

**Identifikation und Charakterisierung neuer
Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus*:
Heparansulfat-bindende Proteine und
WTA-abhängige Methicillin-Resistenz**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Kiefer, Frieder

2015

Dekan: Professor Dr. Ingo Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. rer. nat. Andreas Peschel

2. Berichterstatter: Professor Dr. rer. nat. Ulrich Zanger

*Denn Gott der Herr ist Sonne und Schild;
der Herr gibt Gnade und Ehre.*

Psalm 84, 11

4.1.3.	Heparansulfat-Pull-Down-Assay	◦	◦	◦	◦	◦	◦	76
4.1.4.	Bedeutung der Ergebnisse	◦	◦	◦	◦	◦	◦	77
4.1.4.1.	Heparansulfatbindung von Eap	◦	◦	◦	◦	◦	◦	77
4.1.4.2.	Heparansulfatbindung von IsaB	◦	◦	◦	◦	◦	◦	79
4.1.4.3.	Bedeutung der Heparansulfatbindung von <i>S. aureus</i>	◦	◦	◦	◦	◦	◦	79
4.1.5.	Fazit	◦	◦	◦	◦	◦	◦	80
4.2.	WTA-abhängige Methicillinresistenz von <i>Staphylococcus aureus</i>							82
4.2.1.	Darlegung der Fragestellung	◦	◦	◦	◦	◦	◦	82
4.2.2.	Knockout der Gene tarM und tarS, Bestimmung der minimalen inhibitorischen Oxacillinkonzentration	◦	◦	◦	◦	◦	◦	82
4.2.3.	Bedeutung der Ergebnisse	◦	◦	◦	◦	◦	◦	83
4.2.4.	Fazit	◦	◦	◦	◦	◦	◦	84
5.	Zusammenfassung	◦	◦	◦	◦	◦	◦	85
6.	Literaturverzeichnis	◦	◦	◦	◦	◦	◦	87
7.	Erklärung zum Eigenanteil	◦	◦	◦	◦	◦	◦	99
8.	Danksagung	◦	◦	◦	◦	◦	◦	100
9.	Lebenslauf	◦	◦	◦	◦	◦	◦	101

Abkürzungsverzeichnis

Alle Einheiten leiten sich von SI-Basiseinheiten ab (ISO 1000). Einheitenpräfixe wie M, k, m, μ oder n stehen für mega, kilo, milli, mikro und nano. Chemische Elemente sind nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

Abb	Abbildung
ActA	Actin-polymerizing protein A
APS	Ammoniumpersulfat
Bbp	Bone sialoprotein binding protein
bp	Basenpaar
CA-MRSA	Community-acquired MRSA
CD	Cluster of differentiation
CDP	Cytidindiphosphat
Cif A/B	Clumping factor A/B
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ds	double strand
DTT	Dithiothreitol
Eap	Extracellular adhesion protein
EbpS	Elastin binding protein S
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Emp	Extracellular matrix binding protein
EZM	Extrazellulärmatrix
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
Fnbp A/B	Fibronectin binding protein A/B
GAG	Glykosaminoglykan
Gal	Galactose

GlcA	Glucuronsäure
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GroP	Glycerolphosphat
HA-MRSA	Hospital-acquired MRSA
HRP	Horseradish peroxidase
HS	Heparansulfat
HSbP	Heparansulfat-bindendes Protein
HSPG	Heparansulfat Proteoglykan
HSV	Herpes simplex virus
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IdoA	Iduronsäure
IsaB	Immunodominant surface antigen B
kD	Kilo-Dalton
KO	Knockout
LA-MRSA	Livestock-acquired MRSA
LCP	LytR-Cps2A-Psr (LCP)-Protein
LPXTG	Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin
LTA	Lipoteichonsäure
ManNAc	N-Acetyl-D-Mannosamin
MnaA	UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD ₅₇₈	Optische Dichte (bei 578 nm Wellenlänge)
Opa	Opacity-protein

OsmC	Osmotically inducible protein C
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAPS	3'-Phosphoadenyl-5'-Phosphosulfat
PBP	Penicillinbindeproteine
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Proteoglykan
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RboP	Ribitolphosphat
RNA	Ribonucleinsäure
RSV	Respiratory syncytial virus
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SERAM	Secreted Expanded Repertoire Adhesive Molecules
ss	single strand
Tab	Tabelle
Tag	Teichoic acid glycerol
Tar	Teichoic acid ribitol
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TSST	Toxic Shock Syndrome Toxin
TTBS	Tween Tris buffered saline
UDP	Uridindiphosphat
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLDL	Very low density lipoprotein
wt	Wildtyp
WTA	Wandteichonsäure
Xyl	Xylose

1. Einleitung

1.1. Thematik und Zielsetzung

1.1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, ein grampositives, kokkoides Bakterium, ist ein zunehmend problematisch handhabbarer Erreger diverser Krankheiten. Neben der asymptomatischen Besiedelung des Nasenvorhofs ist dieses Bakterium unter anderem häufig die Ursache für Abszesse und Furunkel, Wundinfektionen, Osteomyelitis, Infektionen intravasaler Implantate, Lebensmittelvergiftungen und der Sepsis. Außerdem löst *S. aureus* das *staphylococcal scaled skin syndrome* und das *toxic shock syndrome* aus. *S. aureus* entstammt einer Familie mit zahlreichen Spezies. Das Vorhandensein von Koagulase, einem wichtigen Virulenzfaktor, dient der Abgrenzung von *S. aureus* von den anderen Vertretern der Familie. Diese sind allesamt koagulase-negativ. *S. aureus* bildet eine Vielzahl an Virulenzfaktoren (Beispiele s. Tab. 1). In kultureller Anzucht entstehen meist gold-gelbe Kolonien. Auf Blutagar zeigt sich die Aktivität des Virulenzfaktors Hämolyisin durch einen hämolytischen Randsaum um die einzelnen Kolonien.

Tab. 1: Beispiele einiger Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus*

Virulenzfaktor	Funktion
Protein A	bindet Immunglobulin-F _c -Bereich, verhindert Phagozytose ^[1]
Clumping factor	aktiviert Fibrinmonomere, erzeugt Fibrinschicht um Zelle ^[1]
Hyaluronidase	spaltet EZM-Moleküle, ermöglicht Gewebsinvasion ^[1]
Toxin-1 (TSST-1)	Superantigen, erzeugt <i>toxic-shock-syndrome</i> ^[1]
Enterotoxine A-E	Superantigene, erzeugen Lebensmittelvergiftung ^[1]

Therapeutisch werden gegen *S. aureus* häufig β -Lactam-Antibiotika eingesetzt. Sie hemmen die Transpeptidasen, welche das Murein der bakteriellen Zellwand quervernetzen und deshalb auch als Penicillinbindeproteine (PBP) bezeichnet werden. Auf sich teilende Bakterienpopulationen wirken β -Lactame bakterizid, weil durch das Fehlen einer stabilen Zellwand Wasser dem osmotischen Gradienten folgend ins Zellinnere strömt und so zum Anschwellen und Platzen der Zellen führt. Gegen diese Antibiotikaklasse haben sich zwei Resistenzmechanismen entwickelt. 80% der *S. aureus*-Stämme bilden heute plasmid-codierte β -Lactamasen, welche den β -Lactamring dieser Antibiotikaklasse hydrolytisch spalten. Dies macht den Einsatz β -Lactamase-fester Antibiotika wie Oxacillin oder Flucloxacillin notwendig. Eine weitere therapeutische Möglichkeit ist der Einsatz von β -Lactamase-Inhibitoren wie Clavulansäure, Sulbactam oder Tazobactam in Kombination mit einem klassischen β -Lactam-Antibiotikum. Mehr als 15 % der Stämme weisen heute das Gen *mecA* in ihrem Genom auf. Dieses codiert für ein verändertes Penicillinbindeprotein *PBP2a*, welches eine verminderte Affinität zu β -Lactamen besitzt. Eine Therapie mit dieser Antibiotikaklasse wird obsolet^[1]. Alternative Antibiotika (z.B. Clindamycin, Rifampicin, Vancomycin oder Teicoplanin) werden in diesem Fall verwendet, stoßen jedoch nicht selten auf weitere Resistenzen^[2].

S. aureus-Stämme, die resistent gegen das Antibiotikum Methicillin sind, werden im Allgemeinen als *MRSA* (=Methicillin resistant *S. aureus*) bezeichnet. Zur Diagnostik wird heute Oxacillin verwendet, da seine Aktivität unter Lagerungsbedingungen besser erhalten bleibt, heteroresistente Stämme eher entdeckt werden und Methicillin nicht mehr auf dem Markt erhältlich ist^[3]. Man unterscheidet heute drei Formen von *MRSA*: Community acquired (*CA-MRSA* = Stämme, welche im ambulanten Rahmen erworben werden), hospital acquired (*HA-MRSA* = Stämme, welche im klinischen Rahmen erworben werden) und livestock acquired (*LA-MRSA* = Stämme, die beim Nutztvieh vorkommen).

1.1.2. Zielsetzung der Arbeit

Eine zentrale Interaktionsschnittstelle für Entstehung, Verlauf und Therapie *S. aureus*-bedingter Erkrankungen spielt die Zelloberfläche der Bakterien. Im Rahmen dieser Arbeit soll auf zwei der wesentlichen Aspekte der Zelloberfläche eingegangen werden. Zum einen trägt sie über Adhäsionsproteine zur Etablierung von *S. aureus* im Wirtsorganismus durch Adhäsion bei. Zum anderen ist sie über Wandteichonsäuren an der Resistenz von *MRSA* gegenüber β -Lactam-Antibiotika beteiligt.

Die Pathogenese der durch Staphylokokken verursachten Erkrankungen des menschlichen Körpers ist davon abhängig, wie effektiv sich die Bakterien im Wirtsorganismus behaupten können. Grundlegender Schritt der Besiedelung mit *S. aureus* ist dessen Adhärenz an Strukturen des Wirtsorganismus. Hierzu zählen sowohl die Zellmembranen wie auch die Extrazellulärmatrix (EZM) eukaryoter Organismen. Einen essenziellen Bestandteil dieser Strukturen stellen Heparansulfate (HS) dar. Sie dienen unter anderem der Aufrechterhaltung physiologischer Prozesse, konnten jedoch zusätzlich als potenziell ausnutzbare Schwachstelle für einige Bakterienarten identifiziert werden^[4]. Zur Bindung an Zellmembran- und Matrixstrukturen besitzt *S. aureus* eine bis heute nicht vollständig bekannte Ausstattung Adhärenz vermittelnder Moleküle. Einen Teil hiervon bilden Heparansulfat-bindende Proteine (HsbP)^[5]. Der erste Teil dieser Arbeit sollte der Untersuchung zweier Proteine von *S. aureus* auf deren Fähigkeit zur Heparansulfatbindung dienen.

Eine weitere Eigenschaft vieler Bakterien ist die Entwicklung von Resistenzmechanismen gegenüber antibiotisch wirkenden Agenzien. *S. aureus* zeigt sich hinsichtlich dieser Fähigkeit als äußerst effektiv. Vor allem *MRSA*-Stämme stellen ein wachsendes Problem für viele Einrichtungen des Gesundheitssystems dar, da sie über viele Jahre hinweg eine breite Resistenz gegen beinahe jede Antibiotikaklasse entwickelt haben. Eine wichtige Barriere

für Antibiotika stellt die Zellwand der Staphylokokken dar, welche bei einigen Stämmen einen wichtigen Beitrag zur Resistenz gegen Oxacillin vermittelt^[6]. Ein Hauptbestandteil der Zellwand von Staphylokokken ist die Wandteichonsäure (WTA), die in einem komplexen Prozess intrazellulär synthetisiert, glykosyliert und nach extrazellulär verbracht wird. Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand in der weiterführenden Charakterisierung der Abhängigkeit zwischen Glykosylierung der Wandteichonsäuren und der Resistenz eines *HA-MRSA*-Stammes gegenüber β -Laktam-Antibiotika.

1.2. Heparansulfat-bindende Proteine von *Staphylococcus aureus*

1.2.1. Adhäsion in der Pathogenese von *Staphylococcus aureus*

Als Adhäsion bezeichnet man den ersten Schritt der Pathogenese bakterieller Infektionen. Um einen Wirtsorganismus erfolgreich zu kolonisieren, ist es für die besiedelnden Organismen von größter Bedeutung, Strukturen des Wirts als Ankerpunkte zu nutzen, an denen sie haften können. Physiologische Prozesse wie die mukoziliäre Clearance der Bronchialschleimhaut, der Blutfluss, die Zottenmotilität der Darmschleimhaut oder die regelmäßige Spülung des Harntraktes mobilisieren nicht adhärenente Elemente und wirken einer Kolonisation des Organismus entgegen. Um diesen Prozessen widerstehen zu können, nutzt *S. aureus* eine Vielzahl adhäsioneller Moleküle.

1.2.1.1. Adhäsionssysteme von *Staphylococcus aureus*

Zur Bandbreite Adhäsion vermittelnder Moleküle von *S. aureus* zählen diverse Proteine wie auch Polysaccharide. Das Adhäsionssystem von *S. aureus* lässt sich in vier Gruppen unterteilen:

Die erste Gruppe bilden Zellwand-gebundene Adhäsine vom MSCRAMM-Typ (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), die auch als Sortase-abhängige Adhäsine der Zellwand bezeichnet werden. Sie werden mit einem C-terminal situierten Ankerpeptid mit der Sequenz LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly) synthetisiert. Nach Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids und Sec-abhängigem Transport des Proteins auf die Außenseite der Zellmembran, wird dort das LPXTG-Motiv durch das Enzym Sortase

spezifisch erkannt. Das aktive Zentrum der Sortase katalysiert die Spaltung des Ankerpeptids zwischen Threonin und Glycin. Anschließend wird das Protein über mehrere Zwischenpeptide an das Peptidoglykan gebunden^[7]. Zu diesem Typ der Adhäsine gehören unter anderem das *fibronectin binding protein A* und *B* (Fnbp A/B) und der *clumping factor A* und *B* (ClfA/B).

Die zweite Gruppe stellen Adhäsine ohne Verankerung in der Zellwand vom SERAM-Typ dar (*Secreted Expanded Repertoire Adhesive Molecules*)^[8]. Dies sind sekretierte Proteine, die keinerlei Ankerpeptide wie das LPXTG-Motiv besitzen. Sie werden von den Bakterien mit einem N-terminalen Signalpeptid synthetisiert, welches der Erkennung durch den sekretorischen Pathway dient, und anschließend an die Umgebung abgegeben. Hier erkennen sie spezifisch Moleküle der EZM oder der Zelloberfläche anderer Organismen und binden an diese. Im Anschluss binden sie entweder selbstständig an Strukturen der bakteriellen Zellwand oder werden von Proteinen dieser aktiv gebunden^[9]. Zu den Adhäsinen dieser Gruppe zählen multifunktionale Proteine wie das *extracellular matrix binding protein* (Emp)^[8] oder das *extracellular adhesion protein* (Eap)^[8].

Die dritte Gruppe wird von transmembranösen Adhäsinen gebildet. Sie sind Membranproteine, besitzen eine oder mehrere Transmembrandomänen und können sowohl über hydrophobe Wechselwirkungen als auch über kovalente Bindungen zu den Lipiden der Membran in jener verankert sein. Ein Beispiel hierfür ist das *elastin binding protein S* (EbpS)^[10], welches mit zwei membranüberbrückenden Domänen in der Zellmembran verankert ist.

Die vierte Gruppe der Adhäsine bilden Polysaccharide, die auf der Oberfläche der Staphylokokken vorkommen. Hierzu zählen in erster Linie die Lipoteichonsäure (LTA) und die Wandteichonsäure (WTA), die Bestandteile des Peptidoglycans der Zellwand sind (s. 1.3.2.). LTA sind zellmembrangebunden und ragen in den periplasmatischen Raum hinein^[11]. WTA sind im Peptidoglycan

selbst verankert und überragen dieses^[12]. Beide sind in der Lage, Adhäsion gegenüber unterschiedlichen Molekülgruppen aufzubauen^{[13], [14]}. Wie von Weidenmeier et al.^{[15], [16]} gezeigt werden konnte, ist die Wandteichonsäure für *S. aureus* essenziell, um eine Kolonisation des Nasenvorhofs zu etablieren.

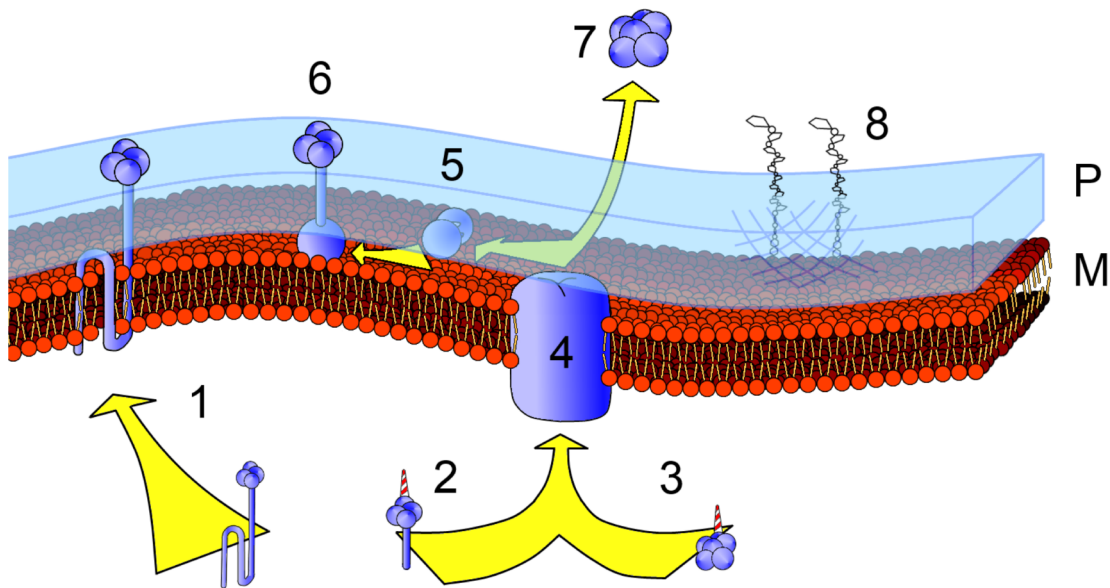


Abb. 1: Adhäsionssysteme von *S. aureus*

M = Zellmembran; P = Peptidoglykan

- 1: Integrale Adhäsine werden synthetisiert, in die Zellmembran integriert und überragen das Peptidoglykan
- 2: MSCRAMMs werden mit einem N-terminalen Signalpeptid und C-terminalen LPXTG-Anker synthetisiert
- 3: SERAMs werden mit einem N-terminalen Signalpeptid synthetisiert
- 4: Das Signalpeptid führt MSCRAMMs und SERAMs dem sekretorischen Pathway zu
- 5: Nach der Sekretion spaltet das Enzym SrtA den LPXTG-Anker der MSCRAMMs
- 6: MSCRAMMs werden an Peptide der Zellmembran gebunden und überragen das Peptidoglykan
- 7: SERAMs werden frei in die Peripherie der Bakterienzelle sezerniert
- 8: Wandteichonsäuren sind im Peptidoglykan verankert und überragen dieses

Die Wirkungen der vier bisher bekannten Adhäsionssysteme von *S. aureus* können als komplementär angesehen werden. Der Verlust eines oder mehrerer Systeme setzt die Kapazität zur Adhäsion zum Teil beträchtlich herab^{[17],[18]}. Weiterhin sind die beschriebenen Systeme zwar oft sehr spezifisch, jedoch auch unselektiv. Die hohe Affinität vieler Adhäsine gilt häufig nicht einem einzelnen, sondern einer ganzen Bandbreite an Wirtsmolekülen. So bindet zum Beispiel FnbpA nicht nur Fibronectin, sondern auch Fibrinogen^[19]. Das *bone sialoprotein binding protein* (Bbp) besitzt als Liganden ebenfalls Fibrinogen^[20]. Zum anderen dienen viele der oben genannten Proteine und Polysaccharidie

nicht ausschließlich der Adhäsion, sondern sind zugleich Immunmodulatoren, Invasine oder Lysine. Tab. 2 zeigt einige Beispiele multifunktionaler Adhäsine von *S. aureus*:

Tab. 2: Beispiele multifunktionaler Adhäsine von *Staphylokokkus aureus*

Adhäsion	Funktion
FnbpA	Bindung an Fibronectin und Fibrinogen ^[19] , Zellinvasion ^[17]
ClfA	Bindung an Fibrinogen, Complement regulator I protein ^[21]
Eap	Bindung an Fibrinogen, Fibronectin, Prothrombin u.a. ^[22] ; Blockade des ICAM-1-Rezeptors ^[23]
LTA	Bindung an TLR-2 und CD 14 ^[24] , Adhäsion ^[25]
WTA	Regulation des Peptidoglycan-crosslinking ^[26] , Kationenreservoir ^[27] , Rezeptormolekül für Bakteriophagen ^[28] , Adhäsion ^[13]

1.2.2. Synthese, Aufbau und Rolle der Heparansulfate

1.2.2.1. Glykosaminoglykane

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung bakterieller Adhäsine gegenüber Heparin, einem stark sulfatierten HS, untersucht. HS sind Glykosaminoglykane (GAG), die größtenteils als Bestandteile von Proteoglykanen (PG), seltener als eigenständige Polysaccharide, ubiquitär auf eukaryotischen Zellen und in der EZM vorkommen^[29].

GAG unterteilen sich in mehrere Gruppen, deren hauptsächliche Vertreter die Chondroitin-, Dermatan- und Heparansulfate sind^[30]. Ihnen gemeinsam ist ihr grundlegender Aufbau: Einer Basisregion, über die die GAG an die Kernproteine der PG gebunden sind, schließt sich ein unterschiedlich langes Rückgrat aus multiplen Disaccharideinheiten an. Diese bestehen abwechselnd aus einer Uronsäure bzw. Galactose und einem Aminozucker und sind

untereinander mit α_{1-4} -, β_{1-3} - sowie β_{1-4} -glykosidischen Bindungen zu einer Polysaccharidkette verknüpft. Diverse Modifikationen sorgen für eine große Vielfalt möglicher Moleküle^[31].

1.2.2.2. Synthese und Struktur der Heparansulfate

Die Synthese der HS beginnt an Serinresten eines Kernproteins. Eine Xylosetransferase überträgt hierbei einen Xylose (Xyl)-Rest auf den Serinrest (Ser). Anschließend wird über die Galactosetransferasen I und II jeweils ein Galactosemolekül (Gal) angeschlossen und über die Glucuronsäuretransferase I ein Molekül Glucuronsäure (GlcA) angehängt. Auf diese Weise entsteht die Basisregion mit der Sequenz Ser-Xyl-Gal-Gal-GlcA. Bis hierher überlappen sich die Synthesepfade der Chondroitin- und Heparansulfate. Die endgültige Weiterentwicklung zum Heparansulfat wird über das Anhängen eines Moleküls N-Acetylglucosamin (GlcNAc) durch das Enzym EXTL3 festgelegt. Das nun entstehende Heparansulfatrückgrat besteht zunächst abwechselnd aus GlcA und GlcNAc. Diese Kettenverlängerung wird durch die Copolymerase EXT1/EXT2 vorgenommen, die GlcA-Transferase- und GlcNAc-Transferase-Aktivität besitzen. Die hohe Variabilität der Heparansulfaten entsteht durch intensive Modifikation der entstandenen Polysaccharidkette. Das Enzym GlcNAc-N-Deacetylase/N-Sulfotransferase versieht GlcNAc-Reste unter Verlust deren Acetylrestes mit einer Sulfatgruppe. Vor allem im basisnahen Bereich tritt diese Modifikation scheinbar nur sehr selten auf. Weitere Sulfatgruppen werden dem Heparansulfat über 2-O-, 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen zugeführt, die diese Reaktion spezifisch katalysieren. Sulfatgruppendonator für diese Reaktionen ist das Molekül 3'-Phosphoadenyl-5'-Phosphosulfat (PAPS)^[31]. Die höchste Konzentration an Sulfatgruppen entsteht im Schwanzbereich des Moleküls, wo diese regelrechte Cluster ausbilden^[32]. Diese Cluster dienen vielen Liganden, z.B. dem *fibroblast growth factor (FGF)* als Bindungsstelle^[33]. Eine weitere Modifikation entsteht durch das Enzym GlcA-C5-Epimerase, welches GlcA-Reste in deren Epimer Iduronsäure (IdoA) überführt^[31]. Die

erwähnten Modifikationen treten nicht zufällig, sondern nach einem strikt geregelten Muster auf, über welches die exakte Funktion des jeweiligen HS geregelt wird^[34]. Abb. 2 zeigt den grundsätzlichen Aufbau der Heparansulfate anhand des Heparins mit Bindestellen für FGF-1/FGF-2 und Antithrombin.

