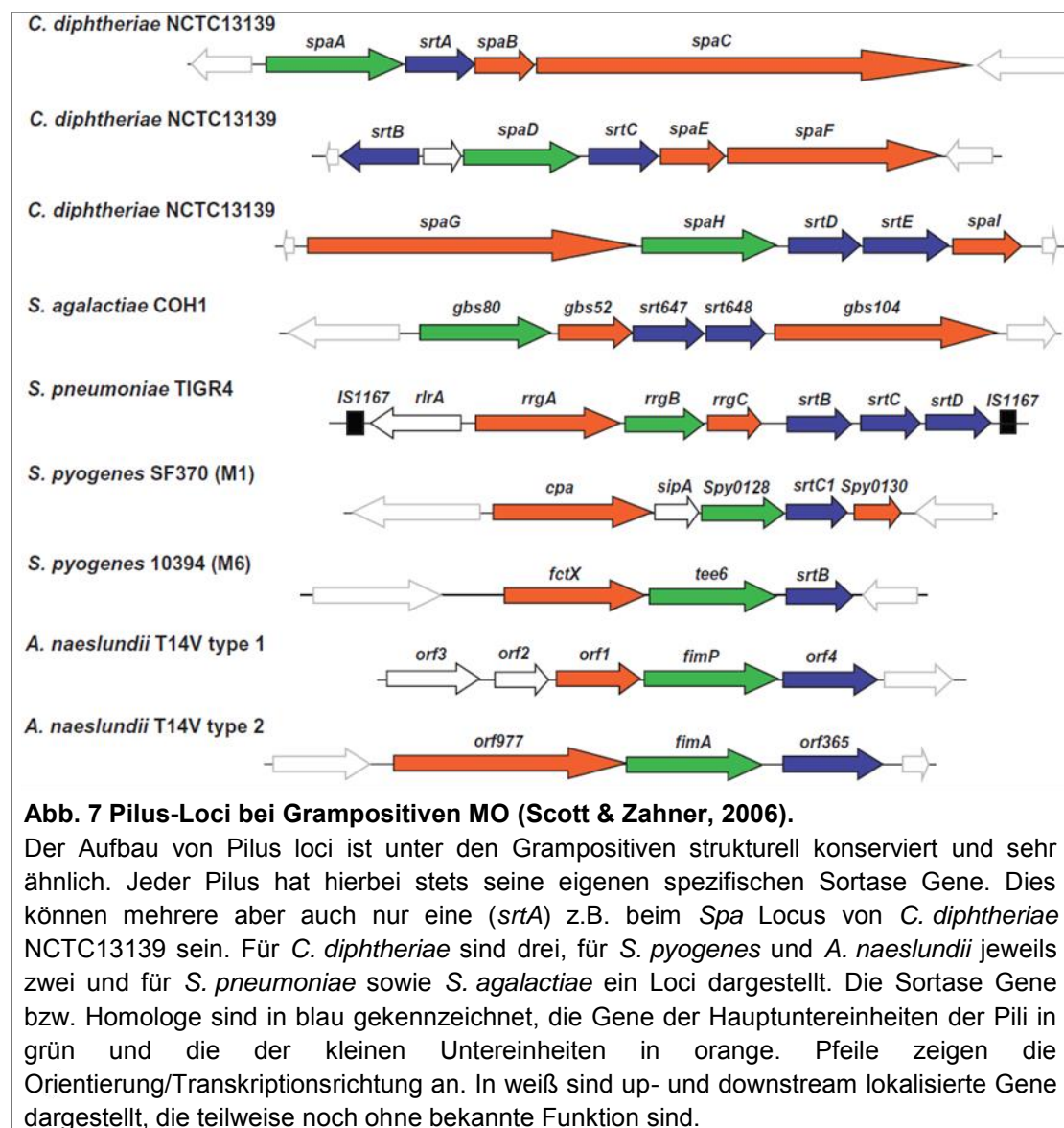


Abb. 6 Pili bei Grampositiven MO (Scott & Zahner, 2006).

Der Transpeptidierungsmechanismus der Sortase vermittelten Pilus Verankerung an die Zellwand Grampositiver Mikroorganismen basiert auf der kovalenten Verknüpfung der Untereinheiten miteinander bzw. mit der Zellwand. Hierfür sind LPxTG Motive als Erkennungssequenz nötig, wobei es durch Schneiden zwischen dem endständigen Threonin und Glycin zur Verknüpfung mit Aminogruppen anderer Pili Einheiten kommt. Pip stellt hier die Membran-ständige Pilus-spezifische Sortase dar, während *SrtA* die Housekeeping Sortase A der Zelle bezeichnet. Der Pilus selber ist aus einem Spitzenprotein (Tip) und einem Schaftprotein (Shaft) aufgebaut.

Neben einer Housekeeping Sortase A der Enterokokken, die für die Verankerung einer Vielzahl an Proteinen mit der Zellwand verantwortlich ist, gibt es piluspezifische Sortasen (*bps/srtC* und *srt1+srt2*), die kolokalisiert mit den Pilus-Loci (*ebp* und *bee*) im Genom bzw. Plasmid-kodiert vorliegen und den Zusammenbau des wachsenden Pilus vermitteln (Nallapareddy *et al.*, 2006; Tendolkar *et al.*, 2006).

Der Aufbau dieser Pili-Loci ist innerhalb der Grampositiven Bakterien hoch konserviert und zeigt große strukturelle Ähnlichkeiten (Scott & Zahner, 2006). In Abb. 7 sind die Pili von fünf verschiedenen Bakterienarten zusammengefasst.

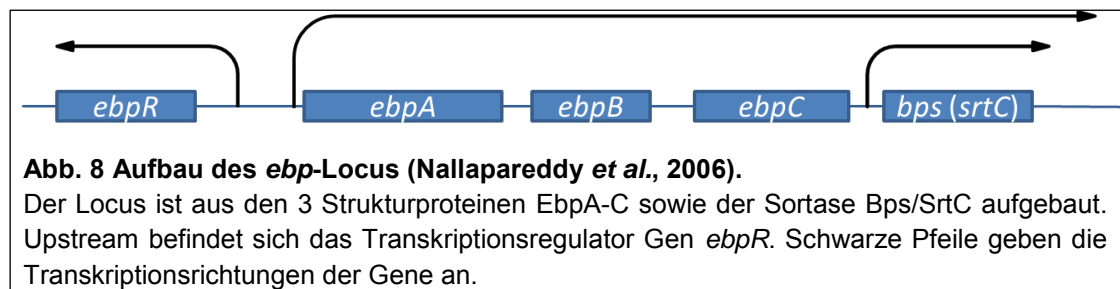


Während in machen Spezies wie *C. diphtheriae* drei unterschiedliche Pili in der Literatur beschrieben sind, gibt es in anderen Spezies lediglich einen einzigen Pilus-Locus (z.B. *S. agalactiae*) Man kann den konservierten Aufbau aus Genen für

Proteinuntereinheiten der Pili (Grüne und orangene Pfeile) mit den jeweiligen Locus-spezifischen Sortasen (blaue Pfeile) erkennen.

1.6.1.1 Der *ebp*-Locus

Der Ebp-Pilus (**e**ndocarditis and **b**iofilm-associated **p**ilus) ist der am häufigsten vorkommende Pilus bei *Enterococcus faecalis* und wurde von Nallapareddy *et al.* (2006) zuerst beschrieben. Nahezu 98% aller Isolate haben diesen chromosomal codierten Gen-Locus (Nallapareddy *et al.*, 2011). Er ist aufgebaut aus den drei Strukturproteinen EbpA, EbpB und EbpC, sowie der colokalisierten pilusspezifischen Sortase SrtC (heute Bps genannt). Die drei Pilusproteine stehen unter einem gemeinsamen Promotor und werden demnach zusammen transkribiert, während die Sortase unter einem eigenen Promotor steht (Abb. 8).



Neben einer konstitutiven Transkription der Pilus-Gene kommt es unter bestimmten Wachstumsbedingungen zu einer vermehrten Pilussynthese durch die Bildung eines, durch das upstream lokalisierte *ebpR* Gen kodierten, Transkriptionsfaktors. Untersuchungen von Bourgoigne *et al.* (2007) haben ergeben, dass die Expression von *ebpR* Sigma A unabhängig und autoaktiviert ist. Deletion bzw. Inaktivierung des Regulators führten zu einer 100-fachen Reduzierung der Transkription der *ebp* Gene. Diese Reduktion zeigte ein ähnliches phänotypisches Bild wie eine *ebpABC* Deletionsmutante (Bourgoigne *et al.*, 2010), was die Wichtigkeit von EbpR für eine korrekte Pilus- und dadurch bedingte Biofilmbildung hervorstellt.

Generell wurde aber festgestellt, dass innerhalb einer Population von Enterokokken nur ein bestimmter Anteil der Zellen den Pilus bildet. Nallapareddy *et al.* (2011) bezifferten diese Anzahl auf 30-72 %.

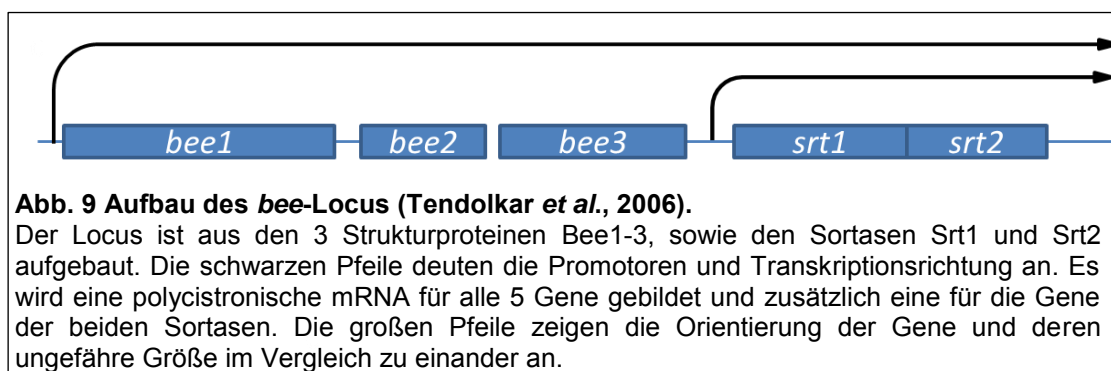
Ebenfalls konnte die Arbeitsgruppe um Bourgoigne *et al.* (2010) den Einfluss von Bicarbonat auf die Expression des *ebp*-Locus zeigen. Für den EbpR Regulator wurde ein starker induzierender Effekt von Bicarbonat nachgewiesen. Für einige andere

Bakterienspezies konnten regulatorische Proteine der Atx A Familie entdeckt werden, die eine Zellantwort auf CO₂ vermitteln und die dem EbpR ähnlich sind.

Nallapareddy *et al.* (2011) haben außerdem gezeigt, dass Ebp-Pili die Anheftung an menschliche Thrombozyten vermitteln, was ein mögliches Ziel neuer immunotherapeutischer Mittel darstellen könnte.

1.6.1.2 Der *bee*-Locus

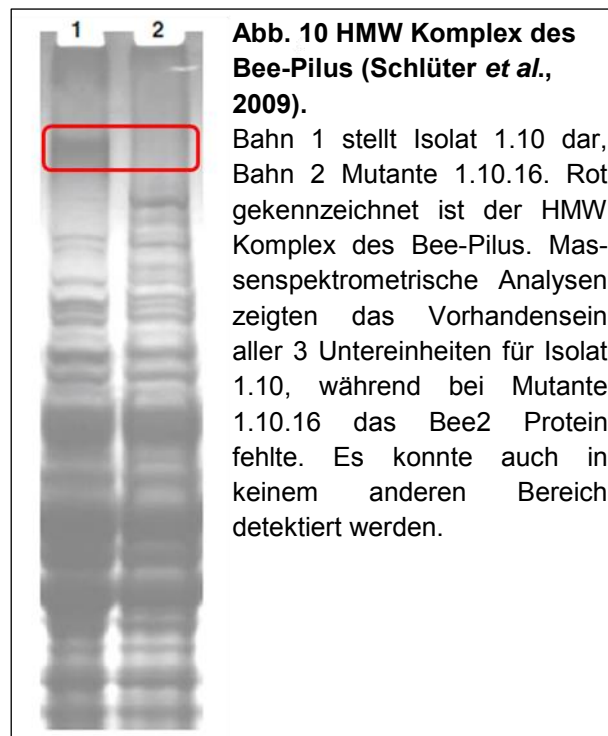
Der *bee*-Locus codiert für einen zweiten Pilus bei Enterokokken. Im Gegensatz zum *ebp*-Locus kommt dieser Pilustyp nur bei einigen wenigen Prozent (1,2 %, 1 von 473 Isolaten) der Enterokokken-Isolate vor (Nallapareddy *et al.*, 2011). Die Arbeitsgruppe um Tendolkar *et al.*, (2006) gaben Werte von 5 % (2 von 40 Isolaten) an, welche von Schlüter (2008) mit 5 % (8 von 150 Isolaten) bestätigt wurden. Aufgrund dessen wird diesem Pilus eine untergeordnete Rolle zugesprochen. Die codierenden Gene liegen auf dem 80 kb großen, konjugativen Plasmid pBEE99 vor (Coburn *et al.*, 2010) und wurden zuerst von Tendolkar *et al.* (2006) beschrieben. Der *bee*-Locus zeigt einen ähnlichen Aufbau wie der *ebp*-Locus, wobei er zwei anstatt einer kolokalisierten Sortase besitzt. Die Strukturgene bilden ebenso wie die beiden Sortasen eine durch einen gemeinsamen Promotor initiierte polycistronische mRNA (Abb. 9).



Untersuchungen von Tendolkar *et al.* (2006) und Schlüter *et al.* (2009) zeigten den Aufbau des Pilus aus den drei Untereinheiten Bee1, Bee2 und Bee3. Die kolokalisierten Sortasen bewerkstelligen den Zusammenbau des Pilus, wobei die genaue Zuordnung der beiden Sortasen zu den Pilus-Untereinheiten noch nicht abschließend geklärt ist.

Die Arbeiten von Schlüter *et al.* (2009) lassen aber vermuten, dass die Sortase 1 den Einbau von Bee2 in den Pilus vermittelt. Eine durch eine spontane Punktmutation in der Sortase 1 defekte Mutante mit der Bezeichnung 1.10.16 zeigte eine etwa 6-fach

geschwächte Biofilmbildung im Vergleich zum ursprünglichen Isolat 1.10, sowie ein Fehlen des charakteristischen High Molecular Weight (HMW) Komplexes (Abb. 10) im SDS-Gel des Gesamtproteinextrakts. Im Vergleich zum Isolat 1.10 konnten bei der Mutante 1.10.16 im entsprechenden Bandenbereich um ca. 250 kDa lediglich die Pilusproteine Bee1 und Bee3 massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Bee2 war nur beim Isolat 1.10 detektierbar. Die Punktmutation an Base 751 im *srt1* Gen von Guanin nach Thymin bewirkte eine Änderung des Glutaminsäurecodons zu einem Stoppcodon. Die Vermutung liegt nahe, dass die dadurch unvollständig gebildete Sortase keine Funktion mehr ausübt. Da sich in der Mutante der Unterschied nur im HMW Komplex widerspiegelte, wurde postuliert, dass die Sortase 1 für den Einbau der Bee2 Untereinheit in den Pilus verantwortlich ist.



Diese Annahme konnte aber von Schlüter *et al.* (2009) nicht durch Komplementation mit dem intakten Wildtyp *srt1* Gen abschließend gezeigt werden.

1.6.1.3 LPxTG Proteine

Zur Gruppe der LPxTG Proteine gehören außerdem die Aggregationssubstanzen, wie solche, die durch *pgrB*, *asa1* oder *asa373* codiert werden. Sie stellen einen wichtigen Faktor beim Prozess der Biofilmbildung bzw. der Virulenz bei Enterokokken dar. Es handelt sich um Plasmid codierte, durch Pheromone induzierbare Oberflächenproteine, die den Zell-Zellkontakt zwischen Donor und Rezipient

vermitteln und so für den konjugativen Transfer von Plasmiden sorgen (Clewell *et al.*, 1985; Hirt *et al.*, 1996).

Auch das *ace* Gen, welches zur Gruppe der MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) (Sillanpää *et al.*, 2004; 2009) gehört und eine Bindung an Kollagenfasern vermittelt, ist durch das typische LPxTG Motiv gekennzeichnet. MSCRAMMs gehören zu den Adhäsinen und vermitteln den primären Kontakt zum Wirtsgewebe. Sie bedingen somit die Bildung und Entwicklung von Krankheiten.

1.6.2 Gene des Stoffwechsels

1.6.2.1 *epa*-Operon

Durch das *epa* (enterococcal polysaccharide antigen) Gencluster (Abb. 11) werden Zuckersyntheseenzyme codiert, die an mehreren zellulären Prozessen beteiligt sind. Es umfasst 22 Gene, die bei den beiden sequenzierten Stämmen *E. faecalis* V583 (EF2174-EF2200) und *E. faecalis* OG1RF (*orfde1+2*, *epaA-R*, OG1RF_0164+0163) unterschiedlich benannt wurden (Teng *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2000).

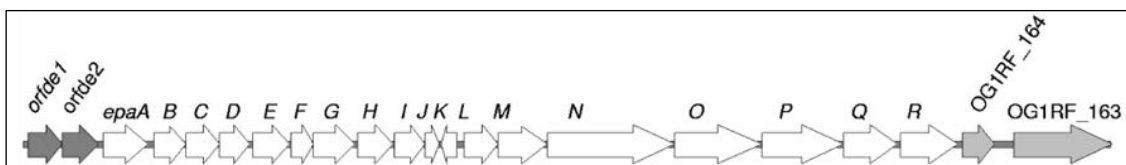


Abb. 11 Aufbau des *epa*-Operons von *E. faecalis* OG1RF (Teng *et al.*, 2009).

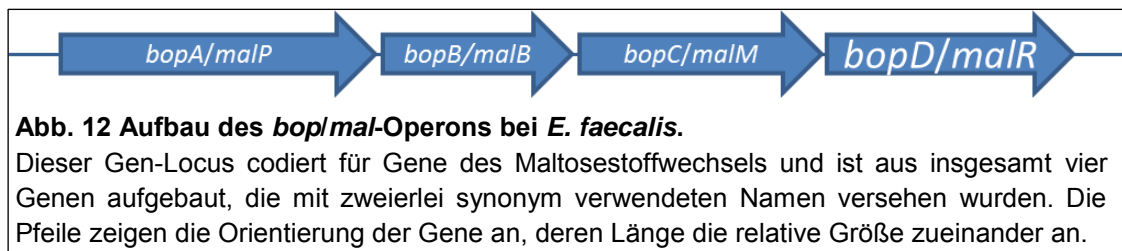
Der *epa*-Locus ist aus den 18 Genen *epaA-R*, den zwei ORF *orfde1+2* und den Genen OG1RF_164+163 zusammengesetzt. Bis auf das *epaK* Gen sind alle in dieselbe Richtung orientiert. Die Pfeilgrößen geben die relativen Größen der einzelnen Gene zueinander an. Es handelt sich generell um Gene der Polysaccharid Biosynthese, wobei die Funktion aller Gene bis auf *epaJ* und *epaK* bekannt ist.

Neben der Bedeutung der Polysaccharide bei der Zellwandbildung und der dadurch bedingten Oberflächenassoziiierung, kommt ihnen auch eine wichtige Rolle bei der Pathogenität zu. Es wurde gezeigt, dass sie sowohl bei der Anheftung und der Invasion von Wirtsgewebe beteiligt sind, als auch beim Schutz gegenüber der Immunabwehr und der Entzündungsantwort durch den Wirt (Teng *et al.*, 2009). Diese Oberflächen exponierten Kohlenhydrate sind typspezifisch für *E. faecalis* und nicht in allen Populationen vorhanden. Durch die Beteiligung an Anheftungsprozessen kommt sowohl die Relevanz zur Biofilmbildung zum Tragen, als auch die generelle

Funktion als Virulenzfaktor, indem die gebildete Kapsel vor Phagocytose durch die Wirtsabwehr schützt (Xu *et al.*, 2000).

1.6.2.2 *bop/mal*-Locus

Während die Abkürzung *mal* für Maltoseverwertung steht, bedeutet *bop* **biofilm on plastic surfaces** und macht so direkt den Bezug zur Biofilmbildung deutlich. Der Locus wurde von Hufnagel *et al.* (2004) beschrieben und ist aus insgesamt vier Genen *bopABCD* bzw. *malPCBM* aufgebaut (Abb. 12).



bopD ist hierbei als zuckerabhängiger Transkriptionsregulator beschrieben (Creti *et al.*, 2006), der die anderen Gene des Locus positiv reguliert. Eine Defektmutante innerhalb dieses Gens zeigte eine signifikante Schwächung in der Biofilmbildungsfähigkeit. Diese konnte über **Rasterelektronenmikroskopie (REM)** Aufnahmen dem zweiten Schritt des BF-Bildungsprozess zugeordnet werden (vgl Kapitel 1.3). Die primäre Anheftung in der Mutante war nicht gestört, wohl aber die des weiteren mehrschichtigen Wachstums (Hufnagel *et al.*, 2004).

1.6.2.3 Weitere Faktoren

Weitere hier zu erwähnende, dem Stoffwechsel zuzuordnende Gene sind die durch die Gene *dtlABCD* codierten Enzyme und Proteine. Diese sind im D-Alaninylierungsprozess von Lipoteichonsäuren (LTA) involviert. Diese LTA sind in vielfältiger Hinsicht als Virulenz und Biofilmbildungsfaktor zu beurteilen indem sie unter anderem die Adhäsion beeinflussen. Des weiteren vermitteln sie Resistenzen gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden (CAMP) und neutrophiler Tötung (Fabretti *et al.*, 2006).

Das *bgsA* Gen codiert für eine Glykosyltransferase und ist im Zusammenhang mit Glykolipiden zu nennen, welche generell an Biofilmbildungsprozess beteiligt sind (Theillacker *et al.*, 2009). Knock Out- und Überexpressionsstudien zeigten den direkten Einfluss auf die Biofilmbildung, indem geschwächte beziehungsweise verstärkte Biofilmproduktion gezeigt werden konnte.

Ebenfalls direkt mit der Biofilmbildung assoziiert sind die Gene *selD* und *xdh*, welche an einen Selen abhängigem Xanthin Dehydrogenase Prozess beteiligt sind. *Enterococcus faecalis* dient hierbei als möglicher Modellorganismus zur Aufdeckung des genauen Mechanismus (Srivastava *et al.*, 2011).

1.6.3 Regulatorische Gene

Zu diesen den Biofilm betreffenden Gene gehören all diejenigen, welche weitere Gene beeinflussen bzw. regulieren. Das Genprodukt von *ebpR* wurde im Kapitel zum *ebp*-Locus (Kap. 1.6.1.1) mit abgehandelt, während der *fsr*-locus in einem eigenständigen Abschnitt behandelt wird.

Die Gene EF0983 und EF0676 (NCBI, complete genome of *E. faecalis* V583) zeigen aufgrund ihrer Sequenzen Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen der ArgR Familie, welche multiple Funktion ausüben können (Arginin Synthese Repressor, Protein Oligomerisation und Transkriptionsregulation) (Kristich *et al.*, 2008). Transposonmutanten dieser beiden regulatorischen Gene zeigten eine signifikant geschwächte Biofilmbildung, was die Bedeutung und den Einfluss des Regulators in diesem Prozess widerspiegelt (Kristich *et al.*, 2008). Weiterführende Untersuchungen wurden bis heute jedoch nicht getätigt.

1.6.3.1 Das *perA*-Gen

PerA stellt einen Transkriptionsregulator dar, der Ähnlichkeiten zur AraC-Typ Familie zeigt. Die Abkürzung steht für *pathogenicity island-encoded regulator* und wurde von Coburn *et al.* (2008) beschrieben (Abb. 13)



Abb. 13 Pathogenitätsinsel aus *E. faecalis* MMH594 im Bereich des *perA* Gens.
Die Gene *esp*, *perA* und EF0059 sowie das Transposon *Tn905* der PAI liegen alle in der gleichen Orientierung vor (Pfeile). Die Länge der Pfeile gibt die relative Größe der Gene zueinander an.

Charakteristisch für diesen Typ Transkriptionsfaktoren sind 100 AS lange hochkonservierte Sequenzen im C-Terminus, die als DNA-Bindedomäne fungieren (helix-turn-helix Motive, HTH). Die Arbeitsgruppe Maddox *et al.* (2012) hat diesen Genregulator und seinen Einfluss auf die Biofilmbildung bzw. die von ihm regulierten

Gene untersucht und beschrieben. Das *perA* Gen ist Teil einer 153 kb großen Pathogenitätsinsel (PAI) auf der Gene weiterer bekannter Virulenzfaktoren wie *esp*, das *cyl*-Operon oder von Aggregationssubstanzen liegen. Maddox *et al.* (2012) zeigten den koordinierten Einfluss des Transkriptionsregulators auf Gene des gesamten Genoms bezogen auf die Pathogenität von Enterokokken. Unter anderem wurde auch der reprimierende Effekt von *perA* auf den *ebp*-Locus gezeigt, wohingegen die Gene *esp*, der *bee*-Locus und der *fsr*-Locus nicht beeinflusst zu sein scheinen.

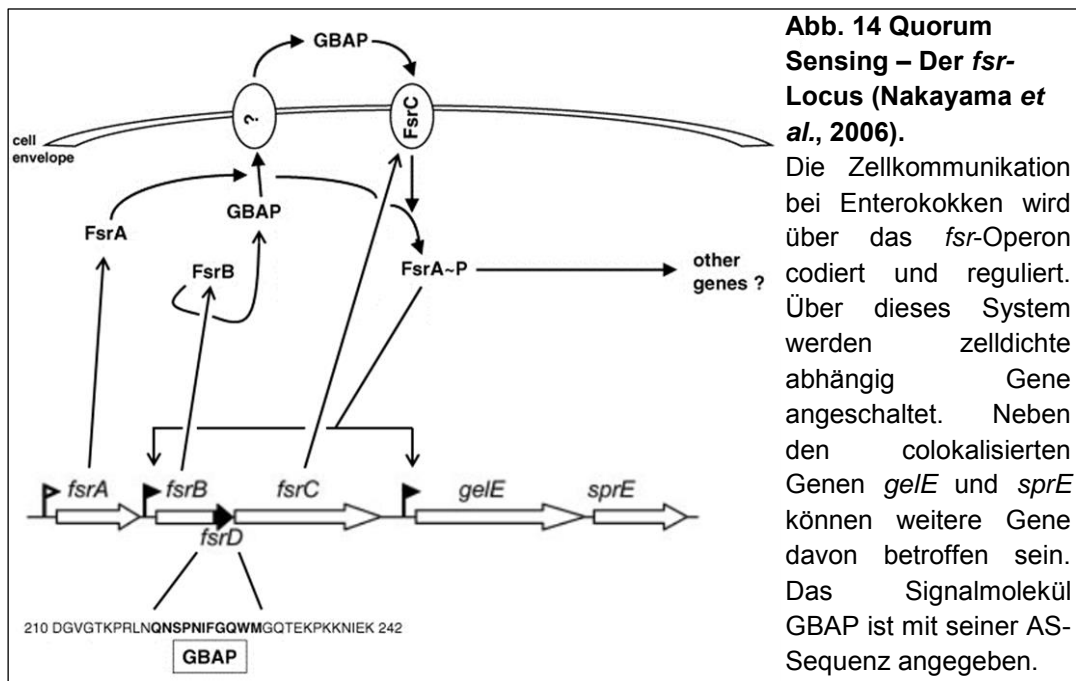
1.6.3.2 Das *ebrA*-Gen

Der enterococcal biofilm regulator (*ebrA*) wurde als neuer Transkriptionsfaktor beschrieben (Ballering *et al.* 2009) und gehört zur Familie der GntR Transkriptionsregulatoren (Haydon & Guest, 1991). Diese Familie hat ebenfalls eine DNA-Bindedomäne mit HTH Motiv, welche sich allerdings N-terminal befindet. Defekte in diesem Gen zeigten eine deutlich Schwächung in der Biofilmbildung und machen daher die Wichtigkeit dieses regulatorischen Proteins deutlich.

1.6.4 Quorum Sensing/*fsr*-Locus

Quorum Sensing (QS) ist eine Form der Zellkommunikation von Bakterien und reguliert zell-dichteabhängig die Expression spezifischer Gene (Miller & Bassler, 2001). Für Enterokokken ist seit längerem der *fsr*-Locus (*E. faecalis* regulator) bekannt, der ein Homolog des *agr*-Locus bei Staphylokokken darstellt (Mohamed & Murray, 2006). Es wurde gezeigt, dass er an unterschiedlichen Expressionsvorgängen beteiligt ist bzw. zu sein scheint, unter anderem auch bei Biofilmbildungsprozessen. Pillai *et al.* (2002) haben gezeigt, dass der *fsr*-Locus bei 70 % aller klinischen Proben nachweisbar ist, bei Endokartiden sogar bei 100 %. In vergleichenden Stuhlproben zeigte sich hingegen nur eine Häufigkeit von 53 %, was eine Beteiligung der Gene an der Virulenz und Pathogenität wahrscheinlich macht. Neuere Untersuchungen von Thomas *et al.* (2008) und Mohamed & Murray (2006) unterstützen diese Argumentation, indem gezeigt wurde, dass *fsr* positive Zellen in Laborversuchen signifikant mehr Biofilm bilden als solche, denen die Gene des *fsr*-Locus fehlen. Die aktuellsten Untersuchungen von Shankar *et al.* (2012) zeigen den generellen, großen Einfluss des *fsr*-Locus auf verschiedenartige zelluläre Prozesse.

QS kann als dreistufiger Prozess definiert werden, aufgebaut aus Produktion, Konzentrierung und Erkennung von Signalmolekülen. In Abb. 14 ist der Signalweg der Zellkommunikation *fsr*-positiver Zellen dargestellt (Nakayama *et al.*, 2006).



Solche Zellen bilden konstitutiv die Proteine FsrB und FsrD. Nach Prozessierung durch FsrB entsteht aus FsrD das reife GBAP (**G**elatinase **B**iosynthesis **A**ctivating **P**heromone). Es handelt sich um ein elf Aminosäure langes zyklisches Lacton, welches in die Umgebung der Zellen sekretiert wird (Abb. 14). Sind genügend Moleküle in einer bestimmten Umgebung vorhanden und somit also genug produzierende Zellen, so kommt es zu einer Erkennung durch das zwei-Komponenten Histidinkinase-System. Hierbei erkennt FsrC an der externen Zelloberfläche das Signalmolekül und phosphoryliert im Zellinneren den ebenfalls konstitutiv exprimierten Regulator FsrA. Dieser nun aktivierte Regulator bewirkt zum einen die verstärkte Transkription der *fsr* Gene, zum anderen die der direkt an den *fsr*-locus nachgeschalteten Gene für eine Gelatinase (*gelE*) und eine Serinprotease (*sprE*).

Neben der hydrolytischen Aktivität der Gelatinase (Zink-Metalloprotease, die Gelatine, Kollagen, Casein, Lactoglobulin und andere biologisch aktive Proteine spaltet) und der proteolytischen Wirkung der Serinprotease, haben Thomas *et al.* (2008) und Thomas *et al.* (2009) gezeigt, dass bei einem Vorgang, der als Brudermord bezeichnet wird, eine direkte Beteiligung dieser beiden Gene an der

Biofilmbildung stattfindet. Bei diesem Vorgang werden gezielt Bakterien in einer Kolonie bzw. im Biofilm lysiert, um deren DNA als Matrixkomponente in den Biofilm einzubauen. Dieser Vorgang dient dem Einbau bzw. der Bereitstellung von DNA bei der Biofilm/Matrixbildung (Paganelli *et al.*, 2012).

1.6.5 Autolysine, Cytolysin und Hyaluronidase

Autolysine werden auch als Murein Hydrolasen bezeichnet, gehören zu den Adhäsinen und sind sowohl an Zellwandwachstum bzw. -regulation als auch an lytischen Prozessen beteiligt. Diese lytischen Vorgänge betreffen auch den Einbau von extrazellulärer DNA (eDNA) bei der Biofilmbildung, wie es von Thomas *et al.* (2008), Thomas *et al.* (2009) und auch Montanaro *et al.*, (2011) beschrieben wurde (siehe auch Kapitel 1.6.4 *fsr*-Locus). Das Hauptautolysin der Enterokokken ist das durch das *atn* Gen codierte AtlA, welches zu den *N*-acetylglucosaminidasen gehört (Guiton *et al.*, 2009). Durch die Gene *cylA* und *hyl* werden die Virulenzfaktoren Cytolysin und Hyaluronidase (Shankar *et al.*, 2002; Shankar *et al.*, 2004) codiert. Es handelt sich um gewebeschädigende Enzyme, die den Wirt schwächen und das Eindringen von Bakterien in das Wirtsgewebe ermöglichen. Cytolysin gehört zu den lantibiotischen Bacteriocinen und hat neben seiner hämolytischen auch eine bakterizide Funktionalität. Es wird durch ein 8 kb großes und aus acht Genen bestehendes Operon codiert, welches sowohl auf Pathogenitätsinseln (PAI) liegen kann (Ike & Clewell, 1992) als auch auf konjugativen Plasmiden wie pAD1 (Gilmore *et al.*, 1994, Clewell, 1981). Im aktiven Zustand besteht es aus den zwei posttranslational modifizierten Untereinheiten CylL_L und CylL_S und besitzt eine gewebeschädigende Aktivität, die sich gegen verschiedenartige Zelltypen richtet. So können andere Grampositive Bakterien getötet, aber auch Erythrozyten geschädigt werden, was durch das Hämolyseverhalten der Enterokokken widerspiegelt wird.

1.6.6 Weitere Faktoren

Zu dieser allgemein gehaltenen Gruppe gehören zum einen die sekretierten Antigene SalA und SalB (Mohamed *et al.*, 2006) als auch die Hitzeschockproteine GrpE, DnaJ und DnaK (Kristich *et al.* 2008). Mittels Transposonmutagenese erzeugte, in der Biofilm geschwächte Mutanten zeigten so den Zusammenhang der Gene bzw. derer Proteine mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung (Kristich *et al.*, 2008). Während die beiden Gene *salA* und *salB* für Proteine kodieren, die die Bindung an Bestandteile der EPS Matrix, wie Kollagen, Laminin und Fibrinectin vermitteln, ist über die

Funktion der drei Hitzeschockproteine bei *E. faecalis* bisher wenig bekannt. Sequenzvergleiche zeigten Übereinstimmungen mit Genen aus *E. coli*, die in reifen Biofilmen überexprimiert werden. Ebenfalls wurden Hitzeschockproteine in Verbindung mit Biofilmbildung bei *Pseudomonas putida* (Dubern *et al.*, 2005) und erwähnt.

In der nachfolgenden Tabelle (Tab.3) sind alle zuvor beschriebenen Gene für Biofilmbildung und Virulenz aufgelistet.

Tab. 3 Virulenz- und Biofilmbildungsfaktoren (erweiterte Version nach Paganelli et al., 2012).

