

**Universität
Rostock**



Traditio et Innovatio

**Untersuchungen zur Hemmung der Biofilmbildung anaerober
Mikroorganismen am Beispiel von *Clostridioides difficile***

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Julia Strübing, geboren am 27.08.1988 in Zehdenick

aus Rostock

Rostock, den 19.06.2023

Gutachter:

Prof. Dr. Hubert Bahl, Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften

Prof. Dr. Michael Hecker, Universität Greifswald, Institut für Mikrobiologie

Jahr der Einreichung: 2022

Jahr der Verteidigung: 2023

Die Promotion wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „Card-ii-Omics“ angefertigt und durch Mittel des Europäischen Sozialfonds (ESF) finanziert (ESF/14-BM-A550015/16). Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil des Qualifikationsprogrammes „Förderung von Nachwuchswissenschaftlern in exzellenten Forschungsverbänden - Exzellenzforschungsprogramm des Landes Mecklenburg-Vorpommern“.



EUROPÄISCHE UNION
Europäischer Sozialfonds



Europäische Fonds EFRE, ESF und ELER
in Mecklenburg-Vorpommern 2014-2020

Inhalt

1	Einleitung	- 6 -
1.1	Biofilme – Vorkommen, Bildung und ihre Bedeutung bei Infektionen	- 6 -
1.2	Potentielle Wirkstoffe zur Vermeidung der Biofilmbildung auf Implantatoberflächen	- 10 -
1.2.1	<i>Cis</i> -2-Decensäure	- 10 -
1.2.2	D-Aminosäuren	- 11 -
1.2.3	Schistosomale Proteine	- 13 -
1.3	Der Teufelskreis aus Infektion und Antibiotikatherapie - die „leaky gut“ Hypothese	- 14 -
1.4	<i>Clostridioides difficile</i>	- 16 -
	Die Biofilmbildung von <i>Clostridioides difficile</i>	- 17 -
1.5	Zielstellung	- 18 -
2	Materialien und Methoden	- 19 -
2.1	Geräte und Materialien	- 19 -
2.2	Verwendete Software	- 19 -
2.3	Organismen, Plasmide und Oligonukleotide	- 19 -
2.4	Stammhaltung und Kultivierung	- 19 -
2.4.1	<i>C. difficile</i>	- 19 -
2.4.2	<i>E. coli</i>	- 20 -
2.4.3	<i>S. cerevisiae</i>	- 21 -
2.5	Bestimmung physiologischer Parameter	- 22 -
2.5.1	Optische Dichte	- 22 -
2.5.2	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten	- 22 -
2.5.3	Ermittlung der Zelllänge	- 22 -
2.5.4	Quantifizierung der Biofilmmasse	- 22 -
2.5.5	Vitalitätsuntersuchungen nach Lebend/Tot Färbung mittels Fluoreszenzmikroskopie	- 23 -
2.6	Arbeiten mit Nukleinsäuren	- 24 -
2.6.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	- 24 -
2.6.2	Isolierung von RNA aus <i>Schistosoma mansoni</i>	- 24 -
2.6.3	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase	- 24 -
2.6.4	PCR-Techniken	- 24 -
2.6.5	Enzymatische Modifikation von DNA	- 27 -
2.6.6	Agarose-Gelelektrophorese	- 27 -
2.7	Erzeugung rekombinanter Organismen	- 28 -
2.7.1	Erzeugung des Spendervektors	- 30 -
2.7.2	Erzeugung des Zielvektors	- 31 -