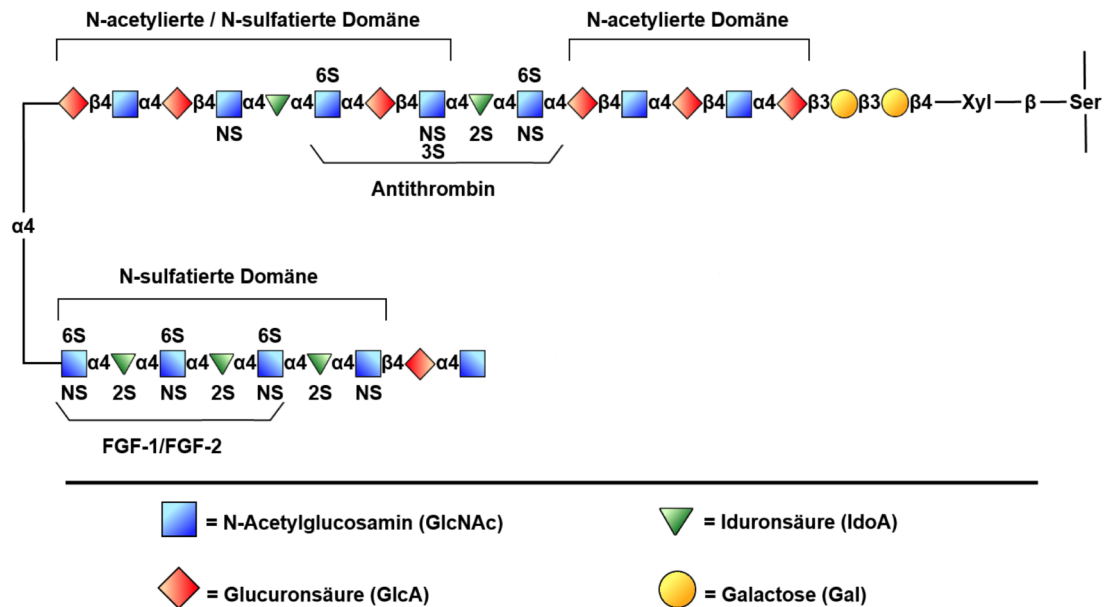


Abb. 2: Struktur der Heparansulfate anhand des Heparins mit Bindungsstellen für FGF-1/FGF-2 und Antithrombin (nach Kreuger et al. [33])

1.2.2.3. Rolle der Heparansulfate

HS kommen entweder – wie das Heparin – als eigenständiges Molekül oder in Verbindung mit einem Kernprotein als PG vor. Als solche sind sie entweder zellmembran- (Syndecan, Glypican) oder extrazellulärmatrixständig (Perlecan, Agrin, Kollagen XVIII).

Zellmembranständiges Syndecan dient als relativ unspezifischer Korezeptor für vielerlei Wachstumsfaktoren (z.B. FGF1, FGF2 und VEGF), indem es deren Bindung an ihren eigentlichen Rezeptor stabilisiert und so ihre Wirkung verstärkt. Weiterhin wirkt es als Anker-molekül für Proteine der EZM, wie Kollagen, Fibronectin und Laminin, und vermittelt Zell-Zell-Adhäsion^[35].

Glypicane, welche ebenfalls auf der Zellmembran vorhanden sind, spielen eine wichtige Rolle für Zellentwicklung und -differenzierung^[36]. Zellmembranständige HS dienen außerdem der Endozytose diverser Liganden, zum Beispiel VLDL^[37]. Ebenso konnten HS für verschiedene Pathogene als Eintrittspforte in die Wirtszelle identifiziert werden. Das *Respiratory syncythial virus (RSV)*^[38] und das *Herpes simplex Virus 1 (HSV 1)*^[39] nutzen HS der eukaryotischen Zellmembran, um ihre Internalisation auszulösen.

Perlecan ist ein HSPG der EZM und liegt vor allem in Basalmembranen vor^[40]. Hier ist es unter anderem für den Erhalt der negativen Ladung der Matrix verantwortlich^[41]. Agrin, ein weiteres extrazellulärmatrixständiges HSPG, dient vor allem während der Entwicklung der Bildung neuromuskulärer Endplatten und der Synaptogenese im zentralen Nervensystem^[42]. Kollagen XVIII ist ein PG der Basalmembran^[43]. Ein 20 kD schweres C-terminales Fragment hiervon, das Protein Endostatin, scheint eine inhibitorische Rolle im Rahmen der Angio- und Tumorgenese zu spielen^[44]. HS der EZM haben zudem regulierenden Einfluss auf die Diffusion von Wachstumsfaktoren durch die Basalmembran^[45]. Heparin, ein frei vorliegendes HS, wird von Mastzellen synthetisiert und in Vesikeln gelagert. Es ist ein stark sulfatiertes HS^[46]. Seine physiologische Rolle ist noch nicht vollständig geklärt. Im klinischen Rahmen werden unterschiedliche Heparine und Heparinanaloga zur therapeutischen Antikoagulation eingesetzt, wo sie an Antithrombin III binden und dessen gerinnungsverzögernde Funktion um das bis zu 1000-fache verstärken.

1.2.3. Potenziell Heparansulfat-bindende Proteine von *Staphylococcus aureus*

HS sind ubiquitär vorkommende Makromoleküle^[29], die durch ihr hohes negatives Ladungsniveau besonders auf die Bindung diverser Liganden ausgerichtet sind. Physiologischerweise sind solche Liganden Wachstumsfaktoren, Moleküle der Zell-Zell-Interaktion oder der EZM. Viele pathogene Bakterien und Viren haben jedoch ihrerseits Proteine entwickelt, die ebenfalls als Liganden von HS dienen können und deren Verbreitung im Wirtsorganismus als Schwachstelle zur Etablierung in selbigem ausnutzen. Oftmals sind diese essenziell für die Pathogenese, da sie Adhäsion oder Internalisation auslösen. Tab. 3 zeigt einige HSbP, die verschiedene Syndecane als Bindungspartner nutzen.

Tab. 3: Beispiele für mit Heparansulfaten interagierende Proteine unterschiedlicher Organismen

Organismus	Protein	Funktion	Quelle
<i>L. monocytogenes</i>	Actin-polymerizing protein (ActA)	Adhäsion, Invasion	[47]
<i>N. gonorrhoeae</i>	Opacity-proteins (Opa)	Adhäsion, Invasion	[48]
<i>S. aureus</i>	α -Toxin, β -Toxin	Shedding	[49]
<i>P. aeruginosa</i>	LasA	Shedding	[50]
<i>Herpes simplex 1/2</i>	gB, gC, gD	Adhäsion	[51],[52]

Aus Tab. 3 wird ersichtlich, dass auch *S. aureus* Proteine zur Interaktion mit HS besitzt. Liang et al. zeigten 1992, dass *S. aureus* auf seiner Oberfläche zwei Proteine mit je 60 bzw. 66 kDa Molekülmasse besitzt, die HS binden können^[5]. Weitere Arbeiten stellten den Einfluss von HS auf die Interaktion von *S. aureus* mit verschiedenen Epithelien heraus. So konnten Hess et al. 2006 zeigen, dass die Internalisation von *S. aureus* durch intestinales Epithel durch HS vermittelt

wird^[53]. Weiterhin war es Alston et al. bereits 1997 gelungen, zu zeigen, dass Endothelzellen empfänglicher für eine Infektion durch *S. aureus* waren, wenn sie keine oder nur unsulfatierte HS auf ihrer Oberfläche exprimierten^[54]. Die Interaktion von *S. aureus* mit Epithelien scheint HS also zumindest zu involvieren.

Die an der Interaktion mit HS beteiligten Strukturen von *S. aureus* sind bisher unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Proteine dieses Bakteriums auf ihre Fähigkeit der Heparansulfatbindung untersucht. Es wurden mehrere Kriterien zur Auswahl der zu untersuchenden Proteine angelegt: Zum einen wurden bereits publizierte Eigenschaften bezüglich der Bindung negativ geladener Moleküle berücksichtigt. Auch wurden Publikationen berücksichtigt, die auf eine mögliche Beteiligung der Proteine an einem Heparansulfat-Bindungssystem von *S. aureus* hinwiesen. Zum anderen wurden der isoelektrische Punkt und die Gesamtladung der Proteine bei pH = 7,40 einbezogen. Ein weiteres Kriterium war das Vorkommen der Proteine in möglichst vielen *S. aureus*-Stämmen. So rückten das *extracellular adherence protein (Eap)* und das *immunodominant surface antigen B (IsaB)* in den Fokus.

1.2.3.1. Extracellular adherence protein (Eap)

Das *extracellular adherence protein* ist ein Adhäsion der SERAM-Gruppe. Es besteht abhängig vom exprimierenden Stamm aus bis zu 7 tandem-repeat-Domänen^[55], von denen jede aus ca. 110 Aminosäuren aufgebaut ist. Die Molekülmasse beträgt 60-70 kDa. Jede Domäne besitzt dabei ein eigenes Muster spezifischer Liganden^[56]. *Eap* zeichnet sich durch die große Bandbreite seiner Bindungspartner aus. Hierzu zählen unter anderem Fibrinogen, Fibronectin, Thrombospondin, Kollagen, Elastin, Vitronectin^[22] und Osteopontin^[57]. Es ist in der Lage, mit anderen Eap-Molekülen Multimere zu bilden und Strukturen der Staphylokokken-Oberfläche zu binden. Hierzu zählen das Protein *Neutrale Phosphatase*^[9] und die Zellwand. Die Bindung an die

Zellwand ist abhängig von der D-Alanylierung der WTA^[58], ^[59]. Auf diese Weise können Eap-Ketten und ganze Staphylokokken-Aggregate entstehen^[56]. Studien mit Eap-KO-Mutanten konnten nachweisen, dass diese eine verringerte Affinität gegenüber eukaryotischem Gewebe zeigten^[18], nicht mehr zu Kolonisation und Gewebsinvasion in der Lage waren^[60] ^[61] und eine Wundheilung schneller zuließen als exprimierende Stämme^[62]. Ein weiterer Ligand von Eap ist das humane *intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)*, auch als *CD54* bekannt, das auf Gefäßendothelien exprimiert wird. Es dient der Extravasation von Leukozyten. Durch Bindung an dieses Protein, blockiert Eap die Migration der Leukozyten^[63]. *Eap* beschleunigt weiterhin die Internalisation von *S. aureus* in die Wirtszelle^[60]. Bioinformatische Analysen des Proteins sagten den Isoelektrischen Punkt bei pH = 10,5097 voraus, was bei einem physiologischen pH-Wert (7,40) eine positive Gesamtladung des Proteins bedeuten würde. Dies wiederum würde die Bindung negativgeladener Moleküle wie HS erleichtern. In Anbetracht der breiten Bindekapazität dieses Proteins, der Molekülmasse, die den Aussagen von Liang et al. entspricht, der übrigen Fähigkeiten von *Eap* und der positiven Ladung bei pH = 7,40 wurde im Rahmen dieser Arbeit seine Fähigkeit zur Heparansulfatbindung untersucht.

1.2.3.2. Immunodominant surface antigen B (IsaB)

Das zweite Protein, das in dieser Arbeit als mögliches HSbP untersucht werden sollte, ist das *immunodominant surface antigen B (IsaB)*. Es besitzt eine Molekülmasse von 19,5 kDa^[64] und stellt ein Homolog zu einem HSbP von *Staphylococcus epidermidis* dar^[65], ^[66], ^[67]. *IsaB* wird sekretiert und liegt als Zellwand-gebundenes, oberflächen-assoziiertes Adhäsion vor. Es besitzt ein N-terminales Signalpeptid, jedoch keinen LPXTG-Anker^[64]. Es lässt sich daher nicht direkt einem der beschriebenen Adhäsionstypen zuordnen. McCarthy und Lindsay untersuchten 2010 mehrere Stämme von *S. aureus* und zeigten, dass *IsaB* auf dem Genom aller Stämme codiert war^[68]. *IsaB* bindet Nucleinsäuren sequenzspezifisch, hierbei dsDNA stärker als ssDNA und diese stärker als

RNA^[64]. Bioinformatische Berechnungen sagten den Isoelektrischen Punkt für IsaB bei pH = 10,2294 voraus. Bei pH = 7,40 liegt IsaB als insgesamt positiv geladenes Protein vor. Dies unterstützt die Bindung negativ geladener Moleküle wie HS. Aufgrund seiner Eigenschaft, negativ geladene Moleküle zu binden, wegen seiner Oberflächenassoziation, seiner positiven Gesamtladung bei pH = 7,40 und seiner Homologie zu einem HSbP in *S. epidermidis* wurde IsaB auf seine Fähigkeit hin untersucht, HS zu binden.

1.2.4. Hypothese und Studiendesign

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der oben genannten Erkenntnisse folgende Arbeitshypothese aufgestellt:

Das *extracellular adherence protein (Eap)* und das *immunodominant surface antigen B (IsaB)* von *Staphylococcus aureus* binden Heparansulfate.

Ziel der Arbeit war es, die biochemische Bindung des HS Heparin an die beiden genannten Proteine Eap und IsaB zu beweisen. HS sind ubiquitäre Strukturen des menschlichen Organismus^[29] und werden von vielen bakteriellen Krankheitserregern ausgenutzt, um Adhärenz und Internalisation auszulösen. Die Bindung an und Interaktion mit HS durch *S. aureus* ist bereits bekannt. In dieser Arbeit sollen zwei möglicherweise hieran beteiligte Proteine vorgestellt werden.

1.3. WTA-abhängige Methicillin-Resistenz von *Staphylococcus aureus*

1.3.1. Methicillinresistenz in *Staphylococcus aureus*

Trotz der Entwicklung zahlreicher neuer antibiotischer Substanzen in den vergangenen Jahren, stellen β -Laktam-Antibiotika nach wie vor eine wichtige Wirkstoffgruppe in der Therapie vieler bakterieller Erkrankungen dar. Infektionen mit *S. aureus* werden mit diesen Stoffen häufig therapiert. Allerdings sind es gerade die β -Laktame gegen die immer mehr *S. aureus*-Stämme Resistenzmechanismen entwickelt haben (s. Kapitel 1.1.1.). Eine wachsende Anzahl Methicillin-resistenter Infektionen in den vergangenen Jahrzehnten zeigt die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien. Über die ersten *MRSA*-Fälle berichtete Patricia Jevons 1961 aus Großbritannien^[69]. Als Referenzantibiotikum wurde damals Methicillin verwendet. Heute werden Resistenznachweise mit dem Penicillinderivat Oxacillin durchgeführt.

MRSA stand ursprünglich für Stämme von *S. aureus*, die gegen Methicillin resistent waren. Oftmals liegen heute auch Resistenzen gegen andere Antibiotikaklassen vor, was die Therapie komplex gestaltet. In vielen Fällen muss auf Reserveantibiotika wie z.B. Vancomycin, Linezolid oder Daptomycin zurückgegriffen werden, um Infektionen mit *MRSA* effektiv therapieren zu können. Auch gegen diese Antibiotika wurden bereits Resistenzen festgestellt^[2]. Aufgrund des ausgeprägten Einsatzes antibiotischer Chemotherapien im klinischen Bereich, existiert heute ein erheblicher Unterschied zwischen dem Resistenzniveau ambulant und nosokomial erworbener *MRSA*-Stämme. Ihnen allen sind die in Kapitel 1.1.1. beschriebenen β -Lactamasen und veränderten Penicillinbindeproteine (PBP) gemein. Weitere Resistenzen werden durch Neumutationen, horizontalen Gentransfer und Plasmide erworben.

1.3.2. Wandteichonsäuren von *Staphylococcus aureus*

Grampositive Bakterien unterscheiden sich von gramnegativen durch ihre bis zu 80 nm dicke Zellwand, die vor allem der Formgebung, dem Schutz gegen die Umwelt und der Aufrechterhaltung des intrazellulären Drucks dient. Die Zellwand von *S. aureus* besteht zum großen Teil aus Murein. Dieses Polymer setzt sich aus repetitiven Disaccharideinheiten aus N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) zusammen, welche linear β_{1-4} -glykosidisch miteinander verbunden sind^[70]. Diese Längsstränge sind über Oligopeptidketten, welche an die MurNAc-Untereinheiten gebunden sind, untereinander quervernetzt. Diese Quervernetzung erzeugt die Stabilität der Zellwand und wird von Transpeptidasen katalysiert, welche als Penicillin-Bindeproteine (PBP) bekannt sind^[1]. In das Peptidoglycan eingelagert sind Lipoteichoinsäuren (LTA) und Wandteichoinsäuren (WTA). Letztere sind über eine Phosphodiesterbindung kovalent an die C₆-Hydroxylgruppe der MurNAc-Untereinheiten des Peptidoglykans gebunden. LTA erreichen den periplasmatischen Raum^[11], WTA die Oberfläche des Mureins^{[12], [71]}.

1.3.2.1. Struktur und Synthese der Wandteichoinsäure

WTA von *S. aureus* bestehen aus einer "*linkage unit*" und einer Hauptkette ("*main chain*"). Die *linkage unit* ist während der Synthese über Bactoprenyl an die Zellmembran gebunden und besteht aus je einem Molekül GlcNAc-1-Phosphat, ManNAc und 2 Glycerolphosphatresten^[72]. Die *main chain* ist ein Polyribitolphosphat von 20 – 40 Untereinheiten Länge, das durch D-Alanyl- und N-Acetylglucosaminreste modifiziert wird^{[71], [73], [74]}. Abb. 3 zeigt den Aufbau der üblichen WTA in *S. aureus*.

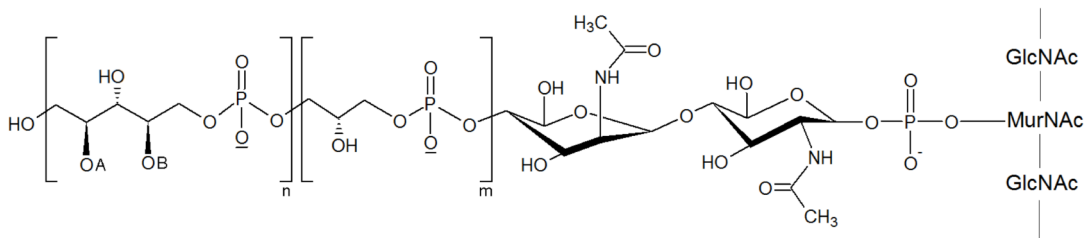


Abb. 3: Strukturformel der WTA in *S. aureus*
 A = D-Alanin; B = α - / β -GlcNAc; m = 1-3; n = 20-40

Die Synthese der WTA gliedert sich in sieben Schritte. Diese werden in Abb. 4 gezeigt und durch Tab. 4 erläutert. Glycerolphosphat (Gro-P)-haltige WTA wird durch Proteine mit der Bezeichnung *teichoic acid glycerol (tag)* synthetisiert, Ribitolphosphat (RboP)-haltige WTA durch Enzyme mit der Bezeichnung *teichoic acid ribitol (tar)*. *S. aureus* synthetisiert fast ausschließlich Rbo-P-haltige WTA^[75]. Es werden daher alle Enzyme mit *tar* bezeichnet, obgleich die

Tab. 4: Syntheseschritte der WTA von *S. aureus* und beteiligte Enzyme

	Bezeichnung	Beschreibung	Enzyme	
1	Ankersynthese	Synthese des Bactoprenyl-GlcNAc-P-ManNAc-Ankers	TarO, TarA	[72]
2	Gro-P-Synthese	Anhängen von 2 Molekülen Glycerolphosphat (GroP)	TarB, TarF	[72]
3	Poly-Rbo-P-Synthese	Synthese des Polyribitol-phosphat (RboP)-Moleküls	TarK, TarL	[72]
4	Glykosylierung	Modifikation des Poly-RboP-Schwanzes mit α -/ β -O-GlcNAc	TarM, TarS	[6], [79]
5	Flipping	Transport der WTA auf die äußere Seite der Zellmembran	TarG, TarH	[72]
6	D-Alanylierung	Modifikation des Poly-RboP-Schwanzes mit D-Alanin	DltABCD	[80]
7	Verankerung	Verankerung der WTA an MurNAc des Peptidoglycans	TarTUV	[76], [77], [78]

ersten Syntheseschritte beider WTA-Arten von denselben Enzymen katalysiert werden. Die in Tab. 4 nicht genannten Enzyme MnaA, TarD, TarJ und TarI dienen der Bereitstellung der benötigten Substrate. MnaA synthetisiert UDP-ManNAc für Schritt 1^[81], TarD das CDP-Glycerol für Schritt 2. Tar J erzeugt Ribulose-5-Phosphat, welches von TarI zu CDP-Ribitol für Schritt 3 umgewandelt wird^[72]. Hinter der Mureinverankerung werden der TarTUV-Komplex^[76] bzw. Proteine der LytR-Cps2A-Psr (LCP)-Familie^{[77], [78]} vermutet.

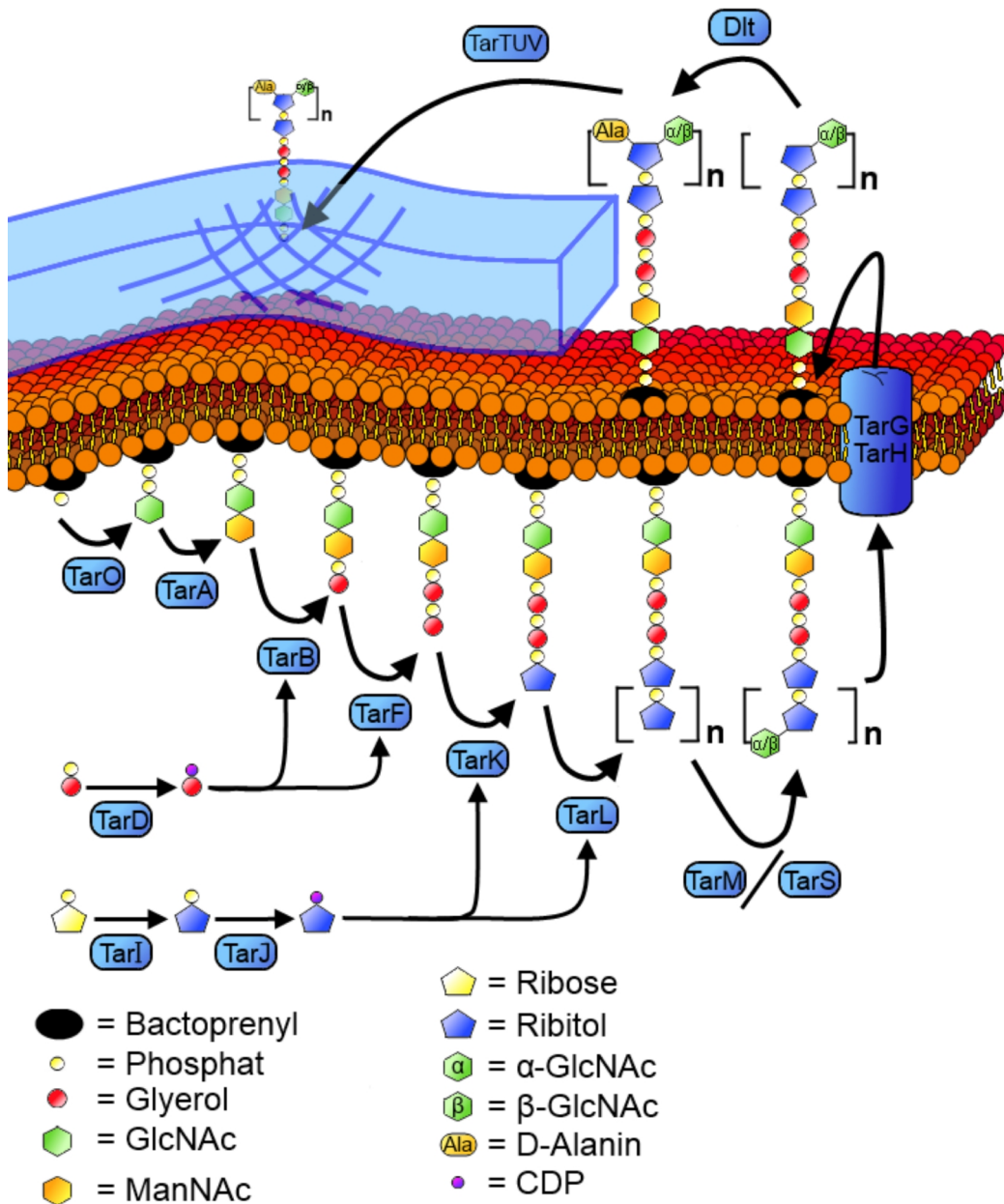


Abb. 4: Schematische Darstellung der WTA-Synthese in *S. aureus*.