Dargestellt sind die bis Januar 2012 bekannten Gene, die an der Biofilmbildung beteiligt sind bzw. zur Virulenz von *Enterococcus faecalis* beitragen. Zusätzlich sind die Funktionen und Referenzstämme angegeben. *E. fc* = *Enterococcus faecalis*, *E. fm* = *Enterococcus faecium*

Gen	Funktion	Referenzstamm	Quelle
<i>prgB</i>	Aggregationssubstanz	<i>E. fc</i> OG1SSP	Chuang-Smith et al. (2010)
<i>asa1</i>	Aggregationssubstanz	<i>E. fc</i> MMH594	Shankar et al. (2002)
<i>asa373</i>	Aggregationssubstanz	<i>E. fc</i> OG1X:pAM373	Clewell et al. (1985)
<i>ace</i>	Kollagen Bindeprotein	<i>E. fc</i> OG1RF	Nallapareddy et al. (2006)
<i>aceB</i> repeats	s.o.	<i>E. fc</i> OG1RF (5,4), <i>E. fc</i> V583 (4,4), <i>E. fc</i> JH2-2 (2,4)	Nallapareddy et al. (2000)
<i>cylA</i>	Cytolysin	<i>E. fc</i> MMH594	Shankar et al. (2004)
<i>hyl</i>	Hyaluronidase	<i>E. fm</i> E734	Willems et al. (2001), Leavis et al. (2004)
<i>esp</i>	Bap-like, Oberflächenprotein	<i>E. fc</i> MMH594	Shankar et al. (1999)
<i>espA</i> repeats	s.o.	<i>E. fc</i> MMH594 (3)	Shankar et al. (1999)
<i>espC</i> repeats	s.o.	<i>E. fc</i> MMH594 (7)	Shankar et al. (1999)
EF0591	nicht charakterisiertes Oberflächenprotein	<i>E. fc</i> MMH594	Paulsen et al. (2003), Creti et al. (2004)
EF3314	mögliche Sortase	<i>E. fc</i> V583	Creti et al. (2009)
<i>ebpA,B,C + srtC</i>	Pilus-Locus mit spezifischer Sortase	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583	Nallapareddy et al. (2006)
<i>ebpR</i>	ebp-Locus Regulator	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583	Bourgogne et al. (2007)
<i>bee1,2,3 + srt1,2</i>	Pilus-Locus mit spezifischer Sortase	<i>E. fc</i> E99, Isolat <i>E. fc</i> 1.10	Tendolkar et al. (2006), Schlüter (2008)
<i>srtA</i>	Housekeeping Sortase	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583	Marrafini et al. (2006), Mandlik et al. (2008)
<i>atn/atIA</i>	Autolysin	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583	Mohamed et al. (2004), Guiton et al. (2009)
<i>gelE</i>	Gelatinase, aktiviert Zellyse	<i>E. fc</i> MMH594	Mohamed et al. (2004), Thomas et al. (2008)
<i>sprE</i>	Serinprotease, inhibiert Zellyse	<i>E. fc</i> MMH594	Mohamed et al. (2004), Thomas et al. (2008)
<i>bgsA</i>	Glykosyltransferase	<i>E. fc</i> V583	Theilacker et al. (2009)
<i>bopABCD</i>	Maltose Metabolismus	<i>E. fc</i> T9	Hufnagel et al. (2004), Creti et al. (2006)
<i>epaA</i>	Mögliche	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583	Mohamed et al. (2004), Teng et al. (2009), Xu et al. (2000)

Gen	Funktion	Referenzstamm	Quelle
<i>epaE</i>	Glykosyltransferasen	<i>E.fc</i> OG1RF, <i>E.fc</i> V583	Mohamed <i>et al.</i> (2004), Teng <i>et al.</i> (2009), Xu <i>et al.</i> (2000)
<i>epal</i>	Biosynthese Operon	<i>E.fc</i> OG1RF, <i>E.fc</i> V583	Mohamed <i>et al.</i> (2004), Teng <i>et al.</i> (2009), Xu <i>et al.</i> (2000)
<i>epaM</i>	für Zellwand	<i>E.fc</i> OG1RF, <i>E.fc</i> V583	Mohamed <i>et al.</i> (2004), Teng <i>et al.</i> (2009), Xu <i>et al.</i> (2000)
<i>epaR</i>	assoziierte Polysaccharide	<i>E.fc</i> MMH594	Mohamed <i>et al.</i> (2004), Teng <i>et al.</i> (2009), Xu <i>et al.</i> (2000)
<i>dtlABCD</i>	D-Alanylierung	<i>E.fc</i> V583	Fabretti <i>et al.</i> (2006)
<i>selD</i>	Selenophosphate Synthetase	<i>E.fc</i> V583	Srivastava <i>et al.</i> (2011)
<i>Xdh</i>	Xanthin Dehydrogenase	<i>E.fc</i> V583	Srivastava <i>et al.</i> (2011)
<i>fsrABDC</i>	Quorum sensing Locus, BF Regulator	<i>E.fc</i> OG1RF, <i>E.fc</i> V583	Mohamed <i>et al.</i> (2004), Mohamed & Murray (2006), Thomas <i>et al.</i> (2008)
<i>perA</i>	<i>araC</i> -like Regulator	<i>E.fc</i> MMH594	Coburn <i>et al.</i> (2008)
<i>ebrA</i>	DNA Bindeprotein, <i>gntR</i> Familie	<i>E.fc</i> OG1RF, <i>E.fc</i> V583	Ballering <i>et al.</i> (2009)
<i>salA</i>	Sekregiertes Antigen	<i>E.fc</i> OG1RF, <i>E.fc</i> V583	Mohamed <i>et al.</i> (2006)
<i>salB</i>	Sekregiertes Antigen	<i>E.fc</i> OG1RF, <i>E.fc</i> V583	Mohamed <i>et al.</i> (2006)
EF0676	Transkriptionsregulator, ArgR Familie	<i>E.fc</i> OG1RF, <i>E.fc</i> V583	Kristich <i>et al.</i> (2008)
EF0983	Transkriptionsregulator, ArgR Familie	<i>E.fc</i> OG1RF, <i>E.fc</i> V583	Kristich <i>et al.</i> (2008)
<i>grpE</i>	Hitzeschockprotein	<i>E.fc</i> OG1RF, <i>E.fc</i> V583	Kristich <i>et al.</i> (2008)
<i>dnaJ</i>	Hitzeschockprotein	<i>E.fc</i> OG1RF, <i>E.fc</i> V583	Kristich <i>et al.</i> (2008)
<i>dnaK</i>	Hitzeschockprotein	<i>E.fc</i> OG1RF, <i>E.fc</i> V583	Kristich <i>et al.</i> (2008)

1.7 Isolat 1.10 und Mutante 1.10.16

Grundlage dieser Doktorarbeit und der zugrunde liegenden Experimente stellt ein klinisches Isolat von *Enterococcus faecalis* aus dem Jahre 2005 dar. Es stammt aus einem Vaginalabstrich einer Patientin eines niedergelassenen Hautarztes, jedoch konnte es nicht als krankheitsverursachender Keim zugeordnet werden.

Dieses Isolat diente schon in der Doktorarbeit von Frau Susanne Schlüter 2008 mit dem Titel „Untersuchungen zum Vorkommen und molekularen Mechanismus der Biofilm-Bildung bei Enterokokken aus verschiedenen klinischen Bereichen“ als Untersuchungsobjekt, sodass die hier erzielten Ergebnisse der weiteren Charakterisierung dienen sollten.

Die aus dem Isolat generierte, in der Biofilmbildung geschwächte, Spontanmutante 1.10.16 wurde durch Überimpfungsstudien erzeugt und die Identität als Mutante von 1.10 mittels verschiedener Typisierungsverfahren bestätigt. Die größte Bedeutung kam hierbei der PFGE (Puls Feld Gel Elektrophorese) zu, die die Zusammengehörigkeit von Isolat und Mutante abschließend hervorhob (Schlüter *et al.*, 2008; 2009).

Es war also davon auszugehen, dass der gefundene phänotypische Unterschied in der geschwächten Biofilmbildung auf Mutationen im Genom von Isolat 1.10 basierte. Dies wurde in der Doktorarbeit von Frau Schlüter auch in Bezug auf das *srt1* Gen des *bee*-locus bewiesen.

2. Zielsetzung

Die Biofilmproblematik im Zusammenhang mit Humanerkrankungen stellt ein zunehmendes Problem in der Behandlung solcher Infektionen dar. Die erhöhte Antibiotikaresistenz sowie die generelle Persistenz der Keime im menschlichen Organismus sind hierbei die hervorstechenden Probleme. Um neue bzw. vertiefende Einblicke in die Biofilmbildung bei *Enterococcus faecalis* zu erlangen, wurden in dieser Arbeit spezifisch Untersuchungen an dem klinischen Isolat *Enterococcus faecalis* Isolats 1.10 und dessen in der Biofilmbildung geschwächten Mutante 1.10.16 durchgeführt. Die Vorarbeiten von Schlüter (2008) in Bezug auf die Biofilmbildung sollten hierbei bestätigt und weitergeführt werden. Die erzielten Ergebnisse können hierbei als Grundlage für neue medizinische Therapieansätze von Biofilmassoziierten Humanerkrankungen dienen. Durch die Verhinderung der ersten Schritte der Biofilmbildung, die unter anderem durch Pili vermittelt wird, kann eine Erkrankung unter Umständen so von vornherein verhindert werden. Auch in späteren Stadien der Biofilmbildung sind Pili beim Zell-Zellkontakt beteiligt, sodass auch hier eventuell therapeutisch eingegriffen werden könnte.

Hauptaugenmerke bei den Experimenten und Untersuchungen dieser Doktorarbeit waren hierbei die Komplementation des defekten *srt1* Gens der Mutante 1.10.16 (Schlüter *et al.*, 2009), sowie die generelle Analyse von dessen *bee*-locus und Vergleich der Mechanismen mit bekannten Pili-Loci bei Grampositiven Mikroorganismen. Zusätzlich sollten Versuche durchgeführt werden, die die zwei Pili bei *Enterococcus faecalis* (Ebp vs. Bee) beurteilen und beschreiben. Des Weiteren sollten mittels zweier verschiedener methodischer Ansätze neue bzw. weitere Faktoren der Biofilmbildung von Isolat 1.10 entdeckt werden. Besonderes Augenmerk wird dabei auf oberflächenassoziierte Proteine der Zellwand der Zellen gelegt.

Durch Nachweis per PCR und anschließender Sequenzierung sollten Mutationen einzelner an der Biofilmbildung beteiligter Gene detektiert werden und somit Rückschlüsse auf den Biofilmbildungsprozess ermöglicht werden.

Für diese Untersuchungen wurden verschiedene Experimente mit einer Vielzahl methodischer Ansätze durchgeführt, wozu auch massenspektrometrische Untersuchungen zählen.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte

Laborautoklav LTA 2x3x4

Autoklav LVSA

Trocknungsschrank UE300

Brutschrank Typ B30

Wasserbad Julabo SW-21C

Bruthaube + Schüttler Excella E24R

Thermomixer Comfort

Tischrundschtüttler TR-125

Kühlzentrifuge Sigma 3K30

Kühlzentrifuge 5424R

Kühlzentrifuge 5810R

PCR-Cup Minizentrifuge

Kühl-/Gefrierschrank

Gefrierschrank -80°C MDF-U54V

Primus 25

Primus 96 plus

Laborcyclor Gradient 96

Gelschlitten multiSub 10x10; 15x10; 20x10

Gelkammern multiSub MSmidi, MSchoice

Blottingkammern MiniProtean Tetra System

SDS-Gelsystem Mini PROTEAN 3 Cell

Power Supply PowerPac 300

Power Supply MP-30P

Power Supply MP-3AP

Gel IX imager

Drucker Modell P93DW

Zirbus technology, Bad Grund

Zirbus technology, Bad Grund

Memmert GmbH, Schwabach

Memmert GmbH, Schwabach

Julabo Labortechnik GmbH,

Seelbach

New Brunswick Scientific.

Enfield (USA)

Eppendorf AG, Hamburg

Infors AG, Bottmingen (CH)

Sigma Laborzentrifugen.

Osterode/Harz

Eppendorf AG, Hamburg

Eppendorf AG, Hamburg

ABImed, Langenfeld

Liebherr-Hausgeräte, Biberach

am Riss

Sanyo, München

MWG AG Biotech, Ebersberg

MWG AG Biotech, Ebersberg

Sensoquest, Göttingen

Geneflow Ltd, Staffordshire

Geneflow Ltd, Staffordshire

Bio-Rad Laboratories, München

Bio-Rad Laboratories, München

Bio-Rad Laboratories, München

Bio-Rad Laboratories, München

Bio-Rad Laboratories, München

Intas, Göttingen

Mitsubishi Electric Corporation

Gilson-Pipetten (5 ml, 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl)	ABImed, Langenfeld
Multipipette DV8-200 (200 µl; 8-Kanal)	ABImed, Langenfeld
Analysewaage BA 110 S	Sartorius, Göttingen
Präzisionswaage BA 610	Sartorius, Göttingen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Spektralphotometer Uvikon 930	Kontron Instruments, Eching
Phasenkontrastmikroskop BH 2	Olympus, Hamburg
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Magnetrührer IKAMAG REO	IKA Labortechnik, Staufen
ELISA-Washer	Sigma, Deisenhofen
FastPrep FP120 Bio101	Savant Instruments, New York
SpeedVac UniVapo 100H Concentrator	UniEquip, Martinsried
Vortex VF 2	IKA Labortechnik, Staufen
Epoch™ Microplate Spectrophotometer	BioTek® Instruments Inc., Vermont (USA)
Sterilwerkbank Heraeus HS12	Kendro Laboratory Products, Hanau
Genpulser BioRad 1652077	Bio-Rad Laboratories, München
Intelli Mixer RM2	elmi Ttd. Riga (LV)
Mikrowelle R-24	Sharp Electronics (Europe) GmbH, Hamburg

Verbrauchsmaterial

Petrischalen (steril)	Sarstedt, Nümbrecht
96well Mikrotiterplatten (PS, steril, mit Deckel)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
PCR Tubes (DNase-/RNase-frei; 200 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
PCR Filter-Tips (1000 µl, 100 µl, 10 µl; DNase-/RNase-frei)	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubdeckelröhrchen (50 ml, 15 ml; steril)	Sarstedt, Nümbrecht
Silicatperlen (Ø 0,17-0,18 mm)	B. Braun, Melsungen

Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	Terumo, Eschborn
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Mikro-Schraubröhrchen (2 ml; steril; PP)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Impfösen (10 µl, 1 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Infusionswasser (A. ad iniectabilia, steril)	B. Braun, Melsungen

3.2 Nährmedien & Chemikalien

Nährmedien

Die Zusammensetzung folgender verwendeter Fertignährmedien (Granulate) sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen. Die Zubereitung erfolgte nach Herstellerangaben.

Für die Herstellung von festen Nährmedien wurden 1,5 % Agarose vor dem Autoklavieren hinzugeben.

Die flüssigen sowie festen Nährmedien wurden für 20-30 min bei 121°C autoklaviert.

Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren sterilfiltriert in das abgekühlte Medium (~50°C) gegeben.

Brain-Heart-Infusion (BHI)	Merck, Darmstadt
Iso-Sensitest-Medium	Oxoid, Wesel
TSB	BD Diagnostics, Heidelberg
THB	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe
N1	Carl Roth, Karlsruhe
Columbia-Blutagar	BD Diagnostics, Heidelberg

Chemikalien

Agar Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra Qualität	Carl Roth, Karlsruhe
Aluminiumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (bovine serum albumin)	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue G250 / R250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTPs	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEPC	AppliChem, Darmstadt
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutardialdehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	AppliChem, Darmstadt
Lysozym	AppliChem, Darmstadt
MOPS	Carl Roth, Karlsruhe
Osmiumtetroxid	Carl Roth, Karlsruhe
PMSF	Serva, Heidelberg
RNase-ExitusPlus-Lösung	AppliChem, Darmstadt
Saccharose	AppliChem, Darmstadt
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe

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

Antibiotika

Spectinomycin	AppliChem, Darmstadt
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vancomycin	AppliChem, Darmstadt

3.3 Kits

- NucleoSpin Plasmid Mini Kit, Macherey&Nagel (740615.250)
- NucleoSpin PCR and Gel Clean-up Kit, Macherey&Nagel (740609.250)
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific (#K1622)
- NucleoSpin RNAII Total RNA Isolation Kit, Macherey&Nagel (740955.50)

3.4 Antikörper

Die Antikörper zum *ebp*-locus, welche in dieser Arbeit Verwendung gefunden haben, wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Frau Barbara Murray (The University of Texas Health Science Center at Houston, Medical School, Department of Infectious Diseases) zur Verfügung gestellt und entsprechen den von Nallapareddy *et al.* (2006) verwendeten.

- goat anti-EbpA,
- goat anti-EbpB,
- goat anti-EbpC

Der dazu gehörende zweite Antikörper HRP goat-anti-mouse AK wurde von Santa Cruz Biotechnology bezogen.

3.5 Bakterienstämme und Plasmide

Alle verwendeten Bakterienstämme und Isolate waren in der Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie, Universität Kassel bereits vorhanden und werden in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tab. 4 Bakterienstämme. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sowie deren Verwendungszweck und Referenz; <i>E. fc</i> = <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>E. fm</i> = <i>Enterococcus faecium</i>		
Name	Funktion/Anwendung	Referenz
<i>E. fc</i> Isolat 1.10	Untersuchungsobjekt , klinisches Isolat	Schlüter 2008
<i>E. fc</i> Mutante 1.10.16	Untersuchungsobjekt, Mutante des Isolat 1.10	Schlüter 2008
<i>E. fc</i> Mutante kompl	Untersuchungsobjekt, komplementierte Mutante 1.10.16	diese Arbeit
<i>E. fc</i> T9	Referenzstamm BF-Assay, sehr starker BF	Maekawa <i>et al.</i> , 1992; Hufnagel <i>et al.</i> , 2004
<i>E. fc</i> OG1RF	Referenzstamm BF-Assay, starker BF, PK Virulenz-&BF-faktoren PCRs	Dunny <i>et al.</i> , 1978
<i>E. fm</i> 64/3	Referenzstamm BF-Assay, kein BF	RKI, Wernigerode
<i>E. fc</i> ATCC 29212	Referenzstamm Van-Resistenz	DSMZ Braunschweig
<i>E. fc</i> MMH594	PK Virulenzfaktoren PCRs	Huycke <i>et al.</i> , 1991; Shankar <i>et al.</i> , 2002
<i>E. fm</i> BM4147	<i>tetM</i> -Gen	Arthur <i>et al.</i> , 1993
<i>E. fc</i> V583	Empfängerstamm der <i>bee</i> -locus pAT28, PK Virulenz-&BF-faktoren PCRs	Sahm <i>et al.</i> , 1989; Paulsen <i>et al.</i> , 2003; Tendolkar <i>et al.</i> , 2003
<i>E. coli</i> DH5 α	Klonierungsarbeiten	Invitrogen, Paisley (UK)
<i>E. coli</i> Top10	Klonierungsarbeiten	Invitrogen, Paisley (UK)

Beide in dieser Arbeit genutzten Plasmide wurden von der Arbeitsgruppe um Nathan Shankar (Department of Pharmaceutical Sciences, University of Oklahoma Health Sciences Center) zur Verfügung gestellt.

Tab. 5 Plasmide.		
Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sowie deren Verwendungszweck und Referenz		
Name	Funktion	Referenz
pAT28	Shuttlevektor	Trieu-Cuot et al., 1990
pTCVlac	<i>aphA</i> Promotor	Poyart and Trieu-Cuot, 1997

3.6 Enzyme & Längenstandards

Die benutzten Enzyme sind in den folgenden Tabellen aufgeführt und wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot bezogen (ehemals Fermentas).

Tab. 6a Restriktionsenzyme.		
Name	Kat.-Nr.	Schnittstelle
BamHI	#ER0051	5'...G↓GATCC...3'
		3'...CCTAG↑G...5'
EcoRI	#ER0271	5'...G↓AATTC...3'
		3'...CTTAA↑G...5'
Mlsl	#ER1211	5'...TGG↓CCA...3'
		3'...ACC↑GGT...5'
EcoRV	#ER0301	5'...GAT↓ATC...3'
		3'...CTA↑TAG...5'
HindIII	#ER0501	5'...A↓AGCTT...3'
		3'...TTCGA↑A...5'
Sacl	#ER1131	5'...GAGCT↓C...3'
		3'...C↑TCGAG...5'
Van91I	#ER0711	5'...CCANNNN↓NTGG...3'
		3'...GGTN↑NNNNACC...5'
KpnI	#ER0521	5'...GGTAC↓C...3'
		3'...C↑CATGG...5'

Tab. 6b Enzyme.

Name	Kat.-Nr.
T4 Pol	#EP0061
T4 Lig	#EL0011
Fast AP	#EF0651
DreamTaq	#EP0711
Phusion-Pol	#F530S

Tab. 6c Längenstandards.

Name	Kat.-Nr.
GeneRuler 1kb	#SM0311
GeneRuler 1kb Plus	#SM1331
GeneRuler 100bp	#SM0321
PMWM prestained	#SM0441
PageRuler™ Plus Prestained	#SM1811

3.7 Primer

Im Folgenden sind alle während dieser Doktorarbeit verwendeten Primer alphabetisch aufgelistet. Sie wurden alle durch die Firma Invitrogen synthetisiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Tab. 7 Primerverzeichnis.				
Aufgelistet sind alle verwendeten Primer in alphabetischer Reihenfolge. Fett gedruckt sind eingefügte Restriktionsschnittstellen und die 19 bp Mosaikenden bei den Primern zum Transposon-Spectinomycinresistenzgen. Neben den Namen und jeweiligen Sequenzen sind die Herkunftsorganismen, die Referenz sowie die entsprechende Annealingtemperatur (A.-T.) angegeben.				
<i>E. fc</i> = <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>E. fm</i> = <i>Enterococcus faecium</i> ; pTCVlac, pAM373, pBEE99, pAT28 = Plasmidnamen				
Name	Sequenz	Organismus	Referenz	A.-T.
6259-2	CATTAACAAGCGTAGCGTTG	<i>E. fc</i> V583	Mohamed <i>et al.</i> , 2006	46°C
6259-3	GCCTTTTTCAGGAGTCGTTG	<i>E. fc</i> V583	Mohamed <i>et al.</i> , 2006	46°C
<i>aceB</i> rep for	AAAATGTGGAAATGCCAACAGAAGAAAGTC	<i>E. fc</i> OG1RF	Nallapareddy <i>et al.</i> , 2000	55°C
<i>aceB</i> rep rev	ATTTAATTTTTGAATTGGTTCACTAAGCAG	<i>E. fc</i> OG1RF	Nallapareddy <i>et al.</i> , 2000	55°C
<i>aph</i> -for-Sacl	GAGAG GAGCT CCCCAGCGAACCATTT	pTCVlac	Tendolkar <i>et al.</i> , 2006	56,5°C
<i>aph</i> -rev-KpnI	GAGAG GTACC GATTTTGAAACCAC	pTCVlac	Tendolkar <i>et al.</i> , 2006	56,5°C
ASA 11	GCACGCTATTACGAACTATGA	<i>E. fc</i> MMH594	Van Kerckhoven <i>et al.</i> , 2004	56°C
ASA 12	TAAGAAAGAACATCACCACGA	<i>E. fc</i> MMH594	Van Kerckhoven <i>et al.</i> , 2004	56°C
<i>asa</i> 373 rev	CTGGGTGTGATTCCGCTGTTA	<i>E. fc</i> OG1X:pAM373	Creti <i>et al.</i> , 2004	58°C
<i>asa</i> 373 for	GGACGCACGTACACAAAGCTAC	<i>E. fc</i> OG1X:pAM373	Creti <i>et al.</i> , 2004	58°C
<i>atn/atIA f</i>	GTGCTAAAAACAACCTCTTTCC	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>atn/atIA r</i>	CGCCTGATTTAATTGTGTAGTA	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
b1-for-KpnI	GAGAG GTACC ATGAAGAAGAAGAAATCGGTCT	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	54°C
b1-rev-XbaI	GAGAT CTAGAG AATAACCAATCACTAGTAGTGC	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	54°C
b2-for-KpnI	GAGAG GTACC GCCTACTACTGGTGGACAAG	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	54°C
b2-rev-XbaI	GAGAT CTAGAC GAAACCAACACGCCGGTGA	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	54°C
b3-for-KpnI	GAGAG GTACC CGGAAACACTCTGTACGAAAC	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	54°C
b3-rev-XbaI	GAGAT CTAGAG GGTCATAATAGGAATTCACCGC	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	54°C

Name	Sequenz	Organismus	Referenz	A.-T.
<i>bgsA</i> f	TGCTGACTAGCTAATGCTTCTA	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>bgsA</i> r	AAGTTATTTATCATGCCCATTC	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>bopA</i> left-2	TCCAAATTGATCCTTGAAAA	<i>E. fc</i> T9	Hufnagel <i>et al.</i> , 2004	44°C
<i>bopC</i> right-2	CCGTTTGGTAGGTTTGCTTT	<i>E. fc</i> T9	Hufnagel <i>et al.</i> , 2004	44°C
CYT-1	ACTCGGGGATTGATAGGC	<i>E. fc</i> MMH594	Van Kerckhoven <i>et al.</i> , 2004	56°C
CYT-2b	GCTGCTAAAGCTGCGCTT	<i>E. fc</i> MMH594	Van Kerckhoven <i>et al.</i> , 2004	56°C
<i>dnaK</i> f	TACAAATCCTAACACGATTTC	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>dnaK</i> r	GTCAGGGTAACTGATTTGTTT	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>dnaJ</i> f	AAGTTTCTGAAGCGTATGAAGT	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>dnaJ</i> r	ATTTTTAATTCACGTCACCAT	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>dtlABCD</i> f	TACATGTTGAGAAGTCAGCAAT	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>dtlABCD</i> r	CCTGTTTATTTAACCGAAGAAA	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>ebpA</i> for	AATGATAACAGATGAGAATGATAAAA	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	54°C
<i>ebpA</i> rev	TTACACACTCCCTTCTGGTC	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	54°C
<i>ebpB</i> for	ATGAAAACGCACGTTG	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	54°C
<i>ebpB</i> rev	TCATTTTCTCTCTCTTTTT	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	54°C
<i>ebpC</i> for	ATGGGGAGAGCGCAC	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	54°C
<i>ebpC</i> rev	TTAAGCATTTTCTTTTCTACGTC	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	54°C
<i>ebpR</i> for	TTTCGTTTAGCTGATTATCTTAAG	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	54°C
<i>ebpR</i> rev	TTATACAGAGAAGGAACCTAATAAT	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	54°C
<i>ebrA</i> f	TATGGCGTATCTGATAATGAAA	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
<i>ebrA</i> r	GAAAATGCCTTTAAAACAAAG	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
EF0591 for	CGGAAGTATTGCGTTTGGTGGG	<i>E. fc</i> MMH594	Creti <i>et al.</i> , 2004	58°C
EF0591 rev	CGTCTGCTTTAATAGACCCAG	<i>E. fc</i> MMH594	Creti <i>et al.</i> , 2004	58°C
EF0676 f	CAACAAGAAATTGAAACACAAG	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	???
EF0676 r	ATCATATTTTCGATGCGTTC	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	???
EF0983 f	AGCAAGATAGACACCGTTAAT	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	???
EF0983 r	TCTCTTGGTAATCTTTTCGAT	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	???

Name	Sequenz	Organismus	Referenz	A.-T.
EF3314 f	CAGTGATTTTGTCAACAGTAGG	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
EF3314 r	GGTTACGAAGTTAAAGGAACTG	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>epaA</i> f	TCGCTCCTAAAATAATAATCGT	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>epaA</i> r	TAAGAATCGACCCTAATTCTGT	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>epaE</i> f	TCGTA AAAATACAAACCTGTCA	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>epaE</i> r	GTAAACAAAAGCAACATCAAAA	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>epal</i> f	TTCCAGCATATACTTCACAGAA	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>epal</i> r	GAACCAAACAAATTTTAGAAGC	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>epaM</i> f	CGTATCCTCCATTTATGATCT	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>epaM</i> r	ACGGAAATTA AAAATTCTGGTA	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>epaR</i> f	TCTTTACAATAATCCATCGTCA	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>epaR</i> r	GATTTACAAACAAACTCGGATT	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
ESP12R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG	<i>E. fc</i> MMH594	Van Kerckhoven <i>et al.</i> , 2004	56°C
ESP14F	AGATTCATCTTTGATTCTTGG	<i>E. fc</i> MMH594	Van Kerckhoven <i>et al.</i> , 2004	56°C
<i>esp2</i>	CAGATGGATCATCTGATGAAGT	<i>E. fc</i> MMH594	Eaton & Gasson, 2002	64°C
<i>esp46</i>	TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC	<i>E. fc</i> MMH594	Shankar <i>et al.</i> , 1999	63°C
<i>esp47</i>	CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG	<i>E. fc</i> MMH594	Shankar <i>et al.</i> , 1999	63°C
<i>esp5</i>	GTAACGTTACTGTTACATCTGC	<i>E. fc</i> MMH594	Eaton & Gasson, 2002	64°C
<i>fsrAF</i> 1	GGGAGCTCTGATGATGATTGATTGATGGAC	<i>E. fc</i> OG1RF	Qin <i>et al.</i> , 2000	60°C
<i>fsrAR</i> 1	GGGGTACCATTACAAGTGGCACACCAGGAC	<i>E. fc</i> OG1RF	Qin <i>et al.</i> , 2000	60°C
<i>fsrBF</i> 1	GGGAGCTCTGGACAAAGTATTATCTAACCG	<i>E. fc</i> OG1RF	Qin <i>et al.</i> , 2000	55°C
<i>fsrBR</i> 1	TTGGTACCCACACCATCACTGACTTTTGC	<i>E. fc</i> OG1RF	Qin <i>et al.</i> , 2000	55°C
<i>fsrCF</i> 1	GGGAGCTCATCGTGTGTTAGAAAATAGC	<i>E. fc</i> OG1RF	Qin <i>et al.</i> , 2000	55°C
<i>fsrCR</i> 1	GGGGTACCACGAATCACAACCACTAAGTC	<i>E. fc</i> OG1RF	Qin <i>et al.</i> , 2000	55°C
GEL 11	TATGACAATGCTTTTTGGGAT	<i>E. fc</i> MMH594	Van Kerckhoven <i>et al.</i> , 2004	56°C
GEL 12	AGATGCACCCGAAATAATATA	<i>E. fc</i> MMH594	Van Kerckhoven <i>et al.</i> , 2004	56°C
<i>grpE</i> f	TCTGAAGTAGAAGTTGAAGCAA	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>grpE</i> r	AACTTCAACAATGGTATCTGCT	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C

Name	Sequenz	Organismus	Referenz	A.-T.
<i>gyd</i> 1 rev	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	<i>E. fc</i> OG1RF	Ruiz-Garbajosa <i>et al.</i> , 2006	51°C
<i>gyd</i> 1for	GGCGCACTAAAAGATATGGT	<i>E. fc</i> OG1RF	Ruiz-Garbajosa <i>et al.</i> , 2006	51°C
HYLn1	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	<i>E. fm</i> E734	Van Kerckhoven <i>et al.</i> , 2004	56°C
HYLn2	GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	<i>E. fm</i> E734	Van Kerckhoven <i>et al.</i> , 2004	56°C
<i>perA</i> -13F	CATTACATGTATGCTTAGGGATACC	<i>E. fc</i> MMH594	Coburn <i>et al.</i> , 2008	47°C
<i>perA</i> -14R	CCACAGGAACAACACCATTACTTAG	<i>E. fc</i> MMH594	Coburn <i>et al.</i> , 2008	47°C
<i>pgrB</i> f	ATGTATAAGGCAAAGAAGCATT	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
<i>pgrB</i> r	TTGTCATGTTTGACGTCTAGTT	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RT- <i>bee1</i> -A for	AAGATGTCGCAAGTGATG	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	52°C
RT- <i>bee1</i> -A rev	GAATTTCAAGAGCTACCTTGG	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	52°C
RT- <i>bee1</i> -E for	GGAAAGATTTGAAAGGTGC	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	52°C
RT- <i>bee1</i> -E rev	CAATGGTGACTTTGCCG	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	52°C
RT- <i>bee2</i> -M for	TGATTATCAAAAAATTATCAGAGAAC	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	51°C
RT- <i>bee2</i> -M rev	GTGCTCATTTATATACTGGTAAA	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	51°C
RT- <i>bee3</i> -A for	ATCCACTTAAAGGAGTCGG	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	52°C
RT- <i>bee3</i> -A rev	CGCCGTCTTTTAAAGCA	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	52°C
RT- <i>bee3</i> -E for	TCGTAAAACAAGGCTCTAACTT	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	52°C
RT- <i>bee3</i> -E rev	ACACATATTTATCACTTGAAGTCG	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	52°C
RT <i>ebpA</i> A for	CGGTACAGCTTTCGTTAGC	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RT <i>ebpA</i> A rev	GAGCCGAATCATTTTTGTT	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RT <i>ebpA</i> E for	CACTTAAAGGAGCGAAATTC	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RT <i>ebpA</i> E rev	TCGTGACTGAACCATCTTC	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RT <i>ebpB</i> A for	ATGACGTCACTTATCAAGTCTATG	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RT <i>ebpB</i> A rev	GCTGCGAATCTTTGCTAG	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RT <i>ebpB</i> E for	TCAAAAATCAAGCGGG	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RT <i>ebpB</i> E rev	CCGTAAAAGGAATTTCTGTTT	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RT <i>ebpC</i> A for	ATAAATATCAAGGACTGGCAGA	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RT <i>ebpC</i> A rev	TACCATTTTGTTTTTAGGTAAGT	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C

Name	Sequenz	Organismus	Referenz	A.-T.
RTebpC E for	TCGTCCGTGATCAAAAC	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RTebpC E rev	TTGTTAACAAGACATAATCATCAG	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RTebpR A for	TGGACATAGTTTCCAATATATTGA	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RTebpR A rev	TCACTTATATGCACGATTA AAAAG	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RTebpR E for	GAGTAAGTTTCCAAGACCTGAT	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RTebpR E rev	TCGTTTAGAAAAC TTTAATGTGTC	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RTebp-srtC A for	AGAAAAACCAAGAATTAGCG	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RTebp-srtC A rev	ACAAGGAGCTTCCTTTTTTC	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RTebp-srtC E for	GACATCGTGGTCTCCCT	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RTebp-srtC E rev	TATACGGTGTGCAAGTTAATAAA	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
RT-srt1-A for	AAGAAATGGCCGAAAAAA	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	51°C
RT-srt1-A rev	TGGTTTCATCAAATAAAGGTAAG	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	51°C
RT-srt1-E for	TGTATTTACTACTGATCCCGC	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	51°C
RT-srt1-E rev	CAGCAACTGGTTGGTTAGT	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	51°C
RT-srt2-A for	TGAGCGAAAGCGGGT	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	51°C
RT-srt2-A rev	CAGGAAAGGACGTGCC	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	51°C
RT-srt2-E for	TTCGTAAGTTGAAACAAATCG	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	51°C
RT-srt2-E rev	CATTACGCCGCAGGG	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	51°C
s1-for-KpnI	GAGAGGTACCATGGATCAGCGCCAAAAAAGG	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	54°C
s2-for-KpnI	GAGAGGTACCATGAAGAAAATCGGCAAGTGAT	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	54°C
s2-rev-XbaI	GAGATCTAGATTATTTGACTTCTAGTATTCTTT	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	54°C
salBlower	TCATTGCTGATTAGGCTGAG	<i>E. fc</i> V583	Mohamed <i>et al.</i> , 2006	46°C
salBupper	CACGTGAAAAC TAGTCGTAA	<i>E. fc</i> V583	Mohamed <i>et al.</i> , 2006	46°C
selD f	CTACTGCTGTGTTCTTTTTGG	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
selD r	TTTTTATCACAATGTACATCAGGT	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
SpecME for	CTGTCTCTTATACACATCT ATTATTAATCTGTAGACAAATTGTGA	Plasmid pAT28	vorliegende Arbeit	53°C
SpecME rev	CTGTCTCTTATACACATCT AATTAAGTAATAAAGCGTTCTCT	Plasmid pAT28	vorliegende Arbeit	53°C
sprEF 1	TTGAGCTCCGTTCCCTGCCGAAAGTCATTC	<i>E. fc</i> MMH594	Qin <i>et al.</i> , 2000	60°C

Name	Sequenz	Organismus	Referenz	A.-T.
<i>sprER 1</i>	TTGGTACCGATTGGGGAACCAGATTGACC	<i>E. fc</i> MMH594	Qin <i>et al.</i> , 2000	60°C
<i>srt1</i> kompl rev	ATATTCTAGATCATTTTTTCGCTCCATTC	<i>E. fc</i> 1.10, pBEE99	vorliegende Arbeit	53°C
<i>srtA f</i>	TTTTAACAATCAGATACGCAGT	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
<i>srtA r</i>	AACGTCATCAATTA ACTCAACA	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	51°C
<i>srtC</i> for	TAAGGAGGAAGCAATGAAGTC	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	54°C
<i>srtC</i> rev	CTACTTTGGTTTTCTGGTCG	<i>E. fc</i> OG1RF	vorliegende Arbeit	54°C
<i>TetM</i> for	CAAATATTGGTACATGATTACAGAT	<i>E. fc</i> BM4147	vorliegende Arbeit	53°C
<i>TetM</i> rev	ATTTACCCCTCCAATAATGA	<i>E. fc</i> BM4147	vorliegende Arbeit	53°C
<i>xdh f</i>	CTACTTCAGCAGCATAACCATA	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C
<i>xdh r</i>	CTGCTAAAATGTTTTGTGAAGA	<i>E. fc</i> V583	vorliegende Arbeit	51°C

3.8 Phänotypische Standardmethoden

3.8.1 Kultivierung von MO

Die Kultivierung der Enterokokkenstämme erfolgte entweder auf N1- oder Blutagar. *E. coli* Top10 bzw. DH5 α Stämme wurden ebenfalls auf N1- oder BHI-Agar kultiviert. Für die Biofilmanalysen wurden die MO auf TSBG-Agar bzw. -Bouillon kultiviert. Zur Aufrechterhaltung von Plasmiden in den Stämmen wurden die entsprechenden Antibiotika sterilfiltriert nach dem Autoklavieren zum Medium hinzugefügt. Für die stetige Analyse wurden alle untersuchten und benötigten Stämme nach Inkubation bei 37° ÜN bei 4°C gelagert. Alle 4 Wochen wurden die Stämme auf frisches Medium überimpft. Dauerkulturen wurden von Flüssigkulturen der späten log-Phase durch Mischung mit 100 % Glycerin im Verhältnis 1:1 angelegt und bei -20°C gelagert.