2.7.3	Herstellung kompetenter Zellen	- 32 -
2.7.4	CaCl ₂ -vermittelte Transformation in <i>E. coli</i>	- 33 -
2.7.5	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mittels Elektroporation	- 33 -
2.8	Arbeiten mit Proteinen	- 34 -
2.8.1	Überexpression von Proteinen in <i>S. cerevisiae</i>	- 34 -
2.8.2	Zellaufschluss von <i>S. cerevisiae</i> mittels Hochgeschwindigkeits-homogenisation	- 34 -
2.8.3	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatografie	- 35 -
2.8.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	- 36 -
2.8.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	- 36 -
2.8.6	Kolloidale Coomassie-Färbung	- 38 -
2.8.7	Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	- 39 -
2.8.8	Detektion von 6x-His-Tag Fusionsproteinen	- 40 -
2.9	Statistische Auswertung	- 41 -
3	Ergebnisse	- 42 -
3.1	Die Biofilmbildung klinischer <i>C. difficile</i> Isolate <i>in vitro</i> ist variabel	- 42 -
3.2	Wachstums- und Biofilmhemmende Effekte von <i>cis</i> -2-Decensäure	- 49 -
3.2.1	Der Einfluss von <i>cis</i> -2-Decensäure nach Beschichtung der Oberfläche auf die Biofilmbildung von <i>C. difficile</i>	- 49 -
3.2.2	Der Einfluss von <i>cis</i> -2-Decensäure auf die Biofilmbildung von <i>C. difficile</i> nach Zugabe zum Medium	- 52 -
3.3	Kultivierungsbedingte Effekte von D-Aminosäuren auf die Biofilmbildung von <i>C. difficile</i>	- 56 -
3.3.1	Die Biofilmbildung von <i>C. difficile</i> auf mit D-Aminosäuren beschichteten Oberflächen	- 56 -
3.3.2	Die Biofilmbildung von <i>C. difficile</i> bei Zugabe von D-Aminosäuren	- 58 -
3.4	Der Effekt von Tegumentproteinen des Saugwurmes <i>Schistosoma mansoni</i> auf die Biofilmbildung von <i>C. difficile</i>	- 62 -
3.4.1	Die rekombinante Herstellung schistosomaler Tegumentproteine	- 62 -
3.5	Die Effekte von rSm22.6 auf die Biofilmbildung von <i>C. difficile</i>	- 69 -
4	Diskussion und Ausblick	- 71 -
4.1	Anaerobier als Infektionserreger in Biofilmen auf Implantaten	- 71 -
4.2	Das Biofilmverhalten klinischer Isolate und der Einfluss der Kultivierungsbedingungen	- 72 -
4.3	<i>Cis</i> -2-Decensäure hemmt das Wachstum und die Biofilmbildung von <i>C. difficile</i>	- 74 -
4.4	D-Aminosäuren und ihr Einfluss auf Biofilme	- 77 -
4.5	Schistosomale Proteine als Oberflächenbeschichtung für Implantate	- 80 -
5	Zusammenfassung	- 85 -

Anhang	- 85 -
Literaturverzeichnis	- 102 -
Abbildungsverzeichnis	- 113 -
Tabellenverzeichnis	- 115 -
Abkürzungs – und Symbolverzeichnis	- 116 -
Eidesstattliche Versicherung	- 118 -
Wissenschaftlicher Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Danksagung	- 119 -

1 Einleitung

1.1 Biofilme – Vorkommen, Bildung und ihre Bedeutung bei Infektionen

Im Jahr 1987 veröffentlichte der kanadische Mikrobiologe J. William Costerton die Theorie, dass die Mehrzahl der Bakterien aquatischer Ökosysteme in Matrix umschlossener Glykokalix wächst und dass diese sessilen Bakterien sich grundlegend von planktonisch lebenden Bakterien unterscheiden [1, 2]. Für dieses Verhalten prägte er den Begriff Biofilm [3]. Ein Biofilm ist eine sessile mikrobielle Gemeinschaft, welche aus Zellen besteht, die irreversibel an ein Substrat, eine Oberfläche oder Grenzfläche anhaften und in eine selbstproduzierte Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind [4]. Biofilme kommen ubiquitär vor. Sie sind in der Natur zum Beispiel auf Steinen in Gewässern zu finden [5, 6]. Im industriellen Umfeld siedeln sich Biofilme u.a. in Wasserrohren [7], in Kläranlagen für die Reinigung des Abwassers [8–10] und auch in Klimaanlage [11] an. Im medizinischen Bereich spielen Biofilme als Besiedler des menschlichen Gastro-Intestinaltrakts [12], als Plaque auf den Zähnen [13] und auch auf Implantaten als Infektionsherd [14] eine wichtige Rolle. Die Bildung von Biofilmen basiert auf einer Abfolge komplexer physikalischer, chemischer und biologischer Prozesse und ist schematisch in **Abb. 1** dargestellt.