Auf dem Genom von *S. aureus* liegen die Gene der Tar-Enzyme regional organisiert als Cluster vor. Qian et al. vermuteten 2006 unterschiedliche regulatorische Mechanismen für die verschiedenen Cluster^[75]. Die Gene der für die Glykosylierung verantwortlichen Enzyme TarM und TarS liegen in verschiedenen Clustern. Während TarS im selben Cluster codiert ist wie TarF, TarI, TarJ und TarL, liegt TarM in einer eigenen Region des Genoms^[82] (Abb. 5).

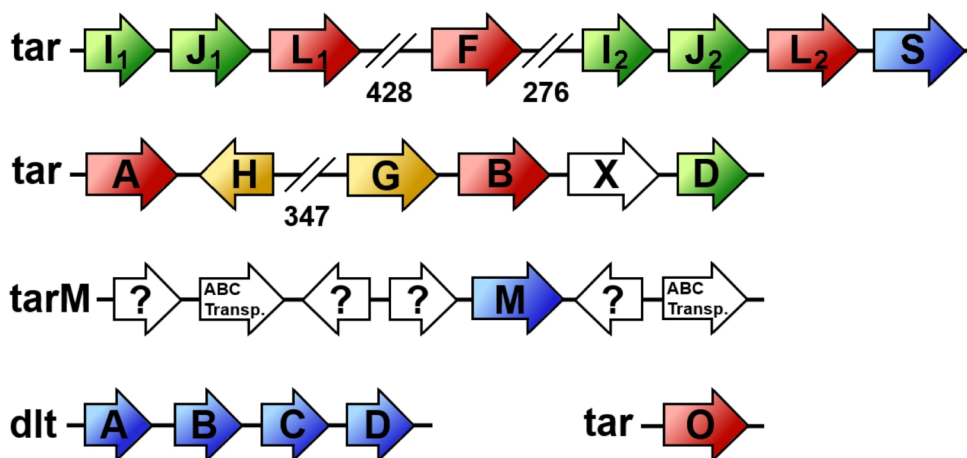


Abb. 5: Organisation der tar-Cluster mit unabhängig lokalisierten Regionen für dlt und tarO (nach Winstel V. et al.^[79] und Swoboda et al.^[72])

1.3.2.2. Glykosylierung der Wandteichonsäure

Der Weg bis zur Identifikation der GlcNAc-Transferasen TarM und TarS führt vom ersten Bericht über β -GlcNAc-Transferasen-Aktivität im *S. aureus*-Stamm Copenhagen 1963^[83] bis zur Entdeckung der Mutante *S. aureus* RN4220 K6 durch Xia et al 2010. Diese Mutante besaß eine Transposon-bedingte Mutation in einem Gen, die die Synthese α -O-GlcNAc-substituierter WTA verhinderte und die Mutante resistent gegen Serogruppe B-Phagen machte. Die Komplementierung mit dem Wildtyp des *tarM* genannten Gens, befähigte die Mutante zur Synthese α -O-GlcNAc-substituierter WTA und machte sie wieder phagensensibel. Hieraus wurde der Schluss gezogen, dass *tarM* für eine α -O-GlcNAc-Transferase codiert^[82].

Das Vorhandensein von β -O-GlcNAc-modifizierter WTA wurde von Brown et al. 2012 so gedeutet, dass mindestens eine weitere GlcNAc-Transferase in *S. aureus* vorhanden sein musste. Sequenzanalysen des Genoms der Mutante K6 und *in vitro*-Versuche mit den in Frage kommenden Enzymen führten zu dem Schluss, dass TarS die gesuchte β -O-GlcNAc-Transferase sei^[6].

Wie Abb. 4 zeigt, findet die Glykosylierung der WTA innerhalb der Bakterienzelle statt. Sie wird über die Enzyme TarM und TarS vermittelt. TarM katalysiert, wie oben beschrieben, die Glykosylierung des Polyribitolphosphats mit α -O-GlcNAc^[82], TarS jene mit β -O-GlcNAc^[6]. Es entstehen WTA mit unterschiedlich hohem Verhältnis an substituiertem α - und β -O-GlcNAc. So synthetisiert der Stamm MW2 zum Beispiel ungefähr gleiche Mengen α - und β -GlcNAc-haltiger WTA^[6].

1.3.2.3. Funktion der Wandteichonsäure und ihrer Glykosylierung

WTA machen bis zu 60% der Trockenmasse der Zellwand von *S. aureus* aus^[72]. Mutanten, die aufgrund einer tarO-Deletion keine WTA synthetisieren können, sind *in vitro* lebensfähig. Jedoch sind unter anderem Zellteilung^[6] und Lokalisation des PBP4^[26] beeinträchtigt. Weiterhin sind WTA essenziell für die Adhäsion von *S. aureus* an Epithelien^[15] und Endothelzellen^[16]. WTA dienen außerdem als Serogruppe B-Phagenrezeptor^{[28], [85], [86]} und beeinflussen über ihre D-Alanylation die Interaktion des Adhäsins Eap^[59] mit der Zellwand. WTA erzeugen als anionische Glykopolymere ein negatives Ladungsniveau der Zelloberfläche^[87]. Das Niveau der D-Alanylation hat Einfluss auf die Empfindlichkeit von *S. aureus* gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden wie Defensinen^[80] und beeinflusst die Empfindlichkeit gegenüber Glykopeptid-Antibiotika^{[88], [89]}.

Die Glykosylierung der WTA von *S. aureus* wurde in den vergangenen Jahren intensiv untersucht und ihre Rolle für verschiedene Prozesse dargestellt. So ist die oben genannte Rezeptorfunktion für Serogruppe B-Phagen von der

Glykosylierung der WTA abhängig. Die GlcNAc-Reste der WTA dienen der Adsorption der Phagen, die dabei nicht zwischen den beiden GlcNAc-Anomeren unterscheiden. Mutanten, die ihre WTA weder durch α - noch β -O-GlcNAc modifizieren können, entwickeln so eine Phagenresistenz^{[6], [82], [90]}. Eine weitere Rolle spielt die Glykosylierung der WTA für die Resistenz von bestimmten MRSA-Stämmen gegenüber β -Lactam-Antibiotika. Für komplett WTA-defiziente MRSA-Stämme ist bereits eine Empfindlichkeit gegenüber Methicillin bekannt^{[91], [92], [93]}. Während der Verlust der Fähigkeit zur D-Alanylierung oder der α -O-GlcNAc-Transferase-Aktivität auf die β -Lactam-Resistenz der untersuchten Stämme keine Auswirkung hatte, wurden β -O-GlcNAc-defiziente MRSA-Stämme wieder empfindlich gegenüber β -Lactam-Antibiotika^[6]. Der hierfür verantwortliche Mechanismus ist bisher unbekannt. Die Beziehung zwischen der WTA und dem *PBP2a* oder *PBP4*^[26] könnte eine Erklärung für dieses Verhalten sein. Brown et al. postulierten die Vermutung, dass die WTA glykosylierungsabhängig Einfluss auf den Aufbau des Mureins haben und hier als Gerüststruktur dienen könnte^[6]. Weitere Vermutungen sehen die Rolle der WTA-Glykosylierung für das Mikromilieu der Zellwand als Ursache für das Wiederauftreten der Methicillin-Sensibilität^[79].

1.3.3. Hypothese und Studiendesign

Die bisherigen Studien zur Abhängigkeit der Methicillin-Resistenz von *S. aureus* von der Glykosylierung der WTA wurden an einigen wenigen Stämmen dieses Bakteriums durchgeführt. So entstanden die Ergebnisse von Brown et al. mit dem in Laboren häufig und seit Jahren verwendeten Stamm *S. aureus* RN4220 und dem *Community-acquired(CA)-MRSA*-Stamm MW2^[6]. Im klinischen Alltag wird eine Vielzahl antibiotischer Chemotherapeutika eingesetzt, denen *Hospital-acquired(HA)-MRSA*-Stämme ständig ausgesetzt sind. Sie unterliegen daher einem höheren Selektionsdruck als Labor- und *CA-MRSA*-Stämme. Um den bisherigen Ergebnissen die Erkenntnisse über einen *HA MRSA*-Stamm hinzuzufügen, fokussierte diese Studie den Blick auf den Stamm *S. aureus*

COL. Es wurde angenommen, dass solche Stämme ein wesentlich höheres Resistenzniveau erreicht haben als Laborstämme und *CA-MRSA*-Stämme und die Glykosylierung der Wandteichonsäuren bei diesen Stämmen daher weniger Einfluss auf ihre Resistenz gegenüber Methicillin hat. Die Hypothese lautete daher:

Der Einfluss der Glykosylierung der Wandteichonsäuren auf die Resistenz von *Staphylococcus aureus* gegenüber Methicillin ist stammabhängig.

Um die Hypothese zu belegen, wurde geplant, *tarM*- und *tarS*-defiziente Mutanten des Stammes *S. aureus* COL anzufertigen. Es sollte anschließend die minimale Hemmkonzentration von Oxacillin (heutiger Nachfolger des Methicillin) auf das Wachstum dieser Mutanten in Flüssigkultur bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborgeräte

Tab.5: Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Anlage für deionisiertes H ₂ O	Millipore
Brutschrank Function Line, 37° C	Heraeus
Brutschüttler Unitron, 37°	Infors
Bunsenbrenner Fuego Basic RF	WLD-tec
Desinfektions-Dosierungsgerät	Schülke & Mayr
Durchleuchter slimlite	Rex Leuchtsysteme
Eismaschine AF100	Scotsman
Elektropipette Easypet	Eppendorf
Elektroporator Multiporator	Eppendorf
Feinwaage CPA225D-0CE	Sartorius
Feinwaage EW1500-2M	Kern
Fotoentwickler Curix 60	AGFA
Gefrierschrank -Premium No Frost, -20° C	Liebherr
Gefrierschrank HeraFreeze, -80° C	Thermo electron Corp.
Gel-Transluminator BioDocAnalyse	biometra
Gelelektrophoresekammern Compact M	biometra (analytikjena)

Tab. 5: Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Kühlschrank soft plus	Thermo Cryotechnics
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph
Mikrowellenofen Micromat	AEG
NanoPhotometer	Implen
pH-Meter pH Level 2	InoLab
Photometer Genesys 10vis	Thermo Scientific
Research Plus – Pipetten, versch. Volumina	Eppendorf
Rollschüttler RM5-V	M. Zipperer GmbH
Scanner Perfection 3200	Epson
Schüttler Unimax 1010	Heidolph
SDS – Gel – Tank MiniProtean	BioRad
Sterilbank HeraSafe KS 18	Thermo Scientific
Stromquelle EPS 301	Amersham Biosciences
Systemec 2 Autoklav 5075EL	Tuttnauer Autoclave Systems
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Tischzentrifuge MiniSpin plus	Eppendorf
Ultraschallstab Sonifirt 250	Branson
Vakuum-Zentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf
Vortex Reax Control	Heidolph
Wasserbad, Typ 1083	Gesellschaft für Labortechnik
Western Blot – Tank	BioRadx

2.1.2. Kits und zusätzlich verwendete Reagenzien

Tab. 6: Kits zur Plasmid- und Genom-Isolation und zur DNA-Reinigung

Kit – Name	Hersteller
peqGOLD Plasmid Miniprep	peqLab
GeneJET Plasmid Miniprep	Fermentas
QIAprep Spin Miniprep	QIAGEN
innuPREP Plasmid Mini	analytikjena
peqGOLD XChange Plasmid Midi	peqLab
DNA Clean & Concentrator	Zymo Research
Gel Recovery Kit	Zymo Research
NucleoSpin Tissue	Macherey-Nagel
Lysostaphin, 1550 U/mg, 1mg/ml	Genmedics

2.1.3. Einzelprodukte und Verbrauchsmaterial

Tab. 7: Einzelreagenzien und Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
15 ml Cellstar Tubes	Greiner
50 ml Polypropylene Conical Tube	BD Biosciences
Schottflaschen, Durantyp, versch. Volumina	Schott
Schikane – Kolben, versch. Volumina	Simax
Elektroporationsküvette rot, 1 mm gap	peqlab
Impfösen, Pipettenspitzen, Reagenzgläser	

2.1.4. Kulturmedien, Antibiotika, Langzeitaufbewahrung der Bakterien

Tab. 8: Kulturmedien und Antibiotika

Kulturmedien	Zusammensetzung
Difco LB Broth Lennox, BD Biosciences	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Trypton 5 g/l NaCl H ₂ O Millipore, autoklaviert pH 7,0 (1 N NaOH) ggf. 1,5 % AgarAgar
BM Broth (Basic Medium)	10 g Caseinhydrolysat Pepton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 1 g Glucose 1 g K ₂ HPO ₄ pH 7,2 H ₂ O auf 1 l Gesamtvolumen
Müller-Hinton Broth +2 % NaCl	30 % Rindfleischaufguss 1,75 % Casein 0,15 % Stärke (1,7 % AgarAgar) 2,0 % NaCl pH 7,0

Tab. 8: Kulturmedien und Antibiotika

Antibiotika (stock solution)	Konzentration
Chloramphenicol	10 mg/ml in H ₂ O
Anhydrotetracyclin	1 bzw 2 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin	25 mg/ml in H ₂ O

Zur Langzeitaufbewahrung von Bakterien über mehrere Monate wurde folgendes Gefriermedium verwendet:

Tab. 9: Gefriermedium

Medium	Zusammensetzung
Gefriermedium	65 % Glycerin 100 mM MgSO ₄ 25 mM TrisHCl pH 8,0

2.1.5. Primer

Tab. 10: Primer

Primer (Biomers.net)	Sequenz	Referenz
IsaB-C-His-NcoI (f)	5' ATC GCC ATG GGT AAT AAA ATT TTC AAA GTA TAT TGC AAT AGC A 3'	Diese Arbeit
IsaB-C-His-XhoI-rc	5' ATC GCT CGA ATT TAC TTG TTT TGA TAT GGT GTA TGT C 3'	Diese Arbeit

Tab. 10: Primer

Primer (Eurofins MWG)	Sequenz	Referenz
eap C-His up Xho I	5' GGT GCT CGA GTT TAT TTT TTT TTG ATT TAG TG 3'	Diese Arbeit
eap C-His down Pag I	5' GCT ATC ATG AAA TTT AAG TCA TTG ATT AC 3'	Diese Arbeit
Typing-Primer	Sequenz	Referenz
tagE4-801 up (tarM)	5' GGT AAC GCC ATA ATA ATA AAA GA 3'	[6]
tagE4-801 dn (tarM)	5' GCT GGA AGA AAT GGC TAC A 3'	[6]
tagY2676 up (tarS)	5' AAA CCG ATA TTC CAT TCT ACG 3'	[6]
tagY2676 dn (tarS)	5' GTC CGC CAC AAC AAAA 3'	[6]

2.1.6. Reagenzien zur Plasmidkonstruktion

Tab. 11: Reagenzien zur PCR

Reagenzien	Hersteller
5x Phusion HF Reaction Buffer	Finzymes
dNTP Mix, 10 mM	Fermentas
Phusion Hot Start HF Polymerase	Thermo Scientific
template DNA	Genomisolat aus <i>S. aureus</i> , SA113

Tab. 12: Reagenzien zur Gel-Elektrophorese

Reagenzien	Hersteller
Seakem LE Agarose	Lonza
GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 0,1 µg/µl	Fermentas
0,1 % Methylenblau	Merck Millipore
6x DNA Ladepuffer	Thermo Scientific
1 µg/ml Ethidiumbromid	AppliChem
50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	2,0 M TrisHCl (242,28 g) 0,1 M EDTA (37,22 g) 1,0 M Eisessig (57,5 g) pH = 8,2 (eingestellt mit 99% Eisessig) H ₂ O auf 1 l Gesamtvolumen

Tab. 13: Reagenzien zur Restriktion

Enzyme / Reagenzien	Hersteller
10 x NEBuffer II	New England BioLabs
Nco I (10 U/µl)	Fermentas
Nhe I (10 U/µl)	Fermentas
Pag I (10 U/µl)	Fermentas
Xho I (10 U/µl)	Fermentas

Tab. 14: Reagenzien zur Ligation

Reagenzien	Zusammensetzung
T4 DNA Ligase (5 U/ μ l)	Fermentas
10x Ligationspuffer	Fermentas

Tab. 15: Reagenzien zur Colony-PCR

Colony - PCR	Hersteller
illustra PuReTaq Ready-To-Go PCR beads	GE Healthcare

2.1.7. Bakterienstämme

Tab. 16: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Plasmid	Hersteller / Referenz
<i>E. coli</i> TOP10		Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET28a (+)	Stamm: Lucigen Plasmid: Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET28a-eap	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> C43		Lucigen
<i>E. coli</i> C43	pRARE	Stamm: Lucigen Plasmid: Novagen
<i>E. coli</i> C43	pRARE; pET28a-eap	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> C43	pRARE; pET28a-isaB	Diese Arbeit
<i>S. aureus</i> RN4220		Laborstamm
<i>S. aureus</i> RN4220	pKO-tarS	Laborstamm
<i>S. aureus</i> RN450	pKO-tarM	Laborstamm
<i>S. aureus</i> COL		Laborstamm
<i>S. aureus</i> COL	Δ tarM	Diese Arbeit
<i>S. aureus</i> COL	Δ tarS	Diese Arbeit

2.1.8. Reagenzien zur Überexpression, SDS-PAGE, Western Blot und Heparansulfat-Pull-Down-Assay

Tab. 17: Reagenzien zur Überexpression

Reagenzien zur Überexpression	Hersteller / Bestandteile
Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranosid (IPTG), Dioxan frei	Fermentas
DNAse I, RNAse-free	Fermentas
Chicken Egg White Lysozyme Solution (10 mg/ml)	Novagen
Proteoblock Protease Inhibitor	Fermentas
cOmplete ULTRA Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH
Lysispuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol in H ₂ O, pH 7,4
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol in H ₂ O, pH 7,4
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 500 mM Imidazol in H ₂ O, pH 7,4
Low-binding Durapore PVDF membrane	Millipore
Ni NTA Resin Superflow	QIAGEN
Austauschpuffer	TrisHCl in H ₂ O, pH 7,4

Tab. 18: Reagenzien zur SDS-PAGE

Reagenzien zur SDS-PAGE	Hersteller / Zusammensetzung
30 % Acrylamid	Carl Roth
Trenngelpuffer	1,5 M TrisHCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	1 M TrisHCl, pH 6,8
SDS 20 %	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	Serva
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
4x SDS – Ladepuffer (Laemmli – Puffer), modifiziert mit DTT anstatt β -Mercaptoethanol	0,25 M TrisHCl, pH 6,8 40 % Glycerol 4 % SDS 0,04 % Bromphenolblau 0,2 M DTT
SDS - Laufpuffer	0,5 M TrisHCl 1,92 M Glycin 0,5 % SDS
25 % Isopropanol	Carl Roth
SDS Marker Ladder #0660	Fermentas
6xHis Protein Ladder	QIAGEN
Coomassie Brilliantblau Lösung	0,25 % Coomassie Brilliant Blau R250 (Applichem) 10 % Essigsäure 50 % Methanol 39,75 % H ₂ O
Essigsäure 100 %	Merck
Ponceau-Rot 1 % in 3 % TCA	MTA-Team AGP

Tab. 19: Reagenzien zum Western Blot

Reagenzien zum Western Blot	Hersteller / Zusammensetzung
10x Western Blot Laufpuffer	30,3 g TrisHCl 144,0 g Glycin 2,0 g SDS 1 l H ₂ O Millipore
Blotting Sheet Papers	Munktell
Protran BA 85 Nitrocellulose	Whatman GmbH
Starting Block Blocking Buffer	Pierce
Tris Buffered Saline (TBS)	1,5 M NaCl 30 mM KCl 250 mM Tris 1 l H ₂ O pH 7,4
Tween Tris Buffered Saline (TTBS)	1,5 M NaCl 30 mM KCl 250 mM Tris 0,5% Tween 1 l H ₂ O pH 7,4
Magermilchpulver	MTA-Team AGP, selbst abgefüllt
Maus Penta-His Antikörper	QIAGEN
Ziege anti-Maus Antikörper IgG (HRP)	Merck Millipore
ImmunoCruz Western Blotting Luminol	Santa Cruz Biotechnology Inc.

Tab. 20: Reagenzien zum Heparansulfat-Pull-Down-Assay

Reagenzien zum Heparansulfat-Pull-Down-Assay	Hersteller / Zusammensetzung
Lysispuffer	TrisHCl, pH 7,400
Heparin-Beads	Adar Biotech

2.1.9. Knockout-Vektoren

Zum Knockout der Gene tarM und tarS wurden folgende Plasmidvektoren verwendet:

Tab. 21: Verwendete Knockout-Vektoren

Vektor	Referenz
pKO-tarM	[6]
pKO-tarS	[6]

2.2. Methoden

2.2.1. Resuspension lyophilisierter Primer und PCR

Bei der Polymerase Chain Reaction handelt es sich um ein Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Proben. Die Primer für die zu klonenden Gene wurden digital anhand des Genoms des Stammes *S. aureus* SA 113 geplant. Die von der Firma Eurofins lyophilisiert gelieferten Primer (s. 2.1.5) wurden auf 100 pmol/ μ l resuspendiert. Je Primer wurden 100 μ l 1:10 verdünnte Arbeitslösung hergestellt. 100 μ l PCR-Reaktionsansatz beinhalteten:

20 μ l 5x Puffer

2 μ l dNTPs

2 μ l Primer (je 1 μ l Upstream- und Downstream-Primer)

1 μ l template-DNA (genomische DNA des Stammes *S. aureus* SA113)

1 μ l High Fidelity Polymerase

74 μ l H₂O Millipore

Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler durchgeführt:

1. Denaturierung 94° C, 10 min
2. 30 Zyklen Amplifikation 94° C, 1 min
52° C, 30 s (Annealing)
72° C (Extension),
 - ▶ 30 s bei isaB (528 bp)
 - ▶ 60 s bei eap (1755 bp)
3. nochmalige Extension 72° C, 10 min
4. Kühlung 4° C bis zur Probenentnahme

2.2.2. Colony-PCR

Die Colony-PCR diente dem Nachweis des erfolgreichen Knockouts von Genen. Es wurden PCR-Beads der Firma GE Healthcare verwendet, denen lediglich 25 µl H₂O Millipore, 1 µl von jedem Primer (s. Tab. 10, Typing Primer) und die template-DNA zugefügt werden mussten. Auf eine separate DNA-Isolation aus den Klonen wurde verzichtet, stattdessen wurden 5 µl Übernachtskultur direkt zu den Beads pipettiert. Die PCR wurde nach folgendem Programm durchlaufen:

1. Denaturierung 98° C, 10 min
2. 30 Zyklen Amplifikation 98° C, 1 min
52° C, 30 s (Annealing)
72° C, 60 s (Extension)
3. nochmalige Extension 72° C, 10 min
4. Kühlung 4° C bis zur Probenentnahme

Während der anfänglichen, zehnmütigen 98° C-Phase wurden die Bakterien thermisch aufgeschlossen und ihre DNA denaturiert.

2.2.3. DNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten diente das Kit „ZymoSpin DNA Clean & Concentrator“ der Firma ZymoResearch. Die Aufreinigung nach Restriktionsverdau wurde durch Gelelektrophorese erreicht (Gelaufbau und Elektrophorese s. 2.2.2). Gele wurden mit Methylenblau gefärbt und mit H₂O entfärbt. Methylenblau enthaltende Banden wurden ausgeschnitten, gewogen und die enthaltene DNA mit dem Kit „Gel Recovery Kit“ der Firma ZymoResearch mittels chaotroper Lösungen extrahiert. Alle Schritte erfolgten gemäß Herstellerangaben.

2.2.4. Plasmidisolaton

Zur Plasmid-Isolation wurden je nach Verfügbarkeit Kits unterschiedlicher Firmen verwendet (s. Tab. 6, Zeilen 1 - 5). Herstellerangaben wurden eingehalten. Kulturen von *S. aureus* wurden zuvor mit 10 mg/ml Lysostaphin für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 230 nm Wellenlänge. Lagerung fand bei -20° C statt.