3.8.2 Wachstumskurve

Die Wachstumskurve sollte Aufschlüsse darüber geben, ob die verminderte Biofilmbildungsfähigkeit der Mutante einen Einfluss auf den typischen Verlauf des Wachstums einer statischen Bakterienkultur hat. Hierfür wurden Kulturen von Isolat, Mutante und komplementierter Mutante in TSBG bei 37°C ÜN inkubiert. Morgens wurde eine frische 100 ml TSBG Kultur mit den ÜN Kulturen im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 130 rpm und 37°C inkubiert. Alle 30 Minuten erfolgte eine Messung der optischen Dichte bei 595 nm. Die so erhaltenen Werte wurden halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Zusätzlich wurden aus exponentiellen Bereichen der Kurve die Wachstumsrate μ (Formel 1) und Verdopplungszeit t_d (Formel 2) berechnet.

$$(1) \quad \mu = \frac{\ln(x_t) - \ln(x_0)}{t - t_0}$$
$$(2) \quad t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

3.8.3 Minimale Hemmende Konzentration (MHK)

Die MHK Bestimmung ist eine Art der Mikrodilution und wird durchgeführt um Antibiotikaresistenzkonzentrationen aufzudecken. Sie wurde nach der DIN 58940-81 durchgeführt. Die Konzentrationsreihe reichte von 1024 µg/ml bis 1 µg/ml Vancomycin in Iso-Bouillon, die Inkubation erfolgte bei 37°C/ÜN.

Zu testende Stämme waren Isolat 1.10 und V583. Als Referenzstamm diente *E. faecalis* ATCC 29212.

3.8.4 Biofilmassay

Beim Biofilmassay (Christensen *et al.*, 1985) wird im Mikrotitermaßstab das Anheftungsvermögen von Mikroorganismen an Polystyroloberflächen untersucht. Durch die Unterschiede in der Fähigkeit zur Anheftung bzw. Matrixbildung kommt es nach Anfärbung zu Farbintensitätsunterschieden, die die Stärke der Biofilmbildung widerspiegeln.

Hierzu wurden ÜN-Kulturen in TSBG angeimpft und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde in Mikrotiterplatten 180 µl frische Bouillon im Verhältnis 1:20 mit der ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C in einer feuchten Kammer bebrütet. Als Kontrollen dienten jeweils drei Stämme mit bekannter Biofilmbildungsfähigkeit: *E. faecalis* T9, *E. faecalis* OG1RF und *E. fm* 64/3. Zusätzlich wurde eine unbeimpfte Nullkontrolle (NK) angelegt. Nach ca. 18 h wurde das Medium und die nicht angehefteten Zellen aus den Mikrotiterplatten entfernt, dreimal mit PBS-Puffer mit Hilfe eines ELISA-Washers gewaschen und für eine Stunde bei 60°C getrocknet. Um den Biofilm sichtbar zu machen, wurden die Zellen anschließend mittels Hucker's Kristallviolett für 3 min angefärbt, überschüssige Färbelösung durch wiederholtes Waschen mit ddH₂O entfernt und abschließend erneut für 10 Minuten bei 60°C getrocknet. Der durch die anheftenden Zellen und in der Matrix fixierte Farbstoff wurde in 100 % Ethanol wieder gelöst. Mittels einer OD₅₉₅ Messung am EpochReader erfolgte so eine Einteilung in sehr starke, starke und keine Biofilmbildner.

Die Analyse erfolgte stets in sechs Parallelansätzen pro Stamm in dreifacher Wiederholung. Die so gemessenen Werte werden mit der NK abgeglichen, gemittelt und sowohl tabellarisch als auch grafisch dargestellt.

3.9 Rasterelektronenmikroskopie

Mittels dieser hochauflösenden Technik der Bilddarstellung sollen Unterscheide in der Oberflächenbeschaffenheit sowie der Koloniestruktur untersucht werden. Dazu werden Einzelkolonien von Agarplatte ausgestanzt und für die REM präpariert. Diese Präparation erfolgt in mehreren Schritten: Fixierung, Entwässerung, Trocknung und Bedampfung der Proben. Die zu untersuchenden Stämme wurden auf TSBG Agarplatten ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Gewachsene Einzelkolonien wurden nun mit dem Skalpell samt Agar präpariert. Die Fixierung der Probe erfolgte über eine zeitgleiche Übersichtung mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid für zwei Stunden. Anschließend wurde mittels Soerensenpuffer drei-mal gewaschen. Die so fixierten Kolonien mussten nun durch eine Ethanolreihe entwässert werden. Dies ist nötig um die Zell- und Oberflächenstruktur in der abschließenden Critical Point Trocknung nicht zu zerstören. Hierfür wurden die Proben in ansteigenden Konzentrationen von Ethanol (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 94 %, 97 %, 3 x 100 %) jeweils für 10 Minuten bei RT inkubiert bis das Wasser schließlich vollständig eliminiert war.

In der nun folgenden Critical Point Trocknung erfolgte der Austausch von Ethanol über mehrere Zyklen bei 10°C und 60 bar gegen CO₂. Nachfolgend wurde die Probe durch Temperatur- und Druckerhöhung bis ca. 50°C und 100 bar über den Kritischen Punkt getrocknet. Die Kolonien lagen nun wasserfrei in intakter Form vor. In der Bedampfungskammer wurden sie unter Vakuum mit Platin bedampft, um eine leitende Oberfläche für die REM zu schaffen. Nach der Bedampfung können die Proben bis zur REM staubfrei zeitlich unbegrenzt (z.B. im Exsikkator) aufbewahrt werden. Die Durchführung der Mikroskopie erfolgte bei 10 kV Spannung mit einem REM Hitachi S-4000 in der Abteilung Zellbiologie / Universität Kassel.

3.10 Plasmid-Transfer und -Eliminierung

3.10.1 Filtermating

Der Versuch wurde nach Tendolkar *et al.* (2006) durchgeführt. Durch Mischen zweier ÜN-Kulturen von Donor und Rezipient mit anschließender Inkubation auf einem Filter soll der Transfer des konjugativen Plasmids pBEE99 ermöglicht werden.

Hierzu wurde eine Mischkultur mit einem Gesamtvolumen von 5 ml von Isolat 1.10 (Donor) und *E. faecalis* V583 (Rezipient) im Verhältnis 1:10 angesetzt. Diese Kultur

tropfte man anschließend auf eine Filtermembran (Cellulosemischester, Schleicher&Schuell ME24) und ließ diese eintrocknen. Die Bakterien hefteten so am Filter an, welcher nachfolgend mit den Bakterien nach unten auf N1-Agar gelegt wurde. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37°C. Die gewachsenen Bakterien wurden am nächsten Tag in frischer BHI-Bouillon gelöst und Verdünnungsstufen bis 1:10000 auf BHI-Agar + 200 µg/ml Vancomycin ausplattiert. Vorherige MHK-Bestimmungen für Isolat 1.10 und *E. faecalis* V583 ergaben Hemmkonzentrationen, die eine Unterscheidung ermöglichten. Lediglich letzterer Stamm besaß eine Toleranz gegenüber Vancomycin von über 200 µg/ml. Somit war gewährleistet, dass lediglich der Rezipientenstamm wachsen konnte. Die Aufnahme des pBEE99 Plasmids musste über PCR Screens überprüft werden, da geeignete Marker nicht bekannt bzw. auf dem transferierten Plasmid vorhanden waren. Zusätzlich wurde ein Biofilmassay als phänotypischer Nachweis durchgeführt.

3.10.2 Curing

Beim so genannten Curing nach Coburn *et al.* (2010) werden Plasmide aus Bakterienzellen entfernt. Durch Stresseinwirkung auf die betreffenden Zellen, soll die Weitergabe der nicht essentiellen Plasmide verhindert bzw. gemindert werden. Sind bestimmte Marker auf den Plasmiden bekannt, kann anschließend negativ auf diese selektiert werden.

Um das pBEE99 Plasmid, welches Träger des *bee*-locus ist aus Isolat 1.10 zu eliminieren, wurde es in 10 ml BHI Bouillon mit 8 µg/ml Cefuroxime bei einer Temperatur von 45°C (Thermostress) unter sanfter Rotation (8 Umdrehungen/min) inkubiert. Da Enterokokken intrinsisch resistent gegenüber Cefuroxime sind, stellte das Antibiotikum keinen Stressfaktor für das Isolat dar, sondern diente lediglich der Unterdrückung von Kontaminationen. Für einen Zeitraum von 10 Tagen wurde die Kultur alle 24 Stunden in frisches Medium überführt (1:100). Nach dieser „Curing time“ wurden entsprechende Verdünnungen hergestellt und auf N1-Agar ausplattiert (37°C/ÜN). Nun wachsende Kolonien wurden per PCR auf Verlust des Plasmids pBEE99 getestet. Anschließend sollten plasmidfreie Klone per Biofilmassay auf verminderte Biofilmstärke geprüft und so der Einfluss des *bee*-locus bzw. weiterer Genen des Plasmids untersucht werden.

3.11 Transformationen

3.11.1 Chemisch kompetente *E. coli*

Für eine Hauptkultur des *E. coli* Stamms DH5α bzw. *E. coli* Top10 wurden 50 ml LB-Medium mit 250 µl Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 130 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Nach Abkühlen im Wasserbad wurden die Zellen 5 min bei 4°C und 3000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem TFBI-Puffer (1 ml Kaliumacetat; 1,2 g Rubidiumchlorid; 1 ml 1 M Calciumchlorid; 966 mg Manganchlorid; 15 ml Glycerin; pH 5,8 mit verdünnter Essigsäure eingestellt; add 100 ml ddH₂O) resuspendiert. Nach Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Zellen 5 min bei 4°C und 3000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml TFBII-Puffer (209 mg MOPS; 7,5 ml 1 M Calciumchlorid; 120 mg Rubidiumchlorid; 15 ml Glycerin; pH 6,5 mit KOH eingestellt; ad. 100 ml ddH₂O) aufgenommen und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Aliquots à 150 µl wurden auf 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 50-150 ng Plasmid-DNA 50 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 37°C für 1 min. Durch Zugabe von 1 ml vorgewärmten SOC-Medium und Inkubation des Ansatzes bei 37°C für 35 min sollten sich die Zellen erholen. Durch Ausplattieren entsprechender Verdünnungen auf den jeweiligen antibiotikahaltigen Medien und Inkubation bei 37°C ÜN, konnte auf Aufnahme des Plasmids selektiert werden.

3.11.2 Elektrisch kompetente *E. coli*

Für die Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli* DH5α wurden auf einer N1-Platte 100 µl Bakteriensuspension (McFarland Standard 0,5) ausplattiert und für 16 h bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Zellen wurden in 1 ml 10 %igem Glycerin gelöst und dreimal gewaschen. Das Pellet wurde abschließend in 10 %igem Glycerin gelöst, sodass die Zellzahl etwa $1-2 \times 10^{11}$ entsprach. Die so präparierten Zellen wurden in 100 µl Aliquots bei -20°C gelagert.

3.11.3 Elektrisch kompetente *E. faecalis*

Die Herstellung kompetenter Enterokokken basiert auf der Schwächung der Zellwand mittels Anzucht in glycinhaltigem Medium (Teissié, 2000). Dieser Glycingehalt ist spezifisch für jeden Stamm und wurde jeweils über eine Glycinkonzentrationsreihe von 1-9 % in THB Bouillon + 0,5 M Saccharose ermittelt. Als korrekte zu wählende Konzentration wählt man eine Prozentstufe niedriger als diejenige, die zu komplettem Zellwachstumstopp führt.

Eine ÜN-Kultur wurde mit einer Kolonie in entsprechender glycinhaltiger THB Bouillon mit 0,5 M Saccharose angeimpft und ohne Schütteln für ca. 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Nachdem die Zellen bei 4000 g geerntet wurden, erfolgte eine Inkubation in frischem Medium für eine weitere Stunde. Anschließend wurden die Zellen dreimal in Elektroporationspuffer gewaschen, wobei das Volumen von 1 über $\frac{1}{2}$ zu $\frac{1}{10}$ des Erntevolumens abnahm. Schließlich wurde das Pellet in $\frac{1}{100}$ des Originalvolumens gelöst und in 50 μ l Aliquots aufgeteilt. Die Zellen konnten nun direkt in der Elektroporation eingesetzt werden oder wurden bei -80°C gelagert.

Für die Transformation der Zellen mit Plasmid DNA wurden entsprechende Mengen Aliquots auf Eis aufgetaut, mit 50-200 ng DNA gemischt und für 5 Minuten auf Eis gehalten. Nach dem der Mix in eine Elektroporationsküvette (0,2 cm Abstand) überführt wurde, folgte die Transformation bei 25 μ F, 2500 V und 200 Ω . Die Zellsuspension wurde direkt mit vorgekühltem THB + 0,5 M Saccharose Medium gemischt und für 5 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend erholten sich die Zellen bei 37°C für 1-2 Stunden, bevor entsprechende Verdünnungen auf antibiotikahaltigem Medium ausplattiert wurden. Durch Inkubation der Agarplatten bei 37°C für 1-2 Tage konnte auf die Aufnahme des Plasmids selektiert werden.

3.12 Molekularbiologische Experimente

3.12.1 DNA-Extraktion

3.12.1.1 Schnellpräparation für PCR

Für die Extraktion der DNA zum Einsatz in die PCR wurden in Anlehnung an Top *et al.* (2004) pro Isolat jeweils 3-4 Kolonien in 20 µl Lysispuffer gelöst. Die Suspensionen wurden für 5 min bei 95°C erhitzt. Nach Zugabe von jeweils 180 µl Tris/HCl- Lösung (10 mM, pH 8,0) wurden die Zelldebris für 5 min bei 16000 g und 4°C abzentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in 1,5 ml Reagiergefäße überführt und bei -20°C gelagert.

3.12.1.2 Gesamt-DNA-Isolierung (mechanischer Zellaufschluss)

Die DNA wird aus Zellen einer 2 ml ÜN- Kultur gewonnen. Das durch Zentrifugation für 10 min bei 3750 rpm gewonnene Zellpellet wird durch Zugabe von 0,5 g Silicatperlen, 500 µl NaPi- Puffer und 100 µl 10 %iger SDS in der FastPrep für 35 s bei 5 m/s aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (15300 rpm/4°C) wird der Überstand von den Zelldebris getrennt und dieser insgesamt dreimal mit Chloroformisoamylalkohol (24:1) im Verhältnis 1:1 gewaschen. Nach der ersten Waschung erfolgte eine Behandlung der Proben mit RNase (10 mg/ml) für 30 Minuten bei 37°C. Zum Abschluss wurde durch Zugabe von 2,5 Volumenteilen Ethanol und 0,1 Volumenteilen NaAc die DNA ÜN bei -20°C präzipitiert. Durch erneute Zentrifugation wurde die DNA pelletiert und bei RT getrocknet. Das Pellet wurde daraufhin in 50 µl Tris/HCl (10 mM/pH 8) resuspendiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Die DNA wurde für den Einsatz in der PCR vor Beginn jeweils frisch 1:100 mit ddH₂O verdünnt.

3.12.1.3 Plasmidextraktion

Plasmide wurden über Miniprep Säulen der Firma Macherey&Nagel (MN) isoliert. Die Durchführung erfolgte anhand des vom Hersteller angebotenen Protokolls. Das Kulturvolumen betrug zwischen 2 und 3 ml. Eluiert wurde in einem Endvolumen von 40-60 µl.

3.12.1.4 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von DNA in Form von linearen Plasmiden oder PCR-Amplifikaten erfolgte mittels Säulen der Firma M&N. Die Durchführung richtete sich nach den Herstellerangaben. Eluiert wurde in einem Endvolumen von 40-60 µl.

3.12.2 PCRs

3.12.2.1 Dream *Taq*-Polymerase

Alle PCRs zum Nachweis der Virulenz- bzw. Biofilmfaktoren sowie weitere diagnostische PCRs wurden mit Hilfe der Dream-*Taq* Polymerase durchgeführt. Die spezifischen Annealingtemperaturen sowie Elongationszeiten sind dem Primerverzeichnis (Kap. 3.7) zu entnehmen.

Tab. 8a Dream <i>Taq</i> -Polymerase.			
PCR-Mastermix		Cyclerprogramm	
		Prim. Denaturierung	94°C - 3-5 min
Puffer	1x	25-35x	
dNTPs	0,2 mM	Denaturierung	94°C - 1 min
Primer	0,5 - 1,5 µM	Annealing	x °C - 1 min
Polymerase	0,1 - 0,5 U	Elongation	72°C - 1 min/kb
ddH ₂ O	ad 20 - 50 µl		
		Final Elongation	72°C - 8 min

3.12.2.2 Phusion-Polymerase

Für die Amplifikation von längeren Fragmenten (> 5 kb), sowie für alle Klonierungs-PCRs wurde die Phusion-Polymerase verwendet, da sie aufgrund ihrer Korrekturaktivität eine deutlich geringere Fehlerrate besitzt. Auch hier sind die spezifischen Annealingtemperaturen und Elongationszeiten der zu amplifizierenden Gene dem Primerverzeichnis (Kap. 3.7) zu entnehmen.

Tab. 8b Phusion-Polymerase.			
PCR-Mastermix		Cyclerprogramm	
		Prim. Denaturierung	98°C - 30s-1.30 min
Puffer	1x	25-35x	
dNTPs	0,2 mM	Denaturierung	98°C - 10-20 sec
Primer	0,5 - 1,5 µM	Annealing	x °C - 10-30 sec
Polymerase	1 U	Elongation	72°C - 20sec/kb
ddH ₂ O	ad 20 - 50 µl		
		Final Elongation	72°C - 5 min

3.12.3 Klonierungen

3.12.3.1 Restriktionsanalyse

Die Durchführungen erfolgten nach Angaben des Herstellers Fermentas. Die verschiedenen Restriktionsanalysen waren zum einen für die Klonierungsarbeiten nötig, zum anderen wurden sie zur Überprüfung erfolgreicher Ligationen bzw. derer Orientierung verwendet.

Tab. 9a Restriktionsansatz.	
Puffer	2µl
Enzym	1U
DNA	100ng
ddH2O	ad 20µl
1.30h/37°C	

Die Zusammensetzungen für Doppelrestriktionen wurden mit Hilfe des Onlinetools DoubleDigest™ ermittelt (<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>).

3.12.3.2 BluntEnd mit T4-Polymerase

Die Durchführungen erfolgten nach Angaben des Herstellers Fermentas. BluntEnd PCR-Fragmente oder Plasmide wurden benötigt, wenn nicht zwei einzigartige Restriktionsenzym-Sites in den zu schneidenden Sequenzen vorlagen, bzw. wenn die RE-Sites von Vektor und Insert nicht kompatibel waren.

Tab. 9b Blunting.	
Puffer	1x
lineare DNA	1µg
T4-Polymerase	1U
dNTPs	0,1mM
ddH2O	ad 20µl
11°C/20min	

3.12.3.3 Phosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase

Die Durchführungen erfolgten nach Angaben des Herstellers Fermentas. Die Dephosphorylierung der geschnittenen Plasmide und PCR-Fragmente wurde durchgeführt um eine Religation bzw. Zirkularisierung zu verhindern.

Tab. 9c Dephosphorylierung.	
Puffer	2
lineare DNA	1µg
FastAP	1U
ddH2O	ad 20µl
37°C/10 min	

3.12.3.4 Ligation mit T4-Ligase

Die Durchführungen erfolgten nach Angaben des Herstellers Fermentas. Ligationen stellten die abschließenden Schritte der Klonierungsarbeiten dar und wurden sowohl als StickyEnd als auch BluntEnd durchgeführt.

Tab. 9d Ligationsansatz BluntEnd.	
Puffer	1x
PEG 4000	5%
T4 Ligase	5 U
Plasmid DNA	50 ng
Insert DNA	x
ddH2O	ad 20 µl
16°C/ÜN	

Tab. 9e Ligationsansatz StickyEnd.	
Puffer	1x
T4 Ligase	1 U
Plasmid DNA	50 ng
Insert DNA	x
ddH2O	ad 20 µl
16°C/ÜN	

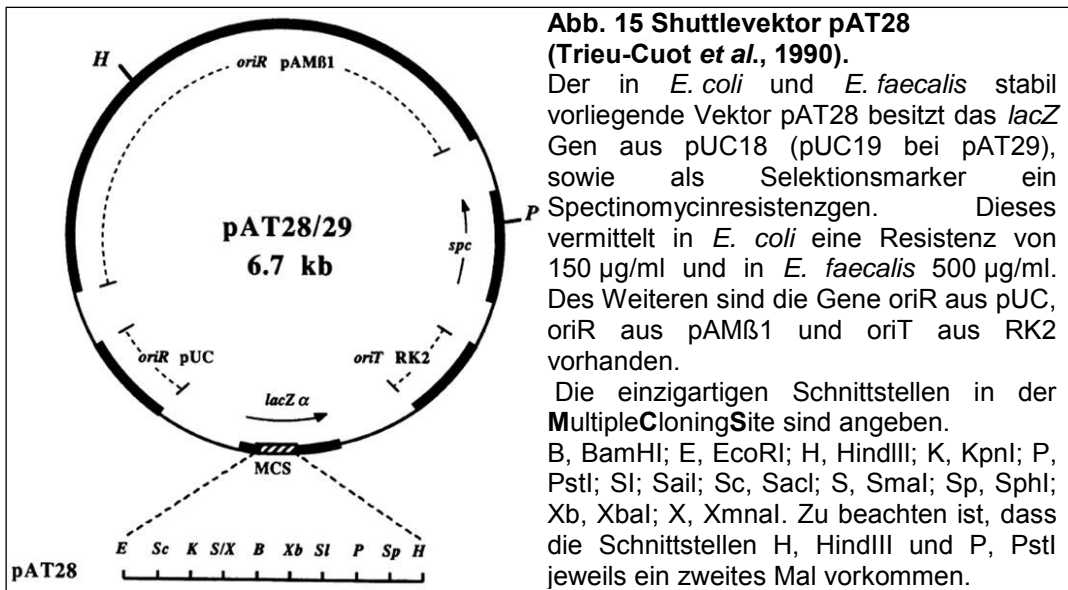
$\text{Menge Insert-DNA (ng)} = 5 \times \text{Plasmid-DNA (ng)} \times \frac{\text{Länge Insert (bp)}}{\text{Länge Plasmid (bp)}}$

3.12.4 Knockout Strategie

Um den *bee*-locus des Isolats 1.10 gezielt untersuchen zu können, wurden spezifische Knockout (KO) Konstrukte für jedes der fünf Gene hergestellt. Dazu wurden mit den gewählten Primerkombinationen (siehe Tab. 10) die einzelnen Gene bzw. Genbereiche (bei *bee1* wurden nur die letzten 1250 bp durch die Primer abgedeckt) amplifiziert. Über die 5' eingeführten Restriktionsenzymststellen *KpnI* und *XbaI* wurden diese anschließend in den Shuttlevektor pAT28 (Abb. 15) ligiert.

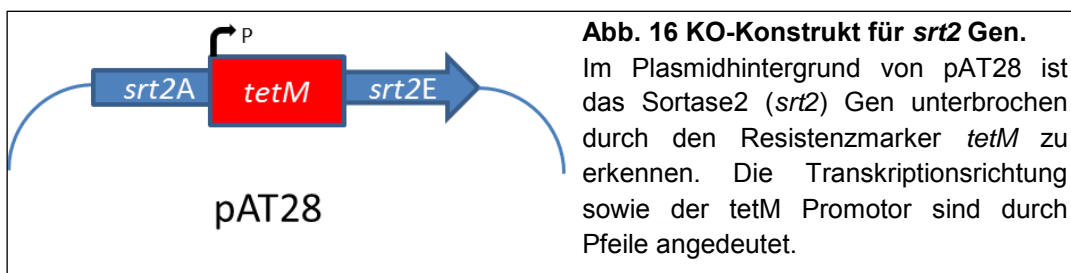
<i>bee1</i>		Tab. 10 Primerkombinationen für KO-Plasmide. Zur Amplifikation der auszuknockenden Gene des <i>bee</i> -locus wurden die angegebenen Primer verwendet. Ebenso für das Resistenzmarker Gen TetM. Die genauen PCR Bedingungen sind den entsprechenden Tabellen zu entnehmen (Material und Methoden).
b1-for-KpnI	b1-rev-XbaI	
<i>bee2</i>		
b2-for-KpnI	b2-rev-XbaI	
<i>bee3</i>		
b3-for-KpnI	b3-rev-XbaI	
<i>srt1</i>		
s1-for-KpnI	s1-rev-XbaI	
<i>srt2</i>		
s2-for-KpnI	s2-rev-XbaI	
<i>tetM</i>		
TetM for	TetM rev	

Die Ligationsansätze wurden anschließend in chemisch kompetente *E. coli* Top10 bzw. DH5 α Zellen transformiert und auf N1-Agar + 150 μ g/ml Spectinomycin selektiert und per PCR auf die Insertion geprüft. Positive Klone wurden in ÜN Kultur bei 37°C in N1 Bouillon + 150 μ g/ml Spectinomycin für die Plasmidpräparation kultiviert.



Das Tetrazyklinresistenzgen *tetM* wurde mittels Phusion-Polymerase amplifiziert (Primer siehe Tab. 10). Als Template DNA diente der *E. faecalis* Stamm BM4147. Die so erhaltenen BluntEnd PCR-Amplifikate wurden nach Aufreinigung (M&N Kit) in die BluntEnd linearisierten pAT28-KO-Plasmide ligiert, sodass die fertigen Konstrukte auf den Plasmiden aus zu den Zielgenen homologen Anfangs- und Endsequenzen bestehen, die durch das Markergen voneinander getrennt sind. Die unterschiedlichen Gene *bee1*, *2*, *3* und *srt1*, *2* wurden hierbei jeweils mit spezifischen einzigartigen Restriktionsenzymen (RE) geschnitten und ggf. zu BluntEnd Vektoren bearbeitet. Diese waren für *bee1* und *bee3* *Van91I*, für *bee2* und *srt1* *EcoRV* und für *srt2* *MlsI*.

Beispielhaft ist dies in Abbildung 16 für das Sortase2 KO-Plasmid gezeigt.



Per Elektroporation wurden diese KO-Plasmide dann in kompetente *E. faecalis* 1.10 transformiert, in denen über das Prinzip der Homologen Rekombination ein Austausch des jeweiligen Wildtyp-Allels mit dem Tetrazyklinmarker stattfinden sollte. Bei einem einfachen Rekombinations-Ereignis würde das ganze Plasmid in den Zielbereich integrieren. Um das plasmidäre Rückgrat wieder zu entfernen muss ein sogenanntes Double crossing over stattfinden (Abb. 17).

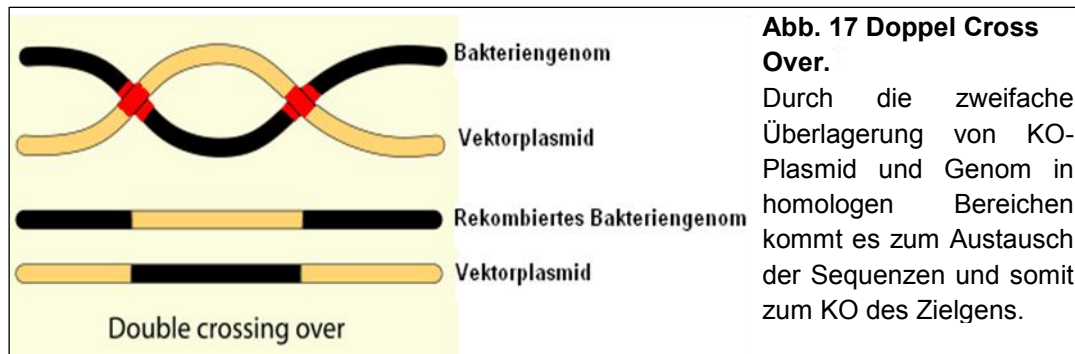


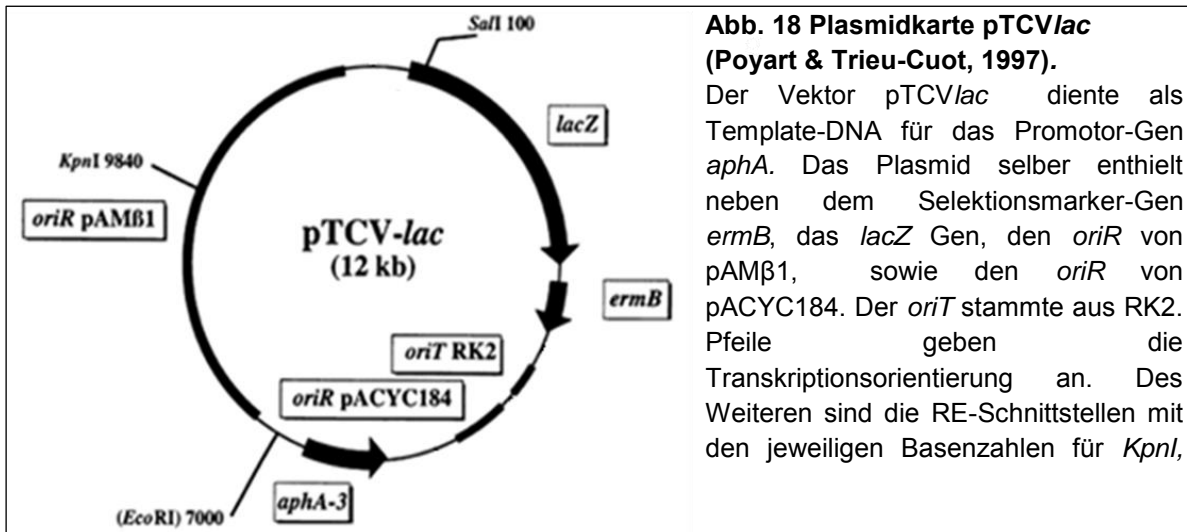
Abb. 17 Doppel Cross Over.

Durch die zweifache Überlagerung von KO-Plasmid und Genom in homologen Bereichen kommt es zum Austausch der Sequenzen und somit zum KO des Zielgens.

Über eine doppelte Selektion auf Tetrazyklin (KO-Marker) und Spectinomycin (Plasmid-Resistenz) kann anfangs auf Aufnahme des Plasmids selektiert werden. Auf eine Kultivierung in Flüssigkultur mit beiden Antibiotika (Tetrazyklin: 5 µg/ml; Spectinomycin: 500 µg/ml) bei 37°C für mehrere Tage folgte eine zweitägige Passage in tetrazyklinhaltigem Medium. Verschiedene Verdünnungen wurden abschließend auf N1-Agar + Tetrazyklin 5 µg/ml ausplattiert und bei 37°C ÜN inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden als Kontrolle auf N1-Agar + Spectinomycin 500 µg/ml per Zahnstocher gespottet. Klone, die auf Spectinomycin noch wachsen konnten, wurden verworfen, da sie das Plasmid noch trugen. Die übrigen Klone wurden per PCR auf das KO-Konstrukt geprüft. Sie sollten das wt-Allel nicht mehr tragen.

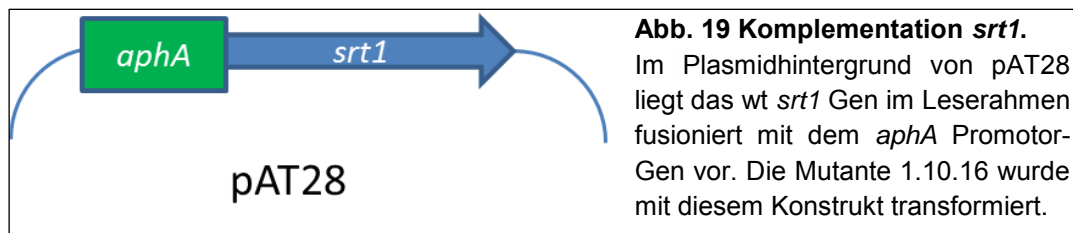
3.12.5 Komplementationsstudie

Um die defekte Sortase 1 der Mutante 1.10.16 zu komplementieren, wurde in Anlehnung an Tendolkar *et al.* (2006) das intakte *srt1* Gen über den Shuttlevektor pAT28 (Abb. 15) in die Zelle transformiert. Die Expression der Sortase 1 erfolgte unter dem konstitutiven Promotor *aphA* des Plasmids pTCV/*lac* (Abb. 18).



Zur Herstellung des Komplementationsplasmids wurde zuerst das *srt1* Gen aus Isolat 1.10 mittels Phusion-Polymerase amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten Restriktionsschnittstellen für *KpnI* am Forward Primer (s1-for-KpnI) und *XbaI* am Reverse Primer (srt1 kompl rev) (Tendolkar *et al.*, 2006). Nach Doppelrestriktion des PCR-Amplifikats sowie des Shuttlevektors mit obig genannten Enzymen, erfolgte die StickyEnd Ligation. Die so gewonnenen Plasmide wurden in ck *E. coli* Top10 Zellen transformiert, auf N1 Agar + Spectinomycin 150 µg/ml ausplattiert und per PCR auf die Insertion geprüft. Positive Klone wurden in ÜN Kultur bei 37°C in N1 Bouillon + 150 µg/ml Spectinomycin für die Plasmidpräparation kultiviert.

Per PCR wurde mit den Primern Aph-1 und Aph-2 der Promotor *aphA-3* von Plasmid pTCV/*lac* (Abb. 20) amplifiziert (Tendolkar *et al.*, 2006), wobei den Primern die Restriktionsschnittstellen *SacI* bzw. *KpnI* zugefügt wurden. Nach Aufreinigung des PCR-Amplifikats (M&N Kit) wurde es ebenso wie das *srt1*kompl-pAT28 Plasmid einer Doppelrestriktion mit *SacI* und *KpnI* bei 37°C unterzogen. So konnte der Promotor anschließend upstream des Startcodons des *srt1* Gens über StickyEnd Ligation fusioniert werden (Abb. 19) und somit einen intakten Leserahmen für die korrekte Sortase1 Produktion liefern.

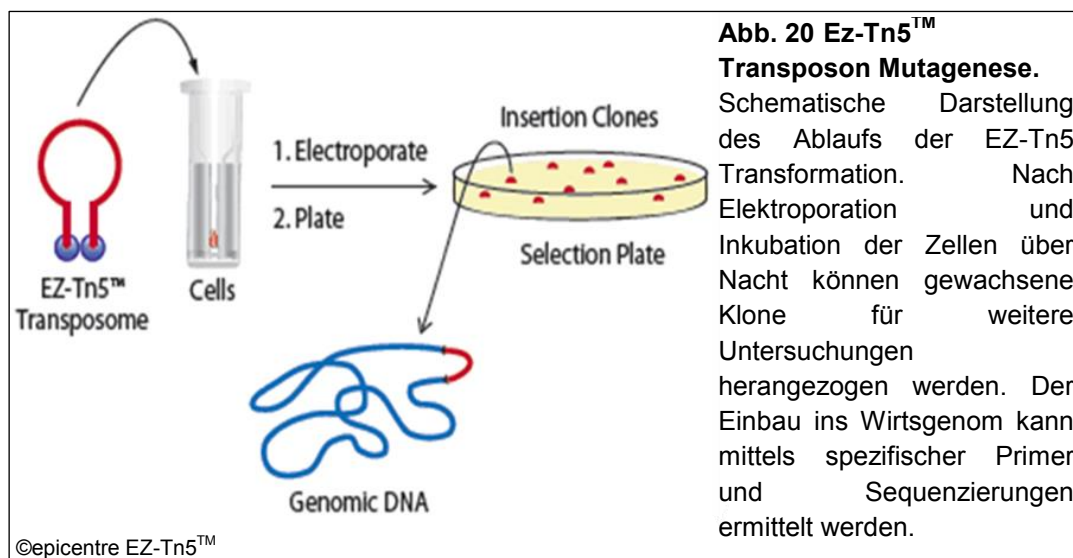


Das Ligationsprodukt wurde wiederum in ck *E. coli* Top10 transformiert, auf N1 Agar + Spectinomycin 150 µg/ml selektiert und per PCR geprüft. Um die korrekte Orientierung zu kontrollieren, wurde eine Primerkombination aus Aph-1 Forward und Sor-1R Reverse gewählt. Diese PCR sollte ein Amplifikat von ca. 1600 bp Länge liefern. Positive Klone wurden daraufhin für die Plasmidpräparation kultiviert und die so gewonnenen Plasmide in ek *E. faecalis* 1.10 transformiert. Die Aufnahme des Plasmids wurde über Spectinomycin selektiert und mittels PCR überprüft. Daraus resultierende positive 1.10 Klone wurden phänotypische auf wieder erlangte Biofilmbildungsstärke getestet und anschließend den weiteren Experimenten wie Proteinextraktion und REM im Vergleich zum Isolat und Mutante unterzogen.