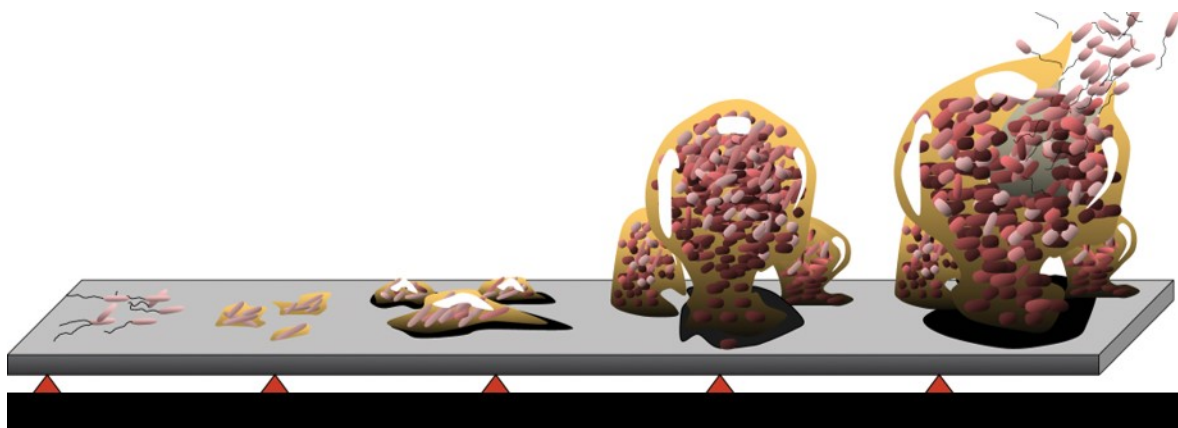


Abb. 1: Phasen der Biofilmbildung. Die Biofilmbildung ist ein mehrstufiger Prozess mit folgenden Stadien: (1) Initiale Adhäsion. (2) Irreversible Adhäsion. (3) & (4) Reifung und Produktion der extrapolymeren Substanz (EPS). (5) Vereinzelung und Verbreitung. Modifiziert nach Monroe 2007 [15].

Zunächst erfolgt die Konditionierung der Oberfläche durch Adsorption organischer Moleküle. Auf die initiale Adhäsion der Bakterien an der konditionierten Oberfläche folgt die irreversible Adhäsion. Der bakterielle Metabolismus verändert sich, sodass die EPS gebildet wird. In der nächsten Phase erfolgen das Zellwachstum und die

Zellverdopplung. In einem ausgereiften Biofilm führen Signalmoleküle, Platz- und Nährstoffmangel sowie metabolische Endprodukte zur Ablösung einzelner Bakterien aus dem Biofilm, welche weitere Oberflächen besiedeln können [16].

Eine besonders wichtige Rolle im Biofilm nimmt die EPS ein. Sie ist der Hauptbestandteil und Strukturgeber eines Biofilms, da sie bis zu 90 % der Biofilmmasse ausmacht [17]. Die Hauptkomponenten der EPS sind Wasser (bis zu 97 %), Polysaccharide, Proteine und Enzyme sowie extrazelluläre DNA und RNA [18]. Zusätzlich vermittelt sie die Adhäsion des Biofilms an biotische und abiotische Oberflächen [17, 19]. Die EPS erfüllt außerdem eine Schutzfunktion für die in ihr angesiedelten Mikroorganismen [20]. Durch die hohe Wasserbindungskapazität sind die in Biofilmen lebenden Mikroorganismen vor kurzzeitigen Trockenperioden besser geschützt, als ihre planktonisch lebenden Vertreter [21]. Auch Nährstoffknappheiten werden durch das Leben im Biofilm besser toleriert [2]. Die wohl wichtigste Funktion, den medizinischen Bereich betrachtend, ist die erhöhte Toleranz bzw. Resistenz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. Diese Eigenschaft entsteht durch unterschiedliche Mechanismen. Die EPS fungiert zum einen als Diffusionsbarriere, zum anderen können aber auch Moleküle an EPS-Komponenten binden [22]. Suci *et al.* stellten fest, dass die Transportrate des Antibiotikums Ciprofloxacin in einem Biofilm verlangsamt ist und nannten die Bindung des Moleküls an Komponenten der Biofilmmatrix als mögliche Ursache [23]. In anderen *in vitro* Untersuchungen wirkte die Biofilmmatrix von *Pseudomonas aeruginosa* als Diffusionsbarriere für Piperacillin [24]. Andererseits wurde auch beschrieben, dass die Antibiotika Rifampicin und Vancomycin in der Lage sind, Biofilme zu durchdringen [25]. Die höhere Antibiotikaresistenz kann also nicht allein durch das Vorhandensein der EPS erklärt werden.

Eine weitere Erklärung für die erhöhte Resistenz von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Substanzen in einem Biofilm ist ihre verringerte Wachstumsrate. Der Mangel von Nährstoffen oder die Akkumulation inhibierend wirkender Stoffwechselendprodukte kann dazu führen, dass Bakterien in eine ruhende Phase eintreten [26]. Eine Vielzahl von Antibiotika, welche nur gegen sich teilende Bakterien wirken, sind somit gegen diese Bakterien unwirksam [22]. Der Einfluss der Wachstumsrate auf die Antibiotikaresistenz konnte u.a. für *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Staphylococcus epidermidis* gezeigt werden [27, 28].