2.2.5. Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden, falls nicht anders vermerkt, stets über 1,0% oder 1,5% Agarosegele elektrophoretisch bei 130 V und 400 mA aufgetrennt. Als Längenreferenz wurden je 10 µl GeneRuler 1 kb DNA Ladder verwendet. Es wurden je 20 µl Probe-Ladepuffer-Gemisch eingesetzt.

2.2.6. Restriktionsverdau

Zur Restriktionsverdau bei 37° C für 60 min wurde folgender Ansatz verwendet:

8 µl DNA (Genamplifikat / Plasmidisolat)

je 1 µl Restriktionsenzym 1 & 2

2 µl NEBuffer II

8 µl H₂O Millipore

2.2.7. Ligation

Ligationsansätze wurden nach folgender Formel errechnet:

$$m_{\text{Fragment}} = 3 \times m_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \left(\frac{\text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]} \right)$$

Die eingesetzte Masse an Fragment variierte, da sie in Abhängigkeit von der verfügbaren Masse an Vektor berechnet wurde. Zur Inkubation über Nacht bei 4° C wurden die Ligationsansätze nach folgendem Schema pipettiert:

Tab. 22: Ligationsansatz

Ansatz	Volumen / Masse
Insert	m_{Fragment}
Vektor	m_{Vektor}
T4 Ligase	1 μl
10 x T4 Puffer	1 μl
H2O	auf 40 μl

2.2.8. Herstellung elektrokompeter Zellen

Zur Herstellung elektrokompeter Zellen wurde über Nacht eine Kultur in LB-Medium für E. coli-Stämme, beziehungsweise BM-Medium für S. aureus-Stämme bei 37° C gezüchtet. Diese wurde dann mit einer Ziel- $OD_{578} = 0,1$ in 50 ml frisches Medium überimpft und erneut bei 37° C bis zu einer $OD_{578} = 0,6$ wachsen gelassen. Die Zellen wurden dreimal in 30 ml einer 4° C kalten 10 % Glycerinlösung in H₂O resuspendiert und dazwischen jeweils bei 5000 g abzentrifugiert, um alle Verunreinigungen auszuwaschen. Im Anschluss wurden die Bakterien ein viertes Mal in 200 μl derselben Lösung resuspendiert, um dann zu je 50 μl auf Eppendorf-Tubes aufgeteilt zu werden. Lagerung erfolgte bei -80° C.

2.2.9. Transformation

2.2.9.1. Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Für Transformationen des Stammes *E. coli* TOP 10 wurde die Hitzeschockmethode angewandt, bei der die käuflich erworbenen, chemokompetenten Zellen zuerst auf Eis aufgetaut und anschließend für 5 min mit 10 – 20 µl Plasmid auf Eis inkubiert wurden. Danach kam die Kultur für 1 min in den 42° C warmen Heizblock, um den Hitzeschock zu induzieren. Den Zellen wurde 1 ml auf 37° C vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und diese für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Es wurden 100 und 200 µl 1:1 und 100 µl 1:10 verdünnte Bakterienkultur auf antibiotikahaltigem Nährboden, der der Plasmidresistenz entsprach, ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.2.9.2. Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Transformationen der Stämme *E. coli* BI21 und C43 wurden mittels Elektroporation durchgeführt. Hierfür wurden die elektrokompetenten Zellen 5 min auf Eis aufgetaut und dann 1 min mit 10 – 20 µl Plasmid inkubiert. Der Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und bei 1.200 V für 5 ms elektroporiert. Sofort wurde auf 37° C vorgewärmtes LB-Medium zugegeben. Die Ansätze wurden für 60 min bei 37° C zur Expression der Resistenzgene inkubiert, anschließend wie die mit Hitzeschock behandelten Kulturen auf entsprechenden Antibiotika-haltigen Nährböden ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.2.9.3. Transformation von *S. aureus* mittels Elektroporation

Bei der Transformation von *S. aureus* kam die Elektroporation mit denselben Schritten wie bei *E. coli* zum Einsatz. Anstatt LB- wurde BM-Medium verwendet, welches auf lediglich 30° C vorgewärmt wurde, weil es sich beim eingesetzten

Plasmid um Knockout-Vektoren handelt. Die niedrigere Temperatur wurde verwendet, um einem unkontrollierten Einbau der Knockout-Kassetten in das Staphylokokkengenom entgegenzuwirken. Die Ansätze wurden für 120 min bei 30° C zur Resistenzexpression inkubiert, auf Antibiotika-haltigen Nährböden ausplattiert und bei 30° C über Nacht inkubiert.

2.2.10. Plasmidsequenzierung

Isolierte und gereinigte Plasmidkonstrukte wurden durch GATC Biotech sequenziert und anschließend mit der Software "DNASTAR Lasergene 7" auf ihre Korrektheit überprüft.

2.2.11. Proteinüberexpression

Die optische Dichte von über Nacht angezüchteten Kulturen der überexprimierenden Stämme *E. coli* C43:pET28a-eap und -isaB wurde bei 578 nm Wellenlänge (OD_{578}) bestimmt und in 100 ml frischem LB-Medium eine $OD_{578} = 0,2$ eingestellt. Diese neuen Ansätze wurden bei 37° C bis zu einer $OD_{578} = 0,6$ herangezüchtet. 1 mM IPTG wurde den Kulturen nun zur Induktion der Proteinexpression zugegeben und diese weitere 2 Stunden bei 37° C inkubiert.

2.2.12. Proteinaufreinigung

Die Proteinaufreinigung erfolgte mittels His-Tag-Markierung der überexprimierten Proteine. Ein C- bzw. N-terminal situierter Anhang aus 6 Histidin-Molekülen diente der Bindung an Ni-NTA-Moleküle in der eingesetzten Säule. Diese Bindung wurde nach der Aufreinigung durch einen Elutionspuffer unterbrochen und die Proteine so aufgereinigt isoliert.

Die Bakterienkulturen wurden in einem ersten Schritt verdaut und

aufgeschlossen. In einem zweiten Schritt wurden dann die Proteine selektiv mittels ihres His-Tags über eine Säule isoliert. Die Pufferkonzentrationen und Arbeitsschritte wurden dem Handbuch "QIAExpressionist" der Firma QIAGEN entnommen. Zuerst wurde die Kultur direkt nach der Überexpression 10 min bei 5.000 g abzentrifugiert. Pro Gramm Zellnassgewicht wurden 2,5 ml Lysepuffer zugegeben und die Zellen darin resuspendiert. Danach wurden 1:100 Protease Inhibitor Cocktail und eine Spatelspitze Lysozym hinzugefügt. Pro Proteinprobe wurden zusätzlich 20 µl DNase I zupipettiert. Anschließend wurden die Ansätze für 1 h auf Eis bei 150 rpm geschüttelt. Das so entstandene Lysat wurde in Eppendorf Tubes überführt und für 30 min bei 16.000 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde in 15 ml fassende Falcontubes pipettiert und je 200 µl Ni-NTA Resin pro ml Lysat zugegeben. Dies wurde für 1 h bei 4° C auf dem Rollschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf Millipore Durapore PVDF-Säulen überführt. Die nun folgenden Zentrifugationen wurden alle über je 5 min bei 1.000 g und 4° C durchgeführt. Zuerst wurde das Lysat abzentrifugiert, so dass nur noch die Resinbeads mit daran gebundenen Proteinen auf der Säule vorhanden waren. Danach wurde die Säule 3x mit je 1 ml Waschpuffer gereinigt und anschließend 2x mit je 500 µl Elutionspuffer die Proteine von den Resinbeads gelöst. Dies geschah mittels einer Konzentration von 500 mM Imidazol im Elutionspuffer, welche die Bindung zwischen Ni-NTA und dem His-Tag unterbrach.

2.2.13. Untersuchung der Proteinlöslichkeit

Die Untersuchung der Proteinlöslichkeit erfolgte den Herstellerangaben des "QiaExpressionist" gemäß. Die Überexpression wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Nach 2 Stunden wurden die Bakterienzellen geerntet und bei 4° C und 5.000 g 20 min lang abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Lysepuffer resuspendiert, erneut abzentrifugiert und nochmals in 5 ml Lysepuffer resuspendiert. Es folgte die Zugabe einer Spatelspitze Lysozym, 20 µl DNase I und 1:100 Protease Inhibitor Cocktail. Nach einer Inkubation für 30

min auf Eis bei 150 rpm auf dem Schüttler wurde der Zellaufschluss mittels Ultraschallstab vervollständigt. Das Lysat wurde danach für 25 min bei 4° C und 10.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein 15 ml Falcon-Tube überführt. Dies stellte die Probe für die löslichen Proteine dar. Das Pellet wurde in 5 ml Lysepuffer resuspendiert, was die unlösliche Phase darstellte. Von beiden Proben wurden je 12,5 µl mit 50 µl Laemmli-Puffer gemischt und 10 min bei 99° C im Heizblock gekocht. Danach wurde eine SDS-PAGE und nachfolgend ein Western Blot der Proben angefertigt.

2.2.14. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde eingesetzt, um überexprimierte Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. SDS-Gele setzten sich zusammen aus einem 5 % Sammelgel auf einem 12 % Trenngel in einer 1 mm weiten Glaskammer. Nach Zusatz von TEMED wurde das Trenngel direkt gegossen

Tab. 23: Mengenangaben für 4 SDS-Gele

12 % Trenngel	5 % Sammelgel
6,6 ml H ₂ O	2,7 ml H ₂ O
8,0 ml 30 % Acrylamid	0,67 ml 30 % Acrylamid
5,0 ml Trenngelpuffer	0,5 ml Sammelgelpuffer
200 µl 10% SDS	40 µl 10% SDS
200 µl 10% APS	40 µl 10% APS
8 µl TEMED	4 µl TEMED

Proben wurden während der Überexpression, Aufreinigung und Heparinbindung der untersuchten Proteine genommen. Hierzu wurden je 50 µl Probe mit 12,5 µl 4x Laemmli-Puffer gemischt, 10 min bei 99° C im Heizblock gekocht und dann bei -20° C gelagert. Die Geltaschen wurden im mit SDS-Laufpuffer befüllten Elektrophoresetank mit je 15 µl Probenmaterial und je eine Tasche mit 10 µl des PAGE Rulers #0671 beladen. Die Gele wurden 10 bis 20 min einem Strom von 20 mA bei 400 V ausgesetzt, bis die gefärbten Proben die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatten. Von hier aus wurde die Stromstärke für 30 bis 45 min auf 40 mA erhöht, bis das Gel vollständig durchlaufen war.

2.2.15. Coomassie Brillant Blau Staining

Proteine, die per SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurden mittels Coomassie Staining im SDS-Gel selbst sichtbar gemacht. Die Gele wurden für 15 min mit Coomassie Brillant Blau gefärbt und anschließend mit 10 % Essigsäure wieder entfärbt. Nach 10 min wurde die Essigsäure erneuert und die Gele weitere 20 bis 30 min entfärbt. Nach der Entfärbung blieben nur Bereiche angefärbt, in denen Proteine vorhanden waren.

2.2.16. Western Blot und Detektion

Beim Western-Tank-Blot wurden zuvor elektrophoretisch aufgetrennte Proteine von SDS-Gelen auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Alle Teile des Blots wurden zuerst in Laufpuffer äquilibriert. Abb. 6 zeigt den exakten Blotaufbau.

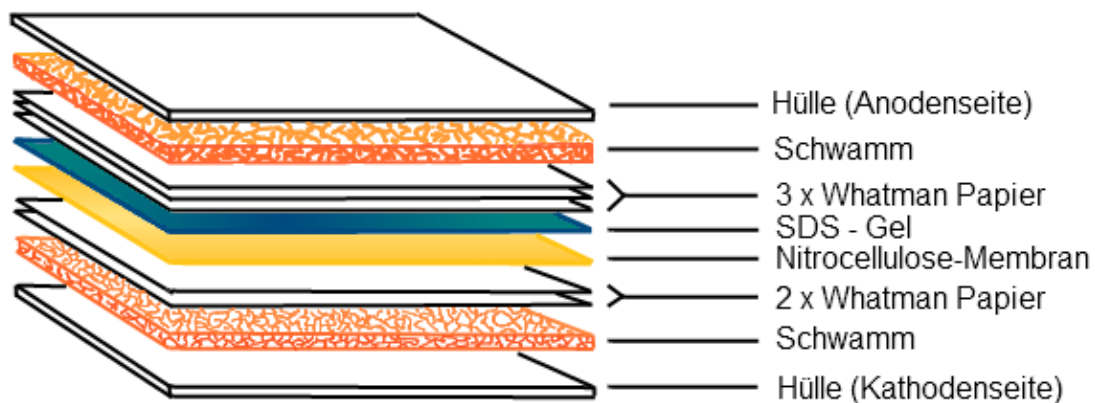


Abb. 6: Aufbau des Western Blot

Das Blotting wurde bei 40V, 300 mA für 70 min durchgeführt. Fertig geblottete Nitrocellulosemembranen wurden in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und dieses mit 10 ml Starting Block Blocking Buffer befüllt. Der Blocking Buffer diente der Blockierung freier Proteinbindungsstellen auf der Membran. Diese würden ansonsten von den später eingesetzten Antikörpern besetzt, was die Detektion von Antigen unmöglich machen würde. Nach 60 min bei Raumtemperatur auf dem Rollschüttler wurde der Blockingpuffer entfernt und ein Waschschrift durchgeführt: Die Membran wurde 2x mit 10 ml TTBS und dann 1x mit 10 ml TBS für je 10 min gewaschen. Die Inkubation mit in 10 ml Blocking Buffer 1:10.000 verdünntem Penta-His Maus-Antikörper erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur. Es folgte derselbe Waschschrift wie zuvor und anschließend die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Dieses Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelte Ziege-anti-Maus IgG wurde 1:2.500 in 10 ml einer 10 % Lösung von Magermilchpulver in TBS gelöst. Der letzte Waschschrift wurde 2x mit 10 ml TTBS und 3x mit 10 ml TBS für je 5 min durchgeführt. Die Visualisierung der Banden erfolgte über die Chemolumineszenzreaktion des Luminols, welche durch die HRP katalysiert wird. Die Membran wurde 5 Minuten mit Luminollösung in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden der Membran in der Dunkelkammer Fotofilme ausgesetzt, die durch die Lumineszenzreaktion belichtet wurden.

2.2.17. Heparansulfat-Pull-Down-Assay

Um die These zu untermauern, dass es sich bei Eap und IsaB um Heparansulfat-bindende Proteine (HSbP) handelte, wurde ein spezieller Pull-Down-Assay entwickelt. Hierzu wurde ein Lysat der Überexpressionsstämme mit Sepharosebeads inkubiert, auf deren Oberfläche Heparin gebunden war. An diese Beads sollten die rekombinanten Proteine binden, um anschließend thermisch gelöst und mittels Western Blot detektiert zu werden. Um die umgebende Flüssigkeit ganz von Protein zu befreien wurden mehrere Waschschriffe zwischengeschaltet, die letztlich nur proteinhaltige Beads in der Suspension zurücklassen würden. Nach thermischer Unterbrechung der Bindung zwischen HS und Protein würde dieses wieder in Lösung gehen und erneut nachgewiesen werden. Genommene Proben maßen 50 µl, wurden mit 12.5 µl 4x Laemmli-Puffer gemischt und auf dem Heizblock bei 99° C für 10 min gekocht.

Zunächst wurde eine Überexpression der Stämme E. coli C43:pET28a-eap und -isaB wie oben beschrieben durchgeführt. Zur Lyse wurden 1:100 Protease Inhibitor Cocktail, 20 µl DNase I und eine Spatelspitze Lysozym zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde per Ultraschall der Zellaufschluss vervollständigt. Das Lysat wurde 10 min bei 5.000 g und 4° C abzentrifugiert und eine Probe genommen. Anschließend wurde 1 ml Überstand mit 1 ml Heparin-Beads in einem 2 ml fassenden Eppendorf-Tube vermischt. Der Ansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur auf dem Rollschüttler inkubiert und danach 5 min bei 2.000 g abzentrifugiert. Es wurde eine Probe des Überstandes genommen. Der restliche Überstand wurde verworfen. Es folgte das Waschen der Beads, bei dem als Waschpuffer eine Lösung von 10 mM Tris in H₂O Millipore bei einem pH von 7,4 verwendet wurde. Der Bodensatz wurde in 1 ml Waschpuffer resuspendiert, 5 min bei 2.000 g zentrifugiert und vom Überstand nach jedem Waschschriffe eine Probe entnommen. Dieser Schriff wurde dreimal wiederholt, bis davon ausgegangen werden konnte, dass sich kein freies

Protein mehr in Lösung befand. Der restliche Überstand wurde vollständig verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 200 μ l 1x Laemmli-Puffer resuspendiert, 10 min bei 99° C im Heizblock abgekocht und erneut 5 min bei 2.000 g abzentrifugiert. Durch das Abkochen sollte die Bindung der Proteine an das Heparin unterbunden werden und diese wieder in Lösung gehen. Vom Überstand, der nun die von den Beads gelösten rekombinanten Proteine enthalten sollte, wurde eine Probe genommen. Alle genommenen Proben werden nochmals in Tab. 24 aufgelistet.

Tab. 24: Proben während des Heparansulphat-Pull-Down-Assays

Probe	Entnahmezeitpunkt
A	Lysat der Überexpressionsstämme
B	Überstand nach Inkubation von Lysat und Heparin-Beads
C	Überstand nach Waschschrift 1
D	Überstand nach Waschschrift 2
E	Überstand nach Waschschrift 3
F	Überstand nach Abkochen der gereinigten Beads

Anschließend wurden die genommenen Proben mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine im Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit denselben Antikörpern wie oben beschrieben.

2.2.18. Knockout von tarM und tarS mittels allelic exchange

Zum Knockout der Gene tarM und tarS wurden die Vektoren pKO-tarM und pKO-tarS verwendet. Durch Integration der KO-Kassetten in das Genom von *S. aureus* und anschließende Exzision des gesamten Genabschnittes blieben

lediglich die flankierenden Allelregionen übrig, funktionales Genprodukt konnte so nicht produziert werden. Das passende Methylierungsmuster erhielten die Vektoren über Transformation von *S. aureus* RN4220. Dies ermöglichte das Einbringen in den Stamm *S. aureus* COL, der die Fremd-DNA sonst nicht akzeptiert hätte. Die Transformationsansätze wurden über Nacht bei 30° C inkubiert, um einem unkontrollierten Einbau der Vektoren in die DNA vorzubeugen. Die Inkubation erfolgte auf Nährböden mit 10 µg/ml Chloramphenicol als Selektionsfaktor. Positive Klone wurden gepickt, erneut in Flüssig-BM-Medium mit 10 µg/ml Chloramphenicol angeimpft und über Nacht bei 30° C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde *S. aureus* COL mit den Vektoren transformiert und bei 30° C inkubiert (s. Tab. 25).

Tab. 25: Knockout-Protokoll

Tag	Protokoll
	Integration der Knockout-Kassette in das Genom
1	10 ml BM-Medium mit 10 µg/ml Chloramphenicol wurden von Platte mit den Transformanden angeimpft. Über Nacht Inkubation bei 30° C
2	25 ml BM-Medium mit 10 µg/ml Chloramphenicol wurden vom Vortag überimpft. Über Nacht Inkubation bei 43° C
3	25 ml BM-Medium mit 25 µg/ml Chloramphenicol wurden vom Vortag überimpft. Über Nacht Inkubation bei 43° C
4	Einzelkolonieausstrich auf BM-Agarplatten mit 10 µg/ml Chloramphenicol. Über Nacht Inkubation bei 43° C
	Exzision des Zielgenes
5	10 ml BM-Medium mit 10 µg/ml Chloramphenicol wurden mit Kolonien von Platte angeimpft. Über Nacht Inkubation bei 30° C
6 & 7	Kultur 10 ⁴ -fach mit H ₂ O verdünnt und je 100 µl ausplattiert auf 3 verschiedenen Medien: BM-Medium ohne, mit 1 µg/ml und 2 µg/ml Anhydrotetracyclin als Selektionsfaktor. 2 Tage Inkubation bei 30° C.

Tab. 25: Knockout-Protokoll

Tag	Protokoll
8	Klone, die auf 1 µg/ml Anhydrotetracyclin gewachsen waren, wurden parallel auf BM-Medium ohne Antibiotikum und mit 10 µg/ml Chloramphenicol überführt. Über Nacht Inkubation bei 30° C
9	Klone, die auf 10µg/ml Chloramphenicol nicht mehr gewachsen waren, wurden in antibiotikafreiem BM-Medium angeimpft. Über Nacht Inkubation bei 37° C
10	Colony-PCR der Deletionsmutanten zur Untersuchung des erfolgreichen Knockouts

2.2.19. Messung minimaler inhibitorischer Oxacillin-Konzentrationen in Flüssigmedium

Die Minimale Inhibitorische Konzentration von Oxacillin wurde in 2% NaCl haltigem Müller-Hinton Flüssignährmedium bestimmt. Eine Verdünnungsreihe von Oxacillin wurde in demselben Nährmedium steril mit folgenden Konzentrationen angesetzt: 4.096, 2.048, 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 0 µg/ml. Es wurden 24-well-Mikrotiterplatten (Fassungsvermögen pro well = 2 ml) mit der Verdünnungsreihe befüllt. Pro Verdünnungsschritt wurden 500 µl pipettiert. 200 µl jeder über Nacht angezüchteten Kultur wurden in je 40 ml Müller-Hinton Flüssigmedium überimpft und hiervon in jedes zuvor befüllte well wiederum 500 µl pipettiert. Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe wurden so halbiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37° C inkubiert und am nächsten Tag die OD₅₇₈ der Kulturen in allen wells gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. Heparansulfat-bindende Proteine von *Staphylococcus aureus*

3.1.1. *In silico* Identifikation potenzieller Heparansulfat-bindender Proteine von *Staphylococcus aureus*

Um der Hypothese nachzugehen, dass sich die adhäsiven Eigenschaften von *S. aureus* unter anderem auf ein System zur Bindung von HS stützen, wurden mehrere Proteine von *S. aureus* bestimmt, deren Kapazität zur HS-Bindung untersucht werden sollte. Abb. 7 zeigt den Arbeitsfluss der *in silico* Planung.

Die Analyse bisher veröffentlichter Publikationen über Adhäsionsmoleküle in *S. aureus* und HSbP anderer Bakterien über das *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* führte zur Isolation zweier möglicher Proteine: Dem *extracellular adhesion protein* (Eap) und dem *immunodominant surface antigen B* (IsaB) der Staphylokokken. Als Expressionssystem wurde der Vektor pET28a definiert, welcher die Kombination der Proteine mit einem Hexa-Histidin-Tag ermöglichte. Zum Sequenz-Alignment der Proteine mit bekannten Mustern von Signalpeptiden wurde die Software *ClustalW* des *Pôle Bioinformatique Lyonnais* verwendet, einem Onlineangebot des *Institut de Biologie et Chimie des Protéines* der Universität Lyon^[113]. Wurde eine für ein Signalpeptid codierende Struktur N-terminal in einem Gen festgestellt, so wurde ein C-terminaler Hexa-Histidin-Tag geplant, damit der Tag nicht durch den Signalpeptidabbau verloren ginge (s. Abb. 7). Bioinformatische Berechnungen wurden mit der Software *PEP-STATS* der *University of Pretoria* durchgeführt^[114].