3.12.6 Transposon-Mutagenese

Die Transposon-Mutagenese des Isolats 1.10 sollte Aufschlüsse über weitere Biofilmfaktoren liefern. Hierzu sollte im Anschluss an die Mutagenese per Biofilmassay eine phänotypische Prüfung auf geschwächte Klone durchgeführt werden. Über anschließende Sequenzierungen um die Insertionsstellen des Transposons sollten so Gene identifiziert werden, die an der Biofilmbildung beteiligt sind. Die Sequenzierungsprimer nutzen die Mosaikenden der Insertionsstellen um jeweils aus dem Markergen heraus zu amplifizieren.

Ausgangspunkt dieses Experiments stellt das Transposom-Kit EZ-Tn5 der Firma Epicentre® Biotechnologies. Prinzip dieses Kits ist der einmalige Einbau eines frei wählbaren Markers in das Zielgenom. Grundlage hierfür stellen 19 bp Mosaikenden (5'-AGATGTGTATAAGAGACAG-3') am 5' und 3' Ende des Markers, welche über die Primer eingeführt werden. Das so designte Transposon bildet mit dem Enzym Transposase einen stabilen Komplex (Transposom), welcher per Elektroporation in die Zielzelle transformiert werden kann. In der Zielzelle wird das Enzym durch zelluläres Magnesium aktiv und vermittelt den Einbau des Transposons in die WirtsdNA. Über Ausplattieren auf selektivem Medium können positive Klone für die weitere Analyse gewählt werden (Abb. 20)



Per Phusion-PCR wurde mittels der Primer Spec-ME-for und SpecME-rev das Spectinomycin-Resistenzgen von Plasmid pAT28 amplifiziert, aufgereinigt und für die Inkubation mit dem Enzym vorbereitet. Die Durchführung hierzu erfolgte nach Herstellerangaben.

Anschließend wurde das fertige Transposom mittels Elektroporation in Isolat 1.10 transformiert und auf Selektivmedium ausplattiert. Um die Funktionalität des Resistenzmarkers zu testen, wurde zusätzlich das Transposon mittels BluntEnd Ligation in das Plasmid RSF1010 ligiert, welches daraufhin als Kontrolle in Isolat 1.10 transformiert und ausplattiert wurde.

3.12.7 RNA-Extraktion

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben des RNA-Extraktions Kits der Firma M&N. Das Kulturvolumen betrug 4 ml. Alle Materialien wurden vor Versuchsbeginn mit RNase Exitus Plus behandelt um den Abbau der RNA zu verhindern.

3.12.8 RT-PCR/cDNA Generierung

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben der Firma Thermo Scientific Fermentas.

3.13 Proteinbiochemische Experimente

3.13.1 Gesamtproteinextraktion

Die zu untersuchenden Bakterienstämme wurden in 100 ml TSBG Bouillon im Verhältnis 1:100 mit einer ÜN-Kultur angeimpft. Im Wasserbad bei 37°C und 130 rpm inkubierten die Zellen bis zu einer OD₅₉₅ von ca. 1,2, was dem Ende der exponentiellen Phase entsprach. Die Zellen wurden bei RT und 4000 g für 15 min pelletiert und anschließend zweimal in Puffer W gewaschen. Nachdem das Pellet in 1 ml Puffer W aufgenommen und resuspendiert wurde, erfolgte der Zellaufschluss mittels enzymatischer Lyse.

Dies geschah durch Inkubation der Proben bei 37°C für 90 min nach Zugabe von 40 µl Lysozym (100 mg/ml) und 15 µl PMSF (100 mM). Die Proben wurden hierbei alle 10 min invertiert um den Zellaufschluss zu verbessern. Um die Zellreste abzutrennen, wurden die Proben bei 12000 g/4°C/15 Minuten abzentrifugiert und der Überstand in neue Reagiergefäße überführt. Um die Proteinkonzentration zu erhöhen und zeitgleich störende DNA-Kontaminationen etc. zu eliminieren, mussten die Proteine über Trichloressigsäure (TCA) oder Aceton gefällt werden.

Acetonfällung:

Die Proteinproben wurden durch Zugabe von drei Volumenteilen Aceton und Inkubation für 2 h oder ÜN bei -20°C gefällt. Im Anschluss wurden die Proteine bei 16000 g/4°C/20 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet ÜN bei 4°C oder alternativ in der SpeedVac für 30 Minuten getrocknet.

TCA-Fällung:

Für die Fällung mit TCA wurden zwei Volumenteile frisch angesetzte 20%ige TCA-Lösung zur Proteinprobe gegeben und die Proteine 2 h auf Eis gefällt. Im Anschluss wurden die Proteine ebenfalls bei 16000 g/4°C/20 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgten zwei Waschschriffe des Pellets mit 80 %igem Aceton, wobei die Überstände jeweils ebenfalls verworfen wurden. Die Proben trockneten entweder ÜN bei 4°C oder in der SpeedVac für ca. 30 min.

Um die Pellets zu lösen und für den Gelauftrag vorzubereiten, wurden sie in 50 µl ddH₂O gelöst. Bei schwer löslichen Proteinen wurde eine Behandlung im Ultraschallbad für wenige Minuten durchgeführt. Es folgte eine

Proteinkonzentrationsbestimmung über den EpochReader. Abschließend wurden die gelösten Proteine mit SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95°C für 10 min denaturiert. Die mittels TCA gefällten Proteine sind auf diese Weise jedoch nicht löslich gewesen, sodass sie direkt in SDS-Ladepuffer gelöst und bei 95°C denaturiert wurden. Die Auftragsmenge konnte bei diesen Proben somit nur annähernd angeglichen werden.

3.13.2 SDS-PAGE

Zur Auftrennung eines komplexen Proteingemisches nutzt man die Technik der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Hierbei werden die Proteine im elektrischen Feld anhand ihres Molekulargewichts der Größe nach aufgetrennt. Dies wird möglich, da das im Puffer sowie Gel vorhandene SDS die Proteine denaturiert und sich an ihnen anlagert. Da dies im konstanten Verhältnis zur Länge der Aminosäureketten geschieht, kommt es zu einer spezifischen negativen Ladung der Proteine. Negative und positive Ladungen der Aminosäuren, sowie Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine fallen somit nicht ins Gewicht. Der Vergleich mit standardisierten Größenmarkern erlaubt schließlich eine grobe Abschätzung des Molekulargewichts in kDA. Durch die Aufteilung der Polyacrylamidgele in Sammel- und Trennbereiche verschiedener Konzentration, kommt es zu einem gleichmäßigen Eintritt der Proteine in die trennende Gelmatrix, was klar definierte Banden bewirkt. Das Sammelgel besteht aus 6 %igem Acrylamid, das Trenngel je nach Anwendung und Auftrennungsvermögen aus 8-12 %.

Die Komponenten von Sammel- und Trenngel wurden gemäß Tab.11 zusammen pipettiert und die Gele in den vorbereiteten BioRad Armaturen nach Herstellerangaben gegossen.

Tab. 11 Zusammensetzung PAA-Gele.		
Stammlösung	Trenngel 12%, 10 ml	Sammelgel 6%, 5 ml
Trenn-bzw. Sammelgelpuffer (4x)	2,5 ml	1,25 ml
Acrylamid 30%	4 ml	1 ml
TEMED	10 µl	5 µl
APS (100 mg/ml)	100µl	50 µl
A. bidest	3,39 ml	2,7 ml

Gleiche Mengen der Proteine (100-400 ng) wurden nach Denaturierung bei 95°C für 10 min aufgetragen und bei 100 V der Elektrophorese unterzogen.

Die Visualisierung der Proteine erfolgte über eine Färbung des Gels mit Coomassie Blue. Hierzu wurden die Gele nach erfolgter Elektrophorese kurz in ddH₂O erhitzt und gewaschen, um überschüssiges SDS zu entfernen. Die Färbung erfolgte ÜN bei RT unter sanftem Schütteln. So gefärbte Gele wurden fotografisch dokumentiert und ausgewertet.

3.13.3 Massenspektrometrie

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).

Beim sogenannten In-Gel-Verdau werden mittels Coomassie angefärbte Proteinbanden im SDS-PA Gel tryptisch verdaut. Dieser enzymatische Verdau ermöglicht es zum einen die Proteine aus der Gelmatrix zu lösen, zum anderen sind die tryptischen Fragmente für die folgende Massenspektrometrie nötig. Das Enzym Trypsin gehört zu den Serinproteasen und spaltet in Proteinen spezifisch die Peptidbindung hinter den Aminosäuren Arginin und Lysin. Diese Information ist für die spätere Auswertung der massenspektrometrischen Daten per Software (MASCOT) nötig. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Rosenfeld *et al.* (1992) in modifizierter Form nach einem Protokoll der Abteilung Biochemie, Universität Kassel.

Wenn es sich um einzelne Proteinbanden handelte, wurden diese per Skalpell ausgeschnitten. Sollten komplette Spuren analysiert werden, wurden diese mit Hilfe eines Gelcutters in 22 gleich große Stücke ausgestanzt. Die jeweiligen Gelstücke wurden daraufhin in eine 10 µl Pipettenspitze überführt, welche sich in einem Mikroglasröhrchen befand. Durch Zentrifugation bei 4°C und 16000 g für 15 min wurden die Gelstücke zerkleinert. Im folgenden Schritt wurden die Proteine tryptisch verdaut. Hierzu wurden zu frisch angesetzttem Ammoniumbicarbonatpuffer (50 mM) 10 ng/µl Trypsin hinzu gegeben und ca. 25 µl zu den zerkleinerten Gelstücken pipettiert. Dabei war darauf zu achten, dass die Gelstücke komplett mit Puffer

überschichtet waren. Der Ansatz wurde nun bei 50°C für eine Stunde bei 500 rpm im Thermomixer inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt (4°C, 16000 g, 20min) wurden die Gelreste pelletiert und der peptidhaltige Überstand in Massenanalysegefäße überführt.

Zugabe von 0,5 %iger Ameisensäure im Verhältnis 1:1 bewirkte ein Ansäuern (Protonierung) der Probe für die folgende MS-Analyse. Die so gemischten Proben lagerten bei -20°C oder wurden direkt auf der Nano-LC mit anschließender ESI-MS/MS analysiert.

3.13.4 Oberflächenprotein–Biotinylierung & Aufreinigung mittels

Dynabeads

Dieser Versuch sollte neue, bisher für das Isolat 1.10 noch nicht bekannte Oberflächenproteine aufdecken, die gegebenenfalls nach weiterer Analyse als Faktoren der Biofilmbildung identifiziert werden können.

Hierfür wurde ein ÜN Kultur von *E. faecalis* 1.10 in 5ml TSBG inokuliert und bei 37°C und 140 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml Hauptkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37°C und 140 rpm bis zu einer OD₅₉₅ von 1,2 (späte log-Phase) inkubiert. Bei 3500 g erfolgte die Zellernte für 15 min woraufhin das Pellet zweimal mit PBS-Puffer (zzgl. 1 mM CaCl₂ und 0,5 mM MgCl₂) gewaschen wurde. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurden die Zellen in obigem Puffer gelöst, sodass eine OD von 2,5 bis 3,5 erreicht wurde. Die Lösung wurde halbiert und in Probe und Negativkontrolle aufgeteilt. Der nun folgende Labeling Schritt basierte auf der Zugabe von 200 µM Sulfo-NHS-Biotin (finale Konzentration) und Inkubation auf Eis für 30 min. Bei diesem Schritt wurde die Biotingruppe des Sulfo-NHS-Biotins kovalent an Aminogruppen der Zielproteine gekoppelt (siehe Abb. 21).

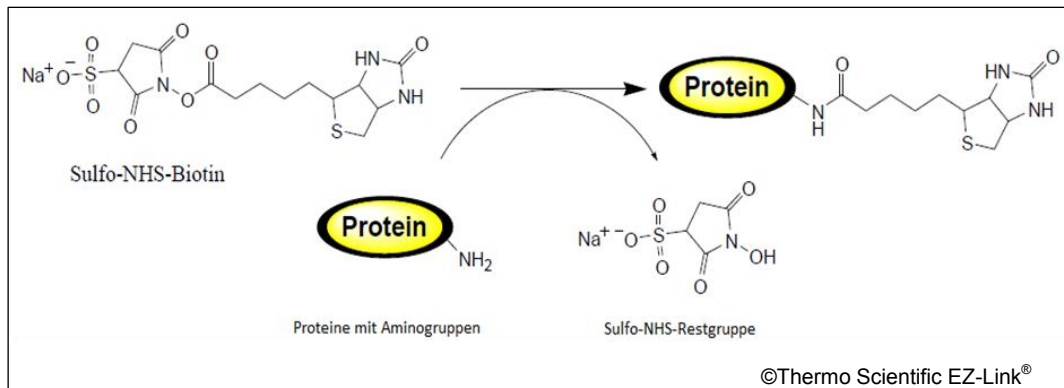


Abb. 21 Oberflächenproteinbiotinylierung.

Mittels des EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit werden, unter Abspaltung der Sulfo-NHS-Restgruppe, Proteine (NH₂-Gruppen) kovalent mit Biotinmolekülen verknüpft. So können selektiv Oberflächenproteine intakter Zellen markiert werden und nach Zellaufschluss von cytoplasmatischen Proteinen getrennt werden.

Der Stopp der Reaktion erfolgte durch Zugabe von zwei Volumenanteilen TNKCM-Puffer (50 mM Tris, pH 7,4, 100 mM NaCl, 27 mM KCl, 1 mM CaCl, 0,5 mM MgCl₂) und zehnmütiger Inkubation bei RT. Der Zellernte bei 3500 g für 10 min folgten drei Waschschrirte mit TNKCM. Die Zellen wurden nun in 1-2 ml PBS-Puffer aufgenommen und einer Gesamtproteinextraktion unterzogen (siehe Protokoll).

Zur selektiven Anreicherung der biotinylierten Proteine wurden Streptavidin-Dynabeads (MyOne™ Streptavidin C1) der Firma Invitrogen verwendet. 200 µl dieser Beads wurden nach Herstellerangaben gewaschen und vorbereitet. Für die Anreicherung wurden 450 µl Oberflächenproteine mit den Beads gemischt und der Ansatz für 30 min bei RT unter sanfter Rotation inkubiert. Nun wurden die Beads samt gekoppelter Proteine vom Überstand über einen Magneten getrennt und 4-5-mal mit PBS (+ 0,1% BSA) gewaschen. Abschließend wurden die Proben in 60 µl Probeladepuffer aufgenommen. Die Trennung der nicht-kovalenten Bindung aus Streptavidin und Biotin wurde durch Denaturierung der biotinylierten Oberflächenproteine bei 95°C für 5 min erzielt. Nach Abzentrifugation der Beads konnten die Proben per SDS-PAGE separiert und mittels Coomassie angefärbt werden.

3.13.5 Westernblot-Analyse

Beim Westernblot werden die per SDS-PAGE aufgetrennten Proteine zuerst elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und dann gewünschte Proteine mittels spezifischer Antikörper (AK) sichtbar gemacht.

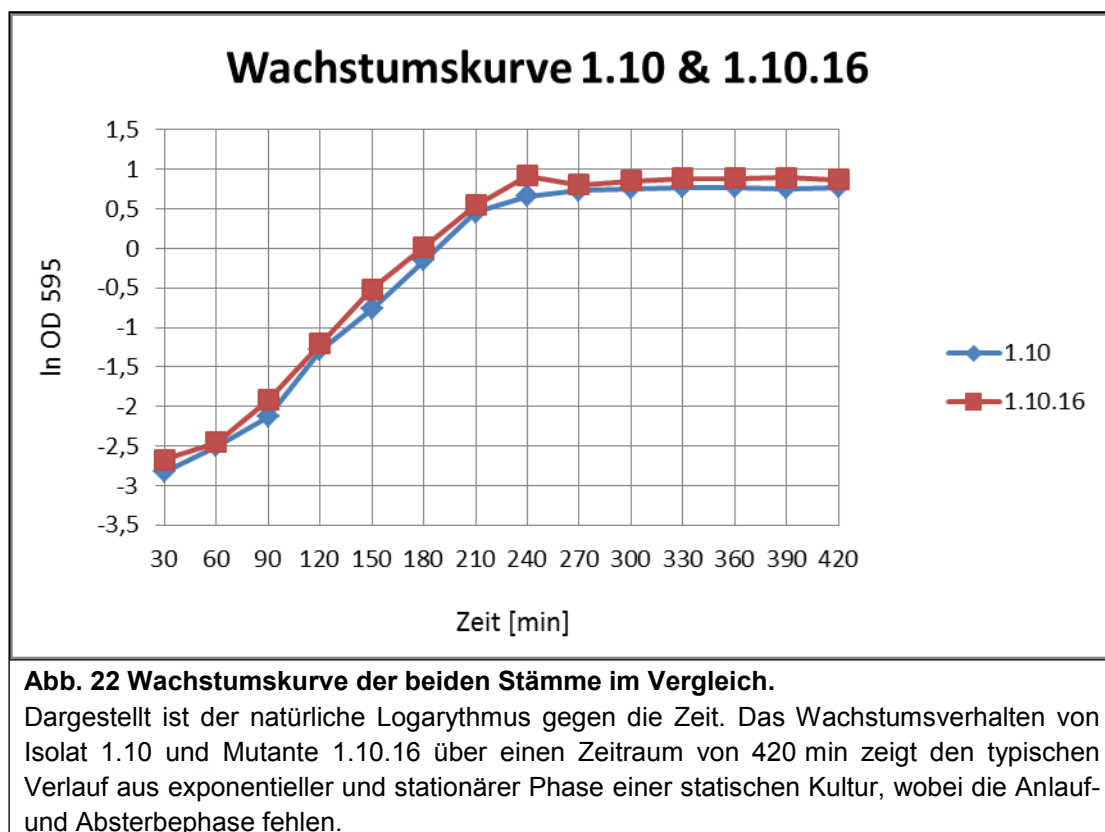
Zu Beginn wurden die Gesamtproteinextrakte vom PA-Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dies geschah für 2 h bei 100 V und 4°C. Freie Stellen der Membranen wurden nun durch Inkubation mit 3 % Milchpulver in TBST für 30 min abgesättigt. Die Membranen wurden dann in primärem AK gegen EbpA, EbpB und EbpC (1:2500 in TBST + 3 % Milchpulver) für 2 h bei RT unter sanftem Schwenken inkubiert. Es folgte die Entfernung des primären AK durch dreimaliges Waschen mit TBST für 10 min bei RT. Die Inkubation mit dem sekundären AK (1:2000 anti-Rabbit-HRP) mit anschließenden Waschschrinen wurde analog zum primären AK durchgeführt. Nach Zugabe der ECL-Lösung (Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1) folgte die Belichtung und Entwicklung der Röntgenfilme in der Dunkelkammer für 30 sec, 3 min und gegebenenfalls länger (bis 15 min). Nach Abwaschen der Entwickler- und Fixierlösungen trockneten die Filme bei RT. Die Markierung der Marker ließ anschließend die Zuordnung der Proben und Größen zu.

4. Ergebnisse

4.1 Wachstumsverhalten des Isolats 1.10 und der Mutante

1.10.16 im Vergleich

Das Wachstum des *Enterococcus faecalis* Isolats 1.10 und seiner Mutante 1.10.16 zeigte keine Auffälligkeiten und Unterschiede im direkten Vergleich (Abb. 22). Der Verlauf der Kurve entsprach den Erwartungen für eine statische Kultur mit seinen typischen Phasen. Das Fehlen der lag-Phase ist begründet durch die Inokulierung mit einer ÜN-Kultur, sodass keine lange Umstellung und Anpassung an das frische Medium erfolgen musste. Die Absterbephase wurde zum Ende der Messungen nach 420 min/7 h noch nicht erreicht, sodass kein Abfall der Kurve zu erkennen ist. Die stationäre Phase wurde bereits nach 270 bis 300 min erreicht, wobei zu beobachten ist, dass die Mutante 1.10.16 generell ein leicht stärkeres Wachstum zeigte. Im exponentiellen Bereich von 90 bis 180 min erreichte die Wachstumsrate bei Isolat 1.10 einen Wert von $0,022 \text{ min}^{-1}$, was eine Verdopplungszeit von 31,5 min bedingt. Die Werte für die Mutante 1.10.16 lagen bei $0,021 \text{ min}^{-1}$ für die Wachstumsrate und 33 min Verdopplungszeit.



4.2 Biofilm- & Virulenzfaktoren

Die Biofilmbildung ist ein Prozess, der von einer großen Anzahl von Faktoren bzw. Genen abhängt. Mittels PCR wurde das Isolat 1.10 auf das Vorhandensein solcher Gene untersucht. Der Umfang dieser diagnostischen PCRs ergab sich aus den von Paganelli *et al.* (2012) beschriebenen und um einige selbst gewählte Gene ergänzten Faktoren.

Tab. 12 Gene der Biofilmbildung/Virulenz bei *E. faecalis*.

Die Tabelle führt die von Paganelli *et al.* (2012) zusammengefassten Gene auf, die bei Prozessen der Biofilmbildung beteiligt sind. Sie wurde um einige weitere Gene ergänzt und nennt neben dem Gen-Namen auch deren Funktion und jeweiligen Referenzstamm. Per PCR wurde das Isolat auf das Vorhandensein dieser Gene überprüft und mittels Sequenzierungen auf Unterschiede hin untersucht. Grau unterlegt sind diejenigen Gene hervorgehoben, die einen Unterschied bei Isolat 1.10 im Vergleich zu den Referenzstämmen der Datenbank (NCBI) aufwiesen.

+, vorhanden; -, nicht vorhanden; IS, Insertionselement; *E. fc*, *E. faecalis*; *E. fm*, *E. faecium*

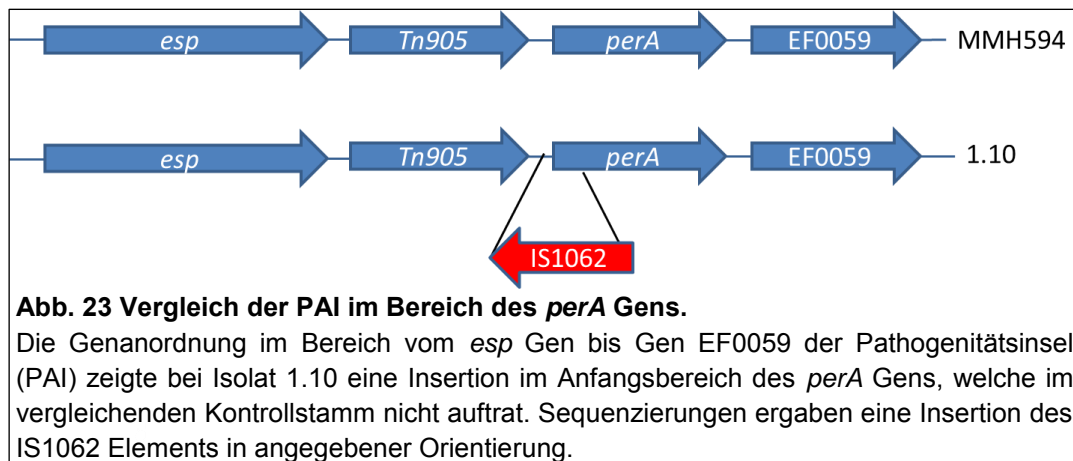
Gen-Name	Vorhanden in 1.10 (Unterschiede)	Funktion	Referenzstamm
<i>ace</i>	+	Kollagen Bindeprotein	<i>E. fc</i> OG1RF
<i>asa1</i>	+	Aggregationssubstanz	<i>E. fc</i> MMH594
<i>asa373</i>	-	Aggregationssubstanz	<i>E. fc</i> OG1X:pAM373
<i>atn/atIA</i>	+	Autolysin	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
<i>bee1,2,3 + srt1,2</i>	+	Pilus-Locus mit spezifischer Sortase	Isolat <i>E. fc</i> E99 Isolat <i>E. fc</i> 1.10
<i>bgsA</i>	+	Glykosyltransferase	<i>E. fc</i> V583
<i>bopABCD</i>	+	Maltose Metabolismus	<i>E. fc</i> T9
<i>cylA</i>	-	Cytolysin	<i>E. fc</i> MMH594
<i>dnaJ</i>	+	Hitzeschockprotein	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
<i>dnaK</i>	+	Hitzeschockprotein	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
<i>dtlABCD</i>	+	D-Alanylierung	<i>E. fc</i> V583
<i>ebpA,B,C</i>	+ (IS6770 in <i>ebpC</i>)	Pilus-Locus	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
<i>srtC</i>	+ (~200 bp verlängert)	Pilusspezifische Sortase C	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
<i>ebpR</i>	+ (IS1062)	<i>ebp</i> -Locus Regulator	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
<i>ebrA</i>	+	DNA Bindeprotein, <i>gntR</i> Familie	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
EF0591	-	nicht charakterisiertes Oberflächenprotein	<i>E. fc</i> MMH594
EF0676	nicht amplifizierbar	Transkriptionsregulator, ArgR Familie	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583

Gen-Name	Vorhanden in 1.10 (Unterschiede)	Funktion	Referenzstamm
EF0983	nicht amplifizierbar	Transkriptionsregulator, ArgR Familie	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
EF3314	+	mögliche Sortase	<i>E. fc</i> V583
<i>epa</i> Operon	+	Biosynthese Operon für zellwandassoziierte Polysaccharide	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
<i>esp</i>	+	Bap-like, Oberflächenprotein	<i>E. fc</i> MMH594
<i>fsrABDC</i>	+	Quorum sensing Locus, BF Regulator	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
<i>gelE</i>	+	Gelatinase, aktiviert Zelllyse	<i>E. fc</i> MMH594
<i>grpE</i>	+	Hitzeschockprotein	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
<i>hyl</i>	-	Hyaluronidase	<i>E. fm</i> E734
<i>perA</i>	+ (IS0162)	<i>araC</i> -like Regulator	<i>E. fc</i> MMH594
<i>prgB</i>	-	Aggregationssubstanz	<i>E. fc</i> OG1SSP
<i>salA</i>	+	Sekregiertes Antigen	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
<i>salB</i>	+	Sekregiertes Antigen	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
<i>selD</i>	+	Selenophosphate Synthetase	<i>E. fc</i> V583
<i>sprE</i>	+	Serinprotease, inhibiert Zelllyse	<i>E. fc</i> MMH594
<i>srtA</i>	+	Housekeeping Sortase	<i>E. fc</i> OG1RF, <i>E. fc</i> V583
<i>xdh</i>	+	Xanthin Dehydrogenase	<i>E. fc</i> V583

Bis auf die PCRs zu den beiden Genen EF0676 und EF0983 lieferten alle PCRs ein positives Ergebnis. Trotz mehrfacher Wiederholung und Variation in den PCR-Ansätzen, konnte selbst für die Positivkontrolle kein Amplifikat erzielt werden. Somit ist keine Aussage über das Vorhandensein dieser Gene bei Isolat 1.10 möglich.

Interesse weckten die Gene *asa373*, *cylA*, EF0591, *hyl*, *pgrB*, *perA* sowie die Gene des *ebp*-locus. Zum einen, weil sie bei Isolat 1.10 nicht vorhanden waren, zum anderen, weil sich im Vergleich zum Kontrollstamm verlängerte Amplifikate bildeten.

Das PCR-Produkt des wt-*perA* Gens der Positivkontrolle sollte 550 bp groß sein. Bei Isolat 1.10 zeigte sich ein um ca. 1000 bp vergrößertes PCR-Produkt, welches nach Sequenzierung als eine Insertion des IS1062 Elements im 5'-Bereich des Gens identifiziert wurde (Abb. 23).



Das *perA* Gen ist Teil einer 152kb großen Pathogenitätsinsel (PAI) und stellt einen bei der BF-Bildung beteiligten Transkriptionsregulator dar. Dieser scheint bei Isolat 1.10 durch die Insertion inaktiviert zu sein (Abb. 23).

Die Insertionen in die Gene des *ebp*-Locus werden im separaten Kapitel 4.5 dargestellt.

Das Fehlen einiger Gene basiert zum Teil auf der Tatsache, dass es sich um Plasmid-kodierte Faktoren handelt und das Isolat 1.10 diese Plasmide nicht trägt. Andere Virulenzfaktoren sind schlichtweg nicht vorhanden.

4.3 Komplementationsstudie

Die durch die Punktmutation in der Sortase 1 in der Biofilmbildung geschwächte Mutante 1.10.16 wurde erfolgreich durch das intakte Wildtypallel *srt1* komplementiert. Die phänotypischen Tests sowie die massenspektrometrischen Analysen der Proteinextrakte zeigten ein dem Isolat 1.10 entsprechendes Bild.

Bei der Optischen-Dichte-Messung des Biofilmassays konnten sogar leicht höhere OD-Werte ermittelt werden, die jedoch im Standardfehlerbereich der Messwerte lagen (Kap. 4.3.1). Auch die REM Aufnahmen zeigten die gleichen Oberflächenstrukturen wie Isolat 1.10, welche bei der Mutante fehlten (Kap. 4.3.4). Das Bandenmuster der SDS-PAGE ließ bei der komplementierten Mutante 1.10.16K die typische HMW Bande im Bereich von 250 kDA vermuten. Massenspektrometrische Untersuchungen zeigten das Vorhandensein aller drei Strukturproteine des *bee*-Locus in Isolat 1.10, wohingegen die Untereinheit *bee2* bei der Mutante fehlte. Durch die Komplementation konnte der intakte Bee-Pilus wieder gebildet werden, was sich im erneuten Nachweis aller drei Untereinheiten bei 1.10.16K widerspiegelte (Kap. 4.3.2). Die Annahme, dass es zur einer defekten Bildung der mRNA, bedingt durch das Stoppcodon in der Sortase 1 kommt, konnte nicht bestätigt werden. Die mRNA wurde für den kompletten *bee*-Locus auch in der Mutante korrekt gebildet (Kap. 4.3.3).

4.3.1 Biofilmassay

Die phänotypischen Untersuchungen zur Wiedererlangung der Biofilmbildungsstärke der komplementierten Mutante zeigten ein deutlich positives Ergebnis. Die nun wieder durch das *wt-srt1* Gen intakte Mutante erreichte OD₅₉₅ Werte, die denen des Isolats 1.10 entsprachen (Abb. 24). Der intakte *bee*-locus sorgte somit für die verstärkte Biofilmbildung. Die Einteilung in die verschiedenen Stärken der Biofilmbildung erfolgte nach modifizierten Kriterien von Christensen *et al.* (1985). Die zusätzliche Unterteilung von starken und sehr starken BF-Bildern wurde nötig, um die Mutante 1.10 vom Isolat 1.10.16 unterscheidbar zu machen.

OD₅₉₅ < 0,120 kein BF-Bildner

0,120 ≤ OD₅₉₅ ≤ 0,240 schwacher BF-Bildner

0,241 ≤ OD₅₉₅ ≤ 0,650 starker BF-Bildner

OD₅₉₅ > 0,650 sehr starker BF-Bildner

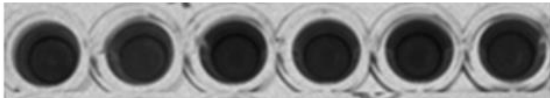


Name	Biofilmassay	OD ₅₉₅
Isolat 1.10		1,34 ± 0,14
Mutante 1.10.16		0,63 ± 0,07
Kompl. 1.10.16		1,39 ± 0,04

Abb. 24 Biofilmassay im Mikrotitermaßstab.

Isolat 1.10, Mutante 1.10.16 und komplementierte Mutante 1.10.16 wurden hinsichtlich ihrer Biofilmbildungsstärke untersucht. Die anhaftenden Zellen wurde mit Kristallviolett gefärbt und die Optische Dichte bei 595 nm gemessen. Das Isolat zeigt im Vergleich zur Mutante eine mehr als doppelt so starke Färbung. Diese Stärke kann in der komplementierten Mutante wieder erlangt werden.

Die OD₅₉₅ wurde im sechsfachen Ansatz in dreifacher Wiederholung ermittelt und die so gewonnenen Mittelwerte samt Standardabweichung berechnet (Abb. 25). Es ist zu erkennen, dass die leicht höhere OD bei 1.10.16K im Standardabweichungsbereich von 1.10 liegt. Die Werte zeigten aber im Vergleich zur Mutante jeweils mehr als doppelt so hohe OD an.

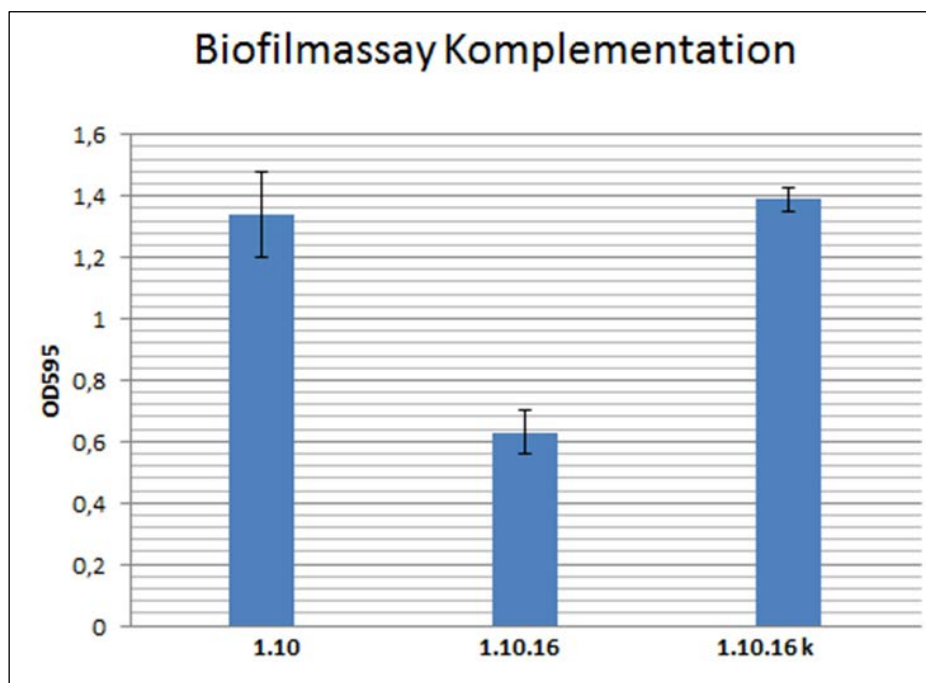


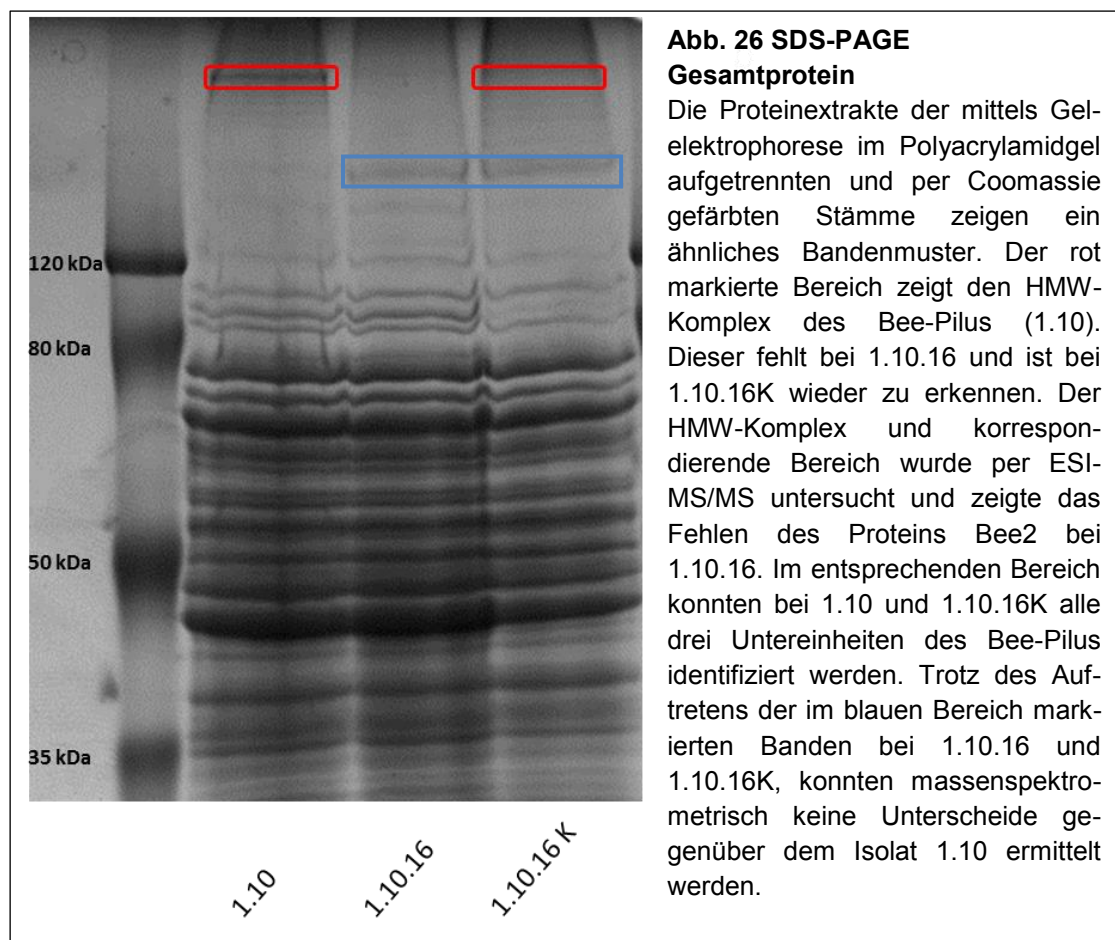
Abb. 25 Biofilmassay: OD₅₉₅-Messungen.