Die Mikroumgebung der Biofilme spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Innerhalb eines Biofilmes besteht ein Diffusionsgradient für Nährstoffe und Sauerstoff [29, 30]. Die im Biofilm lebenden Bakterien ordnen sich somit nach den Präferenzen ihres Metabolismus und ihrer Sauerstofftoleranz an [31] (**Abb. 2**). Dies hat zum Beispiel Einfluss auf die Wirksamkeit von Aminoglykosiden, da sie im aneroben Milieu weniger effektiv sind, als in Gegenwart von Sauerstoff [32].

Die mikrobielle Adhärenz und die Biofilmbildung sind für 60-80 % aller Infektionen in Geweben oder auf medizinischen Geräten bzw. Implantaten verantwortlich [33, 34].

Bereits 1980 konnte festgestellt werden, dass Mikroorganismen, die in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind und Mikrokolonien bilden, zu Infektionen führen und diese schwieriger zu behandeln sind [35]. Weiterhin ist bekannt, dass wiederkehrende Infektionen mit der Fähigkeit der pathogenen Mikroorganismen assoziiert sind, Biofilme zu bilden [34].

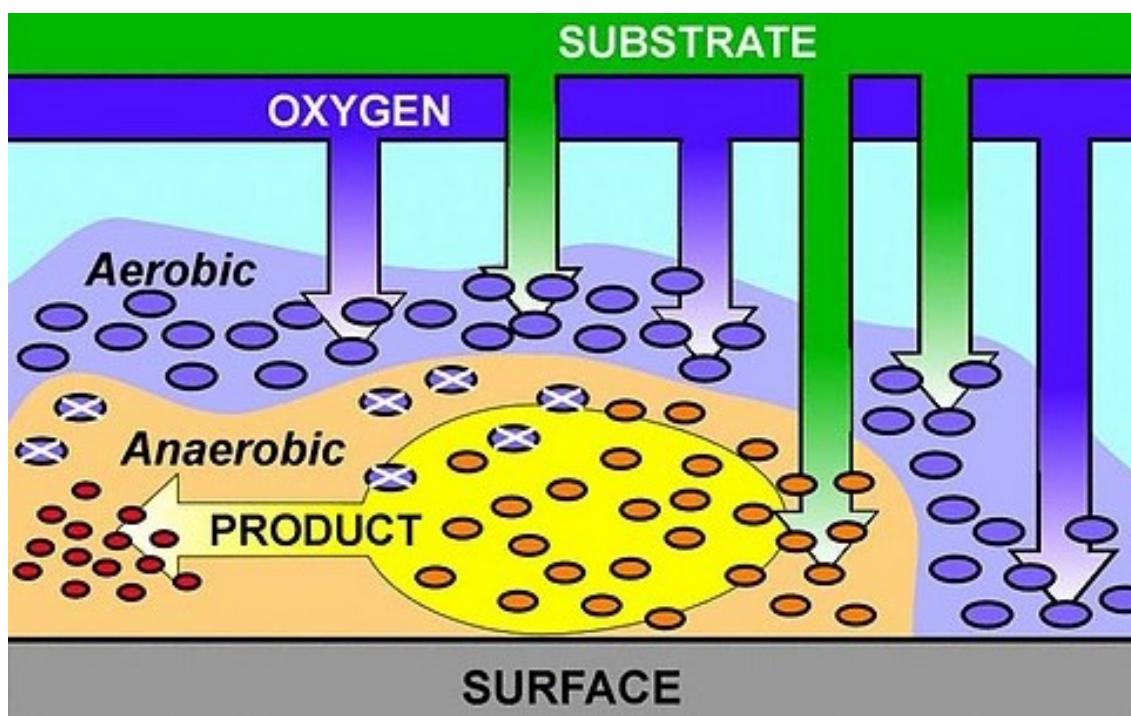


Abb. 2: Schematische Darstellung von aeroben und anaeroben Zonen im Biofilm. Es ist der Strom von Substraten und Sauerstoff durch einen Biofilm schematisch dargestellt. Die Mikroorganismen in der äußeren Schicht verstoffwechseln den eindringenden Sauerstoff, sodass im Inneren des Biofilmes sauerstoffarme Regionen entstehen. Mit freundlicher Genehmigung des Centers for Biofilm Engineering, Montana State University

Die Häufigkeit verschiedener Implantatinfektionen, die mit Biofilmen assoziiert sind, ist in **Tab. 1** dargestellt. Es ist ersichtlich, dass insbesondere im kardiovaskulären Bereich hohe Raten von Infektionen nachgewiesen wurden.