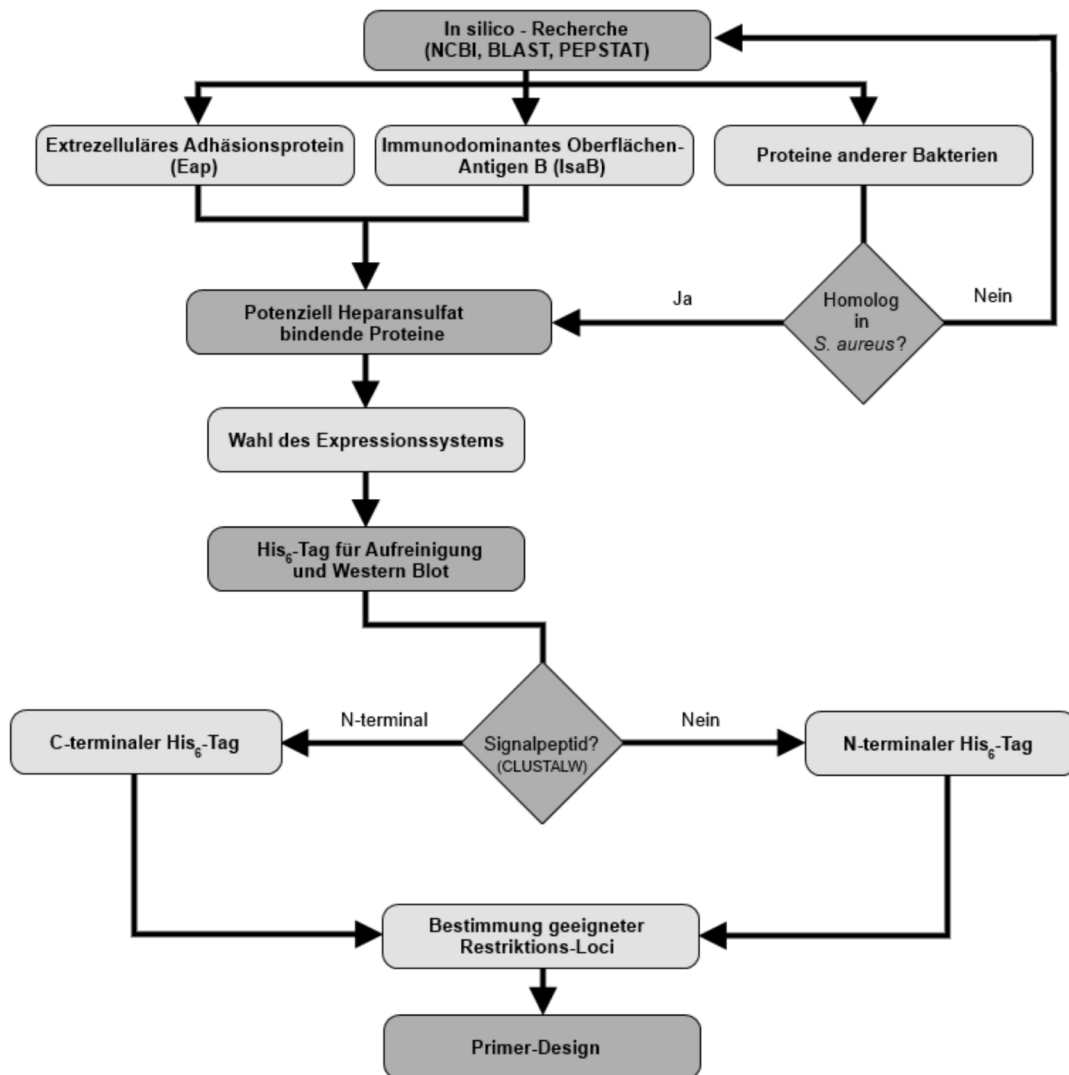


Abb. 7: In silico Planung für potenzielle Heparansulfat-bindende Proteine

Lag keine solche Sequenz vor, wurde er N-terminal belassen. Im Anschluss wurden geeignete Sequenzabschnitte an den Enden der Gene festgelegt, welche als Zielsequenz für den späteren Einsatz von Restriktions-Endonukleasen dienen sollten und das Primer-Design mit der Software *LaserGene 7* realisiert.

3.1.1.1. Wahl des Expressionssystems und Hexa-Histidin-Tag

Zur Überexpression der Proteine Eap und IsaB wurde der Vektor pET28a ausgewählt. Dieser bietet mehrere Vorteile gegenüber anderen Vektoren. Zu diesen zählten vor allem die Möglichkeit, Gene sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende mit für Hexa-Histidin-Tags (6xHis) codierenden Sequenzen auszustatten. Dies ist möglich, da auf pET28a mehrere Regionen existieren, die für diesen Tag codieren. Desweiteren bot sich mit pET28a ein Plasmid an, welches eine hohe Gen-

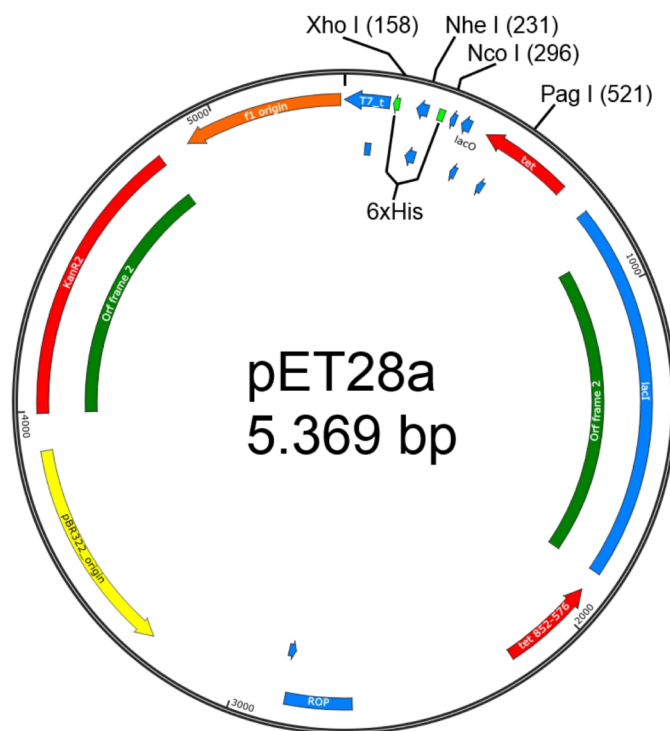


Abb. 8: pET28a, optimierte Darstellung

expression ermöglichen sollte. Abb. 8 zeigt eine optimierte Vektorkarte des Plasmids pET28a, die auf die in dieser Arbeit wesentlichen Details fokussiert. Ein weiterer Grund für die Verwendung von pET28a waren die an die überexprimierten Proteine gestellten Anforderungen. Zum einen sollte ihr Nachweis durch Western Blot möglichst effektiv erbracht werden, zum anderen ihre Aufreinigung aus dem Zelllysate ohne Verunreinigungen und hochspezifisch möglich sein. Der Hexa-Histidin-Tag des pET28a-Plasmids erfüllte diese Ansprüche. Die DNA-Sequenz des Tags (CAT CAT CAT CAT CAC bzw. CAC CAC CAC CAC CAC CAC) codiert für eine Peptidkette von sechs aufeinander folgenden Histidin-Molekülen, welche an den C- bzw. N-Terminus der überexprimierten Proteine angehängt werden. Über diesen Anhang konnten Aufreinigung und spezifischer Nachweis mittels Antikörpern realisiert werden. Ein weiterer Vorteil des Hexa-Histidin-Tags lag in

expression ermöglichen sollte. Abb. 8 zeigt eine optimierte Vektorkarte des Plasmids pET28a, die auf die in dieser Arbeit wesentlichen Details fokussiert. Ein weiterer Grund für die Verwendung von pET28a waren die an die überexprimierten Proteine gestellten Anforderungen. Zum einen sollte ihr Nachweis durch Western Blot möglichst effektiv erbracht werden, zum anderen ihre Aufreinigung aus dem Zelllysate ohne Verun-

seinem geringen zu erwartenden Einfluss auf die eigentliche Proteinaktivität. Nachfolgende Proteininteraktionsstudien waren somit nicht gefährdet, durch einen solchen Einfluss falsch-negativ beziehungsweise falsch-positiv auszufallen. Weiterhin vorteilhaft war die vergleichsweise einfache Induzierbarkeit der Überexpression mittels IPTG über ein lac-Repressor-System.

3.1.1.2. Identifikation der Signalpeptidsequenz und Design des Expressionsvektors

Um die Position des Hexa-Histidin-Tags bei jedem Protein korrekt zu wählen und damit dessen Verlust durch posttranslationale Modifikation zu verhindern, wurden mit dem *ClustalW*-Applikation des *Pôle Bioinformatique Lyonnais*^[113] die vorhergesagten Peptidsequenzen mit bekannten Signalpeptidmotiven verglichen. Signalpeptide liegen im Protein üblicherweise an N-terminaler Stelle und dienen der Ausschleusung synthetisierter Proteine aus der Zelle in deren Umgebung. Ein Histidin-Tag würde bei N-terminaler Positionierung zusammen mit dem Signalpeptid vom Protein abgespalten. Abb. 9 zeigt die entdeckten Signalpeptidsequenzen der Proteine Eap und IsaB.

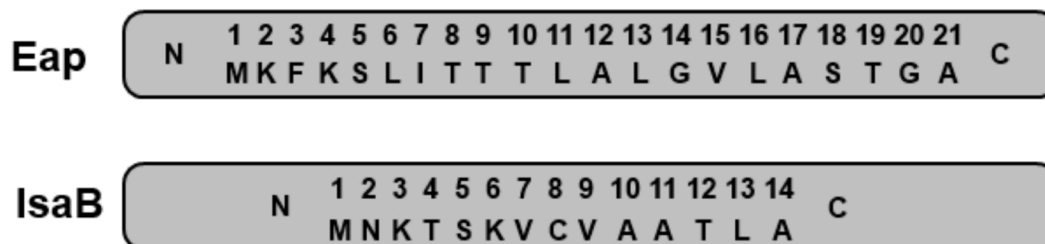


Abb. 9: Signalpeptid-Sequenzen von Eap und IsaB

Eap besitzt ein Signalpeptid von 21 Aminosäuren Länge, während jenes von IsaB 14 Aminosäuren zählte. Für beide Proteine wurde hernach ein C-terminaler Histidin-Tag geplant. Bioinformatische Berechnungen zeigten den Isoelektrischen Punkt für Eap bei $\text{pH} = 10,5097$ und für IsaB bei $\text{pH} = 10,2294$ und liesen somit auf bei $\text{pH} = 7,40$ positiv geladene Proteine schließen^[114].

Die Planung der Restriktionsloci und somit das finale Primer-Design geschahen mittels der Software *LaserGene 7*. Die ausgewählten Gene sollten mittels PCR amplifiziert und dann in den Vektor pET28a integriert werden. Hierzu mussten die späteren Amplifikate mit passenden Restriktionsloci ausgestattet werden. Dies wurde im Primer-Design realisiert, indem passende Pallindromsequenzen an die Primer angehängt wurden, die wiederum zu den Restriktionsloci passten, die pET28a anbietet. So wurde eine passgenaue Integration in den Vektor möglich. Die Primersequenzen mit genetischem Annealing und verwendeten Restriktionsenzymen zeigt Abb. 10.

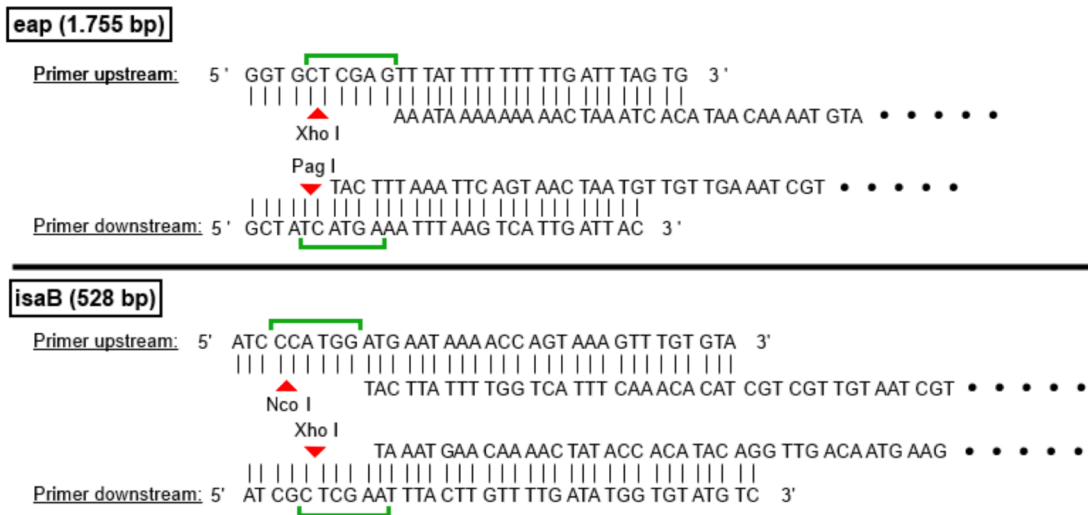


Abb. 10: Primersequenzen mit genetischem Annealing, Pallindromsequenzen (Klammern) und verwendete Restriktionsendonukleasen (Pfeile)

3.1.2. Konstruktion überexprimierender Bakterienstämme

Ziel des nun folgenden Arbeitsschrittes war es, bakterielle Stämme zu propagieren, die die Zielproteine Eap und IsaB überexprimierten. Abb. 11 beschreibt den exakten Ablauf der Herstellung überexprimierender Bakterienstämme. Die genetischen Informationen der putativen Heparansulfat-bindenden Proteine wurden, ausgehend vom Design der Primer, mittels PCR amplifiziert. Als *template* diente die genomische DNA des Stammes *S. aureus* SA113. Zunächst wurden dann sowohl Amplifikate wie auch Vektorisolat mit den zugeordneten Restriktionsendonukleasen behandelt und im folgenden Schritt liegiert. Nach erfolgreicher Transformation von *E. coli* TOP 10 mit den hergestellten Überexpressionsvektoren wurden die Plasmide isoliert und von der Firma GATC sequenziert. Dies diente dem Ausschluss von Mutationen, was die Proteinaktivität unvorhersehbar beeinträchtigen hätte können. Im Anschluss wurde der Stamm zur Überexpression, *E. coli* BI21(DE3), mit den mutationsfreien Plasmiden transformiert. Auftretende Toxizität der rekombinanten Proteine wurde durch die Optimierung des Systems ausgeglichen. Hierzu wurde *E. coli* BI21(DE3) durch *E. coli* C43 ersetzt, welcher eine wesentlich höhere Anzahl – auch und vor allem toxischer – Proteine zu exprimieren in der Lage war.

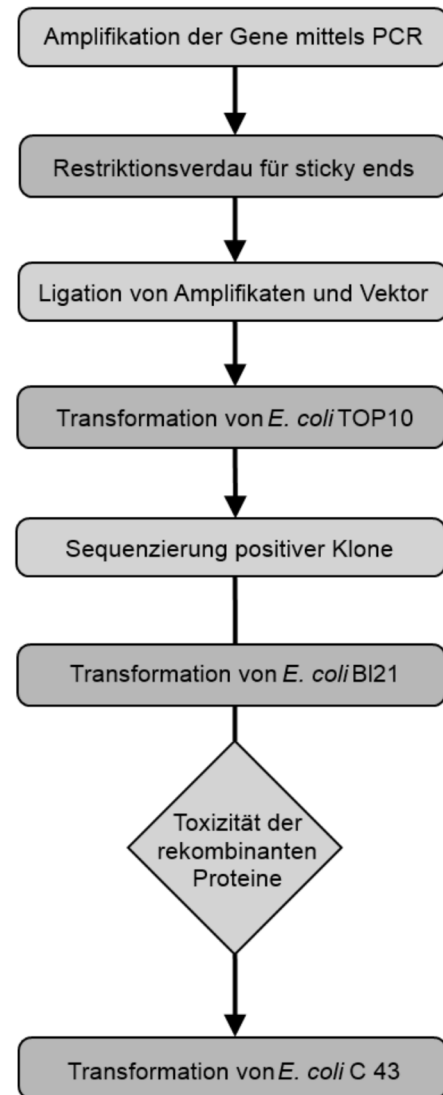


Abb. 11: Arbeitsfluss von Gen-Amplifikation, Klonierung und Transformation

3.1.2.1. Amplifikation der Gene für Eap und IsaB

Die Amplifikation der Gene für Eap und IsaB wurde durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) realisiert. Als *template* diente das zuvor isolierte Genom von *S. aureus* SA113. Ausgehend vom Primer-Design wurden die Genkopien mit den eingeplanten Restriktionsloci ausgestattet, die die spätere Ligation mit dem pET28a-Vektor ermöglichen sollten. Der Erfolg der PCR wurde durch Gelelektrophorese überprüft. Die Amplifikate besaßen die erwarteten Genlängen von 1.755 bp für eap und 528 bp für isaB (Abb. 12).

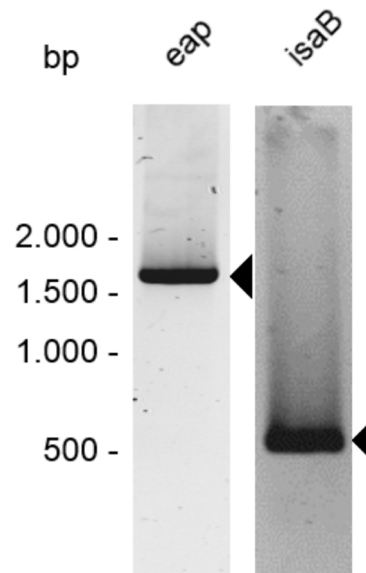


Abb. 12: PCR-Ergebnisse für eap, isaB und

3.1.2.2. Konstruktion pET28a-basierter Expressionsvektoren für die Heparansulfat-bindenden Protein und Sequenzierung

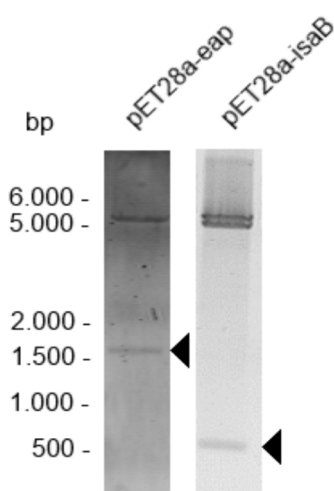


Abb. 13: Transformation von *E. coli* TOP10 mit pET28a-Konstrukten

Anschließend wurden die Genamplifikate wie auch das Vektorisolat durch Restriktionsverdau mit sticky ends versehen. Zum Einsatz kamen hier die im Primer-Design zuvor festgelegten Restriktionsendonukleasen. XhoI und PstI für eap, sowie NcoI und XhoI für isaB. Die so geschnittenen DNA-Moleküle wurden über Gelelektrophorese aufgereinigt und extrahiert. Durch Ligation wurden die Gene jeweils in den Vektor eingefügt und *E.*

coli TOP10 mit den entstandenen Plasmiden transformiert. Nach der Transfor-

mation wurde mittels Re-Isolation der Vektoren, erneuter Restriktionsverdau und Gelelektrophorese bestätigt, ob die gewünschten Gene tatsächlich in die Bakterienzellen aufgenommen wurden (s. Abb. 13). pET28a stellte sich hierbei als Bande zwischen 5.000 und 6.000 bp dar, während die Banden der Gene in den erwarteten Bereichen lagen (s. 3.1.2.1.).

Mutationen innerhalb des genetischen Codes sollten vermieden werden. Um dies sicherzustellen, wurden die positiv getesteten Plasmidisolate von der Firma GATC sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden elektronisch mit dem Originalgenom von *S. aureus* SA 113 verglichen. Für beide Proteine konnten im Verlauf mutationsfreie Überexpressionsvektoren kloniert werden. Mit diesen wurde zunächst der Überexpressionsstamm *E. coli* Bl21 transformiert.

3.1.3. Überexpression von Eap und IsaB

Die Überexpression der rekombinanten Proteine Eap und IsaB erfolgte zunächst mit dem Stamm *E. coli* Bl21. Erste Expressionsversuche wurden durchgeführt, erbrachten jedoch nach Induktion mittels 1mM IPTG kein weiteres Wachstum der Flüssigkulturen. Die OD₅₇₈ konnte nach Induktion trotz Inkubation bei 37° C über mehrere Stunden nicht weiter gesteigert werden. Es wurde daher angenommen, dass die rekombinanten Proteine eine toxische Wirkung auf die Bakterien ausübten. Um dieses Problem zu überwinden, wurde ein alternativer *E. coli* Stamm ausgewählt, der zur Überexpression geeignet war und zugleich eine breite Zahl an Proteinen exprimieren konnte, ohne unter deren toxischen Effekten zu leiden. Der Stamm *E. coli* C43 erfüllte diese Voraussetzungen. Er wurde wie zuvor *E. coli* TOP 10 mit den klonierten Vektoren transformiert und für alle weiteren Überexpressionsversuche eingesetzt. Die allgemeine Proteinexpression des Systems wurde durch Färbung mit Coomassie Brilliantblau in der SDS-PAGE, und mit Ponceau-Rot im Western Blot nachgewiesen. Der spezifische Beweis der Überexpression rekombinanter Proteine erfolgte im-

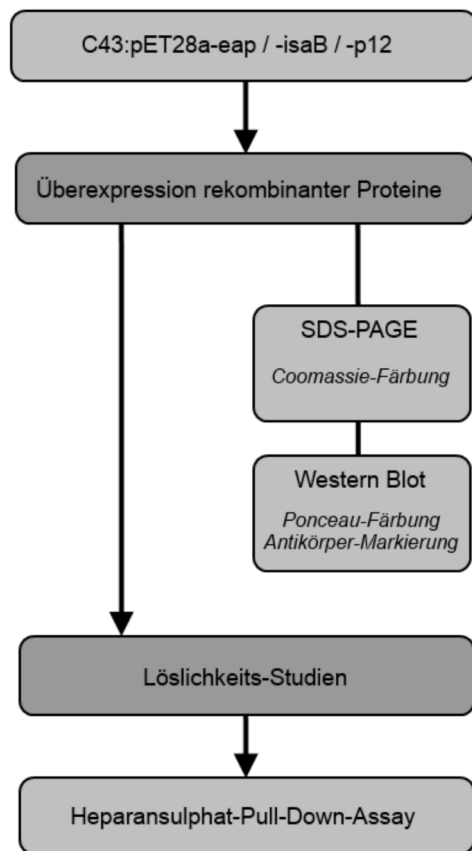


Abb. 14: Arbeitsfluss von Expression, Löslichkeitsuntersuchung und Heparansulfat-Pull-Down-Assay

munochemisch mittels Western Blotting. Der Nachweis der Heparansulfat-Bindekapazität der rekombinanten Proteine Eap und IsaB mit den geplanten Methoden setzte deren Löslichkeit in Wasser voraus. Nachdem eine effektive Überexpression mit dem Stamm *E. coli* C43 gewährleistet war, wurden Untersuchungen der Löslichkeit beider Proteine durchgeführt. Erst wenn diese sicher nachgewiesen war, folgte der eigentliche, speziell für diese Arbeit entwickelte Heparansulfat-Pull-Down-Assay. Abb. 14 illustriert den Arbeitsfluss während der genannten Arbeitsschritte.

3.1.3.1. Induktion und Detektion der Expression der rekombinanten Proteine Eap und IsaB

Die Expression wurde induziert, indem 1mM Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) den Kulturen zugegeben wurde. Dieses lagerte sich intrazellulär an das lac-Repressorprotein an. Dessen inhibierende Wirkung auf die Promotorregion des Vektors wurde unterbunden und die Transkription der genetischen Information konnte beginnen. Die so überexprimierten Proteine Eap und IsaB wurden über Ni-NTA-Beads aufgereinigt. Die Beads binden spezifisch an Poly-Histidin-Abschnitte der Proteine, also vor allem an deren Hexa-Histidin-Tags. Für Eap wurden ca. 66 kDa, für IsaB ca. 19 kDa Molekülmasse erwartet. Nach der Überexpression des Extrazellulären Adhäsionsproteins (Eap) wurde eine

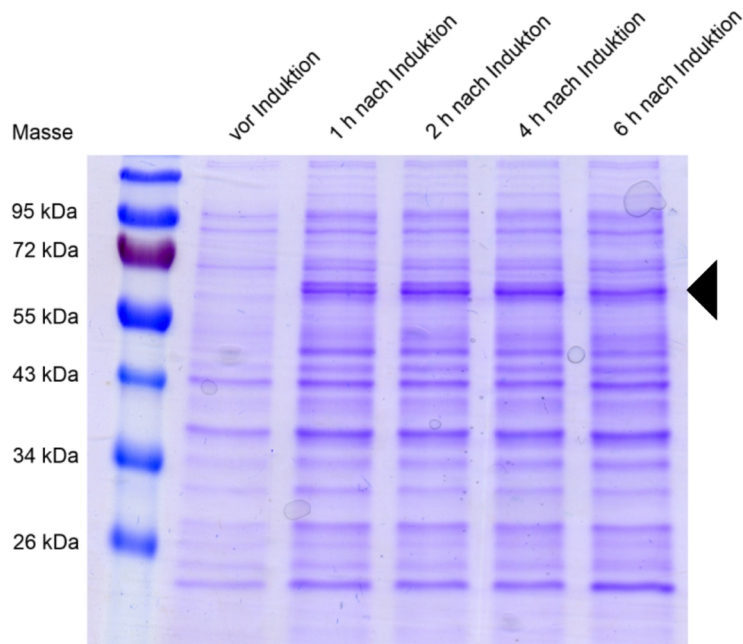


Abb. 15: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der Überexpression von Eap

SDS-PAGE der extrahierten Proben mit nachfolgender Coomassie-Färbung zum unspezifischen Proteinnachweis durchgeführt. Abb. 15 zeigt dieses SDS-Gel. Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Induktion genommen, um deren Effektivität zu untersuchen. Bereits nach zwei Stunden veränder-

te sich die Stärke der Eap-Bande nicht mehr. Für spätere Überexpressionen wurden zwei Stunden als ausreichend festgesetzt. Per Western Blot wurden die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Für Eap wurde die stattgefunden Übertragung mittels Ponceau-Rot-Färbung kontrolliert. Diese Färbemethode arbeitet mit einem unspezifischen Proteinfarbstoff, der reversibel an die Aminogruppen der Proteine bindet. Anschließend konnte der Ponceau-Farbstoff wieder von der Membran abgewaschen werden. Das Vorhandensein der gewünschten Proteinbanden für Eap auf der Nitrozellulosemembran nach Western Blotting und damit die erfolgreiche Übertragung aus dem SDS-Gel zeigt Abb. 16.