Die Durchschnittswerte der optischen Dichte aus drei Messungen im sechsfachen Ansatz von Isolat 1.10, Mutante 1.10.16 und komplementierter Mutante 1.10.16K zeigen die Unterschiede in der Biofilmbildungsstärke. Die Mutante ist deutlich geschwächt. Stamm 1.10 und 1.10.16K erreichen mehr als doppelt so hohe Werte.

Insgesamt stellt die Mutante aber immer noch einen starken Biofilmbildner dar, wenn man die Kriterien von Christensen *et al.* (1985) zu Grunde legt.

4.3.2 SDS-PAGE und Massenspektrometrie

In der SDS-PAGE der Gesamtproteinextrakte konnte für die komplementierte Mutante 1.10.16K ein dem Isolat 1.10 ähnliches Bild erzielt werden. Nach Coomassiefärbung war der für den Bee-Pilus charakteristische HMW-Komplex im Bereich von ~250 kDa sichtbar (rote Box in Abb. 26). Dieser ist bei der komplementierten Mutante 1.10.16K nicht so klar wie bei Isolat 1.10 zu erkennen, aber im direkten Vergleich mit der Mutante 1.10.16 doch deutlicher. Das Vorhandensein des HMW-Komplexes konnte zur Bestätigung direkt über massenspektrometrische Analysen nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die bei der Mutante 1.10.16 und komplementierter Mutante 1.10.16K stärker auftretenden Banden oberhalb von 120 kDa (blaue Box) zeigten keine Unterschiede im Vergleich zum Isolat 1.10 in der massenspektrometrischen Analyse. Unterhalb von 120 kDa unterschieden sich die drei Proben in der SDS-PAGE nicht mehr voneinander.



Auch massenspektrometrisch konnten keine qualitativen Unterschiede festgestellt werden. Das im HMW Komplex fehlende Bee2 Protein konnte auch nicht im Massenbereich des Einzelproteins nachgewiesen werden, was die Ergebnisse von Schlüter *et al.* (2009) bestätigte (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Komplementation konnte somit auch mit dieser Methode erfolgreich nachgewiesen werden.

4.3.3 Transkriptionsanalyse via RT-PCR

Um zu zeigen, dass die Mutation im *srt1* Gen keinen Einfluss auf die gebildete polyzistronische mRNA der beiden Sortase Gene hat, wurden qualitative Analysen der Gesamt-RNA der Zelle durchgeführt. Dargestellt in Abb. 27 sind jeweils PCRs zu den mRNA der Gene *srt1* und *srt2* (je 200bp).

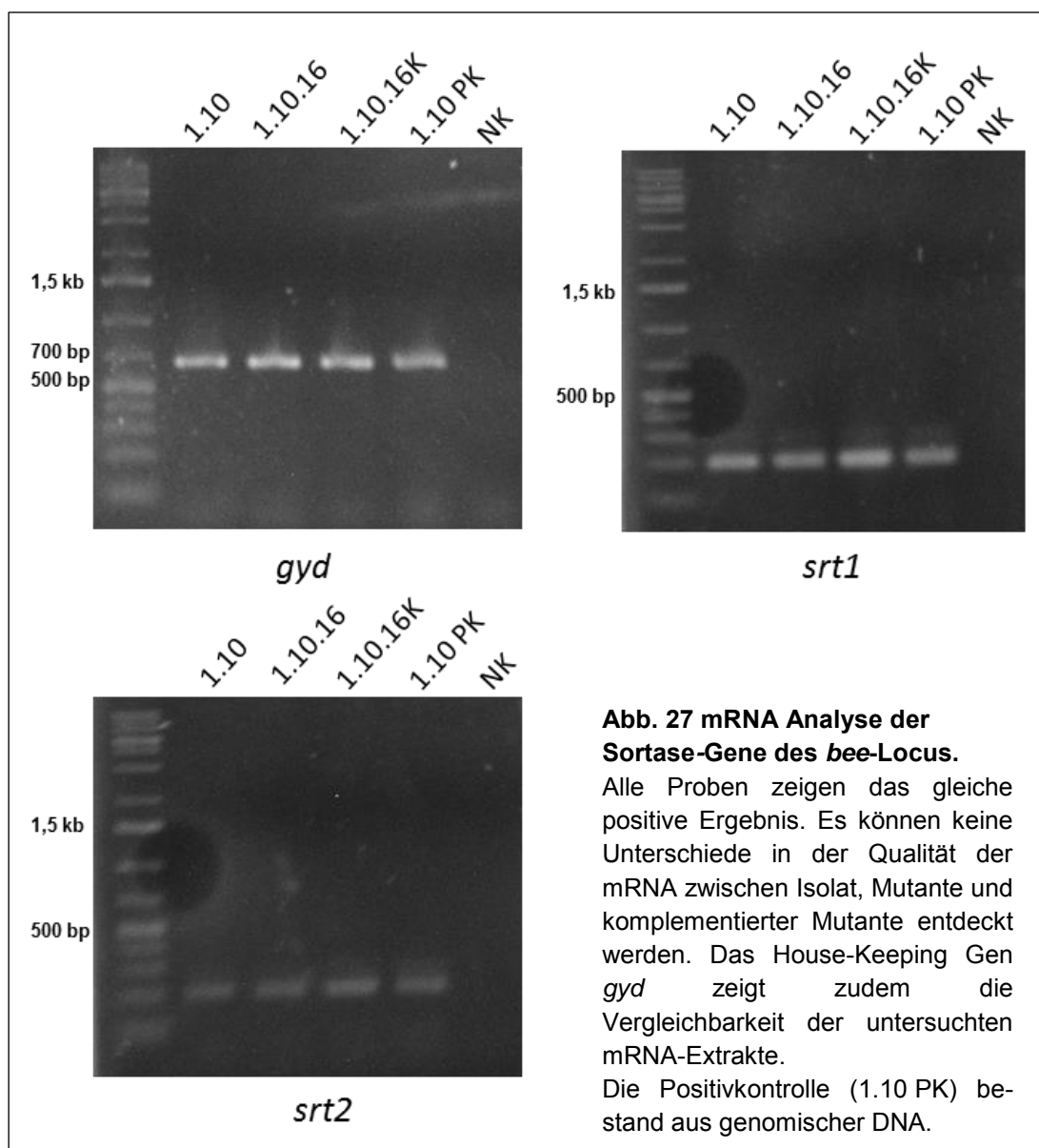


Abb. 27 mRNA Analyse der Sortase-Gene des *bee*-Locus.

Alle Proben zeigen das gleiche positive Ergebnis. Es können keine Unterschiede in der Qualität der mRNA zwischen Isolat, Mutante und komplementierter Mutante entdeckt werden. Das House-Keeping Gen *gyd* zeigt zudem die Vergleichbarkeit der untersuchten mRNA-Extrakte.

Die Positivkontrolle (1.10 PK) bestand aus genomischer DNA.

Zusätzlich ist das Housekeeping Gen *gyd* (700bp) amplifiziert worden um die Vergleichbarkeit der mRNA-Extrakte/cDNA zu zeigen.

Die Ergebnisse zeigten, dass das durch die Mutation gebildete Stopp-Codon keinen negativen Einfluss auf die gebildete mRNA hat. Die Überprüfung der Gesamt-RNA-Extrakte von Isolat 1.10, Mutante 1.10.16 und komplementierter Mutante 1.10.16K zeigten keine Unterschiede, was bedeutet, dass die mRNA in allen Stämmen korrekt gebildet wurde.

Die übrigen Gene des *bee*-Locus wurden ebenfalls auf korrekte mRNA-Bildung untersucht. Die Analysen zeigten ein identisches Bild und werden daher nicht gezeigt. Die mRNA aller drei Strukturprotein-Gene *bee1*, *bee2* und *bee3* wurden in voller Länge gebildet und konnten erfolgreich nachgewiesen werden.

4.3.4 Rasterelektronenmikroskopie

Die REM-Aufnahmen in Abb. 28 zeigen für Isolat 1.10 und komplementierte Mutante 1.10.16K ähnliche Merkmale, die der Mutante 1.10.16 fehlen (Pili, Noppen etc.).

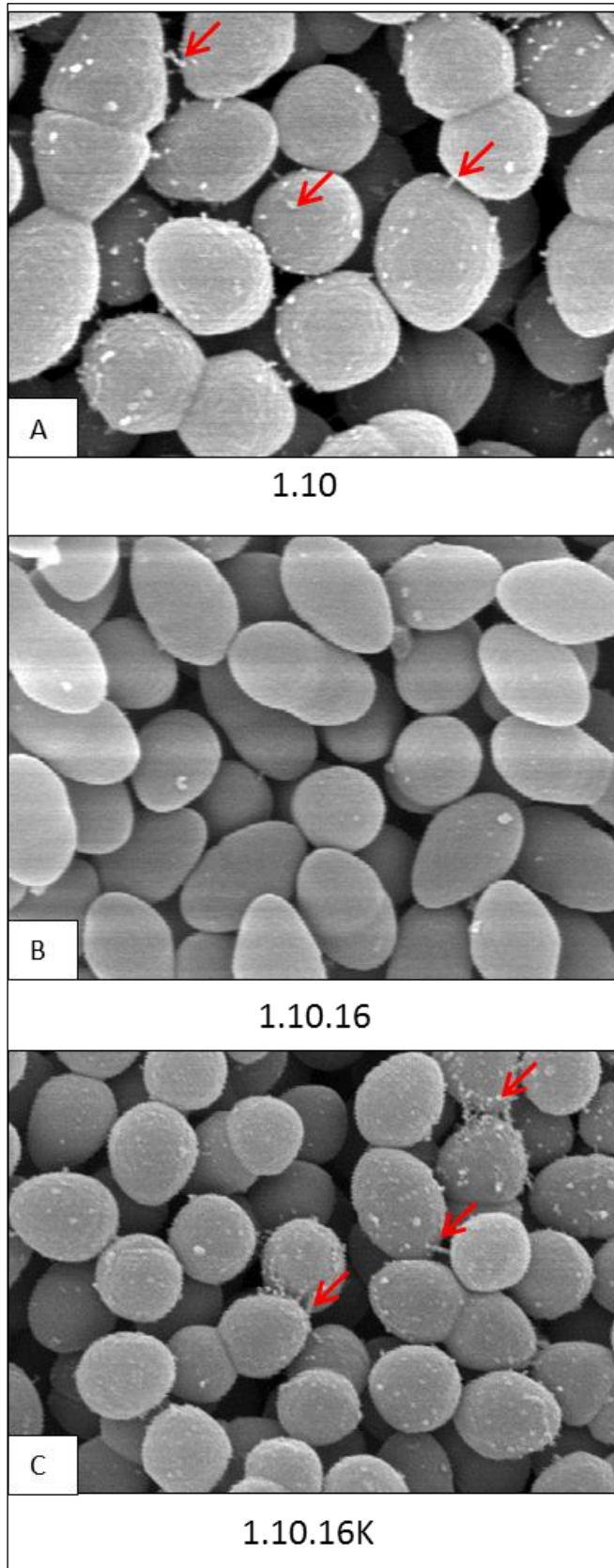


Abb. 28 Rasterelektronenmikroskopie.

Die dargestellten Aufnahmen von *Enterococcus faecalis* wurden durch Präparation von Kolonien der einzelnen Isolate und Mutanten gewonnen. Im engeren Sinne sind es also keine Biofilme, sondern Zellaggregate auf festem Medium.

Die vergleichenden Analysen der REM Aufnahmen **A** des Isolats 1.10 (Bee-Pilus positiv), **B** der Mutante 1.10.16 (Bee-Pilus negativ) und **C** der komplementierten Mutante 1.10.16K (Bee-Pilus positiv) zeigen klar erkennbare Unterschiede in den Oberflächenbeschaffenheiten.

Isolat 1.10 und die kompl. Mutante 1.10.16K zeigen helle Strukturen (rote Pfeile), die teilweise in direkten Kontakt zu Nachbarzellen stehen. Andere dieser Strukturen sind ohne Kontakt und sind in die Betrachtungsebene ausgerichtet. Bei Mutante 1.10.16 fehlen diese Strukturen komplett. Die Oberfläche sieht nahezu glatt und strukturlos aus. Diese Strukturen stellen wahrscheinlich Bee-Pili dar, da der einzige bekannte genetische Unterschied von Isolat, Mutante und komplementierter Mutante im *srt1* Gen des *bee*-Locus liegt.

Diese Pili zeigen häufig Verbindungen zu benachbarten Zellen (Abb. 28 A+C). Da auf die Oberfläche fotografiert wurde, zeigen einige dieser Pili keine Kontakte, sondern stehen in der Betrachtungsebene. Das komplette Fehlen dieser Strukturen bei Mutante 1.10.16 (Abb. 28 B) deutet auf den Zusammenhang zum defekten Bee-Pilus hin.

Da der einzige bekannte Unterschied zwischen Isolat und Mutante in der defekten Sortase liegen, handelt es sich bei diesen Oberflächenstrukturen wahrscheinlich um Bee-Pili. Betrachtet man diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den OD₅₉₅-Werten des Biofilmassays, kann man zu dem Schluss kommen, dass es zu einer stärkeren Anheftung an die Oberfläche sowie zwischen den Zellen kommt. Dies führt folglich zu einer verbesserten Biofilmbildung, die durch die größere Fähigkeit der Farbstoffrückhaltung deutlich wird.

4.4 Entdeckung weiterer Oberflächenproteine/Biofilmfaktoren bei Isolat *E. faecalis* 1.10

4.4.1 Transposonmutagenese mittels Ez *Tn5* Transposom Kit

Der Versuch der Mutagenese mittels Transposom zur Entdeckung neuer bzw. weiterer Oberflächenproteine und Biofilmfaktoren bei Isolat *E. faecalis* 1.10 verlief negativ. Die Einführung des Marker Gens (Antibiotika-Resistenz) über das Transposom-Kit schlug trotz mehrfacher Wiederholung fehl. Der Mechanismus des einfachen Einbaus in unspezifische Bereiche der genomischen DNA konnte nicht erzielt werden. Die Überprüfungen der gewachsenen Klone zeigten lediglich falsch positive Klone, die auf Spontanresistenz zurückzuführen waren. Das Markergen *tetM* war nie mittels PCR nachweisbar. Offensichtlich ist eine Mutagenese mittels dieses Kits bei *E. faecalis* nicht möglich. Kontrollexperimente zur Funktionalität des verwendeten Resistenzmarkers bzw. des Transposoms ließen diese als Fehlerquelle ausschließen.

4.4.2 Oberflächenprotein Biotinylierung

Die Biotinylierung Zelloberflächenassoziierter Proteine wurde einmalig im-Experiment gezeigt. Reproduzierversuche schlugen fehl, da keine Unterschiede in den Bandenmustern im Vergleich zur Negativkontrolle erkennbar waren.



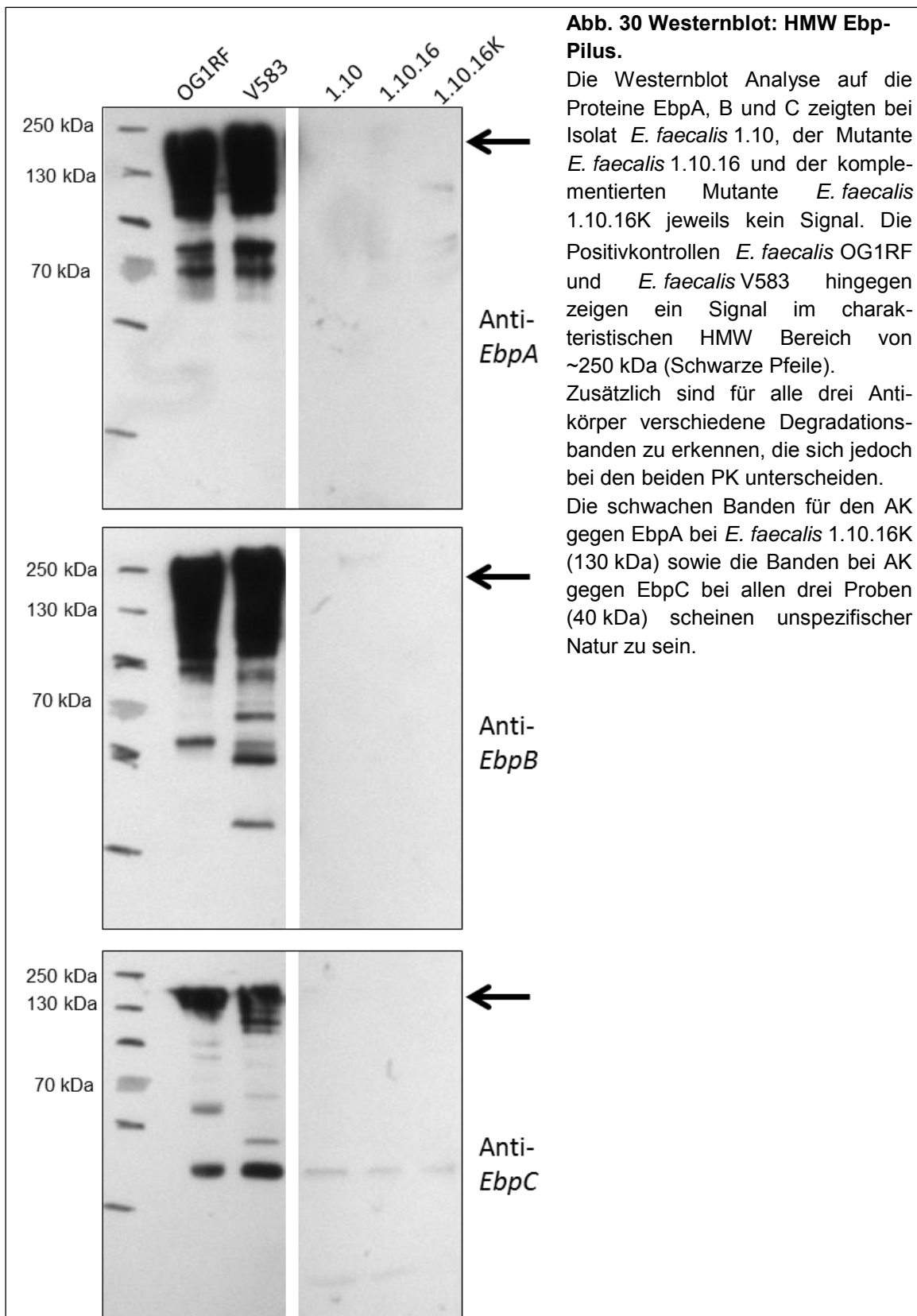
Die in Abb. 29 gekennzeichneten Banden wurden bis dato aufgrund eines defekten Geräts nicht identifiziert und ließen sich daher nicht zuordnen.

Ein kompletter Abgleich der Probe mit der Negativkontrolle könnte zudem noch weitere, mittels Coomassie-Färbung nicht darstellbare, Proteine aufdecken. Die Ergebnisse sind vielversprechender Natur im Hinblick auf die Identifikation weiterer oberflächenexponierter Proteinstrukturen für Isolat *E. faecalis* 1.10. Diese Experimente sollten daher wiederholt und bestätigt und anschließend massenspektrometrisch analysiert werden.

4.5 Der Ebp-Pilus von Isolat 1.10

Laut Literatur besitzen 97% aller Enterokokken (Nallapareddy *et al.*, 2011) die Gene des *ebp*-locus, was durch PCR auch für 1.10 nachgewiesen werden konnte. In Abb. 30 sind die Westernblot-Analysen gegen die drei *ebp*-locus kodierten Untereinheiten EbpA, EbpB und EbpC des Ebp-Pilus zu sehen. Diese zeigten jedoch, trotz Nachweis der kodierenden Gene weder für Isolat 1.10 noch für die Mutante 1.10.16 und komplementierte Mutante 1.10.16K positive Signale. In den beiden Positivkontrollen *E. faecalis* OG1RF und V583 sieht man deutlich den HMW im Bereich von ~250 kDA plus zusätzliche Degradationsbanden. Dies heißt, dass die Proteine des Ebp-Pilus bzw. deren Zusammenbau zum intakten Ebp-Pilus bei Isolat 1.10 nicht in korrekter Weise gebildet werden.

Warum dies so ist, obwohl die Gene des *ebp*-locus in Isolat 1.10 vorhanden sind, soll im Folgenden geklärt werden.



Mittels PCR wurden zu allen vier Genen des *ebp*-Locus sowie zum Regulatorgen *ebpR* Vollängen-Amplifikate ermittelt, wobei für die drei Gene *ebpC*, *srtC* und *ebpR*

vom Typstamm *E. faecalis* OG1RF abweichende Amplifikatlängen festgestellt werden konnten, die in Abb. 31 dargestellt sind.

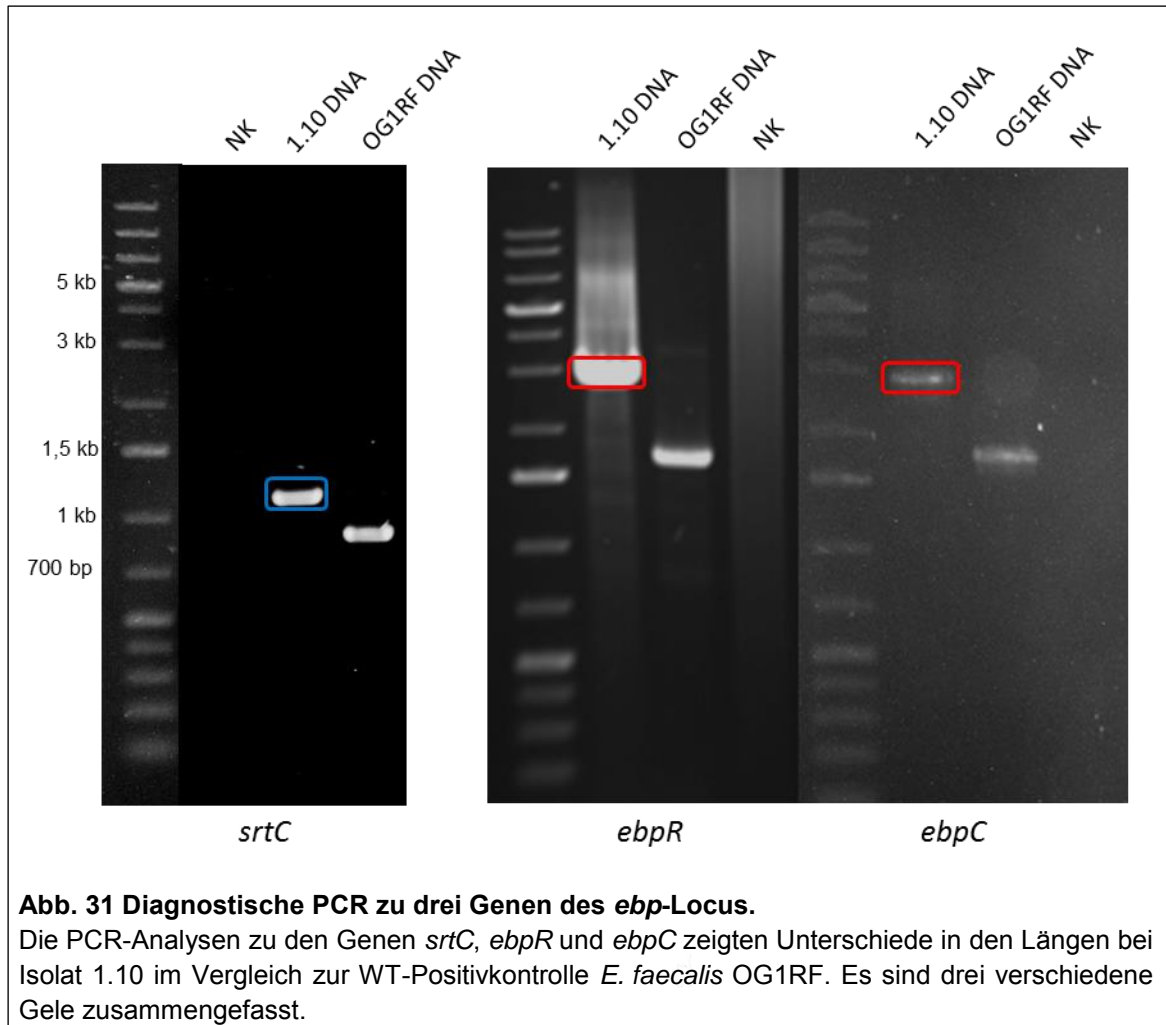


Abb. 31 Diagnostische PCR zu drei Genen des *ebp*-Locus.

Die PCR-Analysen zu den Genen *srtC*, *ebpR* und *ebpC* zeigten Unterschiede in den Längen bei Isolat 1.10 im Vergleich zur WT-Positivkontrolle *E. faecalis* OG1RF. Es sind drei verschiedene Gele zusammengefasst.

Die PCRs zu den Genen *ebpR* und *ebpC* des *ebp*-locus zeigten bei Isolat 1.10 einen Bandenshift um jeweils ca. 1400 bp (rote Box) im Vergleich zur Positivkontrolle des Typstamms *E. faecalis* OG1RF. Das Amplifikat von *srtC* war deutlich (blaue Box) länger als Positivkontrolle (Abb. 31). Die Identifikation der Ursache dieser verlängerten Gene erfolgte über Sequenzierungen (LGC-Genomics) und anschließendem Datenbankabgleich (NCBI Blast) der erhaltenen Sequenzen (siehe Anhang). Diese lieferten Insertionen in den Genen *ebpR* (IS1062) und *ebpC* (IS6770) als Ursache (Abb. 32). Die übrigen Gene des *ebp*-Locus zeigten zum Typstamm identische Amplifikatlängen und werden daher nicht abgebildet.

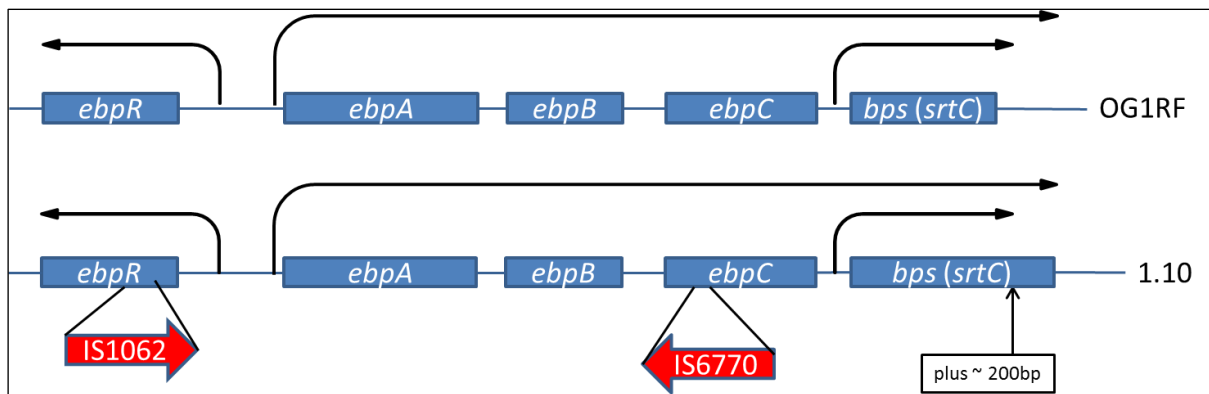


Abb. 32 Neuordnung des *ebp*-locus bei Isolat 1.10.

Durch Insertionen zweier IS-Elemente sowie eines verlängerten *srtC* Gens kommt es zu einer Neuordnung des *ebp*-Locus im Vergleich zum Referenzstamm *E. faecalis* OG1RF. Die Insertionsstellen mit Orientierungen sind durch rote Pfeile angegeben. Schwarze Pfeile deuten die Promotororientierung der Gene an.

Außerdem zeigte die Sequenzierung des *srtC*-Gens eine ca. 200 bp lange vom Typstamm *E. faecalis* OG1RF abweichende Folgesequenz an. Durch Datenbankanalysen zeigte sich eine Übereinstimmung mit der Sortase C Sequenz des *E. faecalis* Isolats 7L76 (Pajon *et al.*, 2010). Der im Vergleich zur Sequenz von *E. faecalis* OG1RF, *E. faecalis* V583 und weiteren in der Datenbank hinterlegten Sequenzen verlängerte Bereich zeigt ein Helix-Turn-Helix Motiv in entgegengesetzter Orientierung zum Sortase C Gen (Abb. 32).

Um einen möglichen Einfluss der Insertionen auf die Transkription der Gene des *ebp*-Locus aufzudecken, wurde eine RT-PCR Analyse zur gebildeten mRNA der Stämme vollzogen.

Diese Untersuchungen lieferten die zu erwartenden Ergebnisse. Die beiden Gene, deren mRNA durch die Insertionen betroffen waren, wurden bei Isolat 1.10 nicht korrekt gebildet (Abb. 33).

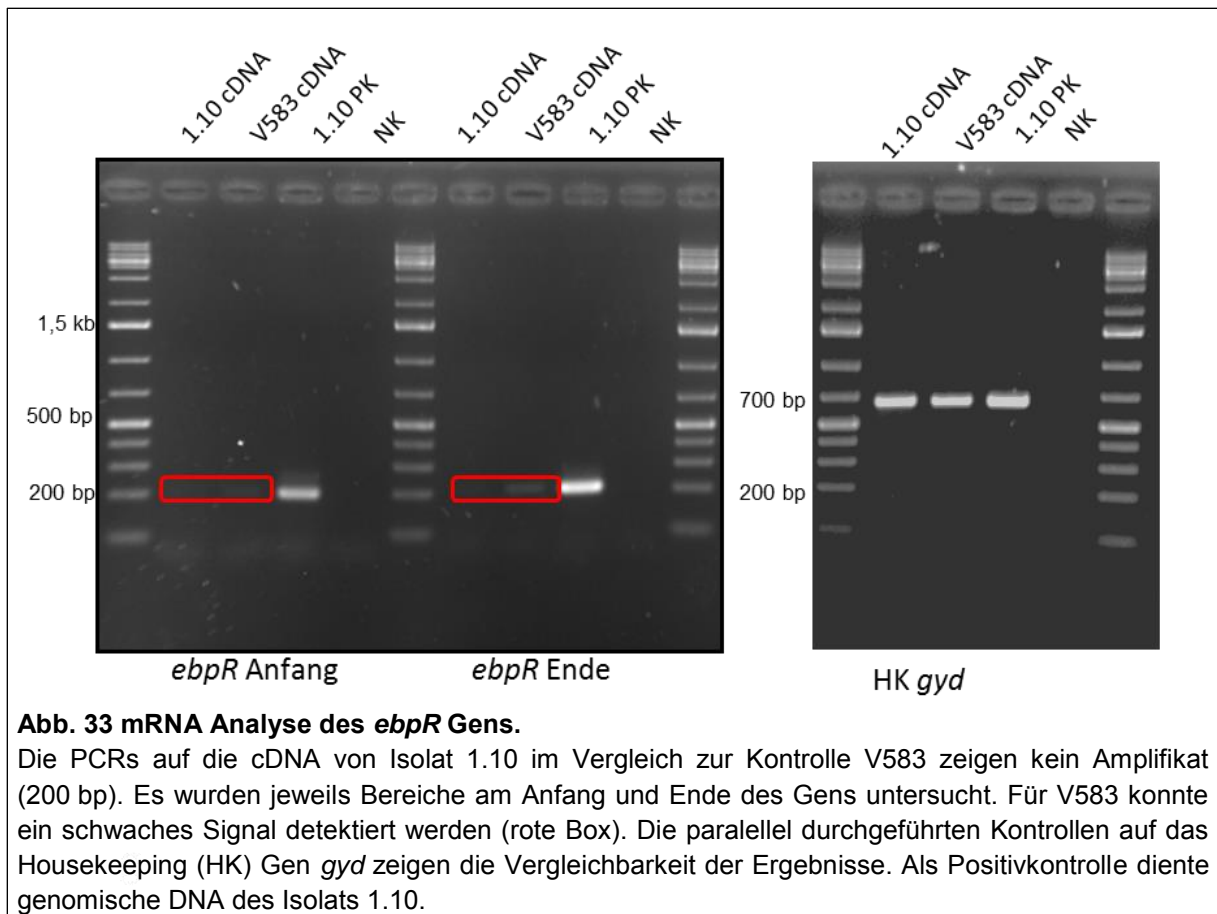
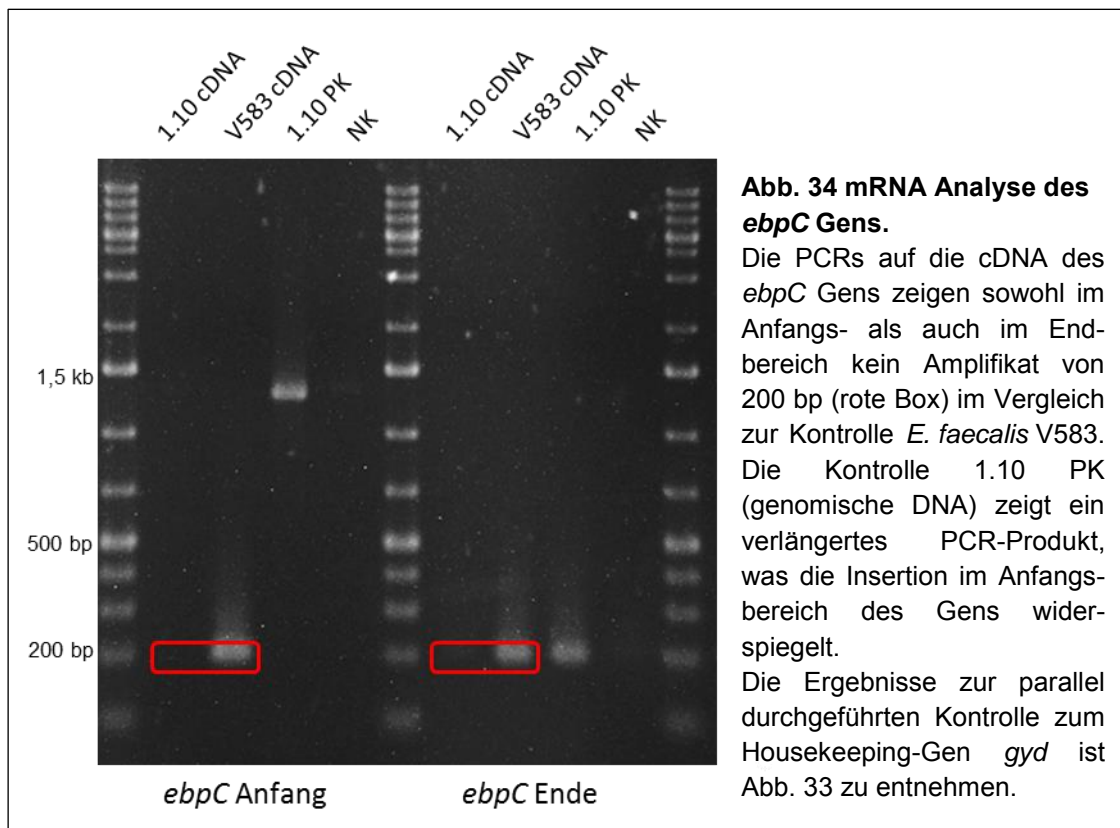


Abb. 33 mRNA Analyse des *ebpR* Gens.