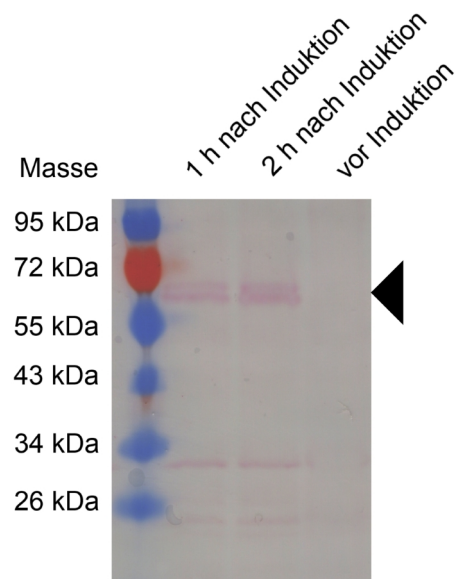


Abb. 16: Ponceaurot-gefärbter Western Blot von Eap

Die geblotteten Membranen wurden mit einem in Plasmazellen von Mäusen hergestellten Antikörper inkubiert, der sich spezifisch gegen den Hexa-Histidin-Tag der Proteine Eap und IsaB richtete. Danach wurde ein Antikörper hinzugegeben, der gegen das Maus-Antigen des ersten Antikörpers gerichtet und mit dem Enzym Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelt war. Das Enzym versetzte den Farbstoff Luminol in dessen oxidierte Form. Die auf diese Weise chemolumineszierenden Banden erlaubten ihre exakte Detektion auf dem

Western Blot (s. 2.2.16.). Abb. 17 zeigt die beiden überexprimierten Proteine nach Detektion mittels Western Blot. An den masseärmeren Banden erkennt man eine Degradation der Proteine. Durch den erhöhten Einsatz von Protease-Inhibitoren während der Lyse konnte diesem Phänomen nicht entgegen gewirkt werden.

3.1.3.2. Wasserlöslichkeit von Eap und IsaB

Die Untersuchung der Löslichkeit der Proteine Eap und IsaB in Wasser diente zum einen ihrer allgemeinen Charakterisierung. Zum anderen wurde die Effektivität der Überexpression des Stammes *E. coli* C43 überprüft. Hierdurch wurde sichergestellt, dass im anschließend durchgeführten Pull-Down-Assay Proteine aus der Heparansulfat-Bindung wieder in die lösliche Phase übergehen konnten. Die extrahierten Proben aus dem in Lysepuffer resuspendierten Pellet des Zelllysats und der flüssigen Phase wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und anschließend mit den bereits genannten Antikörpern detektiert. Die Löslichkeit beider rekombinanten Proteine konnte nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich wieder eine Degradation der Proteine, deren Produkte teilweise

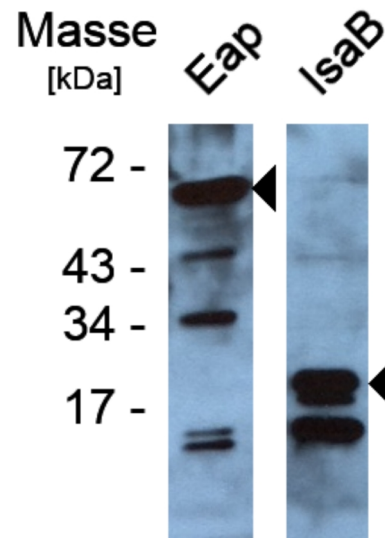


Abb. 17: Überexpression von Eap und IsaB

immernoch in gelöster Form vorlagen. Abb. 18 zeigt den entsprechenden Western Blot mit den Banden für lösliche und unlösliche Proteinprodukte.

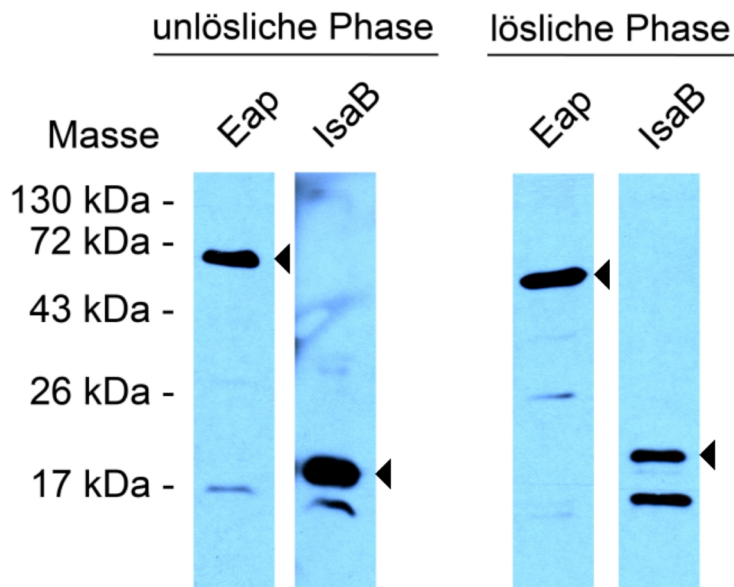


Abb. 18: Löslichkeit von Eap und IsaB

3.1.4. Eap und IsaB binden and Heparin im Pull-Down-Assay

Der Assay wurde für beide Proteine durchgeführt. Zugleich wurde die Funktionalität des Pull-Down-Assays untersucht. Es konnte die Fähigkeit von Eap und IsaB zur Bindung von Heparansulfaten gezeigt werden. Die Untersuchung von IsaB zeigte zudem den stufenweisen Konzentrationsrückgang gelöster Proteine durch das Waschen. Abb. 19 zeigt das Ergebnis des Assays. Für IsaB wurden die Proben B-F (s. Tab. 24), für Eap die Proben B, E und F dokumentiert. Die erste Bande zeigt hierbei jeweils das Vorhandensein löslichen Proteins nach deren Exposition gegenüber den Heparin-beschichteten Beads. Durch die Waschschriffe konnten die Konzentrationen der Proteine unter die Nachweisgrenze des Western Blots gesenkt werden. Nach dem dritten Waschschriffe war kein Protein im Überstand mehr nachweisbar. Es verblieben lediglich die an das

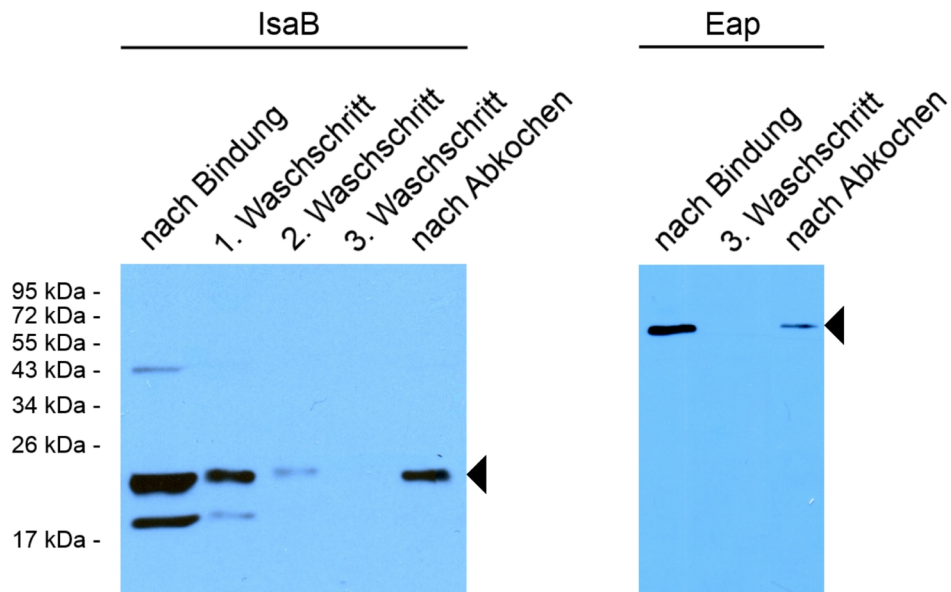


Abb. 19: Heparansulfat-Pull-Down-Assay von IsaB und Eap

Heparin gebundenen Proteine in der Suspension. Das Abkochen der resuspendierten Beads zerstörte diese Bindung. Die Proteine gingen somit in Lösung mit dem Umgebungsmedium über und wurden wieder nachweisbar. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Eap als auch IsaB an das Heparin der Beads gebunden haben mussten, da sie nach dem Waschen und Abkochen der Suspension wieder nachgewiesen werden konnten.

3.2. WTA-abhängige Methicillinresistenz von *Staphylococcus aureus*

3.2.1. Knock-Out von *tarM* und *tarS* in *S. aureus* COL

Die beiden Knock-Out-Vektoren *pKO-tarM* und *pKO-tarS* wurden aus den *S. aureus*-Stämmen RN450:*pKO-tarM* und RN4220:*pKO-tarS* isoliert. Der *Hospital acquired (HA)-MRSA*-Stamm *S. aureus* COL wurde mit diesen Vektoren transformiert und dem Knock-Out-Prozess zugeführt. Das Knock-Out geschah über das Prinzip der homologen Rekombination: Flankierende Bereiche des Zielgens entsprechen dabei ihren homologen Bereichen auf dem Vektor. Im Zielorganismus kommt es zur Rekombination dieser homologen Bereiche, einem physiologischen Prozess, der in allen Lebewesen auftritt und eine höhere Vielfalt der Gene gewährleistet. Der auf dem KO-Vektor zwischen die beiden flankierenden Bereiche

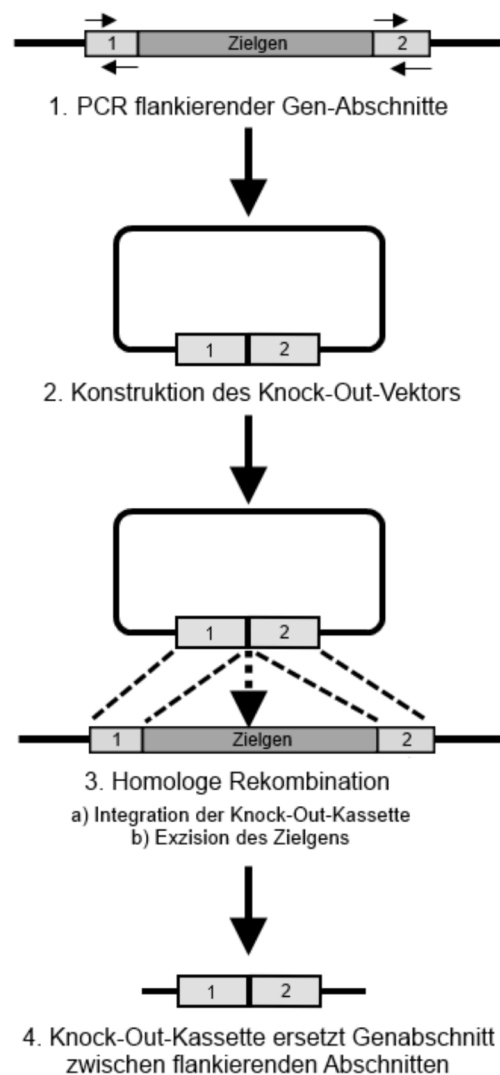


Abb. 20: Knock-Out-Prozess

geschaltete DNA-Abschnitt wird hierbei in das Zielgen eingebaut und ersetzt einen weiten Bereich dieses Gens. Das Zielgen verliert so einen gewissen Anteil seines Gencodes und codiert so für kein funktionelles Genprodukt mehr. Abb. 20 zeigt das Prinzip dieses Knock-Out-Prozesses. Die mutmaßlichen Knock-Out-Stämme wurden mittels Colony-PCR kontrolliert.

Tabelle 26: Erwartete Genlängen von *tarM* und *tarS* bei Wildtyp und Mutante

	<i>tarM</i>	<i>tarS</i>
Wildtyp	2.200 bp	4.000 bp
KO-Mutante	801 bp	2.700 bp

Dabei zeigten sich deletierte Gene in der Gel-Elektrophorese als Banden mit geringerer Länge als die Gene des Wildtyps. Abb. 21 zeigt die Ergebnisse der Colony-PCR und damit des Knock-Out-Prozesses, durch den es gelang, die Gene *tarM* und *tarS* in *S. aureus* COL durch homologe Rekombination zu inaktivieren. Die erwarteten Genlängen wurden erreicht (s. Tab. 26).

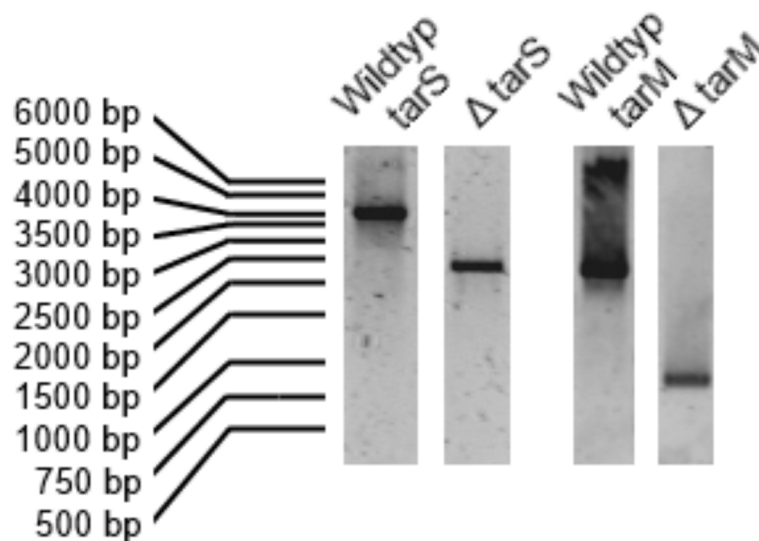


Abb. 21: Knock-Out-Kontrolle von *tarM* und *tarS* durch Colony-PCR

3.2.2. Bestimmung der minimalen inhibitorischen Oxacillin-Konzentration mittels OD₅₇₈

Die minimale Hemmkonzentration wurde für die Knock-Out-Mutanten *S. aureus* COL Δ tarM und *S. aureus* COL Δ tarS bestimmt. Als Negativkontrolle diente der Wildtyp *S. aureus* COL wt, als Positivkontrolle *S. aureus* RN4220 wt als Methicillin sensibler *S. aureus*-Stamm. Eingesetztes Antibiotikum war Oxacillin. Die OD₅₇₈ der angeimpften Kulturen wurde nach Inkubation über Nacht bestimmt. So konnte überprüft werden, ob und in welchem Ausmaß Wachstum stattgefunden hatte. Es zeigte sich, dass das Ausschalten sowohl von tarM als auch von tarS keine Verringerung der Oxacillin-Resistenz im Vergleich zum Wildtyp mit sich brachte. Die minimale Hemmkonzentration lag weiterhin bei 512 μ g/ml für beide Mutanten. Die Ergebnisse zeigen Tab. 27 und Abb. 22.

Tab. 27: Minimale Hemmkonzentrationen von Oxacillin auf *S. aureus* COL wt, Δ tarM, Δ tarS und *S. aureus* RN4220

C _{Oxacillin} [μ g/ml]	<i>S. aureus</i> COL wt (OD ₅₇₈)	<i>S. aureus</i> COL Δ tarM (OD ₅₇₈)	<i>S. aureus</i> COL Δ tarS (OD ₅₇₈)	<i>S. aureus</i> RN4220 (OD ₅₇₈)
0	1,338	1,380	1,320	1,437
16	1,157	1,222	1,090	0,000
32	1,129	1,166	1,050	0,000
64	1,134	1,14	1,016	0,000
128	1,176	1,177	1,047	0,000
256	0,020	0,046	0,018	0,000
512	0,000	0,000	0,000	0,000
1024	0,000	0,000	0,000	0,000
2048	0,000	0,000	0,000	0,000

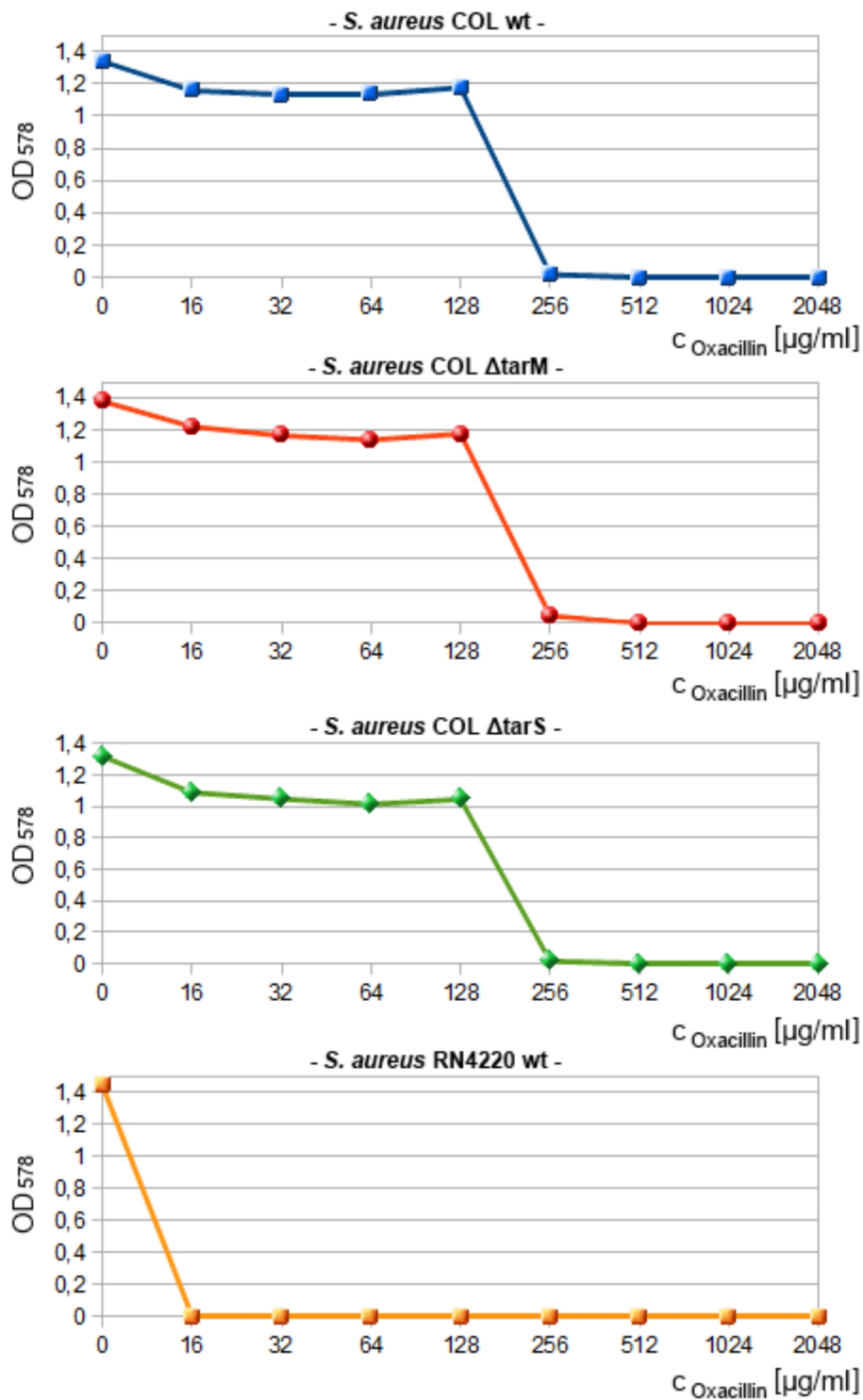


Abb. 22: Minimale Inhibitorische Konzentration von Oxacillin gegenüber der OD₅₇₈ von *S. aureus* COL wt, COL ΔtarM, COL ΔtarS und RN4220

4. Diskussion

4.1. Heparansulfat-bindende Proteine von *Staphylococcus aureus*

4.1.1. Darlegung der Fragestellung

Die Fähigkeit von *S. aureus*, Heparansulfate zu binden, ist bereits seit Langem bekannt^[5]. Heparansulfate sind ubiquitär vorkommende Glykosaminoglykane^[29]. Sie dienen vielen Bakterien als Zielstruktur, um zu adhären und sich im Wirtsorganismus zu etablieren^{[47], [48], [51], [52]}. Außerdem ist bekannt, dass die Anwesenheit von Heparansulfaten entscheidend für die Internalisation von *S. aureus* ist^[53]. Für die Bindung an Heparansulfate sind mindestens zwei Proteine mit Massen von 60 und 66 kDa verantwortlich^[5]. Dennoch wurde bisher keine Studie veröffentlicht, die die Heparansulfat-bindenden Proteine von *S. aureus* identifiziert hätte. Die vorliegende Studie diene diesem Zweck.

4.1.2. Expression, Aufreinigung und Charakterisierung der Heparansulfat-bindenden Proteine

Das Studiendesign sah vor, die beiden Proteine Eap und IsaB von *S. aureus* auf ihre Fähigkeit zur Heparansulfatbindung zu untersuchen. Hierfür war zunächst die Überexpression in einem bakteriellen System notwendig. Zur Überexpression wurden die Gene *eap* und *isaB* in den Vektor pET28a kloniert und zunächst der Stamm *E. coli* BI21(DE3) mit diesen Konstrukten transformiert. Die Amplifikation und Vektorklonierung verliefen wie geplant (s. Abb. 12 und 13), als Positivkontrollen der Kontrollelektrophoresen wurden

hierbei die Markerbanden verwendet. Negativkontrollen wurden nicht durchgeführt, da die erwarteten Banden längen die korrekte Primerfunktion bestätigten. Nach der Transformation von *E. coli* BL21(DE3) mit den Konstrukten stellte sich während erster Überexpressionsversuche heraus, dass die erzeugten Proteine toxische Wirkung hatten. Das Problem wurde durch den Wechsel des Expressionsstammes behoben. Der Stamm *E. coli* C43 zeichnet sich durch eine hohe Anzahl nicht toxisch wirkender Proteinexprimat aus^[96]. Das bereits vorhandene Plasmid pRARE codierte für die in *E. coli* selten vorkommenden tRNAs von Arginin, Glycin, Isoleucin, Leucin und Prolin^[97]. Die Überexpression verlief hierauf problemlos. Die Isolation der Proteine Eap und IsaB erfolgte über NiNTA-haltige Lösung, die deren HisTag reversibel band. Die in silico Vorhersage von Signalpeptiden ermöglichte dabei im Voraus die korrekte Anlage der HisTags an die C-Termini der Proteine. SDS-PAGE, Western und Western Blot wurden ebenfalls über die Bandenlaufweite der Marker positivkontrolliert (s. Abb. 15, 16 und 17). Die Löslichkeitskontrollen zeigten eine gute Löslichkeit von Eap und IsaB in Wasser (s. Abb. 18).