Die PCRs auf die cDNA von Isolat 1.10 im Vergleich zur Kontrolle V583 zeigen kein Amplifikat (200 bp). Es wurden jeweils Bereiche am Anfang und Ende des Gens untersucht. Für V583 konnte ein schwaches Signal detektiert werden (rote Box). Die parallel durchgeführten Kontrollen auf das Housekeeping (HK) Gen *gyd* zeigen die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Als Positivkontrolle diente genomische DNA des Isolats 1.10.

Die Insertion des IS-Elements in das *ebpR* Gen führte zur vollständigen Inaktivierung der Bildung bzw. dem Abbau der mRNA bei Isolat 1.10 (rote Box). Für den Referenzstamm *E. faecalis* V583 war ein schwaches Signal zu erkennen (rote Box). In Abb. 33 sind die PCRs zum *ebpR*-Anfang und -Ende (je 200 bp) auf die cDNA von *E. faecalis* 1.10, *E. faecalis* V583 sowie die Positivkontrolle *E. faecalis* 1.10 (genomische DNA) und NK zu sehen. Die Amplifikation des Housekeeping-Gens *gyd* (ca. 700 bp) verdeutlicht die Vergleichbarkeit des gebildeten mRNA Levels.

Abb. 34 zeigt die PCRs zur Überprüfung der mRNA zum *ebpC* Gen. Auch hier kann man erkennen, dass die mRNA bei Isolat 1.10 im Gegensatz zur Kontrolle *E. faecalis* V583 nicht gebildet wurde (rote Box). Das Amplifikat der Positivkontrolle 1.10 (genomische DNA) zeigt die Insertion des IS-Elements IS6770 im Anfangsbereich des *ebpC* Gens.



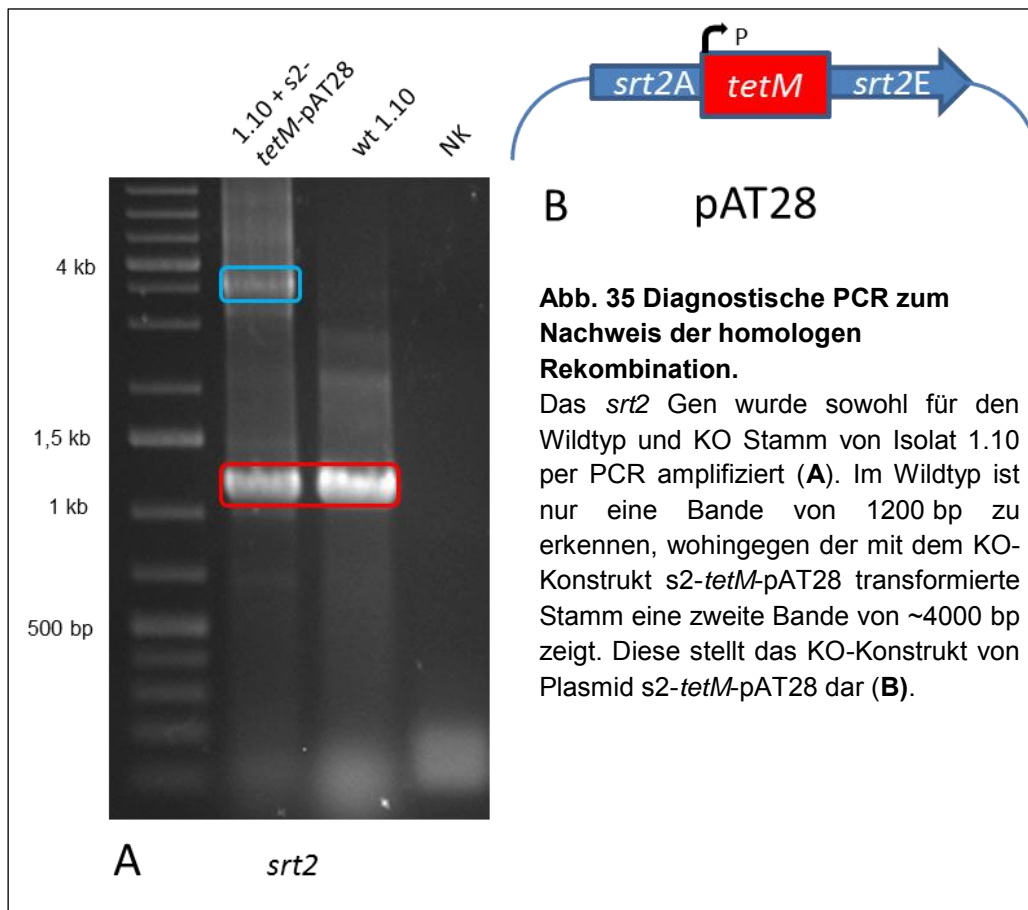
Für die anderen beiden intakten Gene *ebpA* und *ebpB* sowie das verlängerte *srtC* Gen konnten schwache Signale erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Das heißt, dass die Insertion im *ebpR* und *ebpC* nicht zu einer vollständigen Inaktivierung des Locus führt. Die konstitutive Transkription der Gene *ebpA* und *ebpB*, die unter einem gemeinsamen Promotor stehen, war weder beeinflusst von der Insertion in *ebpC* noch von der Insertion in das Gen des Transkriptionsregulators *ebpR*.

4.6 Knockout Analysen

Die Knockoutkonstrukte für *bee1*, *bee3*, *srt1* und *srt2* konnten vollständig gebildet werden (pAT28 Vektor) und liegen sowohl in *E. coli* als auch in aufgereinigter Plasmidform vor. Lediglich das KO-Konstrukt für *bee2* konnte bisher nicht fertig konstruiert werden, da keine Klone detektiert werden konnten, die die Fusion aus *aphA*-Promotor und Strukturgen *bee2* aufwiesen.

Für den KO-Vektor des *srt2*-Gens konnte auch eine Transformation mit Isolat 1.10 vollzogen werden. Die Selektion hierfür erfolgte auf Spectinomycin und Tetrazyklin. Durch eine zehntägige Kultivierung und der Überführung in frisches Medium alle 24 Stunden, sollte den Zellen Zeit gegeben werden, den Schritt der doppelten

homologen Rekombination (Kap. 3.12.4) durchzuführen. Nach erfolgter Rekombination des KO-Konstrukts mit der genomischen DNA und anschließender Kultivierung ohne Antibiotika sollten die Zellen nur noch Tetrazyklinresistenz zeigen. In Abb. 35 sind die Amplifikate der PCRs zu sehen, die entweder das wt-Allel (~1200 bp, rote Box) und das KO-Konstrukt (~4000 bp, blaue Box) oder aber nur noch das wt-Allel zeigen (~1200 bp, rote Box).



Nach einer erfolgten doppelten homologen Rekombination dürfte per PCR nur noch die KO-Konstrukt Bande (~4000 bp, blaue Box) nachweisbar sein. Da dies in keinem der getesteten Klone detektierbar war, konnte der Einbau und somit die Stilllegung des Zielgens nicht vollzogen werden.

4.7 Transfer der *bee*-Locus Gene auf biofilmbelasteten Stamm

E. faecalis V583

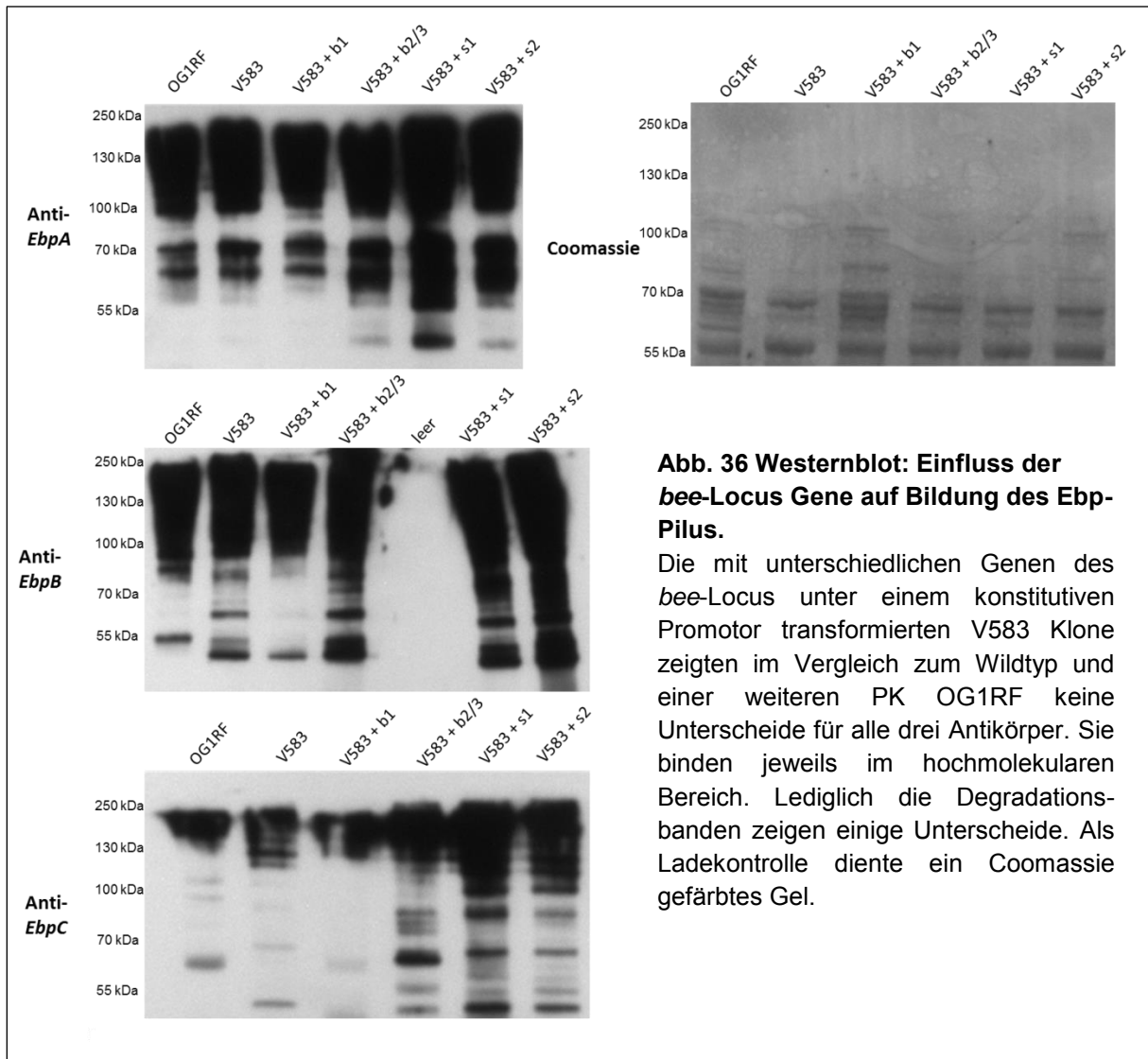
Mit dem Ziel die Eigenschaften eines zeitgleichen zweiten Pilus in *E. faecalis* zu untersuchen, sollten die Gene des *bee*-locus auf einen in der Biofilmbildung schwachen Stamm transferiert werden. Hierzu wurden sowohl einzelne Gene als auch Genkombinationen in den Shuttlevektor pAT28 inseriert und unter Kontrolle des *aphA* Promotor gestellt. Diese Konstrukte wurden in den Stamm *E. faecalis* V583 per Elektroporation gebracht und die Auswirkungen auf die Biofilmbildung untersucht. Diese Untersuchungen waren zum einen proteinbiochemischer, zum anderen phänotypischer Natur. Neben Westernblotanalysen zu den Untereinheiten des Ebp-Pilus wurden Biofilmassays und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen durchgeführt.

In Tabelle 13 sind die Konstrukte aufgeführt, die untersucht werden sollten. Lediglich die Einflüsse der Einzelgene *bee1*, *bee2*, *srt1* und *srt2* sowie der Einfluss der Genkombination *bee2+3* konnten bisher untersucht werden. Die entsprechenden Konstrukte sind farblich rot hervorgehoben. Aufgrund von Klonierungsproblemen und mangelnder Zeit, konnten die übrigen Konstrukte nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden.

Tab. 13 pAT28 Konstrukte der zu transferierenden <i>bee</i> -locus Gene.		
<i>aphA-bee1</i>	<i>aphA-srt1</i>	<i>aphA-bee2-srt2</i>
<i>aphA-bee2</i>	<i>aphA-srt2</i>	<i>aphA-bee3-srt2</i>
<i>aphA-bee3</i>	<i>aphA-srt1+2</i>	pBEE99
<i>aphA-bee1+2</i>	<i>aphA-bee1-srt1</i>	<i>bee1-srt2</i>
<i>aphA-bee2+3</i>	<i>aphA-bee2-srt1</i>	
<i>aphA-bee1-3</i>	<i>aphA-bee3-srt1</i>	
<i>aphA-bee1+3</i>	<i>aphA-bee1-srt2</i>	

Mittels Rasterelektronenmikroskopie sowie des Biofilmassays zeigten sich keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp *E. faecalis* V583 Stamm (ohne Abbildung). Die Oberflächen aller Stämme entsprachen denen des Wildtyps. Die OD₅₉₅-Werte des Biofilmassays wiesen ebenfalls keine Erhöhung bzw. Veränderung auf (Daten nicht gezeigt), sodass man auch hier von einem Wildtyp-charakteristischen Ergebnis sprechen konnte.

Zusätzliche wurden Westernblotanalysen (Abb. 36) mit den transformierten *E. faecalis* V583 Klonen durchgeführt, welche jedoch keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollstämmen zeigten.



Aufgrund des Transfers einzelner Gene des *bee*-Locus war dies auch nicht zu erwarten, da nur bestimmte Kombinationen von Genen, wie z.B. Strukturprotein-kodierende Gene mit den entsprechen spezifischen Sortasen, zusammen einen Effekt bewirken können. Die durchgeführten und dargestellten Experimente wurden lediglich durchgeführt, um ein vollständiges Bild eines möglichen Einflusses der *bee*-Locus Gene zu erlangen.

Um die Untersuchungen abzurunden, wurden neben den Versuchen zum Transfer einzelner und kombinierter Gene auch zwei Ansätze unternommen, die den Transfer des *bee*-Locus tragenden Plasmids pBEE99 auf V583 bzw. das Eliminieren des Plasmids in Isolat 1.10 zum Ziel hatten. Das Plasmid-Mating und Plasmid-Curing

konnte nicht mehr umgesetzt werden. Die begonnenen Versuche lieferten weder plasmidfreie *E. faecalis* 1.10 Isolate noch übertragene pBEE99 *E. faecalis* V583 Klone und konnten ebenfalls nicht mehr im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit wiederholt werden.

5. Diskussion

5.1 Komplementation

Die Untersuchungen und Ergebnisse zum *bee*-locus und der Mutation des Sortase 1 Gens von Schlüter (2008) und Schlüter *et al.* (2009) haben phänotypisch eine Schwächung der Mutante in der Biofilmbildung gezeigt. Diese beruht auf der Punktmutation innerhalb des *srt1* Gens, welche zu einem Stoppcodon führt, was einen unvollständigen Piluszusammenbau verursacht. Solchen Zellen fehlte die Pilusuntereinheit Bee2. Um die Behauptung, die Schwächung läge an diesem, durch die defekte Sortase bedingtem Verlust, abschließend zu beweisen, wurde über die Komplementationsstudie das intakte Sortase 1 Gen zurück in die Mutante gebracht. Die so gentechnisch manipulierten Zellen sollten demnach wieder in der Lage sein, den Pilus korrekt zu bilden und folglich ihre ursprüngliche Biofilmbildungsstärke erlangen.

Die Durchführung zu diesen Experimenten erfolgte hierbei in Anlehnung an Tendolkar *et al.* (2006) unter Nutzung des Shuttlevektors pAT28 (Trieu-Cuot *et al.*, 1990) und des konstitutiven Promotors *aphA* von Plasmid pTCV*lac* (Poyart & Trieu-Cuot, 1997).

Nach Transformation der Mutante 1.10.16 mit dem intakten Sortase1 Gen konnten sowohl phänotypisch im Biofilmassay (Abb. 24 & 25), als auch proteinbiochemisch durch massenspektrometrische Analyse des HMW Komplexes (Abb. 26) Wildtyp-charakteristische Werte erzielt werden. Ebenso liegt durch Auswertung der REM Aufnahmen (Abb. 28) die Vermutung nahe, dass es sich bei den Oberflächenstrukturen des Isolats und der komplementierten Mutante um Bee-Pili handelt. Diese fehlten in der Mutante komplett. Da der einzige bekannte Unterschied im defekten *srt1* Gen liegt, ist diese Annahme zwar nicht gesichert, aber doch sehr wahrscheinlich. Um dies genau zu überprüfen, müsste man die Pili über Antikörperkonstrukte (z.B. Goldpartikel) markieren und mikroskopisch sichtbar machen. Dies wurde bereits für andere Pili bei Enterokokken wie dem Ebp-Pilus (Nallapareddy *et al.*, 2006) oder bei *C. diphtheriae* dem SpaA-Pilus (Ton-That & Schneewind, 2003) erfolgreich durchgeführt. Da derzeit keine Antikörper gegen die *Bee* Proteine existieren, müssten solche in analoger Weise wie für die genannten Ebp- bzw.- SpaA-Pili hergestellt werden.

Auch im Biofilmassay verhielten sich die komplementierten Zellen der Mutante 1.10.16 ähnlich wie die des Isolats 1.10. Die OD₅₉₅ Werte zeigen, dass sie sogar denen des Isolats 1.10 überlegen waren, auch wenn die Werte sich noch im Standardfehlerbereich befanden. Dies könnte daran liegen, dass die Transkriptionsrate durch den konstitutiven Promotor *aphA* derart hoch ist, dass eine bessere bzw. schnellere Assemblierung des Pilus eintritt.

Im Coomassie gefärbten SDS-PA Gel zeigt sich bei der komplementierten Mutante 1.10.16K die Bande des für den Bee-locus charakteristischen HMW Komplexes. Diese ist zwar im Vergleich zum Isolat 1.10 weniger stark ausgeprägt, massenspektrometrisch konnte aber wieder die in der Mutante fehlende Bee2 Untereinheit des Pilus detektiert werden (Abb. 26).

Alle erzielten Ergebnisse ergeben zusammen folgendes Bild: Das Enzym Sortase 1 ist spezifisch für den Einbau des Bee2 Proteins in den reifen Pilus verantwortlich. Folglich beruht die Schwächung der Biofilmbildung auf einem inkorrekten, weil unvollständig assemblierten Bee-Pilus. Die Annahme, dass die Schwächung durch die Punktmutation innerhalb des *srt1* Gens an Position 751 (G→T) bedingt war (Schlüter *et al.*, 2009), konnte somit bestätigt werden. Inwieweit eine weitere Funktion der Sortase 1 vorliegt, ist noch unklar. Die REM Aufnahmen, auf denen keinerlei Oberflächenstrukturen bei Mutante 1.10.16 zu erkennen sind (Abb. 28b), lassen vermuten, dass eventuell auch eine Beteiligung der Sortase1 bei der Assemblierung der Bee1 Untereinheiten vorliegt. Wäre die einzige Funktion der Sortase 1 der Einbau der Bee2 Untereinheit, sollten trotzdem im REM Pilusstrukturen aus den übrigen beiden Untereinheiten Bee1 und Bee3 vorhanden sein. Da dies nicht der Fall ist, liegt es nahe, dass der einzelne Zusammenbau von Bee1 und Bee3 funktioniert, die Verlängerung des Pilusschafts über Einbau weiterer Bee1 Untereinheiten jedoch verhindert ist. Diese Vermutung könnte ebenso wie die generelle Anordnung der Piluseinheiten mittels Gold markierten AK bestätigt bzw. widerlegt werden (siehe oben). Eine zusätzliche Beteiligung der Housekeeping Sortase A beim Piluszusammenbau bzw. der Verankerung an die Zellwand ist aufgrund der derzeitigen Datenlage nicht auszuschließen. Per diagnostischer PCR konnte zumindest das Vorhandensein des *srtA* Gens nachgewiesen werden.

Der Zusammenhang und die Notwendigkeit eines vollständig intakten Pilus-Locus aus den Strukturproteinen plus seiner spezifischen Sortasen wurde somit für

E. faecalis wie auch schon für Pili anderer Grampositiver Bakterien gezeigt (Ton-That *et al.*, 2004; Ton-That & Schneewind, 2003; Marraffini *et al.*, 2004; Nallapareddy *et al.*, 2006). Lediglich wenn beide Komponenten des Locus zusammen arbeiten, ist eine Pilussynthese möglich.

Unterschiede in den Loci Grampositiver Bakterien gibt es hierbei in der Anzahl der Pilus-Untereinheiten und der Anzahl der Sortasen (Abb. 7). Einige Pili, wie der Ebp-Pilus, kommen hierbei mit einer einzelnen spezifischen Sortase aus, um alle Untereinheiten untereinander zu verknüpfen. Für den Bee-Pilus ist dies mit zwei Sortasen ein anderer Fall, wobei deutlich wird, dass jeder einzelnen Sortase hierbei anscheinend eine spezifische Aufgabe zukommt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, wie ein Piluszusammenbau bzw. die Biofilmbildung aussähe, wenn das *srt2* Gen mutiert wäre. Es ist davon auszugehen, dass der alleinige Defekt einer der beiden Sortasen des *bee*-Locus einhergeht mit der unkorrekten Ausbildung des Pilus. Ob die Sortase 2 nun spezifisch für den Einbau der Untereinheit Bee3 in den Pilus verantwortlich ist, oder weitere Funktionen bei der Pilussynthese übernimmt, könnte dadurch geklärt werden. Die genaue Funktion der Srt2 ließe sich ebenso in umgekehrter Weise analysieren. Durch eine Stilllegung der Strukturgene Bee1, Bee2 und Bee3 des Pilus wäre der Zusammenhang der Sortasen mit ihren spezifischen Aufgaben zu erklären. Diese Aspekte sollen aber Teil der Diskussion zur Inaktivierung der *bee*-Locus Gene (Kap. 5.5) sein und hier nur schon einmal vorab erwähnt werden.

Erste Untersuchungen zur Funktionsweise des *bee*-Locus wurden bereits von Tendolkar *et al.* (2006) erzielt. Mittels Transposonmutagenese generierte *bee*-locus Mutanten zeigten eine geschwächte Biofilmbildung, die alleine auf einer einzelnen Insertion innerhalb des *bee2* Gens begründet lag. Dieses Ergebnis war somit in seiner Konsequenz identisch mit den Ergebnissen von Schlüter *et al.* (2009). Weitere Mutanten in anderen Bereichen des Locus wurden nicht hinsichtlich der Biofilmbildungsstärke untersucht. Dies beweist, dass es keinen Unterschied macht ob das Enzym Srt1 oder das Substrat Bee2 einen Defekt trägt. Beide Mutationen führen zu einem defekten Pilus und damit korrelierender geschwächter Biofilmbildung (Tendolkar *et al.*, 2006, Schlüter *et al.*, 2009).

5.2 Neue Biofilmfaktoren

Seit Entdeckung und ersten wissenschaftlichen Erwähnungen der Biofilmproblematik bei Enterokokken im Zusammenhang mit Humanerkrankungen in den 1990er Jahren und der damit verbundenen Intensivierung der Untersuchungen zu diesem Prozess wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen viele Faktoren der Biofilmbildung identifiziert bzw. mögliche Faktoren dieser postuliert (Ballering *et al.*, 2009, Kristich *et al.*, 2008, Nallapareddy *et al.*, 2011, Sillanpaa *et al.*, 2004). Dabei ist zum Teil mittels Transposonmutagenese gearbeitet worden, in anderen Fällen wurden bioinformatische Analysen bevorzugt.

Es kommen natürlich nicht zwangsläufig alle Gene bei jedem Enterokokkenisolat vor bzw. werden nicht zwingend alle zeitgleich exprimiert. Zudem können gerade Oberflächenstrukturen der Zelle von der Zusammensetzung des jeweiligen Mediums, insbesondere des Glukosegehalts, abhängen (Tendolkar *et al.*, 2006). Deshalb sollten für Isolat 1.10 Faktoren experimentell nachgewiesen werden, die unter den gewählten Bedingungen (TSB-Medium+ 1% Glukose) zusätzlich zu den bisher bekannten, wie zum Beispiel dem Bee Pilus oder der Glutamyl-Aminopeptidase PepA (Schlüter, 2008), von Isolat 1.10 gebildet werden.

Zu eben dieser spezifischen Identifikation von Faktoren der Biofilmbildung bei Isolat 1.10 wurden zwei verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. Die Transposonmutagenese zielte generell auf die Entdeckung weiterer Biofilmbildungsfaktoren ab, während bei der Biotinylierung von Oberflächenproteinen gezielt Faktoren gesucht wurden, die mit der Zellwand der Bakterien assoziiert sind. Die Absicht war, mittels mindestens eines methodischen Ansatzes Gene zu identifizieren, die zum einen spezifisch bei Isolat 1.10 zur Biofilmbildung beitragen, zum anderen komplett neue, noch nicht beschriebene Biofilmfaktoren darstellen.

Die Transposonmutagenese mittels Transposom Kit EzTn5 verlief bei Isolat 1.10 negativ. Trotz mehrfacher Wiederholung der Experimente konnten keine Mutanten detektiert werden. Der gewählte Resistenzmarker Spectinomycin zeigte in entsprechenden Kontrollexperimenten volle Funktionalität, sodass davon auszugehen ist, dass diese Art der Mutagenese bei *E. faecalis* nicht anwendbar zu sein scheint. Laut Herstellerangaben wurde das Prinzip für insgesamt 72 verschiedene Spezies erfolgreich durchgeführt. Darunter waren auch 18 grampositive Mikroorganismen, nicht jedoch *E. faecalis* (Epicentre® 2012).

Daher wurde die Konzentration auf die Oberflächenprotein-Biotinylierung gelegt. Dieser Versuch wurde in Anlehnung an die Experimente von Sabarth *et al.* (2002) durchgeführt und brachte verwertbare Ergebnisse.

Zur Identifikation neuer Faktoren der Biofilmbildung bei *E. faecalis* 1.10 wurden intakte Zellen mit dem Sulfo-NHS-Biotinylierung Kit behandelt. Durch Abgleich der behandelten Probe mit der Negativkontrolle (unbehandelt) konnten künstlich biotinylierte Proteine der Oberfläche von cytoplasmatischen, natürlich biotinylierten Proteinen unterschieden werden. Das differierende Bandenmuster in der SDS-PAGE zeigte einige markante Unterschiede (Abb. 29). Um die Identität dieser zusätzlichen Banden zu bestimmen, sollten massenspektrometrische Analysen durchgeführt werden. Über das Prinzip der ESI-MS/MS werden von unbekannt Proteinen die Aminosäuresequenzen aufgeschlüsselt und so identifiziert. Ein Abgleich mit in Datenbanken hinterlegten, bekannten Sequenzen erlaubt so die Identifikation neuer Proteine.

Leider konnten hierbei aufgrund eines defekten Gerätes im Untersuchungszeitraum meiner Arbeit keine Ergebnisse erzielt werden. Zur Wiederholung der Experimente fehlte die Zeit, jedoch sind die erzielten und nicht weiter identifizierten Ergebnisse vielversprechender Natur. Eine Wiederholung der Experimente mit erfolgreicher Massenspektrometrie würde eben solche Faktoren aufdecken, die spezifisch an der Oberfläche des Isolats 1.10 unter den gewählten Bedingungen gebildet wurden. Diese Ergebnisse könnten dann als Grundlage für weitere Experimente und Analysen zur Charakterisierung der Biofilmbildung dienen.

5.3 Insertionselemente

Bei Insertions-Elementen handelt es sich um springende Gene, die als codierende Sequenz meist lediglich eine Transposase besitzen. Sie transponieren nach dem „cut&paste“ Prinzip, was bedeutet, dass sie nicht bei ihrer Ausbreitung duplizieren (Munk, 2008). Springen sie in Strukturgene, kann dies zur Inaktivierung selbiger führen. Dieser Vorgang geschieht häufig in stationären Phasen von Bakterienkulturen. Über ihre flankierenden Bereiche, „Inverted Repeats“ genannt, werden sie bei der Transposition mittels der Transposase an neue Stellen im Genom gebracht. Durch versetzte Schnitte an den Integrationsstellen kommt es zu Bildung von „Direct Repeats“, die als sogenannte Fußabdrücke zurückbleiben (Mahillon & Chandler, 1998).

Die beiden IS-Elemente IS1062 und IS6770 sind strukturell miteinander verwandt und gehören zur weitverbreiteten Familie der IS30 transponierbaren Elemente bei *E. coli* (Hirt *et al.*, 1996). Sie sind in Enterokokken weit verbreitet, besonders IS6770 kommt laut einer brasilianischen Studie bei 97% der Isolate vor (Camargo *et al.*, 2005). Thorisdottir *et al.* (1994) haben mit einer Häufigkeit von über 90 % bei Enterokokken etwas niedrigere Werte für das Auftreten des IS-Elements angegeben. Die Insertion von IS6770 in *ebpC* ist laut Datenbankabgleich in drei Fällen bereits beschrieben worden. Bei einer Studie im Jahr 2009 zu Stuhlproben norwegischer Kinder aus dem Jahr 2002 (Solheim *et al.*, 2009) wurde das *E. faecalis* Isolat 62 mit einer solchen Insertion beschrieben. Des Weiteren kam diese Form des *ebpC* Gens bereits bei dem *E. faecalis* Isolat D32 aus Schwein in Dänemark 2001 vor (Zischka *et al.*, 2012). Zusätzlich wurde es ebenfalls bei dem probiotisch genutzten Stamm *E. faecalis* Symbioflor-1 der Firma Symbiopharm (Herborn) genomisch nachgewiesen (NCBI nucleotide sequence data: HF558530, Fritzenwanker *et al.*, 2012).

Für die Insertion von IS1062 in *ebpR* gibt es bisher lediglich eine wissenschaftliche Erwähnung und diese befindet sich ebenfalls in dem oben erwähnten probiotischen Stamm *E. faecalis* Symbioflor-1. Dieser Stamm ist im Medikament Symbioflor-1 enthalten und wird in Tropfenform verabreicht, um sich im Darm der Patienten zu etablieren. Diesem speziellen, seit mehr als 20 Jahren genutzten *E. faecalis* Stamm werden positive Eigenschaften bei Problemen wie wiederkehrende Entzündungen der Nasennebenhöhlen, der Bronchien und der Rachenmandeln, Störungen der

Magen-Darmfunktion sowie dem „Training des Immunsystems“ zugesprochen (Gebrauchsinformationen Symbioflor-1, Symbiopharm, Herborn). Eine pathogene Wirkung ist bei dem Stamm hingegen verloren gegangen. Dies wird begründet in der Tatsache, dass mittels PCR der Verlust von Genen für Virulenzfaktoren wie zum Beispiel Gelatinase, Enterococcal surface protein (ESP), Cytolysin und Hyaluronidase nachgewiesen wurde (Franz *et al.*, 2011). Der Stamm Symbioflor-1 besitzt jedoch andere sonst als virulent eingestufte Gene (z.B. Aggregationssubstanzen, Kollagenbindende Proteine), jedoch werden diesen positive, probiotische Attribute zugesprochen. Diese sind insbesondere Konkurrenzvorteile gegenüber anderen MO bei der Darmbesiedlung. Bis 2011 sind weltweit keine Probleme mit Infektionen durch diesen Stamm berichtet worden, was seine apathogenen Eigenschaften anzeigt (Franz *et al.*, 2011).

Für klinische Isolate gibt es daher auch keine in der Datenbank hinterlegten Sequenzen von Genen, die auf den Stamm *E. faecalis* Symbioflor-1 hindeuten. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen jedoch einen Zusammenhang des probiotisch genutzten Stamms und dem klinischen Isolat *E. faecalis* 1.10 vermuten. Es könnte sich aufgrund der charakteristischen *ebp*-Locus Sequenzen um den Symbioflor-1 Stamm handeln oder aber einen anderen Stamm, welcher über HGT bestimmte Gene des Symbioflor-1 Stamms aufgenommen hat. Der Gastrointestinaltrakt stellt einen „Hot Spot“ für den Austausch von Genen innerhalb einer Spezies bzw. verschiedener MO dar (Franz *et al.*, 2011), was diese Vermutung unterstützt.

Um die Herkunft und die Identität des Isolats 1.10 bestimmen zu können, wäre es interessant zu wissen, ob der Patientin, bei der das Isolat 1.10 isoliert wurde, der probiotische Keim aus therapeutischen Zwecken verabreicht wurde. Ein Transfer aus der Darmflora in den vaginalen Bereich der Patientin könnte dann nicht ausgeschlossen werden. Durch eine Überprüfung und einen Abgleich von Isolat 1.10 und dem *E. faecalis* Stamm Symbioflor-1 mittels Pulsfeldgelelektrophorese könnte eine mögliche Antwort auf den Ursprung des Isolats gegeben werden. Es könnte sich somit bei dem klinischen Isolat um einen durch HGT entstandenen Stamm handeln, der durch Aufnahme neuer Virulenzfaktoren, wie dem *bee*-Locus, seine probiotische, positive Funktion verloren haben könnte. In umgekehrter Weise könnten auch Gene des Symbioflor-1 Stamms auf andere *E. faecalis* Stämme des Darms übertragen

worden sein. Dies würde den entsprechenden Keim weniger virulent machen, da die durch Insertionen von IS-Elementen inaktivierte Homologe des *ebp*-Locus keine Funktionalität haben. Ob sich dieser, eher als Selektionsnachteil einzustufende Effekt jedoch evolutionär durchsetzen würde, ist anzuzweifeln.

Für den komplett sequenzierten *E. faecalis* Symbioflor-1 Stamm sind insgesamt zwölf Insertionen des IS1062 Elements beschrieben (Fritzenwanker *et al.*, 2012), wobei die genauen Angaben zu den Insertionsstellen und gegebenenfalls resultierenden Geninaktivierungen nicht vorliegen. Neben diesen ist lediglich eine zusätzliche bekannte Plasmidsequenz für *E. faecalis* mit dem Insertionselement IS1062 in der NCBI Datenbank hinterlegt. Dabei handelt es sich um das Plasmid pPD1 (Hirt *et al.*, 1996), in welchem das Insertionselement in Verbindung mit dem *sep1* (surface exclusion protein) Gen lokalisiert vorliegt. Eine Transposition nach Aufnahme des Plasmids innerhalb des Isolats 1.10 wäre eine weitere Erklärung, wie die Inaktivierung des *ebpR* Gens stattgefunden haben könnte.

Eine zusätzliche Möglichkeit der Aufnahme des IS1062 Elements stellt der Plasmidtransfer zwischen *E. faecalis* mit der nah verwandten Spezies *E. faecium* dar. Für *E. faecium* sind noch weitere Plasmide wie das DO Plasmid 3 bekannt, die das IS1062 Element tragen (Qin *et al.*, 2012).

Da das IS1062 Element auch in das *perA* Gen inseriert ist, gelten dieselben Erklärungen und Überlegungen wie oben beschrieben. Ein genetischer Datenbankabgleich der *perA* Sequenz von Isolat 1.10 mit *E. faecalis* Symbioflor-1 hat gezeigt, dass es sich um unterschiedliche Sequenzen/Versionen des Gens handelt. Dies bedeutet, dass das klinische Isolat zumindest an dieser Stelle einen genetischen Unterschied auf chromosomaler Ebene zu dem probiotischen Stamm aufweist. Zusätzlich unterscheiden sie sich durch das Fehlen der *bee*-locus Gene bei *E. faecalis* Symbioflor-1. Die Überprüfung auf das Vorhandensein weiterer Virulenzfaktorengene inklusive etwaiger Sequenzierungen, würde einen tieferen Einblick über einen möglichen Ursprung von Isolat 1.10 aus dem *E. faecalis* Symbioflor-1 Stamm erlauben.

5.4 Die zwei Pili von *E. faecalis*

Die Ergebnisse der Sequenzierungen und das damit verbundene Aufdecken der IS-Elemente zeigten, dass der Ebp-Pilus in Isolat 1.10 nicht gebildet werden kann. Diese These wird zusätzlich durch die Ergebnisse der RT-PCR gestützt (Abb. 33). Da die mRNA der Gene *ebpR* und *ebpC* nicht nachgewiesen werden konnten, folgt daraus, dass die entsprechenden Proteine ebenfalls nicht vorliegen.

Dass der Pilus nicht mehr gebildet wird, liegt hauptsächlich am defekten *ebpC* Gen, da es für das Hauptschaftprotein EbpC des Pilus codiert (Nallapareddy *et al.*, 2006). Da dieses aufgrund des IS-Elements nicht korrekt gebildet wird, kann die Pilus spezifische SrtC den Zusammenbau des Pilus nicht vollziehen. Der Sortase fehlt das Rückgrat zur Assemblierung der weiteren Untereinheiten über Transpeptidierung. Über die Funktionalität der SrtC kann keine Aussage getroffen werden. Das um circa 200 bp verlängerte Gen wurde laut NCBI-Datenbankanalyse in dieser Form bereits für ein *E. faecalis* Isolat 7L76 (GenBank: FP929058.1) und den probiotischen Stamm *E. faecalis* Symbioflor-1 (GenBank: HF558530.1) dokumentiert. Aus den dazugehörigen wissenschaftlichen Arbeiten gehen keine Erkenntnisse über eine etwaige eingeschränkte Funktion hervor.

Aufgrund des EbpC-Defekts kommt die Mutation des Regulatorgens *ebpR* nicht mehr zum Tragen. Ein intakter Regulator beeinflusst die Transkription der *ebp*-Locus Gene positiv (Bourgogne *et al.*, 2007). Das bedeutet, dass unter bestimmten Umwelt- und/oder Nährstoffeinflüssen vermehrt Ebp-Pili gebildet werden. Ist dieses regulatorische Gen, wie in diesem Fall, inaktiviert, kommt es nur noch zu der konstitutiven Transkription über die Promotoren des *ebp*-Locus (Bourgogne *et al.*, 2007). Da das Gen des Hauptschaftproteins EbpC bei Isolat 1.10 aber zusätzlich durch Insertion defekt ist, würde auch ein intakter Regulator keine erhöhte Pilusbildung bewirken. Der *ebp*-Locus bei Isolat 1.10 ist somit in zweierlei Hinsicht inaktiviert worden. Würde die Mutation im Gen *ebpR* fehlen, wäre trotzdem kein korrekter Zusammenbau des Pilus aufgrund des Defekts im *ebpC* Gen möglich. Im umgekehrten Fall wäre eine einzelne Mutation im *ebpR* Gen ebenso schädlich, da die Transkriptionsrate der Pilus codierenden Gene *ebpABC* um ein Vielfaches heruntergesetzt würde und somit eine effektive bzw. erhöhte Pilussynthese verhindert würde (Maddox *et al.*, 2012). Die Transkription des Sortasegens scheint aber in beiden Fällen nicht beeinträchtigt zu werden, da sie unter einem eigenen

Promotor steht und unabhängig vom Regulator *ebpR* transkribiert wird. Dies hat auch Bourgne *et al.* (2007) als vorläufige, nicht gezeigte Ergebnisse erwähnt.

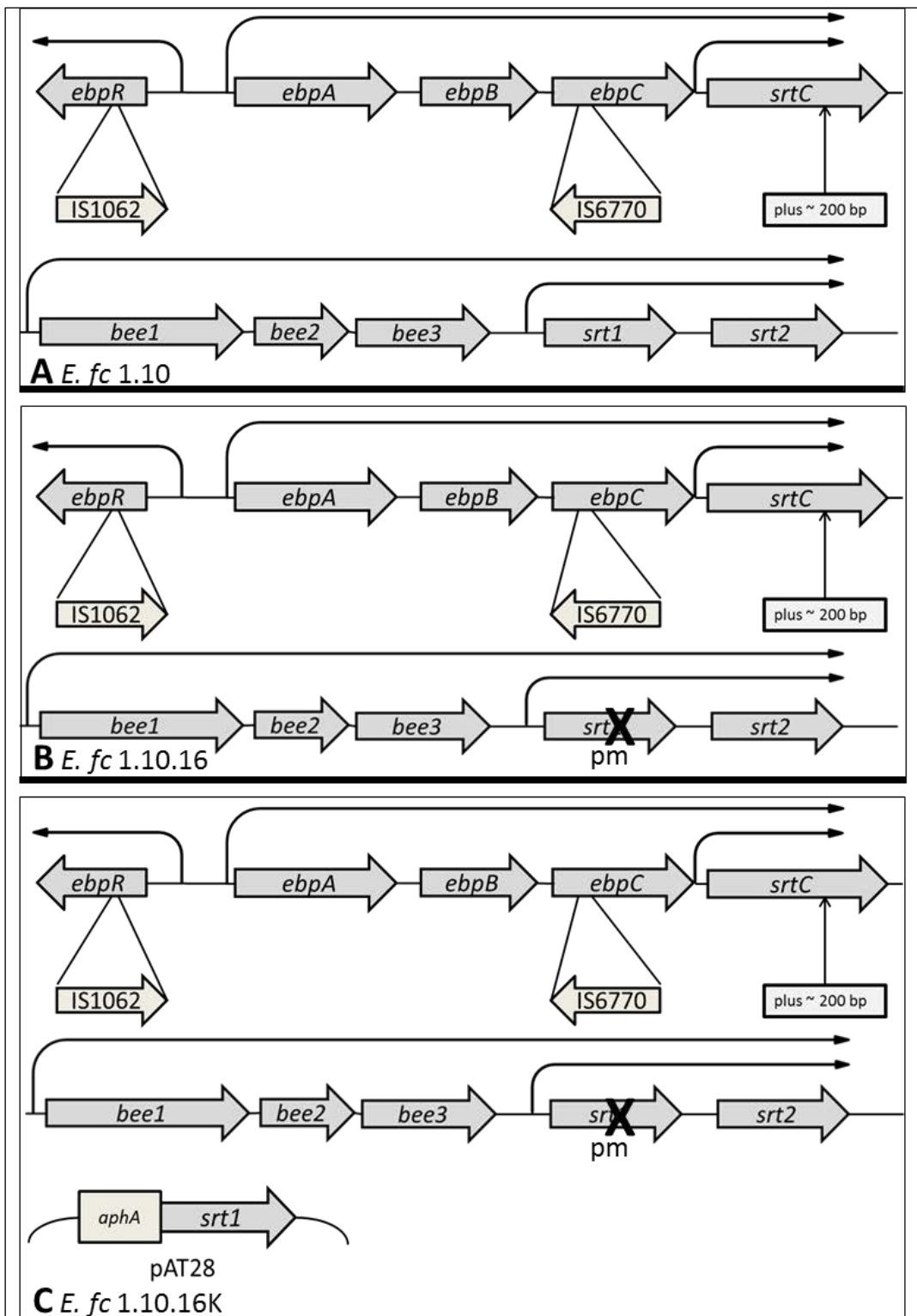


Abb. 37 Genetischer Pilus-Hintergrund bei *E. faecalis* 1.10, 1.10.16 & 1.10.16K. Zu sehen sind der durch IS-Elemente inaktivierte chromosomale *ebp*-Locus sowie der Plasmid kodierte *bee*-Locus **A**. Dieser ist bei der Mutante 1.10.16 **B** zusätzlich durch eine Punktmutation (pm) inaktiviert. Dieser Defekt wurde durch Komplementation mit dem wt *srt1* Gen **C** in 1.10.16K kompensiert (pAT28 Shuttlevektor).

Die Tatsache, dass das Isolat 1.10 trotz des defekten Ebp-Pilus einen sehr starken Biofilmbildung bilden kann (Kap. 4.3.1), ist durch das Vorhandensein des *bee*-locus als zweiten bzw. alternativen Pilus-Locus begründet. Der Ersatz des defekten durch einen intakten Pilus verleiht dem Isolat weiterhin gute Anheftungseigenschaften sowie eine Stärkung des Biofilms durch Zell-Zellkontakte. Für die Mutante *E. faecalis* 1.10.16 konnte gezeigt werden (Abb. 37), dass zwei defekte Pili zu einer deutlichen Schwächung der Biofilmbildung führten. Der Ebp-Pilus wurde aufgrund der Insertionen nicht gebildet, während der Bee-Pilus in einer defekten Form auftrat. Das Fehlen der Untereinheit Bee2 bedingte eine deutliche Schwächung der Biofilmbildung im Biofilmassay im Vergleich zu Isolat *E. faecalis* 1.10 (Kap. 4.3.1). Die REM Aufnahmen zeigten eine nahezu strukturlose Zelloberfläche der Mutante *E. faecalis* 1.10.16 (Kap. 4.3.4). Daraus lässt sich auf die Bedeutung von mindestens einem intakten Pilus für die primäre Anheftung der Zellen an Oberflächen mit nachfolgender Biofilmbildung schließen. Genauso ist aber zu erkennen, dass auch das komplette Fehlen der Pili nicht zu einem vollständigen Verlust der Biofilmbildung führt (Kap. 4.3.1). Dies zeigt, dass die Biofilmbildung ein multifaktorieller Prozess ist (Tab. 3).

Inwieweit ein Vorhandensein zweier intakter Pili einen Vorteil darstellt bzw. zu einer stärkeren Biofilmbildungsfähigkeit befähigt, könnte durch Komplementation aller defekten Pilus Gene von Isolat *E. faecalis* 1.10 gezeigt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre der Transfer des *bee*-locus tragenden pBEE99 Plasmids auf einen *E. faecalis* Stamm, dessen *ebp*-Locus intakt ist. Einen solchen genetischen Hintergrund könnten zum Beispiel die Typstämme *E. faecalis* OG1RF und V583 liefern. In einem ersten Versuch, das Plasmid von Isolat *E. faecalis* 1.10 auf *E. faecalis* V583 per Konjugation zu transferieren (Filter mating assay), konnten keine Transkonjuganten erzielt werden. Dies könnte unter anderem an der Wahl des Rezipientenstamms gelegen haben. Der Stamm *E. faecalis* V583 ist ein klinisches Isolat, welches verschiedene Plasmide trägt (Paulsen *et al.*, 2003). Dies führt eventuell zu einer Inkompatibilität oder auch Entry Exclusion und verhindert so die Plasmidaufnahme (Thomas & Smith, 1987, Palmer *et al.*, 2010, Colmar & Horaud, 1987).

Tendolkar *et al.* (2006) haben deshalb *E. faecalis* OG1RF als Empfängerstamm gewählt und zeigen können, dass die Biofilmbildungsstärke nach Aufnahme des *bee*-

locus tragenden Plasmids pBEE99 deutlich erhöht war. Die Untersuchungen enthielten jedoch keine Experimente zum Nachweis des zweiten für Enterokokken typischen Pilus, Ebp. Laut Datenbank verfügt der Stamm *E. faecalis* OG1RF jedoch über alle Gene des *ebp*-Locus, was auch durch eigene Untersuchungen bestätigt wurde. Daher sollte dieser den Ebp-Pilus auch bilden. Die von Tendolkar *et al.* (2006) gewählten Bedingungen zur Bildung der Pili waren identisch (TSB + >0,5 % Glukose), sodass beide Pili zeitgleich auf der Zelloberfläche in deren Experimenten hätten nachweisbar sein müssen. Auch aktuelle Studien und Untersuchungen von Nallapareddy *et al.* (2011) legten ihren Fokus gezielt auf den Ebp-Pilus. Experimente, die das zeitgleiche Auftreten beider Pili-Spezies untersuchten, liegen bislang nicht vor. Lediglich für die nah verwandte Spezies *E. faecium* liegen wurde gezeigt, wie sich zwei Pili auf die Biofilmbildung auswirken. Es konnten verschiedene Parameter festgestellt werden, die die Bildung der Pili beeinflussen. Diese war z.B. Temperatur- und Nährmedienbedingt (Hendrickx *et al.*, 2008). Dass der *ebp*-Locus tragende Stamm *E. faecalis* OG1RF jedoch vor Aufnahme des *bee*-Locus kodierenden Plasmids eine deutlich geringere Biofilmbildung zeigte, deutet auf die enorme Bedeutung und den starken Einfluss des *bee*-Locus beim Prozess der Biofilmbildung hin (Tendolkar *et al.*, 2006).

5.5 Inaktivierung der *bee*-Locus Gene

Der Knockout der einzelnen Gene des *bee*-Locus konnte nicht abschließend vollzogen werden. Lediglich die Aufnahme des KO-Plasmids s2-*tetM*-pAT28 konnte via PCR zwar bestätigt werden, jedoch kam es nicht wie gewünscht zum Austausch mit dem *srt2* wt-Allel und einer daraus resultierenden Knockout-Mutation. Das Prinzip der doppelten homologen Rekombination mit Integration des gesamten Plasmids im ersten und nachfolgender Exzision des Plasmidrückgrats im zweiten Schritt konnte nicht vollzogen werden. Das Plasmid-kodierte wt-Allel (pBEE99) von Isolat 1.10 und das Plasmid-basierte KO-Konstrukt waren in allen Transformanten parallel per PCR nachweisbar. Warum es zu keinem Rekombinationsereignis kam, kann nicht abschließend geklärt werden. Eine mögliche Rolle könnte die Tatsache spielen, dass das Zielgen Plasmid-kodiert (Coburn *et al.*, 2010) und nicht chromosomal vorliegt. Unter Umständen spielt die durch Überspiralisierung des Plasmids pBEE99 nicht gegebene Zugänglichkeit des wt-Gens und somit verhinderte Anlagerung der homologen Bereiche einen entscheidenden Faktor.

Problematisch könnte zusätzlich die Wahl des Shuttlevektors und die Zugänglichkeit bzw. Verfügbarkeit des zu rekombinierenden Bereichs selbst sein. Da das Plasmid pAT28 nicht über den Replikationsmechanismus des „rolling circles“ verfügt (Abb. 15), liegt es zu keinem Zeitpunkt in linearer, frei zugänglicher Form in der Zelle vor, sondern stets zirkulär. Eine vergleichbare Knockout-Studie bei *E. faecalis* wurde laut Literatur (Biswas *et al.*, 1993) mit eben solchen Plasmiden durchgeführt. Der „rolling circle“-Mechanismus ist hierbei ein thermosensitiver Prozess, der durch Kultivierung der Zellen bei 28°C eingeleitet wird. Nach erfolgter Integration des gesamten Plasmids wird unter normalen Wachstumstemperaturen von 37°C der zweite Rekombinationsschritt eingeleitet. Durch Anhang zweier unterschiedlicher Marker kann so auf die Exzision des Plasmidrückgrats selektiert werden.

Der Versuch, die KO-Konstrukte aus pAT28 in den „rolling circle“ Vektor pG+host5 von Biswas *et al.* (1993) zu klonieren, schlug in mehreren Ansätzen fehl. Es konnten keine stabilen Konstrukte erzielt werden. Nach Anzucht in entsprechenden Selektivmedien und DNA-Präparationen wurden keine Plasmidkonstrukte isoliert, die den erwarteten Größen entsprachen. Auch ein Nachweis der Insertion per PCR verlief negativ. Variationen der Klonierungs-/Restriktionsstellen brachten hierbei keinerlei Verbesserungen. Es müsste daher eine neue Klonierungsstrategie für zukünftige

Experimente entwickelt werden um die aufgetretenen Fehler des homologen Rekombinationsvorgangs zu eliminieren.

Ein weiterer Faktor für den missglückten Knockout könnte das Fehlen eines intakten RecA Systems sein. Dieses in allen bislang untersuchten Bakterien vorkommende „Housekeeping“ Gen (Rocha *et al.*, 2005) wurde ursprünglich im Zusammenhang mit genetischer Variabilität bzw. Genaustausch beschrieben. Generell ist in der Literatur das Prinzip der Homologen Rekombination zur Gen-Inaktivierung mittels Knock-out bei *E. faecalis* beschrieben und genutzt worden (Hechard *et al.*, 2001), sodass ein prinzipieller Fehler dieser Art ausgeschlossen werden kann.

Weaver & Reddy (2006) haben in ihren Versuchen gezeigt, dass die Mutante *E. faecalis* UV202 aufgrund einer einzelnen Punktmutation innerhalb des *recA* Gens nicht mehr zur homologen Rekombination befähigt war. Dies könnte auch bei Isolat *E. faecalis* 1.10 der Fall sein, sodass der gewählte Versuchsansatz zur KO-Generierung zum Scheitern verurteilt ist. Einen Defekt im RecA System müsste durch Amplifikation und Sequenzierung der beteiligten Gene überprüft werden.

5.6 Transfer des *bee*-Locus

Ein weiterer Versuch die Eigenschaften des *bee*-Locus bzw. dessen einzelner Gene zu charakterisieren, sollte mit den Transferexperimenten unternommen werden. Hierzu wurden einzelne Gene bzw. Genkombinationen des *bee*-Locus unter dem konstitutiven Promotor *aphA3* über den Shuttlevektor pAT28 (Tab. 13) in den Stamm *E. faecalis* V583 gebracht, um so Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen beim Zusammenbau der Bee-Pili ziehen zu können.

Der Transfer einzelner Genkomponenten des *bee*-Locus auf den gewählten Stamm *E. faecalis* V583 konnte in insgesamt vier Fällen erfolgreich durchgeführt werden. Da es sich dabei allerdings um einzelne Gene *bee1*, *srt1* oder *srt2* bzw. die Genpaarung *bee2* und *bee3* handelte, war weder eine phänotypische Beeinflussung in der Biofilmbildungsstärke noch in der Oberflächenbeschaffenheit der Zellen (REM) zu erkennen (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies ist nicht weiter verwunderlich, da die einzelnen Gene nicht funktional sein können. Die Pilus bildenden Strukturproteine Bee1, Bee2 und Bee3 können nur in Zusammenhang mit ihren spezifischen Sortasen einen Pilus bilden, was neben den Arbeiten von Tendolkar *et al.*, (2006) und Schlüter *et al.*, 2009 auch in dieser Studie gezeigt wurde. Eine mögliche Beteiligung der Housekeeping Sortase A (Mandlik *et al.*, 2008) bei der Verknüpfung

der Pili bzw. der Untereinheiten wie zum Beispiel Bee1 an die Zellwand könnte im generierten Stamm *E. faecalis* V583 + *aphA-bee1*-pAT28 untersucht werden. Für die Verknüpfung der Bee1 Untereinheiten miteinander und daraus sich ergebender Elongation des Pilusschafts sollte eine der beiden Pilus spezifischen Sortasen (Srt1 oder Srt2) verantwortlich sein. Da diese fehlen ist lediglich der Einbau einer einzelnen Untereinheit an die Zellwand möglich. Ein Nachweis von Bee1 in diesem Stamm könnte jedoch aufgrund der Detektionsgrenze des Massenspektrometers erschwert sein. Es könnte daher sein, dass das Signal von anderen Proteinen, die häufiger vorkommen und dasselbe Molekulargewicht von 118 kDa haben, überlagert wird. Bis heute wurden keine Analysen in dieser Hinsicht durchgeführt, sodass keine Informationen bezüglich des Vorhandenseins des Bee1 Proteins in *E. faecalis* V583 vorliegen. Läge eine SrtA Beteiligung vor, müsste Bee1 detektierbar sein, falls nicht, würde das gebildete Protein Bee1 lediglich aus der Zelle sekretiert werden. Im Zusammenhang mit den massenspektrometrischen Ergebnissen der Mutante *E. faecalis* 1.10.16, in der lediglich ein Defekt der Sortase Srt1 vorliegt, jedoch die Untereinheiten Bee1 und Bee3 im Gesamtproteinextrakt nachweisbar sind, ergäbe sich dann folgendes Bild: Kann eine Beteiligung der Housekeeping SrtA über Auswertung der beschriebenen Experimente ausgeschlossen werden, müsste die intakte Srt2 des *bee*-Locus den kovalenten Einbau des Pilus an die Zellwand vermitteln. Die einzige andere Erklärung, die noch bliebe, wäre eine weitere noch nicht beschriebene chromosomal kodierte Sortase, die an der Pilussynthese beteiligt ist.

5.7 Biofilmbildung- und Virulenzfaktoren

Per diagnostischer PCRs konnte eine Vielzahl der in Tab. 3 aufgelisteten Biofilm- bzw. Virulenzfaktoren bei Isolat 1.10 nachgewiesen werden. Bis auf einige wenige Loci waren alle geprüften Gene bei Isolat *E. faecalis* 1.10 vorhanden. Für die zwei beschriebenen Faktoren EF0676 und EF983 konnte auch mit den Positivkontrollen kein Amplifikat erzielt werden, sodass keine eindeutige Aussage über das Vorhandensein in Isolat 1.10 getätigt werden kann.

Bei den übrigen nicht vorhandenen Genen handelte es sich zum Teil um Plasmid-kodierte Faktoren, so zum Beispiel um die Gene *pgrB* und *asa373*. Diese für Aggregationssubstanzen kodierenden Gene wurden von Chuang-Smith *et al.* (2010) und Clewell *et al.* (1985) beschrieben und liegen in den Stämmen *E. faecalis*

OG1SSP bzw. *E. faecalis* OG1X:pAM373 vor. Im Gegensatz zum chromosomal-kodierten *asa1* Gen handelt es hierbei also um zusätzliche Loci, die keine essentielle Rolle spielen und alternative Gene bzw. additive Biofilmfaktoren darstellen. Diese ermöglichen der Zelle eventuell auf verschiedene Bedingungen reagieren zu können und jeweils nur den benötigten Faktor zu bilden. Dies stellt somit einen Selektionsvorteil gegenüber anderen, konkurrierenden Organismen dar.

Einen wichtigen, bei Isolat *E. faecalis* 1.10 durch die Insertion eines IS1062 Elements inaktivierten, Faktor stellt das Genprodukt von *perA* dar. Dieses von Coburn *et al.* (2008) beschriebene regulatorische Gen kodiert für einen Transkriptionsregulator einer Pathogenitätsinsel (PAI). Maddox *et al.* (2012) haben die Bedeutung und den großen Einfluss dieses Gens auf die Pathogenität und Biofilmbildung bei *Enterococcus faecalis* aufgedeckt. Sie zeigten mit ihren Versuchen die PerA bedingte Regulation von 151 Genen, die dem Metabolismus, der Aminosäuredegradation und der Pathogenität zugeordnet werden konnten. Wichtige für die Biofilmbildung verantwortliche Gene dieser PAI sind zum Beispiel *esp*, das *cyl*-operon oder Gene für Aggregationssubstanzen. Das enterococcal surface protein (*esp*) ist in der Literatur häufig als einer der entscheidenden Faktoren der Biofilmbildung genannt (Tendolkar *et al.*, 2004; Toledo-Arana *et al.*, 2001; Shankar *et al.*, 2001). Es gibt aber auch gegenläufige Meinungen und Artikel, die einen *esp*-unabhängigen Mechanismus der Biofilmbildung unterstützen (Di Rosa *et al.*, 2006; Kristich *et al.*, 2004). Das durch die *cyl* Gene kodierte Cytolysin und die Gene für Aggregationssubstanzen sind weitere Virulenzfaktoren, die zur Pathogenität bzw. der Biofilmbildung beitragen (siehe auch die entsprechenden Kapitel der Einleitung).

Das *perA* Gen liegt in klinischen Isolaten von *E. faecalis* gehäuft vor (Maddox *et al.*, 2012) und ist stets angrenzend zur PAI lokalisiert, was einen *perA* regulierten Mechanismus dieser Gene vermuten lässt. Maddox *et al.* (2012) haben in ihren Analysen *wt* und *perA* KO-Mutanten miteinander verglichen und gezeigt, dass 98 Gene PerA abhängig hoch- und 53 herunterreguliert wurden. Den größten Einfluss nimmt der Transkriptionsregulator hierbei in der stationären Phase des Wachstums ein, aber auch in der exponentiellen Phase sind Gene durch ihn reguliert. In den durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass PerA einen reprimierenden Effekt auf die Gene des *ebp*-Locus ausübt, jedoch keinen Einfluss auf die Expression des *bee*-Locus besitzt (Maddox *et al.*, 2012). Der reprimierende Effekt auf die *ebp*

Gene sollte also bei Isolat *E. faecalis* 1.10 durch die Insertion und somit Inaktivierung des *perA* Gens nicht mehr auftreten. Da der *ebp*-Locus aber aufgrund der eigenen beiden Insertionen von IS1062 und IS6770 inaktiviert vorliegt, kommt dem PerA Effekt keine weitere Bedeutung in diesem Zusammenhang zu. Da der *bee*-Locus generell keiner Regulation von PerA unterliegt, sind keine Auswirkungen auf die Pilibildung bei Isolat 1.10 zu beobachten, wie die Experimente zum Nachweis des Bee-Pilus zeigen (Abb. 26 & 28).

Die Ergebnisse der Westernblot Analysen, der Massenspektrometrie und erste RT-PCRs zeigen, dass der Ebp-Pilus bei Isolat 1.10 nicht gebildet wird, der Bee-Pilus hingegen schon. Über qPCRs könnten detailliertere Ergebnisse über die Menge der gebildeten mRNA diesbezüglich erzielt werden. Inwieweit weitere Gene bei Isolat 1.10 hoch- bzw. herunterreguliert werden, kann nicht gesagt werden. Lediglich für die Gene der beiden Pili wurden mRNA-Untersuchungen durchgeführt.

Maddox *et al.* (2012) haben neben der Regulation von Biofilm-/Pathogenitätsgenen gezeigt, dass auch eine Reihe an Housekeeping Genen unter dem Einfluss des Transkriptionsregulators liegen. Da die Zellen des Isolats 1.10 im Wachstumsversuch aber normales Wachstum unter den gewählten Bedingungen gezeigt haben, ist von keinem negativen Effekt auf diese Gene auszugehen (Abb. 22). Die erzielten Generationszeiten sind im Verhältnis zu anderen Studien mit verschiedenen *E. faecalis* Stämmen und Isolaten mit ca. 30 min sogar deutlich schneller (Schlüter, 2008; Vebo *et al.*, 2010), was unter Umständen an der fehlenden Kontrolle des PerA Transkriptionsregulators liegt. Weiterhin könnte dieses schnelle Wachstum jedoch auch in den optimierten Bedingungen bestehend aus Vollmedium und Kultivierung bei 37°C unter Schütteln (Sauerstoffzufuhr) begründet sein. Ebenso spielt hier sicher die Inokulierung der Kultur mit einer Vorkultur des selben Mediums eine Rolle.

Um abschließend zeigen zu können, inwieweit sich die Inaktivierung von PerA auf das Wachstum, die Biofilmbildung und die Pathogenität auswirkt, müsste eine Komplementation mit dem wt-Allel des *perA* Gens unter einem nativen Promotor vorgenommen werden. Hierfür wäre der schon während dieser Arbeit zur Komplementation des defekten *srt1* Gens genutzte Shuttlevektor pAT28 nutzbar. Als Promotor wäre der eigene oder ein induzierbarer geeignet. Letzterer würde ein kontrolliertes An- und Abschalten des Gens ermöglichen und so den direkten

Vergleich des PerA-Einflusses beurteilen lassen. Durch RT- und qPCRs könnte dann gezielt eine Analyse ausgewählter Gene stattfinden, die der Regulation durch PerA unterliegen.

6. Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten auf die hohe Bedeutung von Pili bei der Biofilmbildung hin. Daher wäre es im nächsten Schritt interessant zu sehen, wie sich die biofilmbildungsstärke bei zwei intakten Pili ändert bzw. verhält. Hierfür müssten die durch die IS-Elemente inaktiven Gene *ebpC* und *ebpR* mit den entsprechenden wt-Genen komplementiert werden. Mithilfe phänotypischer Experimente wie dem Biofilmassay oder REM könnten so direkt die Einflüsse der Pili analysiert werden. Zusätzlich wäre erstmals eine Aussage des Einfluss zweier intakter Pili auf die Biofilmbildung bei *E. faecalis* möglich. In den bisherigen Arbeiten wurde stets nur das Augenmerk auf einen der beiden Pili gelegt. Lediglich in den Arbeiten von Hendrickx *et al.* (2008) wurde das Vorhandensein zweier Pili bei der nah verwandten Spezies *E. faecium* analysiert. Hier konnten unter anderem Kultivierungsunterschiede festgestellt werden, die von der Art des Mediums und der Temperatur abhängig waren.

Die mittels Oberflächenbiotinylierung erzeugten Bandenmuster in der SDS-PAGE müssen massenspektrometrisch analysiert werden, wodurch eine Identifikation der Oberflächen exponierten Proteinstrukturen von Isolat *E. faecalis* 1.10 möglich wird. Die in dieser Arbeit erzielten vorläufigen Ergebnisse lassen aber auf das Vorhandensein weiterer Oberflächenexponierte Proteine schließen.

Weiterführende Experimente zur Identifikation des Isolats *E. faecalis* 1.10 und ein Vergleich mit dem probiotischen Stamm *E. faecalis* Symbioflor-1 könnte einen möglichen gemeinsamen Ursprung aufdecken. Die bisher durch Sequenzierung erzielten Ergebnisse lassen eine Verwandtschaft hierbei vermuten. Mittels PFGE oder über die Methode des Multilocus Sequence Typing (MLST), bei der mehrere Housekeeping Gene sequenziert werden, könnten so Verwandtschaftsverhältnisse aufgedeckt werden (Maiden, 2006).

Zur Identifikation und Charakterisierung des *bee*-Locus muss eine alternative Strategie ermittelt bzw. die hier genutzte Methode des Knockouts über homologe Rekombination optimiert werden. In diesem Zusammenhang wären die Ergebnisse zum Transfer der *bee*-locus Gene auf einen anderen, Biofilmschwachen *E. faecalis* Stamm und deren Einfluss auf die Biofilmbildung bzw. die Pilusbildung von großem Interesse. Zusätzlich würde der Transfer des *bee*-locus tragenden Plasmid pBEE99 bzw. dessen Eliminierung aus Isolat *E. faecalis* 1.10 weitere nützliche Informationen zur pilusbedingten Biofilmbildung liefern.

7. Literatur

- Anderson, G. G., J. J. Palermo, J. D. Schilling, R. Roth, J. Heuser & S. J. Hultgren, (2003) Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301**: 105-107.
- Arthur, M., C. Molinas, F. Depardieu & P. Courvalin, (1993) Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of bacteriology* **175**: 117-127.
- Bagge, N., M. Hentzer, J. B. Andersen, O. Ciofu, M. Givskov & N. Hoiby, (2004) Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 1168-1174.
- Ballering, K. S., C. J. Kristich, S. M. Grindle, A. Oromendia, D. T. Beattie & G. M. Dunny, (2009) Functional genomics of *Enterococcus faecalis*: multiple novel genetic determinants for biofilm formation in the core genome. *Journal of bacteriology* **191**: 2806-2814.
- Becquet, P., (2003) EU assessment of enterococci as feed additives. *International journal of food microbiology* **88**: 247-254.
- Biswas, I., A. Gruss, S. D. Ehrlich & E. Maguin, (1993) High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology* **175**: 3628-3635.
- Bordi, C. & S. de Bentzmann, (2011) Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Annals of intensive care* **1**: 19.
- Bourgogne, A., K. V. Singh, K. A. Fox, K. J. Pflughoeft, B. E. Murray & D. A. Garsin, (2007) EbpR is important for biofilm formation by activating expression of the endocarditis and biofilm-associated pilus operon (ebpABC) of *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Journal of bacteriology* **189**: 6490-6493.
- Bourgogne, A., L. C. Thomson & B. E. Murray, (2010) Bicarbonate enhances expression of the endocarditis and biofilm associated pilus locus, ebpR-ebpABC, in *Enterococcus faecalis*. *BMC microbiology* **10**: 17.
- Buckling, A. & M. A. Brockhurst, (2008) Kin selection and the evolution of virulence. *Heredity* **100**: 484-488.
- Camargo, I. L., R. C. Zanella, M. C. Brandileone, A. C. Pignatari, G. H. Goldman, N. Woodford & A. L. Darini, (2005) Occurrence of insertion sequences within the genomes and Tn1546-like elements of glycopeptide-resistant enterococci isolated in Brazil, and identification of a novel element, ISEfa5. *International journal of medical microbiology : IJMM* **294**: 513-519.
- Cetinkaya, Y., P. Falk & C. G. Mayhall, (2000) Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical microbiology reviews* **13**: 686-707.
- Chow, J. W., (2000) Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **31**: 586-589.
- Christensen, G. D., W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton & E. H. Beachey, (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology* **22**: 996-1006.
- Chuang-Smith, O. N., C. L. Wells, M. J. Henry-Stanley & G. M. Dunny, (2010) Acceleration of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation

- substance expression in an ex vivo model of cardiac valve colonization. *PloS one* **5**: e15798.
- Clewell, D. B., (1981) Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiological reviews* **45**: 409-436.
- Clewell, D. B., F. Y. An, B. A. White & C. Gawron-Burke, (1985) *Streptococcus faecalis* sex pheromone (cAM373) also produced by *Staphylococcus aureus* and identification of a conjugative transposon (Tn918). *Journal of bacteriology* **162**: 1212-1220.
- Coburn, P. S., A. S. Baghdayan, N. Craig, A. Burroughs, P. Tendolkar, K. Miller, F. Z. Najjar, B. A. Roe & N. Shankar, (2010) A novel conjugative plasmid from *Enterococcus faecalis* E99 enhances resistance to ultraviolet radiation. *Plasmid* **64**: 18-25.
- Coburn, P. S., A. S. Baghdayan, G. T. Dolan & N. Shankar, (2008) An AraC-type transcriptional regulator encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island contributes to pathogenesis and intracellular macrophage survival. *Infection and immunity* **76**: 5668-5676.
- Cole, S. P., J. Harwood, R. Lee, R. She & D. G. Guiney, (2004) Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Journal of bacteriology* **186**: 3124-3132.
- Colmar, I. & T. Horaud, (1987) *Enterococcus faecalis* hemolysin-bacteriocin plasmids belong to the same incompatibility group. *Applied and environmental microbiology* **53**: 567-570.
- Courvalin, P., (2006) Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **42 Suppl 1**: S25-34.
- Creti, R., F. Fabretti, S. Koch, J. Huebner, D. A. Garsin, L. Baldassarri, L. Montanaro & C. R. Arciola, (2009) Surface protein EF3314 contributes to virulence properties of *Enterococcus faecalis*. *The International journal of artificial organs* **32**: 611-620.
- Creti, R., M. Imperi, L. Bertuccini, F. Fabretti, G. Orefici, R. Di Rosa & L. Baldassarri, (2004) Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of medical microbiology* **53**: 13-20.
- Creti, R., S. Koch, F. Fabretti, L. Baldassarri & J. Huebner, (2006) Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *BMC microbiology* **6**: 60.
- Dalton, T., S. E. Dowd, R. D. Wolcott, Y. Sun, C. Watters, J. A. Griswold & K. P. Rumbaugh, (2011) An in vivo polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. *PloS one* **6**: e27317.
- Deutsches Institut für Normung e.V., D.-. (2002-10) Medizinische Mikrobiologie Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika - Teil81: Mikrodilution; Spezielle Anforderungen an die Testung von nicht anspruchsvollen Bakterien.
- Donlan, R. M., (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**: 881-890.
- Donlan, R. M. & J. W. Costerton, (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews* **15**: 167-193.
- Dubern, J. F., E. L. Lagendijk, B. J. Lugtenberg & G. V. Bloemberg, (2005) The heat shock genes *dnaK*, *dnaJ*, and *grpE* are involved in regulation of putisolvin biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445. *Journal of bacteriology* **187**: 5967-5976.