4.1.3. Heparansulfat-Pull-Down-Assay

Die Bindung von Heparansulfaten durch Eap und IsaB konnte mittels eines eigens entwickelten Pull-Down-Assays nachgewiesen werden (s. Abb. 19). Der Assay verwendete Heparin-beschichtete Sepharosebeads, an die die Proteine banden. Durch Erhitzen der Suspension wurde die Heparansulfatbindung nach mehreren Waschschritten, die die umgebende Pufferlösung von Restprotein befreiten, unterbrochen und die Proteine gingen wieder in Lösung über. Der Nachweis wurde dann mittels Western Blot erbracht. Essenzielle Voraussetzung für diesen Assay waren die Wasserlöslichkeit der untersuchten Proteine und eine ausreichende Menge an synthetisiertem Protein. Der Assay erbringt damit einen qualitativen Nachweis der Heparansulfatbindung. Eine quantitative Bestimmung ist nicht möglich, da weder die Menge des

eingesetzten Heparins noch die der Proteinproben gemessen werden kann. Einige Schritte des Vorgehens können die Proteinkonzentration beeinflussen. Hierzu gehören unter anderem die erzielte Proteinkonzentration nach der Überexpression, Sorgfalt beim Pipettieren und Zugängigkeit des HisTags für den Anti-His-Antikörper. Es ist weiters nicht möglich, Aussagen zur Sättigung der Bindung zu treffen. Vorteile bieten die vergleichsweise einfache Handhabung des Assays und seine allgemeine Verwendbarkeit, die ihn für alle Proteine einsetzbar macht, die wasserlöslich und in ausreichender Menge isolierbar sind. Ein weiteres denkbare Einsatzgebiet ist neben der gezielten Untersuchung einzelner Proteine die Isolation Heparansulfat-bindender Proteine aus kompletten Zelllysaten.

4.1.4. Bedeutung der Ergebnisse

4.1.4.1. Heparansulfatbindung von Eap

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass das extracellular adherence protein Eap in seiner Eigenschaft als multifunktionales Adhäsion auch Heparansulfate bindet. Das Bild des Proteins wird damit um diese Stoffgruppe als Interaktionspartner erweitert. Liang et al. identifizierten 1992 zwei Heparansulfat-bindende Proteine von *S. aureus* mit Molekülmassen von 60 und 66 kDa^[5]. Die Molekülmasse von Eap mit ca. 69 kDa kommt diesen sehr nahe. Ob es sich bei Eap um dasselbe Protein handelt, bleibt jedoch unbekannt. Der Vergleich mit der aktuellen Literatur bestätigt, dass Eap ein multifunktionales Adhäsion ist, das eine Vielzahl an Molekülen bindet^{[22], [57]}. Heparansulfate sind ubiquitäre Bestandteile der Zellmembran und EZM^[29], was Eap und damit *S. aureus* eine breite Basis zur Adhäsion bieten könnte. Bertling et al. zeigten 2012, dass Eap Thrombozyten aktivierend wirkt. Diese Aktivierung umfasst eine Granulasekretion, die Aggregation von Thrombozyten und ist von Gylkosaminoglykanen abhängig und durch Heparin blockierbar^[98]. Der

Nachweis, dass Eap ein Heparansulfat-bindendes Protein ist, lässt die Annahme zu, dass die Thrombozytenaktivierung durch diese Eigenschaft des Proteins ausgelöst wird. Die Aktivierung von Thrombozyten spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Abszessbildung durch die Ausschüttung verschiedener Stoffe wie Fibrinogen, Kollagen. Durch die Granulasekretion wird auch das Enzym Pro-Heparanase freigesetzt, welches dann intrazellulär zu aktiver Heparanase prozessiert wird. Extrazellulär degradiert sie anschließend membran- und extrazellulärmatrixständige Heparansulfate zu niedermolekulareren, löslichen Bestandteilen, welche in die Umgebung freigesetzt werden^{[99], [100]}. Dies könnte den Schutz vor bakterieller Adhäsion erhöhen, da bakterielle Heparansulfat-bindende Proteine mit freien Heparansulfaten gesättigt werden, bevor sie ihr adhäsives Potenzial entfalten können. Hess et al. zeigten 2006, dass die Anwesenheit von Heparansulfaten essenziell für die Adhäsion von *S. aureus* an intestinalem Epithel ist^[53]. Hier wäre der Verlust von Heparansulfaten durch Heparanase ein Nachteil für *S. aureus*. Alston et al. zeigten hingegen, dass Heparansulfate des Gefäßendothels einen schützenden Effekt vor Adhäsion durch *S. aureus* haben. Ihr Verlust führt hier zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber *S. aureus*^[54]. Der Thrombozyten aktivierende Charakter von Eap würde somit gewebsspezifisch zu einem Vor- oder Nachteil für die Heparansulfat-abhängige Adhäsion gereichen.

Eine weitere Fähigkeit von Eap ist die Blockade von CD54, dem *intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)*^[23] und eine damit verbundene Behinderung der Extravasation der Leukozyten. Taylor und Gallo zeigten 2006, dass Dermatansulfate die Expression von ICAM-1 auf dem Endothel modulieren^[101]. Dermatansulfate sind den Heparansulfaten verwandte Proteoglykane, deren Verhältnis zu Eap noch nicht untersucht wurde. Ein Einfluss von Eap auf die Dermatansulfat-moderierte Expression von ICAM-1 erscheint daher nicht ausgeschlossen.

4.1.4.2. Heparansulfatbindung von IsaB

Auch für das immunodominant surface antigen B IsaB konnte gezeigt werden, dass es zur Heparansulfatebindung fähig ist. IsaB war bisher kaum Gegenstand der Forschung. Bekannt ist, dass es auf der Oberfläche von *S. aureus* vorhanden ist, Nukleinsäuren bindet^[64] und vor allem in der Septikämiephase der Infektion exprimiert wird, jedoch nicht während der Kolonisation^[102]. Weiterhin wird es nach der Internalisation^[103], unter Biofilmbedingungen^[104] und unter anaeroben Bedingungen^[105] exprimiert. Vermutlich spielt IsaB daher keine tragende Rolle bei der Adhäsion und Etablierung von *S. aureus* im Wirtsorganismus, sondern eher im Rahmen der Immunevasion, für die Virulenz^[106] und bei Vorgängen in der Wirtszelle. Heparansulfate sind als Rezeptoren an der Endozytose beteiligt^[32] und kommen auch im Nucleus der Zelle vor^[100]. Eine Beteiligung von IsaB an der Internalisierung und von *S. aureus* und an intrazellulären Vorgängen des Wirtes wäre daher ebenfalls denkbar. IsaB ist ein Homolog zu einem Heparansulfat-bindenden Protein von *S. epidermidis*^[66]. Die vorliegenden Ergebnisse untermauern die homologe Funktion des Proteins. Es ist oberflächenpräsent und seine Fähigkeit Heparansulfate zu binden, lässt die Vermutung zu, dass es an der Interaktion mit dem Wirtsorganismus beteiligt ist. Welcher Adhäsionsgruppe (s. Abb 1) es zuzuordnen ist, bleibt Gegenstand künftiger Studien.

4.1.4.3. Bedeutung der Heparansulfatbindung von *S. aureus*

Die neu identifizierten Eigenschaft der Heparansulfatbindung von Eap und IsaB vergrößern das Wissen über den Interaktionsbereich von *S. aureus* enorm. Die Vielzahl der Heparansulfate im Wirtsorganismus, die gewebsspezifisch stark variiert und unterschiedliche Effekte auslöst, schafft eine hohe Zahl möglicher Interaktionsloci. Sie eröffnet völlig neue Möglichkeiten für die Beeinflussung der Immunantwort durch *S. aureus*, dessen Immunevasion und seinen Einfluss auf die generelle Physiologie des Wirtes.

Die Interaktion von *S. aureus* mit Heparansulfaten ist bereits seit Langem bekannt^{[5], [98], [53], [54]}. Ebenfalls ist bekannt, dass Heparansulfate unabhängig von ihrem Kernprotein mit Heparansulfat-bindenden Proteinen interagieren können^[30]. Sie vermitteln unter anderem Adhärenz, sind in diverse intrazelluläre Signalwege eingebunden^[33], aktivieren die Endozytose^[32] und die Internalisation von *S. aureus* in intestinales Gewebe^[53]. Endothel hingegen wird durch ihre Gegenwart vor der Besiedelung mit *S. aureus* geschützt^[108]. Letzteres spricht für eine gewebsspezifische Funktion der Heparansulfate. Insgesamt erscheint es denkbar, dass Heparansulfat-bindende Proteine einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Wirkung von Heparansulfaten haben könnten und auch diese gewebsspezifisch variiert. Hierfür spricht auch, dass Heparansulfate exakt regulierte Bindungsstellen aufweisen (s. Abb. 2), die eine hoch selektive Proteinbindung ermöglichen^[100], was allein durch die hohe Diversität der Heparansulfate ein hoch komplexes Bild staphylokokkärer Infektionen erzeugt. Als Beispiel soll der *fibroblast growth factor receptor (FGFR)* dienen. Seine Funktion ist abhängig von FGF und von einem Heparansulfat-Corezeptor, ohne den kein intrazelluläres Signal zustande kommt^{[109], [110], [111]}. Der Einfluss Heparansulfat-bindender Proteine wäre hier zum Beispiel im Rahmen der Abszesswandformation denkbar.

4.1.5. Fazit

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie erweitern das Gesamtbild der Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus* und identifiziert erstmals zwei Heparansulfat-bindende Proteine dieses Bakteriums. Die Rolle dieser Proteine und ihre Relevanz bei Infektionen zu ermitteln, ist ein wichtiger Schritt, um das Bakterium *S. aureus* zu verstehen und effektive Pharmaka gegen es zu entwickeln.

Der Heparansulfat-Pull-Down-Assay, der für diese Studie etabliert wurde, diente bisher dem qualitativen Nachweis Heparansulfat-bindender Proteine. Die Methode hat großes Potenzial hinsichtlich der Analyse vollständiger Zelllysate aus Bakterienkulturen. Eine Analyse wäre durch die Anzüchtbarkeit des jeweiligen Bakteriums und die Löslichkeit der Proteine begrenzt. Eine Weiterentwicklung zum quantitativen Test setzt die Messbarkeit der eingesetzten Mengen an Protein und Heparansulfat voraus.

Kommende Studien sollten sich mit der Relevanz der Heparansulfat-bindenden Proteine für Adhäsion und Pathogenese auseinandersetzen. Heparansulfate werden während der Inflammation freigesetzt, Heparanase hochreguliert^[99]. Von Interesse hierbei ist, ob und in welchem Maße die Heparansulfat-bindenden Proteine von *S. aureus* hierauf Einfluss nehmen und in ihrer Wirkung beeinflusst werden. Auch der Einfluss auf die Immunantwort und die Evasionsmechanismen von *S. aureus* sollten weiter beleuchtet werden. Dies gilt vor dem Hintergrund, dass sie anderen Organismen ebenfalls als Schlüsselmoleküle der Internalisation dienen^{[38], [39]}. Da ein Einfluss der Heparansulfat-bindenden Proteine auf die Zell-Zell-Kommunikation^[33] nicht ausgeschlossen ist, sind geeignete Versuche zu entwickeln, die intra- und interzelluläre Zellsignale dokumentieren, nachdem die Wirtszelle Eap und IsaB exponiert wurde. Für Eap wurde bereits gezeigt, dass seine verschiedenen Domänen unterschiedliche Spezifität besitzen^[56]. Welche Domänen die Heparansulfatbindung vermitteln und in welchem Maße sie Einfluss auf die Pathogenese haben, wäre ein weiterer Schritt, dieses Protein zu charakterisieren. Protein-Ligand-Interaktionen sind häufig durch elektrostatische Wechselwirkungen bedingt^[94]. Heparansulfate sind stark negativ geladene Makromoleküle, die gewebs- und speziesspezifisch unterschiedliche Bindeloci aufweisen (s. Abb. 2)^[33]. Inwiefern dies die Heparansulfatbindung von Eap und IsaB beeinflusst, ist ein wichtiges Ziel künftiger Forschung. Die vorliegende Studie ermöglicht neue Adhäsions- und Interaktionsmodelle und ein besseres Verständnis der Pathogenese der durch *S. aureus* ausgelösten Krankheiten.

4.2. WTA-abhängige Methicillinresistenz von *Staphylococcus aureus*

4.2.1. Darlegung der Fragestellung

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde untersucht, inwiefern die Oxacillinresistenz in *hospital acquired* MRSA-Stämmen von der Glykosylierung der Wandteichonsäuren abhängt. Bisherige Studien trafen noch keine Aussage über diesen Bereich hochresistenter *S. aureus*-Stämme. Es wurden lediglich Laborstämme und *community acquired* MRSA-Stämme untersucht. Da Stämme in Einrichtungen des Gesundheitssystems erworbene Stämme von *S. aureus* häufig ein breiteres Muster an Antibiotikaresistenzen aufweisen und damit eine Gefahr für Patienten und Personal darstellen, ist ein exaktes Verständnis der Resistenzentwicklung hier von größter Bedeutung. Zwischen den einzelnen MRSA-Gruppen existieren heute zahlreiche Unterschiede. Daher ist es nicht möglich, Forschungsergebnisse über CA-MRSA-Stämme vorbehaltlos auf HA-MRSA-Stämme zu übertragen. Die vorliegende Studie sollte überprüfen, ob die für CA-MRSA gültigen Erkenntnisse der Oxacillinresistenz durch die Glykosylierung der Wandteichonsäure auch auf HA-MRSA zutreffen.

4.2.2. Knockout der Gene *tarM* und *tarS*, Bestimmung der minimalen inhibitorischen Oxacillinkonzentration

Das für diese Studie festgelegte Studiendesign sah zunächst die Inaktivierung der Gene *tarM* und *tarS* in *S. aureus* COL, einem HA-MRSA vor. Die für die gleichnamigen Glycosyltransferasen codierenden Gene konnten mittels homologer Rekombination inaktiviert werden. Die Methode umfasste Integration in und anschließende Exzision des pKO-Vektors aus dem Genom von *S.*

aureus COL. Durch die bereits in der Arbeitsgruppe vorhandene Expertise im Umgang mit diesem Knockout-System, gelang dieser Schritt der Studie problemlos. Das erfolgreiche Knockout wurde mittels Colony-PCR und anschließender Gelelektrophorese überprüft. Als Negativkontrollen wurde jeweils der Wildtyp betrachtet, der die ursprüngliche Länge der Gene *tarM* und *tarS* aufwies. Das positive Knockout wurde über die Laufweite der Banden bestätigt (s. Abb. 21). Die Minimale Hemmkonzentration von Oxacillin wurde in Flüssigkultur bestimmt. Als Positivkontrolle wurde der MSSA-Stamm *S. aureus* RN4220 eingesetzt, da er gegen Oxacillin keine Resistenz aufweist. Der Versuch wurde dreifach wiederholt und die Mittelwerte der OD₅₇₈ ermittelt (s. Tab. 28 und Abb. 22).

4.2.3. Bedeutung der Ergebnisse

Es konnte im Rahmen dieser Studie nachgewiesen werden, dass die Glykosylierung der Wandteichonsäure keinen Einfluss auf die Oxacillinresistenz des MRSA-Stammes *S. aureus* COL ausübt. Brown et al. zeigten 2012, dass der Verlust der Glykosylierung der WTA MRSA-Stämme wieder sensibel gegenüber Oxacillin werden lässt^[6]. Die Studie schloss den CA-MRSA-Stamm *S. aureus* MW2 ein, der durch die Deletion von *tarM* und *tarS* seine Oxacillinresistenz verlor. Es ist bereits bekannt, dass die Expression von WTA für die β -Laktamresistenz notwendig ist^[91]. Der Mechanismus hierfür war bislang unbekannt. Durch die Ergebnisse von Brown et al. wurde dieser für die untersuchten *S. aureus* Stämme erstmals beleuchtet. Die vorliegende Studie ergänzt diese Erkenntnisse insofern, als dass die Aussagen von Brown et al. nicht pauschal auf alle MRSA-Stämme angewandt werden können. *S. aureus* COL bleibt auch nach Verlust der Glycosyltransferasen *TarM* und *TarS* resistent gegenüber Oxacillin und zeigt hierin keinen Unterschied zum Wildtyp. Die beschriebene Abhängigkeit der Oxacillinresistenz von der Glykosylierung der WTA ist also zumindest stammabhängig unterschiedlich. Ob die Grenze hier

allgemein zwischen CA- und HA-MRSA zu ziehen ist, kann mit den momentan veröffentlichten Arbeiten nicht bestimmt werden. Jedoch ist ein rein stammspezifischer Unterschied aufgrund der differenzierten Verhältnisse innerhalb der MRSA-Gruppen wahrscheinlich.

4.2.4. Fazit

Wichtig für künftige Studien wird das Verteilungsmuster des oben genannten stammspezifischen Unterschiedes sein. Von noch größerem Interesse allerdings dürfte der Mechanismus sein, der der fortbestehenden Oxacillinresistenz von *S. aureus* COL nach Knockout von *tarM* und *tarS* zugrunde liegt. Die Ursache für die Abhängigkeit zwischen Oxacillinresistenz und WTA-Glykosylierung ist bisher ebenfalls unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass WTA mit PBP2a und PBP4 interagiert^{[26], [112]}. Ob diese Interaktion durch die Glykosylierung der WTA mit bedingt ist, bleibt zu untersuchen. WTA beeinflussen das Ladungsniveau der Bakterienzelle^[87] und dienen als wichtiger Matrixbestandteil der Zellwand. Es ist ebenso denkbar, dass die elektrische Ladung oder die Interaktion anderer Zellwandbestandteile mit der WTA Einfluss auf die β -Laktamresistenz haben. Dass die von Brown et al.^[6] präsentierten Ergebnisse für einen HA-MRSA-Stamm nicht zutreffen suggeriert, dass hier komplexere Resistenzmechanismen vorhanden sind. MRSA bleibt ein ernst zu nehmender Verursacher therapieresistenter Infektionen. Auf Basis der in dieser Studie präsentierten Ergebnisse ist es möglich, noch differenzierter an die Entwicklung neuer antibiotischer Wirkstoffe gegen MRSA heranzugehen. Dies ist dringend notwendig, um das Risiko nosokomialer Infektionen zu reduzieren. Mit dem Wissen, dass die Resistenzmechanismen in HA-MRSA effektiver funktionieren als in CA-MRSA, zeigt sich die Notwendigkeit intensiverer Forschung in diesem Bereich.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertationsschrift umfasste zwei Teilprojekte auf dem Gebiet der Pathogenese und β -Laktam-Resistenz von *S. aureus*. Der erste Teil beschäftigte sich mit der Heparansulfatbindung der Proteine Eap und IsaB. Der zweite Teil ging der Frage nach, ob die Glykosylierung der Wandteichonsäure Einfluss auf die β -Laktam-Resistenz des HA-MRSA-Stammes *S. aureus* COL hat.

Der erste Teil der Promotionsarbeit diente der Identifikation zweier neuer Heparansulfat-bindender Proteine von *S. aureus*. Vorarbeiten zu diesem Thema bestätigten die Relevanz der Interaktion mit Heparansulfaten für die Pathogenese und Internalisation von *S. aureus*. Ebenso war bekannt, dass *S. aureus* mehrere Proteine besitzt, die Heparansulfate binden können. Dem Studiendesign folgend wurden zunächst in Frage kommende Proteine eingegrenzt. Die Auswahl umfasste das sekretierte, multifunktionale *extracellular adherence protein* (Eap) und das membranständige *immunodominant surface antigen B* (IsaB). Die Arbeitshypothese ging davon aus, dass Eap und IsaB in der Lage seien, Heparansulfate zu binden. Die Gene, die für Eap und IsaB codieren, wurden in den Überexpressionsvektor pET28a kloniert. Nach der erfolgreichen Überexpression von Eap und IsaB in *E. coli* C43 wurden diese auf ihre Löslichkeit untersucht und mittels eines eigens zu diesem Zweck etablierten Heparansulfat-Pull-Down-Assays auf ihre Fähigkeit zur Heparansulfatbindung untersucht. In diesem Assay wurden die überexprimierten Proteine mit Heparin-beschichteten Sepharosebeads vermengt. Nach mehreren Waschschrinen wurde die Bindung zwischen Protein und Heparin thermisch unterbrochen und gebundene Proteine gingen wieder in Lösung über. Alle Nachweise wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot erbracht. Es wurde gezeigt, dass Eap und IsaB Heparansulfate binden können, die Arbeitshypothese wurde bestätigt. Dies identifiziert erstmals zwei

Heparansulfat-bindende Proteine dieses Bakteriums. Die Relevanz der Ergebnisse für Adhäsion, Pathogenese und Evasionsmechanismen von *S. aureus* verbleibt zunächst unklar. Jedoch ermöglichen die Erkenntnisse dieser Arbeit die Entwicklung neuer Adhäsions- und Interaktionsmodelle und erweitern das Bild der Einflussmöglichkeiten von *S. aureus* auf den Wirtsorganismus immens.

Im zweiten Teil dieser Promotionsarbeit wurde die Hypothese verfolgt, dass die Glykosylierung der Wandteichonsäuren keinen Einfluss auf die β -Laktam-Resistenz des *hospital acquired* MRSA-Stammes *S. aureus* COL hat. Die Glykosylierung der Wandteichonsäuren erfolgt intrazellulär durch die Glycosyltransferasen TarM und TarS. TarM überträgt dabei α -, TarS β GlcNAc-auf die Wandteichonsäure. Die entsprechenden Gene wurden in dem zu untersuchenden Stamm mittels homologer Rekombination gezielt inaktiviert, um zwei Knockout-Mutanten zu schaffen. Die Kontrolle des korrekten Knockouts wurde mittels Colony-PCR durchgeführt. Es wurde die minimale inhibitorische Konzentration von Oxacillin auf das Wachstum der Mutanten in Flüssigkultur bestimmt. Es zeigte sich hierbei kein Unterschied zum Wildtyp. Die Negativkontrolle zeigte kein Wachstum. Die Studie zeigt, dass der Verlust α - bzw. β -glykosylierter Wandteichonsäuren keinen Einfluss auf das Resistenzniveau von *S. aureus* COL gegenüber Oxacillin hat. Für den *community acquired* MRSA-Stamm MW2 ist bekannt, dass ebendieser Verlust die Resistenz gegenüber Oxacillin herabsetzt. Die Studie zeigt, dass der Einfluss glykosylierter Wandteichonsäure auf die Oxacillinresistenz zumindest stammspezifisch ist. Der exakte Mechanismus hierbei verbleibt unbekannt. Die Interaktion der *penicillin binding proteins 2a* und *4* mit der Wandteichonsäure und das teichonsäureabhängige Ladungsniveau der Zellwand stellen nur zwei der möglichen Ursachen für diesen Effekt dar. Es wird darüber hinaus deutlich, dass Stämme, die vor allem in Einrichtungen des Gesundheitssystems vorkommen, offenbar ein komplexeres System der Resistenzentwicklung besitzen als Stämme, die außerhalb des klinischen Sektors erworben werden.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Groß, U (2009) **Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 2. Auflage.** S. 25-38, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [2] Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D and Fridkin SK (2003) **Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene.** The New England Journal of Medicine 348(14): 1342-1347
- [3] Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd. Atlanta, GA 30333, USA
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections. Stand: 11. September 2013. <http://www.cdc.gov/mrsa/lab/index.html> (abgerufen am 16. August 2014)
- [4] Jenkins C, Geary SJ, Gladd M and Djordjevic SP (2007) **The *Mycoplasma gallisepticum* OsmC-like protein MG1142 resides on the cell surface and binds heparin.** Microbiology 153: 1455-1463
- [5] Liang OD, Ascencio F, Fransson LA and Wadström T (1992) **Binding of heparan sulfate to *Staphylococcus aureus*.** Infection and Immunity 60(3): 899-906
- [6] Brown S, Xia G, Luhachack LG, Campbell J, Meredith TC, Chen C, Winstel V, Gekeler C, Irazoqui JE, Peschel A and Walker S (2012) **Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* requires glycosylated wall teichoic acids.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109(46): 18909-18914
- [7] Mazmanian SK, Ton-That H and Schneewind O (2001) **Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*.** Molecular Microbiology 40(5): 1049-1057
- [8] Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT and Herrmann M (2005) ***Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems.** The Journal of Thrombosis and Haemostasis 94(2): 278-285
- [9] Flock M and Flock JI (2001) **Rebinding of extracellular adherence protein Eap to *Staphylococcus aureus* can occur through a surface-bound neutral phosphatase.** The Journal of Bacteriology 183(13): 3999-4003

- [10] Downer R, Roche F, Park PW, Mecham RP and Foster TJ (2002) **The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein.** The Journal of Biological Chemistry 277(1): 243-250
- [11] Percy MG and Gründling A (2014)
Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria. Annual Review of Microbiology (Epublikation vor finaler Print-Publikation)
- [12] Morath S, von Aulock S and Hartung T (2005) **Structure/function relationships of lipoteichoic acids.** The Journal of Endotoxin Research 11(6): 348-356
- [13] Kristian SA, Lauth X, Nizet V, Götz F, Neumeister B, Peschel A and Landmann R (2003) **Alanylation of teichoic acids protects *Staphylococcus aureus* against Toll-like receptor 2-dependent host defense in a mouse tissue cage infection model.** The Journal of Infectious Diseases 188(3): 414-423
- [14] Ginsburg I (2002) **Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation.** The Lancet Infectious Diseases 2(3): 171-179
- [15] Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, Chanturiya T, Kalbacher H, Gross M, Nicholson G, Neumeister B, Mond JJ and Peschel A (2004) **Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections.** Nature Medicine 10(3): 243-245
- [16] Weidenmaier C, Peschel A, Xiong Y, Kristian SA, Dietz K, Yeaman MR and Bayer AS (2005) **Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis.** The journal of Infectious Diseases 191(10): 1771-1777
- [17] Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Moreillon P, Lew D, Krause KH, Peters G and Herrmann M (2000) **Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells.** Infection and Immunity 68(12): 6871-6878
- [18] Hussain M, Haggar A, Heilmann C, Peters G, Flock JI and Herrmann M (2002) **Insertional inactivation of eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts.** Infection and Immunity 70(6): 2933-2940

- [19] Wann ER, Gurusiddappa S and Hook M (2000) **The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen.** The Journal of Biological Chemistry 275(18): 13863-13871
- [20] Vazquez V, Liang X, Horndahl JK, Ganesh VK, Smeds E, Foster TJ and Hook M (2011) **Fibrinogen is a ligand for the *Staphylococcus aureus* microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) bone sialoprotein-binding protein (Bbp).** The Journal of Biological Chemistry 286(34): 29797-29805
- [21] Hair PS, Ward MD, Semmes OJ, Foster TJ and Cunnion KM (2008) ***Staphylococcus aureus* clumping factor A binds to complement regulator factor I and increases factor I cleavage of C3b.** The Journal of Infectious Diseases 198(1): 125-133
- [22] Palma M, Haggar A and Flock JI (1999) **Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity.** The Journal of Bacteriology 181(9): 2840-2845
- [23] Haggar A, Ehrnfelt C, Holgersson J and Flock JI (2004) **The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits neutrophil binding to endothelial cells.** Infection and Immunity 72(10): 6164-6167
- [24] Schröder NW, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U, Göbel UB, Weber JR and Schumann RR (2003) **Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved.** The Journal of Biological Chemistry 278(18): 15587-15594
- [25] Aly R, Shinefield HR, Litz C and Maibach HI (1980) **Role of teichoic acid in the binding of *Staphylococcus aureus* to nasal epithelial cells.** The journal of infectious Diseases 141(4): 463-465
- [26] Atilano ML, Pereira PM, Yates J, Reed P, Veiga H, Pinho MG and Filipe SR (2010) **Teichoic acids are temporal and spatial regulators of peptidoglycan cross-linking in *Staphylococcus aureus*.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(44): 18991-18996
- [27] Wickham JR, Halye JL, Kashtanov S, Khandogin J and Rice CV (2009) **Revisiting magnesium chelation by teichoic acid with phosphorus solid-state NMR and theoretical calculations.** The journal of Physical Chemistry 113(7): 2177-2183

- [28] Xia G, Corrigan RM, Winstel V, Goerke C, Gründling A and Peschel A (2011) **Wall teichoic acid-dependent adsorption of staphylococcal siphovirus and myovirus.** The Journal of Bacteriology 193(15): 4006-4009
- [29] Capila I and Linhardt RJ (2002) **Heparin-protein interactions.** Angewandte Chemie (International edited in English) 41(3): 391-412
- [30] Couchman JR (2010) **Transmembrane signaling proteoglycans.** Annual Review of Cell and developmental Biology 26: 89-114
- [31] Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW and Etzler ME (2009) **Essentials of Glycobiology, 2nd edition. 16: Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (New York, USA)
- [32] Bishop JR, Schuksz M and Esko JD (2007) **Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology.** Nature 446(7139): 1030-1037
- [33] Kreuger J, Spillmann D, Li JP and Lindahl U (2006) **Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity.** The Journal of Cell Biology 174(3): 323-327
- [34] Esko JD and Lindahl U (2001) **Molecular diversity of heparan sulfate.** The Journal of Clinical Investigation 108(2): 169-173
- [35] Carey DJ (1997) **Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors.** The Biochemical Journal 327(Pt 1): 1-16
- [36] De Cat B and David G (2001) **Developmental roles of the glypicans.** Seminars in cell & developmental Biology 12(2): 117-125
- [37] Seo T and StClair RW (1997) **Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and degradation of beta-VLDL and promote cholesterol accumulation by pigeon macrophages.** The Journal of Lipid Research 28(4):765-779
- [38] Hallak LK, Spillmann D, Collins PL and Peeples ME (2000) **Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection.** The Journal of Virology 74(22): 10508-10513
- [39] Xia G, Chen J, Tiwari V, Ju W, Li JP, Malmstrom A, Shukla D and Liu J (2002) **Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1.** The Journal of Biological Chemistry 277(40): 37912-37919

- [40] Heremans A, van der Schueren B, de Cock B, Paulsson M, Cassiman JJ, van den Berghe H and David G (1989) **Matrix-associated heparan sulfate proteoglycan: core protein-specific monoclonal antibodies decorate the pericellular matrix of connective tissue cells and the stromal side of basement membranes.** The Journal of Cell Biology 109 (Pt 6): 3199-3211
- [41] Goldberg S, Harvey SJ, Cunningham J, Tryggvason K and Miner JH (2009) **Glomerular filtration is normal in the absence of both agrin and perlecan-heparan sulfate from the glomerular basement membrane.** Nephrology, dialysis, transplantation 24(7): 2044-2051
- [42] Kröger S and Schröder JE (2002) **Agtrin in the developing CNS: new roles for a synapse organizer.** News in physiological sciences 17: 207-212
- [43] Halfter W, Dong S, Schurer B and Cole GJ (1998) **Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan.** The journal of Biological Chemistry 273(39): 25404-25412
- [44] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR and Folkman J (1997) **Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.** Cell 88(2): 277-285
- [45] Dowd CJ, Cooney CL and Nugent MA (1999) **Heparan sulfate mediates bFGF transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding.** The Journal of Biological Chemistry 274(8): 5236-5244
- [46] Thomas Karow and Ruth Lang-Roth (2010) **Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 18. Auflage.** S. 167, Herausgeber: Dr. med. Thomas Karow, Köln
- [47] Alvarez-Dominguez C, Vázquez-Boland JA, Carrasco-Marín E, López-Mato P and Leyva-Cobián F (1997) **Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition.** Infection and Immunity 65(1): 78-88
- [48] Freissler E, Meyer auf der Heyde A, David G, Meyer TF and Dehio C (2000) **Syndecan-1 and syndecan-4 can mediate the invasion of OpaHSPG-expressing *Neisseria gonorrhoeae* into epithelial cells.** Cellular Microbiology 2(1): 69-82
- [49] Park PW, Foster TJ, Nishi E, Duncan SJ, Klagsburn M and Chen Y (2004) **Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin and beta-toxin.** The Journal of Biological Chemistry 279(1): 251-258

- [50] Park PW, Pier GB, Preston MJ, Goldberg O, Fitzgerald ML and Bernfield M (2000) **Syndecan-1 shedding is enhanced by LasA, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa***. The Journal of Biological Chemistry 275(5): 3057-3064
- [51] Spear PG (2004) **Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry**. Cellular Microbiology 6(5): 401-410
- [52] Cheshenko N, Liu W, Satlin LM and Herold BC (2007) **Multiple receptor interactions trigger release of membrane and intracellular calcium stores critical for herpes simplex virus entry**. Molecular Biology of the Cell 18(8): 3119-3130
- [53] Hess DJ, Henry-Stanley MJ, Erlandsen SL and Wells CL (2006) **Heparan sulfate proteoglycans mediate *Staphylococcus aureus* interactions with intestinal epithelium**. Medical Microbiology and Immunology 195(3): 133-141
- [54] Alston WK, Elliot DA, Epstein ME, Hatcher VB, Tang M and Lowy FD (1997) **Extracellular matrix heparan sulfate modulates endothelial cell susceptibility to *Staphylococcus aureus***. The Journal of Cellular Physiology 173(1): 102-109
- [55] Jönsson K, McDevitt D, McGavin MH, Patti JM and Höök M (1995) ***Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog**. The Journal of Biological Chemistry 270(37): 21457-21460
- [56] Hussain M, Haggar A, Peters G, Chhatwal GS, Herrmann M, Flock JI and Sinha B (2008) **More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation**. Infection and Immunity 76(12): 5615-5623
- [57] Schneider D, Liaw L, Daniel C, Athanasopoulos AN, Herrmann M, Preissner KT, Nawroth PP and Chavakis T (2007) **Inhibition of breast cancer cell adhesion and bone metastasis by the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus***. Biochemical and Biophysical Research Communications 357(1): 282-288
- [58] Vuong C, Keller D, Peschel A and Otto M (2002)
Binding of the Map protein of *Staphylococcus aureus* Newman to the cell wall is dependent on the D-alanylation of teichoic acids. 10th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, p. 43 Tsukuba, Japan. ISSSI 102-Abstract 01
- [59] Harraghy N, Hussain M, Haggar A, Chavakis T, Sinha B, Herrmann M and Flock JI (2003) **The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap**. Microbiology 149: 2701-2707

- [60] Hagggar A, Hussain M, Lönnies H, Herrmann M, Norrby-Teglund A and Flock JI (2003) **Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells.** Infection and Immunity 71(5): 2310-2317
- [61] Kreikemeyer B, McDevitt D and Podbielski A (2002) **The role of the map protein in *Staphylococcus aureus* matrix protein and eukaryotic cell adherence.** International Journal of Medical Microbiology 292(3-4): 283.295
- [62] Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, Sobke A, Schneider D, Weber H, Augustin HG, Eming SA, Schubert U, Linn T, Nawroth PP, Hussani M, Hammes HP, Herrmann M, Preissner KT and Chavakis T (2006) **The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms.** Blood 107(7): 2720-2727
- [63] Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI, Herrmann M and Preissner KT (2002) ***Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes.** Nature Medicine 8(7): 687-693
- [64] Mackey-Lawrence NM, Potter DE, Cerca N and Jefferson KK (2009) ***Staphylococcus aureus* immunodominant surface antigen B is a cell-surface associated nucleic acid binding protein.** BMC Microbiology 9:61
- [65] Lorenz U, Ohlsen K, Karch H, Hecker M, Thiede A and Hacker J (2000) **Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.** FEMS Immunology and Medical Microbiology 29(2): 145-153
- [66] Fallgren C, Utt M and Ljungh A (2001) **Isolation and characterisation of a 17-kDa staphylococcal heparin-binding protein with broad specificity.** The Journal of Medical Microbiology 50(6): 547-557
- [67] Clarke SR and Foster SJ (Erste Edition: 2006) **Advances in Microbial Physiology, Vol. 51. Kapitel: Surface Adhesins of *Staphylococcus aureus*.** S. 209, Herausgeber: Poole RK, Elsevier Verlag Amsterdam (NL), San Diego (CA, USA), Oxford (UK), London (UK)
- [68] McCarthy AJ and Lindsay JA (2010) **Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions.** BMC Microbiology 10: 173
- [69] Jevons P (1961) **„Celbenin“-resistant *Staphylococci*.** The British Medical Journal 1(5219): 124-125

- [70] Scherf G (2006) **Wörterbuch Biologie**. S. 53, tosa-Verlag, Wien (AT)
- [71] Weidenmaier C and Peschel A (2008) **Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions**. *Nature Reviews, Microbiology* 6(4): 276-287
- [72] Swoboda JG, Campbell J, Meredith TC and Walker S (2010) **Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis, and Inhibition**. *ChemBioChem* 11(1): 35-45
- [73] Mirelman D, Beck BD and Shaw DR (1970) **The location of the D-alanyl ester in the ribitol teichoic acid of *Staphylococcus aureus***. *Biochemical and Biophysiological Research Communications* 39(4): 712-717
- [74] Yokoyama K, Mizuguchi H, Araki Y, Kaya S and Ito E (1989) **Biosynthesis of linkage units for teichoic acids in gram-positive bacteria: distribution of related enzymes and their specificities for UDP-sugars and lipid-linked intermediates**. *The Journal of Bacteriology* 171(2): 940-946
- [75] Qian Z, Yin Y, Zhang Y, Lu L, Li Y and Jiang Y (2006) **Genomic characterization of ribitol teichoic acid synthesis in *Staphylococcus aureus*: genes, genomic organization and gene duplication**. *BMC Genomics* 7: 74
- [76] Brown S, Santa Maria JP Jr and Walker S (2013)
Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology* 67: 313-336
- [77] Kawai Y, Marles-Wright J, Cleverley RM, Emmins R, Ishikawa S, Kuwano M, Heinz N, Bui NK, Hoyland CN, Ogasawara N, Lewis RJ, Vollmer W, Daniel RA and Erington J (2011)
A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. *The EMBO Journal* 30(24): 4931-4941
- [78] Chan YG, Kim HK, Schneewind O and Missiakas D (2014)
The Capsular Polysaccharide of *Staphylococcus aureus* is attached to Peptidoglycan by the LytR-CpsA-Psr(LCP) family of enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* 289(22): 15680-15690
- [79] Winstel V, Xia G and Peschel A (2013) **Pathways and roles of wall teichoic acid glycosylation in *Staphylococcus aureus***. *the International Journal of Medical Microbiology* pii: S1438-4221(13)00159-8

- [80] Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G and Götz F (1999) **Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides.** the journal of Biological Chemistry 247(13): 8405-8410
- [81] Soldo B, Lazarevic V and Karamata D (2002) **tagO is involved in the synthesis of all anionic cell-wall polymers in *Bacillus subtilis* 168.** Microbiology 148(Pt 7): 2079-2087
- [82] Xia G, Maier L, Sanchez-Carballo P, Li M, Otto M, Holst O and Peschel A (2010) **Glycosylation of wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* by TarM.** The Journal of Biological Chemistry 285(18): 13405-13415
- [83] Nathenson SG and Strominger JL (1963) **Enzymatic synthesis of N-acetylglucosaminylribitol linkages in teichoic acid from *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen.** The Journal of Biological Chemistry 238: 3161-3169
- [84] Vergara-Irigaray M, Maira-Litrán T, Merino N, Pier GB, Penadés JR and Lasa I (2008) **Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface.** Microbiology 154 (Pt 3): 865-877
- [85] Chatterjee AN (1969) **Use of bacteriophage-resistant mutants to study the nature of the bacteriophage receptor site of *Staphylococcus aureus*.** The Journal of Bacteriology 98(2): 519-527
- [86] Park JT, Shaw DR, Chatterjee AN, Mirelman D and Wu T (1974) **Mutants of *staphylococci* with altered cell walls.** Annals of the New York Academy of Sciences 236(0): 54-62
- [87] Neuhaus FC and Baddiley J (2003) **A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria.** Microbiology and Molecular Biology Reviews 67(4): 686-723
- [88] Collins LV, Kristian SA, Weidenmaier C, Faigle M, Van Kessel KP, Van Strijp JA, Götz F, Neumeister B and Peschel A (2002) ***Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice.** The Journal of Infectious Diseases 186(2): 214-219
- [89] Peschel A, Vuong C, Otto M and Götz F (2000) **The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44(10): 2845-2847

- [90] Xia G and Wolz C (2013) **Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution.** Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases 21: 593-601
- [91] Campbell J, Singh AK, Santa Maria JP jr., Kim Y, Brown S, Swoboda JG, Mylonakis E, Wilkinson BJ and Walker S (2011) **Synthetic lethal compound combinations reveal a fundamental connection between wall teichoic acid and peptidoglycan biosyntheses in *Staphylococcus aureus*.** ACS Chemical Biology 6(1): 106-116
- [92] Farha MA, Leung A, Sewell EW, D'Elia MA, Allison SE, Ejim L, Pereira PM, Pinho MG, Wright GD and Brown ED (2013) **Inhibition of WTA synthesis blocks the cooperative action of PBPs and sensitizes MRSA to β -lactams.** ACS Chemical Biology 8(1): 226-233
- [93] Maki H, Yamaguchi T and Murakami K (1994)
Cloning and Characterization of a gene affecting the methicillin resistance level and the autolysis rate in *Staphylococcus aureus*. The Journal of Bacteriology 176(16): 4993-5000
- [94] Kukić P and Nielsen JE (2010) **Electrostatics in proteins and protein-ligand complexes.** Future Medical Chemistry 2(4): 647-666
- [95] Novagen®, EMD Chemicals Inc. **pET System Manual 11th Edition.** Darmstadt (D) (2011)
- [96] Dumon-Seignovert L, Cariot G and Vuillard L (2004) **The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3).** Protein Expression and Purification 37(1): 203-6
- [97] Novy R, Drott D, Yaeger K and Mierendorf R (2001) **Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression.** inNovations Newsletter of Novagen Inc 12: 1-4
- [98] Bertling A, Niemann S, Hussain M, Holbrook L, Stanley RG, Brodde MF, Pohl S, Schifferdecker T, Roth J, Jurk K, Müller A, Lahav J, Peters G, Heilmann C, Gibbins JM and Kehrel BE (2012) **Staphylococcal Extracellular Adherence Protein induces platelet activation by stimulation of thiol isomerases.** Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 32: 1979-1990
- [99] Parish CR (2006) **The role of heparan sulphate in inflammation.** Nature Reviews Immunology 6: 633-643
- [100] Vreys V and David G (2007) **Mammalian heparanase: What is the message?** The Journal of Cellular and Molecular Medicine 11(3): 427-452

- [101] Taylor KR and Gallo RL (2006) **Glycosaminoglycans and their proteoglycans: Host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation.** FASEB Journal 20(1): 9-22
- [102] Lorenz U, Ohlsen K, Karch H, Thiede A and Hacker J (2000) **Immunodominant proteins in human sepsis caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.** Advances in Experimental Medicine and Biology 485(2000): 273-278
- [103] Garzoni C, Francois P, Huyghe A, Couzinet S, Tapparel C, Charbonnier Y, Renzoni A, Lucchini S, Lew DP, Vaudaux P, Kelley WL and Schrenzel J (2007) **A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells.** BMC Genomics 8: 171
- [104] Resch A, Rosenstein R, Nerz C and Götz F (2005) **Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions.** Applied and Environmental Microbiology 71(5): 2663-2676
- [105] Fuchs S, Pane-Farre J, Kohler C, Hecker M and Engelmann S (2007) **Anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*.** The Journal of Bacteriology 189(11): 4275-4289
- [106] Mackey-Lawrence NM and Jefferson KK (2013) **Regulation of *Staphylococcus aureus* immunodominant antigen B (IsaB).** Microbiological Research 168(2): 113-118
- [107] Christianson HC and Belting M (2013) **Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor.** Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology pii: S0945-053X(13)00133-9
- [108] Blumberg EA, Hatcher VB and Lowy FD (1988) **Acidic fibroblast growth factor modulates *Staphylococcus aureus* adherence to human endothelial cells.** Infection and Immunity 56(6): 1470-1474
- [109] Zhu H, Duchense L, Rudland PS and Fernig DG (2010) **The heparan sulfate co-receptor and the concentration of fibroblast growth factor-2 independently elicit different signalling patterns from the fibroblast growth factor receptor.** Cell Communication and Signalling 8: 14
- [110] Ornitz DM (2000) **FGFs, heparan sulfate and FGFRs: Complex interactions essential for development.** BioEssays: News and Reviews in molecular, cellular and developmental Biology 22(2): 108-112
- [111] Pellegrini L (2001) **Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: A structural view.** Current opinion in Structural Biology 11(5): 629-634

- [112] Qamar A and Golemi-Kotra D (2012) **Dual roles of FmtA in *Staphylococcus aureus* cell wall biosynthesis and autolysis**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(7): 3797-3805
- [113] Pôle Bioinformatique Lyonnais, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université Claude Bernard Lyon 1, République française (Stand: 18. Oktober 2014) **CLUSTALW**
https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html
(abgerufen am 18. Oktober 2014)
- [114] Bioinformatics and Computational Biology Unit, University of Pretoria, South Africa (Stand: 18. Oktober 2014) **PEPSTATS (Protein statistics)**
http://www.bi.up.ac.za/cgi-bin/emboss.pl?_action=input&_app=pepstats (abgerufen am 18. Oktober 2014)

7. Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit gebe ich, Frieder Kiefer, geboren am 21.07.1987 in Tübingen, folgende Erklärung zum Eigenanteil an dieser Dissertationsschrift ab:

Herr Frieder Kiefer war an der Konzeption der Studie beteiligt. Die Literaturrecherche wurde von ihm eigenständig durchgeführt. Sämtliche Versuche wurden von ihm selbstständig durchgeführt. Optimierungen bereits vorhandener Versuchsprotokolle und Etablierung des Heparansulfat-Pull-Down-Assays wurden von ihm eigenständig realisiert. Das Manuskript sowie sämtliche Abbildungen wurde von ihm selbstständig verfasst. Die Abbildungen 2 und 5 wurden dabei unter Angabe der Bezugsquellen neu entworfen.

Herr Prof. Dr. Andreas Peschel war an der Konzeption der Studie beteiligt, betreute die Arbeit und korrigierte das Manuskript.

Herr Dr. Guoqing Xia war an der Konzeption der Studie beteiligt und betreute die Arbeit.

Die Firma GATC führte die Dienstleistung der Sequenzkontrolle der Vektorkonstrukte durch.

8. Danksagung

Prof. Dr. Andreas Peschel möchte ich sehr herzlich für die Vergabe eines unglaublich spannenden und herausfordernden Dissertationsthemas und die Begutachtung der Dissertationsschrift danken. Für die vielen Jahre der Unterstützung und das Vertrauen, das er in mich setzte, werde ich ihm stets meine höchste Dankbarkeit schulden.

Dr. Guoqing Xia danke ich für die Planung, Betreuung und Hilfe bei der Umsetzung aller Arbeiten für diese Dissertation. Großen Dank schulde ich ihm für die vielen konstruktiven Korrekturvorschläge meiner schriftlichen Ausarbeitungen.

Dr. Volker Winstel danke ich für die vielen freundschaftlichen Gespräche, unzähligen Hilfestellungen und Tipps, mit denen er mir mehr als einmal unter die Arme gegriffen hat. Deshalb und nicht zuletzt wegen seines Wissens über Koleopterologie ist er einer der gewandtesten Biologen, die ich kenne, und ein guter Freund.

Zu den gewandtesten Biologen und guten Freunden zählen desweiteren Dr. Dominik Bloes, Dr. Bernhard Krismer, Dennis Hanzelmann und Katharina Fuchs, die mich als "fachfremden" Mediziner ganz selbstverständlich aufnahmen und denen ich deshalb und wegen ihrer wertvollen Unterstützung für immer freundschaftlich verbunden bleiben werde.

Ein großer Dank gilt Cordula Gekeler und Petra Kühner, die mir mit ihrem Fachwissen bei allen Versuchen zur Seite standen und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und meiner Frau Hanna Kiefer, die mich während guter, wie auch zäher Phasen meiner Arbeit begleitet und immer wieder auf's Neue motiviert haben.

Auch vielen Freunden bin ich Dank schuldig: Dario Bosch für seine tiefgehende Freundschaft, Stephanie Götze für ihre Treue als ich diese am dringendsten brauchte und Lorenzo Roncoroni, weil er einfach eine treue Seele ist.

9. Lebenslauf

	Frieder Kiefer geboren am 21.07.1987 in Tübingen
04/2008 - 12/2014	Studium der Humanmedizin, Eberhard Karls Universität Tübingen
10.12.2014	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2), Approbation als Arzt
10/2011 – 07/2015	Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen, Betreuung durch Prof. Dr. Andreas Peschel, Thema: „Identifikation und Charakterisierung neuer Virulenzfaktoren von <i>Staphylococcus aureus</i> : Heparansulfat-bindende Proteine und WTA-abhängige Methicillin-Resistenz“
08/2013 – 08/2014	Praktisches Jahr, Universitätsklinikum Tübingen
unterdessen	Famulaturen in den Bereichen Pädiatrie, Unfallchirurgie und Anästhesie Tutor für Histologie und Mikroskopie am Institut für Anatomie
31.03.2010	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
07/2007 – 03/2008	Wehrdienst, Logistikbataillon 471, Landsberg am Lech
1998 – 2007	Uhland-Gymnasium, Tübingen <ul style="list-style-type: none">◦ Allgemeine Hochschulreife◦ Zertifikat „Europäisches Abitur“
1994 – 1998	Dorfacker-Grundschule, Tübingen – Lustnau