- Dunne, W. M., Jr., (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews* **15**: 155-166.
- Dunny, G. M., B. L. Brown & D. B. Clewell, (1978) Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 3479-3483.
- Elias, S. & E. Banin, (2012) Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS microbiology reviews*.
- Fabretti, F., C. Theilacker, L. Baldassarri, Z. Kaczynski, A. Kropec, O. Holst & J. Huebner, (2006) Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity* **74**: 4164-4171.
- Flemming, H. C., T. R. Neu & D. J. Wozniak, (2007) The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *Journal of bacteriology* **189**: 7945-7947.
- Franz, C. M., M. Huch, H. Abriouel, W. Holzapfel & A. Galvez, (2011) Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International journal of food microbiology* **151**: 125-140.
- Frei, E., K. Hodgkiss-Harlow, P. J. Rossi, C. E. Edmiston, Jr. & D. F. Bandyk, (2011) Microbial pathogenesis of bacterial biofilms: a causative factor of vascular surgical site infection. *Vascular and endovascular surgery* **45**: 688-696.
- Garsin, D. A. & R. J. Willems, (2010) Insights into the biofilm lifestyle of enterococci. *Virulence* **1**: 219-221.
- Gilmore M. S., Clewell. D. B., Courvalin Patrice, Dunny Gary M., Murray Barbara E., Rice Louis B., (2002) *The Enterococci Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, p. 415. ASM Press.
- Gilmore, M. S., R. A. Segarra, M. C. Booth, C. P. Bogie, L. R. Hall & D. B. Clewell, (1994) Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *Journal of bacteriology* **176**: 7335-7344.
- Gross, R., B. Hauer, K. Otto & A. Schmid, (2007) Microbial biofilms: new catalysts for maximizing productivity of long-term biotransformations. *Biotechnology and bioengineering* **98**: 1123-1134.
- Guiton, P. S., C. S. Hung, K. A. Kline, R. Roth, A. L. Kau, E. Hayes, J. Heuser, K. W. Dodson, M. G. Caparon & S. J. Hultgren, (2009) Contribution of autolysin and Sortase a during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. *Infection and immunity* **77**: 3626-3638.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton & P. Stoodley, (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology* **2**: 95-108.
- Hall-Stoodley, L. & P. Stoodley, (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* **11**: 1034-1043.
- Haydon, D. J. & J. R. Guest, (1991) A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS microbiology letters* **63**: 291-295.
- Hechard, Y., C. Pelletier, Y. Cenatiempo & J. Frere, (2001) Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology* **147**: 1575-1580.
- Hendrickx, A. P., M. J. Bonten, M. van Luit-Asbroek, C. M. Schapendonk, A. H. Kragten & R. J. Willems, (2008) Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired *Enterococcus faecium* isolate. *Microbiology* **154**: 3212-3223.

- Hendrickx, A. P., R. J. Willems, M. J. Bonten & W. van Schaik, (2009) LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends in microbiology* **17**: 423-430.
- Hirt, H., R. Wirth & A. Muscholl, (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. *Molecular & general genetics : MGG* **252**: 640-647.
- Hoiby, N., T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin & O. Ciofu, (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents* **35**: 322-332.
- Hoiby, N., O. Ciofu, H. K. Johansen, Z. J. Song, C. Moser, P. O. Jensen, S. Molin, M. Givskov, T. Tolker-Nielsen & T. Bjarnsholt, (2011) The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* **3**: 55-65.
- Hufnagel, M., S. Koch, R. Creti, L. Baldassarri & J. Huebner, (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. *The Journal of infectious diseases* **189**: 420-430.
- Huycke, M. M., C. A. Spiegel & M. S. Gilmore, (1991) Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **35**: 1626-1634.
- Ike, Y. & D. B. Clewell, (1992) Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. *Journal of bacteriology* **174**: 8172-8177.
- Ingo, S., (2010) Nosokomiale Erkrankungen durch Enterokokken. *Arzneimitteltherapie* **28**: 334-342.
- Jefferson, K. K., (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS microbiology letters* **236**: 163-173.
- Justice, S. S., D. A. Hunstad, P. C. Seed & S. J. Hultgren, (2006) Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 19884-19889.
- Kristich, C. J., Y. H. Li, D. G. Cvitkovitch & G. M. Dunny, (2004) Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* **186**: 154-163.
- Kristich, C. J., V. T. Nguyen, T. Le, A. M. Barnes, S. Grindle & G. M. Dunny, (2008) Development and use of an efficient system for random mariner transposon mutagenesis to identify novel genetic determinants of biofilm formation in the core *Enterococcus faecalis* genome. *Applied and environmental microbiology* **74**: 3377-3386.
- Lam, J., R. Chan, K. Lam & J. W. Costerton, (1980) Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infection and immunity* **28**: 546-556.
- Leavis, H., J. Top, N. Shankar, K. Borgen, M. Bonten, J. van Embden & R. J. Willems, (2004) A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *Journal of bacteriology* **186**: 672-682.
- Maddox, S. M., P. S. Coburn, N. Shankar & T. Conway, (2012) Transcriptional regulator PerA influences biofilm-associated, platelet binding, and metabolic gene expression in *Enterococcus faecalis*. *PloS one* **7**: e34398.
- Maekawa, S., M. Yoshioka & Y. Kumamoto, (1992) Proposal of a new scheme for the serological typing of *Enterococcus faecalis* strains. *Microbiology and immunology* **36**: 671-681.

- Mahillon, J. & M. Chandler, (1998) Insertion sequences. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **62**: 725-774.
- Maiden, M. C., (2006) Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual review of microbiology* **60**: 561-588.
- Mandlik, A., A. Swierczynski, A. Das & H. Ton-That, (2008) Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends in microbiology* **16**: 33-40.
- Marraffini, L. A., A. C. Dedent & O. Schneewind, (2006) Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **70**: 192-221.
- Marraffini, L. A., H. Ton-That, Y. Zong, S. V. Narayana & O. Schneewind, (2004) Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. A conserved arginine residue is required for efficient catalysis of sortase A. *The Journal of biological chemistry* **279**: 37763-37770.
- Miller, M. B. & B. L. Bassler, (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology* **55**: 165-199.
- Mohamed, J. A. & D. B. Huang, (2007) Biofilm formation by enterococci. *Journal of medical microbiology* **56**: 1581-1588.
- Mohamed, J. A., W. Huang, S. R. Nallapareddy, F. Teng & B. E. Murray, (2004) Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and immunity* **72**: 3658-3663.
- Mohamed, J. A. & B. E. Murray, (2006) Influence of the *fsr* locus on biofilm formation by *Enterococcus faecalis* lacking *gelE*. *Journal of medical microbiology* **55**: 1747-1750.
- Mohamed, J. A., F. Teng, S. R. Nallapareddy & B. E. Murray, (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. *The Journal of infectious diseases* **193**: 231-240.
- Monds, R. D. & G. A. O'Toole, (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in microbiology* **17**: 73-87.
- Monroe, D., (2007) Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS biology* **5**: e307.
- Montanaro, L., A. Poggi, L. Visai, S. Ravaioli, D. Campoccia, P. Speziale & C. R. Arciola, (2011) Extracellular DNA in biofilms. *The International journal of artificial organs* **34**: 824-831.
- Moons, P., C. W. Michiels & A. Aertsen, (2009) Bacterial interactions in biofilms. *Crit Rev Microbiol* **35**: 157-168.
- Moons, P., R. Van Houdt, A. Aertsen, K. Vanoirbeek, Y. Engelborghs & C. W. Michiels, (2006) Role of quorum sensing and antimicrobial component production by *Serratia plymuthica* in formation of biofilms, including mixed biofilms with *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* **72**: 7294-7300.
- Munk, K., (2008) *Taschenbuch Biologie: Mikrobiologie*, p. 618. Thieme, Stuttgart.
- Murphy, T. F. & C. Kirkham, (2002) Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC microbiology* **2**: 7.
- Murray, B. E., (1990) The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical microbiology reviews* **3**: 46-65.

- Nakayama, J., S. Chen, N. Oyama, K. Nishiguchi, E. A. Azab, E. Tanaka, R. Kariyama & K. Sonomoto, (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. *Journal of bacteriology* **188**: 8321-8326.
- Nallapareddy, S. R., J. Sillanpaa, J. Mitchell, K. V. Singh, S. A. Chowdhury, G. M. Weinstock, P. M. Sullam & B. E. Murray, (2011) Conservation of Ebp-type pilus genes among Enterococci and demonstration of their role in adherence of *Enterococcus faecalis* to human platelets. *Infection and immunity* **79**: 2911-2920.
- Nallapareddy, S. R., K. V. Singh, R. W. Duh, G. M. Weinstock & B. E. Murray, (2000) 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. *Infection and immunity* **68**: 5210-5217.
- Nallapareddy, S. R., K. V. Singh, J. Sillanpaa, D. A. Garsin, M. Hook, S. L. Erlandsen & B. E. Murray, (2006) Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest* **116**: 2799-2807.
- Noguchi, N., H. Nakaminami, K. Nakase & M. Sasatsu, (2011) Characterization of enterococcus strains contained in probiotic products. *Biological & pharmaceutical bulletin* **34**: 1469-1473.
- Paganelli, F. L., R. J. Willems & H. L. Leavis, (2012) Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm? *Trends in microbiology* **20**: 40-49.
- Palmer, K. L., V. N. Kos & M. S. Gilmore, (2010) Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current opinion in microbiology* **13**: 632-639.
- Parsek, M. R. & P. K. Singh, (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual review of microbiology* **57**: 677-701.
- Paulsen, I. T., L. Banerjee, G. S. Myers, K. E. Nelson, R. Seshadri, T. D. Read, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, J. F. Heidelberg, H. Tettelin, R. J. Dodson, L. Umayam, L. Brinkac, M. Beanan, S. Daugherty, R. T. DeBoy, S. Durkin, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, J. Vamathevan, B. Tran, J. Upton, T. Hansen, J. Shetty, H. Khouri, T. Utterback, D. Radune, K. A. Ketchum, B. A. Dougherty & C. M. Fraser, (2003) Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **299**: 2071-2074.
- Pillai, S. K., G. Sakoulas, H. S. Gold, C. Wennersten, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr. & R. T. Inouye, (2002) Prevalence of the fsr locus in *Enterococcus faecalis* infections. *Journal of clinical microbiology* **40**: 2651-2652.
- Poyart, C. & P. Trieu-Cuot, (1997) A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to beta-galactosidase in gram-positive bacteria. *FEMS microbiology letters* **156**: 193-198.
- Qin, X., J. R. Galloway-Pena, J. Sillanpaa, J. H. Roh, S. R. Nallapareddy, S. Chowdhury, A. Bourgogne, T. Choudhury, D. M. Muzny, C. J. Buhay, Y. Ding, S. Dugan-Rocha, W. Liu, C. Kovar, E. Sodergren, S. Highlander, J. F. Petrosino, K. C. Worley, R. A. Gibbs, G. M. Weinstock & B. E. Murray, (2012) Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes. *BMC microbiology* **12**: 135.

- Qin, X., K. V. Singh, G. M. Weinstock & B. E. Murray, (2000) Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infection and immunity* **68**: 2579-2586.
- Rao, D., J. S. Webb & S. Kjelleberg, (2005) Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and environmental microbiology* **71**: 1729-1736.
- Rocha, E. P., E. Cornet & B. Michel, (2005) Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS genetics* **1**: e15.
- Rosenfeld, J., J. Capdevielle, J. C. Guillemot & P. Ferrara, (1992) In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* **203**: 173-179.
- Ruiz-Garbajosa, P., M. J. Bonten, D. A. Robinson, J. Top, S. R. Nallapareddy, C. Torres, T. M. Coque, R. Canton, F. Baquero, B. E. Murray, R. del Campo & R. J. Willems, (2006) Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *Journal of clinical microbiology* **44**: 2220-2228.
- Sabarth, N., S. Lamer, U. Zimny-Arndt, P. R. Jungblut, T. F. Meyer & D. Bumann, (2002) Identification of surface proteins of *Helicobacter pylori* by selective biotinylation, affinity purification, and two-dimensional gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry* **277**: 27896-27902.
- Sahm, D. F., J. Kissinger, M. S. Gilmore, P. R. Murray, R. Mulder, J. Solliday & B. Clarke, (1989) In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **33**: 1588-1591.
- Schlüter, S., (2008) Untersuchungen zum Vorkommen und molekularen Mechanismus der Biofilm-Bildung bei Enterokokken aus verschiedenen klinischen Bereichen. In: Abteilung Mikrobiologie. Kobra, Universität Kassel online Bibliothek: Universität Kassel.
- Schlüter, S., C. M. Franz, F. Gesellchen, O. Bertinetti, F. W. Herberg & F. R. Schmidt, (2009) The high biofilm-encoding *Bee* locus: a second pilus gene cluster in *Enterococcus faecalis*? *Current microbiology* **59**: 206-211.
- Scott, J. R. & T. C. Barnett, (2006) Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there. *Annual review of microbiology* **60**: 397-423.
- Scott, J. R. & D. Zahner, (2006) Pili with strong attachments: Gram-positive bacteria do it differently. *Molecular microbiology* **62**: 320-330.
- Shankar, J., R. G. Walker, D. Ward & M. J. Horsburgh, (2012) The *Enterococcus faecalis* exoproteome: identification and temporal regulation by *Fsr*. *PloS one* **7**: e33450.
- Shankar, N., A. S. Baghdayan & M. S. Gilmore, (2002) Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* **417**: 746-750.
- Shankar, N., P. Coburn, C. Pillar, W. Haas & M. Gilmore, (2004) Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *International journal of medical microbiology : IJMM* **293**: 609-618.
- Shankar, N., C. V. Lockatell, A. S. Baghdayan, C. Drachenberg, M. S. Gilmore & D. E. Johnson, (2001) Role of *Enterococcus faecalis* surface protein *Esp* in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infection and immunity* **69**: 4366-4372.

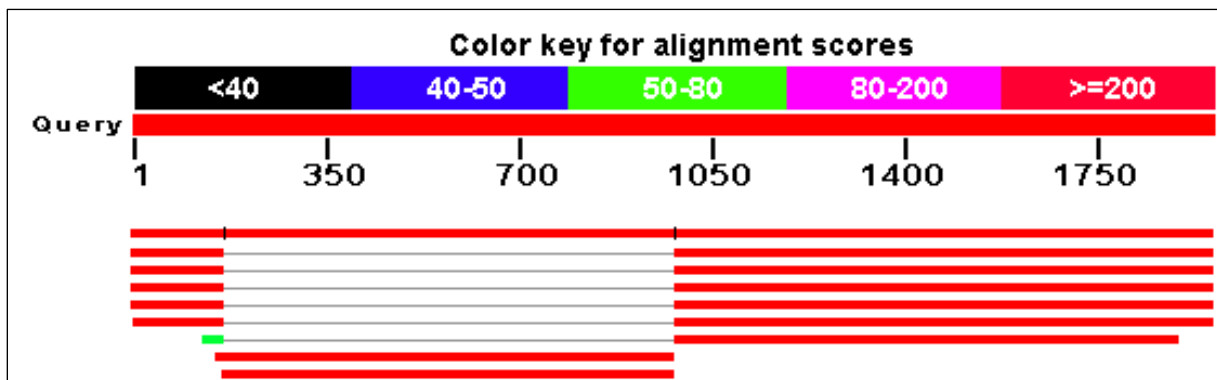
- Shankar, V., A. S. Baghdayan, M. M. Huycke, G. Lindahl & M. S. Gilmore, (1999) Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and immunity* **67**: 193-200.
- Sillanpaa, J., Y. Xu, S. R. Nallapareddy, B. E. Murray & M. Hook, (2004) A family of putative MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology* **150**: 2069-2078.
- Solheim, M., A. Aakra, L. G. Snipen, D. A. Brede & I. F. Nes, (2009) Comparative genomics of *Enterococcus faecalis* from healthy Norwegian infants. *BMC genomics* **10**: 194.
- Srivastava, M., C. Mallard, T. Barke, L. E. Hancock & W. T. Self, (2011) A selenium-dependent xanthine dehydrogenase triggers biofilm proliferation in *Enterococcus faecalis* through oxidant production. *Journal of bacteriology* **193**: 1643-1652.
- Sujatha, S. & I. Praharaj, (2012) Glycopeptide resistance in gram-positive cocci: a review. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* **2012**: 781679.
- Tendolkar, P. M., A. S. Baghdayan, M. S. Gilmore & N. Shankar, (2004) Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and immunity* **72**: 6032-6039.
- Tendolkar, P. M., A. S. Baghdayan & N. Shankar, (2006) Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* **188**: 2063-2072.
- Teng, F., K. V. Singh, A. Bourgoigne, J. Zeng & B. E. Murray, (2009) Further characterization of the epa gene cluster and Epa polysaccharides of *Enterococcus faecalis*. *Infection and immunity* **77**: 3759-3767.
- Theilacker, C., P. Sanchez-Carballo, I. Toma, F. Fabretti, I. Sava, A. Kropec, O. Holst & J. Huebner, (2009) Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*. *Molecular microbiology* **71**: 1055-1069.
- Thiele, J. H., M. Chartrain & J. G. Zeikus, (1988) Control of Interspecies Electron Flow during Anaerobic Digestion: Role of Floc Formation in Syntrophic Methanogenesis. *Applied and environmental microbiology* **54**: 10-19.
- Thomas, C. M. & C. A. Smith, (1987) Incompatibility group P plasmids: genetics, evolution, and use in genetic manipulation. *Annual review of microbiology* **41**: 77-101.
- Thomas, V. C., Y. Hiromasa, N. Harms, L. Thurlow, J. Tomich & L. E. Hancock, (2009) A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Molecular microbiology* **72**: 1022-1036.
- Thomas, V. C., L. R. Thurlow, D. Boyle & L. E. Hancock, (2008) Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *Journal of bacteriology* **190**: 5690-5698.
- Thorisdottir, A. S., L. L. Carias, S. H. Marshall, M. Green, M. J. Zervos, C. Giorgio, L. A. Mermel, J. M. Boyce, A. A. Medeiros, H. Fraimow & et al., (1994) IS6770, an enterococcal insertion-like sequence useful for determining the clonal relationship of clinical enterococcal isolates. *The Journal of infectious diseases* **170**: 1539-1548.
- Toledo-Arana, A., J. Valle, C. Solano, M. J. Arrizubieta, C. Cucarella, M. Lamata, B. Amorena, J. Leiva, J. R. Penades & I. Lasa, (2001) The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and environmental microbiology* **67**: 4538-4545.

- Ton-That, H., L. A. Marraffini & O. Schneewind, (2004) Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 269-278.
- Ton-That, H. & O. Schneewind, (2003) Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Molecular microbiology* **50**: 1429-1438.
- Trieu-Cuot, P., C. Carlier, C. Poyart-Salmeron & P. Courvalin, (1990) A pair of mobilizable shuttle vectors conferring resistance to spectinomycin for molecular cloning in *Escherichia coli* and in gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res* **18**: 4296.
- Vebo, H. C., M. Solheim, L. Snipen, I. F. Nes & D. A. Brede, (2010) Comparative genomic analysis of pathogenic and probiotic *Enterococcus faecalis* isolates, and their transcriptional responses to growth in human urine. *PloS one* **5**: e12489.
- Vu, J. C., J. (2011) *Enterococcus*: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Frontiers in Biology* **6**: 357-366.
- Weaver, K. E. & S. G. Reddy, (2006) The recombination deficient *Enterococcus faecalis* UV202 strain is a *recA* mutant. *Plasmid* **55**: 164-168.
- Willems, R. J., W. Homan, J. Top, M. van Santen-Verheuevel, D. Tribe, X. Manziros, C. Gaillard, C. M. Vandenbroucke-Grauls, E. M. Mascini, E. van Kregten, J. D. van Embden & M. J. Bonten, (2001) Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet* **357**: 853-855.
- Woodford, N., (2001) Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Microbial drug resistance* **7**: 229-236.
- Xu, Y., K. V. Singh, X. Qin, B. E. Murray & G. M. Weinstock, (2000) Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis. *Infection and immunity* **68**: 815-823.
- Zischka, M., C. Kuenne, J. Blom, P. W. Dabrowski, B. Linke, T. Hain, A. Nitsche, A. Goesmann, J. Larsen, L. B. Jensen, W. Witte & G. Werner, (2012) Complete genome sequence of the porcine isolate *Enterococcus faecalis* D32. *Journal of bacteriology* **194**: 5490-5491.

GACTTCTGGAGAGTATGCCTATGCGTTATATGATGGGGATACAGTGATTGCTCCTGAAAATTATCAAGTGACTGAACAAGCA
 AATGGCTTCACTGTGCGCGTTAATCCAGCATATATTCCTACGTTAACGCCAGGCGGCACACTAAAATTCGTTTACTTTATGC
 ATTTAAATGAAAAAGCAGATCCTACGAAAGGCTTTAAAAATGAGGCGAATGTTGATAACGGTCATACCGACGACCAAACACC
 ACCAACTGTTGAAGTGGTGACAGGTGGGAAACGTTTCATTAAAGTCGATGGCGATGTGACAGCGACACAAGCCTTGGCGG
 GAGCTTCCTTTGTCGTCCGTGATCAAACAGCGACACAGCAAATTATTTGAAAATCGATGAAACAACGAAAGCAGCAACTTG
 GGTGAAAACAAAAGCTGAAGCAACTACTTTTACAACAACGGCTGATGGATTAGTTGATATCACAGGGCTTAAATACGGTACC
 TATTATTTAGAAGAACTGTAGCTCCTGATGATTATGTCTTGTTAACAAATCGGATTGAATTTGTGGTCAATGAACAATCATAT
 GGCACAACGAAAAACCTAGTTTCACCAGAAAAAGTACCAAACAAACACAAAGGTACCTTACCTTCAACAGGTGGCAAAGGA
 ATCTACGTTTACTTAGGAAGTGCGCAGT

Alignments *ebpR* Gen von Isolat 1.10:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Enterococcus faecalis str. Symbiofor 1, complete genome	1786	20096	100%	0.0	100%	HF558530.1
Enterococcus faecalis D32, complete genome	1786	2085	58%	0.0	99%	CP003726.1
Enterococcus sp. 7L76 draft genome	1786	2096	58%	0.0	100%	FP929058.1
Enterococcus faecalis V583, complete genome	1775	2074	58%	0.0	99%	AE016830.1
Enterococcus faecalis OG1RF, complete genome	1764	2074	58%	0.0	100%	CP002621.1
Enterococcus faecalis 62, complete genome	1748	2052	58%	0.0	100%	CP002491.1
Enterococcus faecalis strain OG1RF EbpR (ebpR) gene, complete cds	1652	1721	48%	0.0	100%	EF646762.1
E.faecalis plasmid DNA sep1 gene, 4068bp	1519	1519	42%	0.0	99%	X96976.1
Enterococcus faecium DO plasmid 3, complete sequence	1375	1815	41%	0.0	99%	CP003586.1

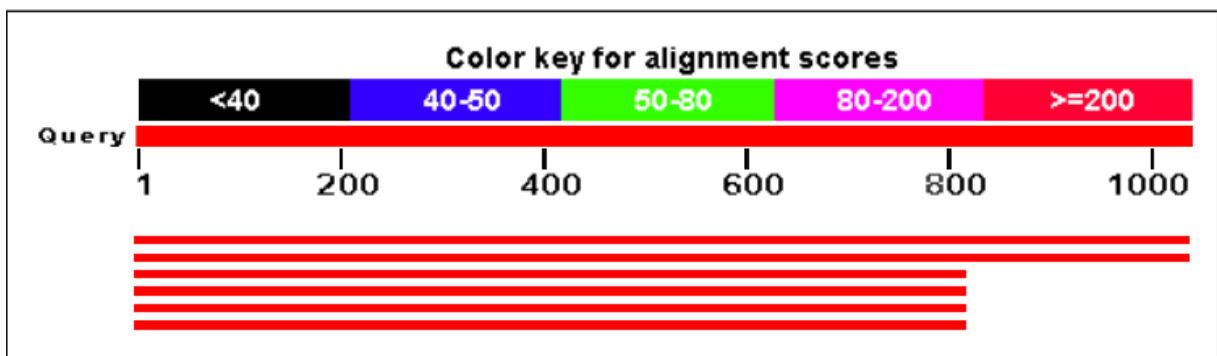
Sequenz von Isolat 1.10: *ebpR* mit Insertion

TTCGACTTATGTCCTATTTTCTTTTTATTTTCAGAAAAATAAAAATATCTTCTGTATGATGGCACCTCACATTACGCGGTTCTT
 GCTAAAAGGGCTATCTTTTTGGTAGATAGGGAAAACCATTAAGACGTTAAAAGTTTAATAAATCGAGCAATTCTTTTTGTTA
 CGCCGATTGTAATAAAGCTAGACAAATAAAAAAGTCATTTGTGCTACACTCAAGATAGTTCCCGCAAAAAGAATTATAAGGA
 GTGAAGACAAATGACCTATACCCATCTTACATCAAATGAACTTGCAATGATAGAGCGTATTATAAATCATCAATCTGTAG
 CAAAACCGCAGTACTATTGAATAGATCTAGACAAACGATTCATAAAGTTACCAATTTTTCAAACAGGGCACAATGCTCTA
 GATTATTTCAATCAATACAAGAAGAATAAACTCGCTGTGGCAGACGTCCTATTGTCTTATCAGATGAACAAACAGAATATAT
 TCAAAGAGGGTTGTTCAAGGTTGGACACCTGATGTGATTGTTGGCCGTGCAGAGTTTTCTATTTCTTGTCTATGCGTACA
 CTTTATCGTATGTTAAACAAGGCGTATTTGAAGTGACTCACCTACCTATGAAAGGAAAACGTAAGCCAACGGACACAAAG
 AAACGCGGGGAAAACAATCTTTTCGTCGATCACTTCGTGACAGAGGAAATGATTATTCTAAATTCATCAAGAATTTGGCCAC
 CTTGAAGGGGATACTATTGTAGGTA AAAAGCACAAAAGTGCTGTTATTACCCTCGTTGAGCGATTATCTAAAGTAATCATCAC
 TCTTCAGCCAGAAGGCAGACGAGCTATAGATATTGAAAATCGTTTGAACCAATGGATGCAATCTGTACCTAAGCATCTATTC
 AAATCAATGACTTTTGATTGTGAAAGGAATTTCAAATTGAAATCAATCAGTAATATCAATGATATTGA---NNNNNNNNN---
 GAAGTCGACGACTTCTTCTGTTAATTGTTCAATCTGTGAAAAAGCATTAAATTTTAAATTTTACGATTTCTTTGACTGATGAC
 TTCTTGGTCTTCGGAGTAGTATTGCTGAAAAGCGCCTCTTTGAAAATATCGGAGAACTTCCCGATAGGTTTACGGCTGAGT

CCAGTGAAATGACGACTGAGTAAAAGATAATCTTCCATTTTGATTGGACTCTTTTATCTGTTTTTTCTGGAAACGTTGTTGA
AATCCTTGATGCTCTCTTAATAAATCAACAATAAAATACATAATAAAGAAATCGTGTTCCATAACTGTTATCCATACTAATAATAT
TTAATTGGCATTGATTACGACGCATTAATTGTTTGATTTCTGCTTATCTAATTGATAAGGCAATTCATAATGACCATAATACA
TTAAAAAGAAAAAGGTTGTAATAACGTAAGGCAATTTCTGTTGGCTAGTTAATTGATAGCCTTGATCAACGATAACG
CGAAGAGAGTAAGTTTCCAAGACCTGATTACACTGCTTCAATTTTCGAGCAAAAGAGAGCGACTAATATTAATGGTATCGC
AATAATATTCGATGGTTTTGCCAGGATTTGGATAAACTCATGGAGCAATTGGGTGGTCGTTGACGTTTTTCCATATCCGT
CAGCACGTTTAAATATAAGGACACATTAAGTTTTCTAAACGATAGCCTAATTTATGCGATGTTTTAATGGTTAACTTTTCGCG
CCAACGCTGTTAATCTCCTCAATATAACGAATAAAAGTAGACTCAGAACTACCAATATATTTTGAAGTCTTTTTTTGTCAT
CCATTTATCAGAAATGGATAAGACACGAATGATTTCTCCATTTCCGATAATTTTTTCTAAAAACCTAATCATATTGTTTCTT
CCCAAGTCTTTACTTTAATGAAACAATCATCGAAACAATAACGCAATTCAGAA

Allignments *srtC* Gen von Isolat 1.10:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>



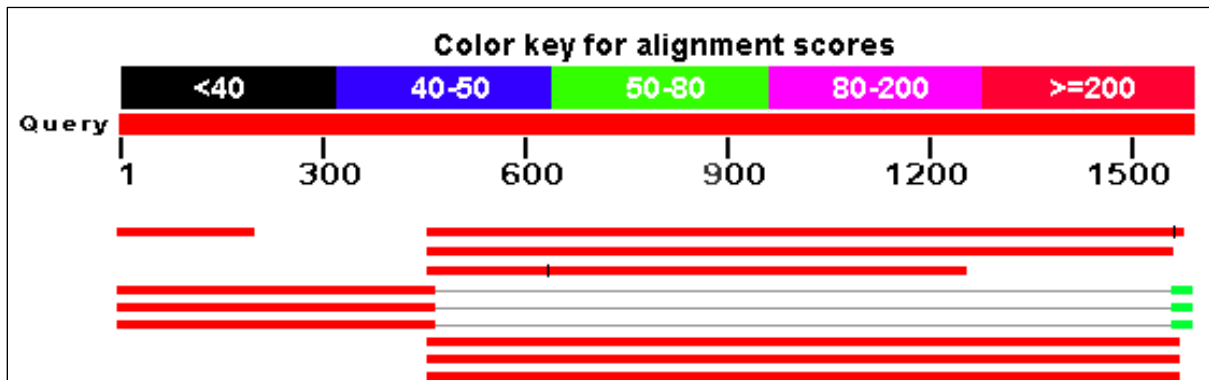
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Enterococcus faecalis str. Symbioflor 1. complete genome	1888	1888	100%	0.0	99%	HF558530.1
<input type="checkbox"/>	Enterococcus sp. 7L76 draft genome	1882	1882	100%	0.0	99%	FP929058.1
<input type="checkbox"/>	Enterococcus faecalis OG1RF. complete genome	1506	1506	78%	0.0	100%	CP002621.1
<input type="checkbox"/>	Enterococcus faecalis 62. complete genome	1483	1483	78%	0.0	99%	CP002491.1
<input type="checkbox"/>	Enterococcus faecalis D32. complete genome	1478	1478	78%	0.0	99%	CP003726.1
<input type="checkbox"/>	Enterococcus faecalis V583. complete genome	1478	1478	78%	0.0	99%	AE016830.1

Sequenz aus Isolat 1.10: verlängertes *srtC*

TGATGGTTTTATGATTCTTTTACTGATTATTGGAATAGGTGCATTTGCGTATCCTTTTGTAGCGATGCATTAATAACTATCT
GGATCAACAAATTATCGCTCATTATCAAGCAAAAGCAAGCCAAGAAAACACCAAAGAAATGGCTGAACTCAAGAAAAAATG
GAAAAGAAAAACCAAGAATTAGCGAAAAAGGCAGCAATCCTGGATTAGATCCTTTTCTGAAACGCAAAAAACAACGAAAA
AACCAGACAAATCCTATTTTAAAAGTCATACGATTGGTGTTTAACCATTCCAAAAATAAATGTCCGTTTACCAATTTTTGATA
AAACGAATGCATTGCTATTGAAAAAGGAAGCTCCTTGTAGAAAGAACCTCCTATCCTACAGGTGGTGCGAATACACATGC
GGTCATTTTCAAGACATCGTGGTCTCCCTCAAGCCAAATTATTTACAGATTTGCCAGAATTAATAAAGGCGATGAATTTTATA
TCGAAGTTAATGGGAAGACGCTTGCTTATCAAGTAGATCAAATAAAACCGTTGAACCAACTGATACAAAAGATTTACACATT
GAGTCTGGCCAAGATCTCGTCACTTTATTAACCTTGACACCGTATATGATAAACAGTCATCGGTTATTAGTTTCGAGGACATC
GTATCCCATATCAACCAGAAAAAGCAGCAGCAGGAATGAAAAAGTGGCACAACAACAAAATTTACTATTATGGACATTACT
TTTAATTGCCTGTGCGTTAATTATTAGCGGCTTCATTATCTGGTACAAGCGACGGAAAAAGACGACCAGAA-NNNNNNNNNN-
GCAATGGAAATTAACGATTTCGTATAATAAAAGTGACTATGTTTTTATTTTTTAAACCCTTACGTAGTAAATCAATGACCAAA
CCTAAGCAAAAATAAGTACAAAAATGAAGCCAGAAAAATCAACATTCTGGTTGTTAAAGGCTGCTGGGAATAATAAGTATC
CAGCACAGGCGTTTGGTGAATAATAGAAAAACCTAGAAAATCTGTAAGGCCA

Alignments *perA* Gen von Isolat 1.10:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>



Enterococcus faecalis str. Symbioflor 1, complete genome	1855	22164	70%	0.0	98%	HF558530.1
E. faecalis plasmid DNA sep1 gene, 4068bp	1855	1855	69%	0.0	98%	X96976.1
Enterococcus faecium DO plasmid 3, complete sequence	1262	1475	50%	0.0	96%	CP003586.1
Enterococcus faecalis 62, complete genome	859	920	31%	0.0	100%	CP002491.1
Enterococcus faecalis putative pathogenicity island, partial sequence	835	896	31%	0.0	100%	AY032999.1
Enterococcus faecalis pathogenicity island, complete sequence	835	896	31%	0.0	100%	AF454824.1
Enterococcus faecium DO plasmid 1, complete sequence	667	667	70%	0.0	78%	CP003584.1
Enterococcus faecium plasmid pM7M2, complete sequence	667	667	70%	0.0	78%	JF800907.1
Enterococcus faecium plasmid p5753cB, partial sequence	667	667	70%	0.0	78%	GQ900487.1

Sequenz von Isolat 1.10: *perA* mit Insertion

```
TCTTGTAAGAAGATATAGATCTGATAGGACTATATCATTATTTTATGATTTCCCACTTTTTTAAAAAAGTAGTGAAAGACAA
GCTTAAATTTGATTATATAACTGGTAATTATAATGAGTTGTTTTATTGTACACATACAATAAAAACTGTTTTGTTTGGTCCA
TTCAGATGTAATACCATAGAAAAAGATAAATTCTATTCTATGGTTCAATATAAAAGTATAAAGCATTCTGATAAAGAATCCTTA
TATAAATTATTAATAAATTACCATTATTTTCATTAGGGGATATTAGAGATATTCTTATCCTTATAAATTATTTTTTACGGGAAA
GATTGAAGACTTATTTTATAAGCCGTTACATGATTATGAGAAAAATTTTTCAGAAGATATCCAAATAGAACGGATAGATATGT
TATTATCTCAAATATGATCCAGAAATTTATTTATTTTATATGACGCCGATTGTAATAAAGCTAGACAAATAAAAAAGTCA
TTTGTGCTACACTCAAGATAGTTCCCGCAAAGAATTATAAGGAGTGAAGACAAATGACCTATACCCATCTTACATCAAATGA
ACTTGCAATGATAGAGGCGTATTATAAATCATCAATCTGTAGCCAAAACCGCAGTACTATTGAATAGATCTAGACAAACGA
TTCATAAAGTTTACCAATTTTTCAAACAGGGCACAATGCTCTAGATTATTTCCGGCACAATGCTCTAGATTATTTCAATCAATA
CAAGAAGAATAAACTCGCTGTGGCAGACGTCCTATTGTCTTATCAGATGAACAAACAGAATATATTCAAAAGAGGGTTGTT
CAAGTTGGACACCTGATGTGATTGTTGGCCGTGCAGAGTTTTCTATTTCTTGTCTATGCGTACACTTTATCGTATGTTTAA
ACAAGGCGTATTTGAAGTACTCACCTACCTATGAAAGGAAAACGTAAGCCAACGGACACAAAGAACTCGGGGAAAACA
ATCTTTTCGTCGATCACTTCGTGACAGAGGAAATGATTATTCTAAATTCATCAAGAATTTGGCCACCTTGAAAGGGGATACTA
TTGTAGTAAAAAGCACAAAAGTGCTGTTATTACCCTCGTTGAGCGATTATCTAAAGTAATCATCATTCTTCAGCCAGAAGGC
AGACGAGCTATAGATATTGAAAATCGTTTGAACCAATGGATGCAATCTGTACCTAAGCATCTATTCAAATCAATGACTTTTGA
TTGTGGAAAGGAATTTCAAATGGAAATCAATCAGTAATATCAATGATATTGATATCTATTTTGAGATCCTGGTACACCATC
ACAAAGAGGTTTAAATGAAAATCTAATGGTTTATTACGTAAGATGGTTTACCAAAGCAAATGGACTTCAACGAAGTTGATG
AATCTTTTATCCAATCTATTGCATCGAAAAGAAATAATATCCCTCGAAAATCATTAAACTATAAAACACCAATAGAAGTATTCT
TGAGTCACATATGCAAAGAGGAATTGTCTAACTTAATTTGACAATTAATATGAAAATAAAATTTTAGAATATGTTGTAA
```