Wenn sich Mikrokolonien aus dem Biofilm lösen, führt dies zu einem hohen Risiko einer infektiösen Embolie und kann zu Schlaganfällen oder schweren pulmonalen Folgeerkrankungen führen [4].

Tab. 1: Durchschnittliche Infektionsraten verschiedener Implantattypen [36].

Implantat	Implantationen/Jahr (USA)	Durchschnittliche Infektionsrate (%)
<i>Kardiovaskulär</i>		
Mechanische Herzklappe	85.000	4
Gefäßprothese	450.000	4
Herzschrittmacher	300.000	4
Ventrikuläre Hilfssysteme	700	40
<i>Orthopädie</i>		
Gelenksprothesen	600.000	2
Fixationsmittel für Brüche	2.000.000	5
<i>Neurochirurgie</i>		
ventrikulärer Shunt	40.000	6
<i>Plastische Chirurgie</i>		
Brustimplantate	130.000	2
<i>Urologie</i>		
Penisimplantat	15.000	2

Aufgrund der erhöhten Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen und der schweren gesundheitlichen Probleme welche dadurch entstehen, sind Alternativen zur Vermeidung bzw. zur Behandlung von durch Biofilme ausgelöste Infektionen notwendig. Im folgenden Abschnitt werden potentielle Substanzen zur Vermeidung dieser Art Infektion näher erläutert.

1.2 Potentielle Wirkstoffe zur Vermeidung der Biofilmbildung auf Implantatoberflächen

Infektionen durch antibiotikaresistente Bakterien sind ein globales Problem. Eine vom europäischen Zentrum für die Prävention und Kontrolle von Krankheiten (ECDC) finanzierte Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Belastung in Europa durch Infektionen mit antibiotikaresistenten Bakterien höher ist, als durch andere Infektionskrankheiten. Weiterhin stiegen die Fallzahlen seit 2007 an [37]. In China haben Antibiotikaresistenzen innerhalb von 6 Jahren um 22 % zugenommen [38]. Laut des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) werden in den USA jährlich 2,8 Millionen Infektionen mit antibiotikaresistenten Bakterien verzeichnet [39]. In dem vom CDC veröffentlichten Bericht werden auch Infektionen mit *C. difficile* berücksichtigt, da diese ein großes gesundheitliches Problem darstellen und ebenfalls mit der verbreiteten Anwendung von Antibiotika assoziiert sind [39]. Der Anstieg von antibiotikaresistenten Bakterien wird durch verschiedene Faktoren gefördert. Die Indikation, die Wahl des Antibiotikums sowie die Dauer der Therapie sind in 30 – 50 % der Fälle inkorrekt [40, 41]. Desweiteren führt der umfangreiche Einsatz von Antibiotika in der Landwirtschaft zur Resistenzentwicklung von Bakterien [42]. Auch die Entwicklung neuer Antibiotika ist über Jahrzehnte zurückgegangen [40]. Wie im vorherigen Kapitel beschrieben sind Infektionen, welche durch Biofilme verursacht werden, im Allgemeinen schwerer zu behandeln. Die zunehmende Resistenzentwicklung vergrößert dieses Problem zusätzlich. Alternative Substanzen, welche eine Biofilmbildung vermeiden können, sind daher unabdingbar.

Im folgenden Abschnitt wird auf die *cis*-2-Decensäure, D-Aminosäuren und schistosomale Tegumentproteine als potentielle biofilminhibierende Wirkstoffe detaillierter eingegangen.

1.2.1 *Cis*-2-Decensäure

In den letzten Jahren wurde eine neue Gruppe von Fettsäure-Signalmolekülen in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien sowie in *Candida albicans* identifiziert. Diese nehmen Einfluss auf das Wachstum, die Virulenz, die Motilität sowie die Biofilmbildung und -auflösung [43–46]. Die *cis*-11-methyl-2-Dodecensäure von *Xanthomonas campestris* wurde als erstes beschrieben und charakterisiert. Sie führt zur Auflösung von matrixumgebenen Zellaggregaten [44].

Stenotrophomonas maltophilia verfügt über ein System mehrerer Fettsäurederivate, welche auch speziesübergreifend wirken. Es ist beschrieben, dass sie die Stresstoleranz sowie die Resistenz von *P. aeruginosa* gegenüber antimikrobiellen Substanzen erhöht [47]. Auch in *P. aeruginosa* selbst wurde eine ungesättigte Fettsäure identifiziert, welche zur Auflösung von Biofilmen führt [48]. Die Strukturformel dieser *cis*-2-Decensäure (C2DA) ist in der **Abb. 3** dargestellt.

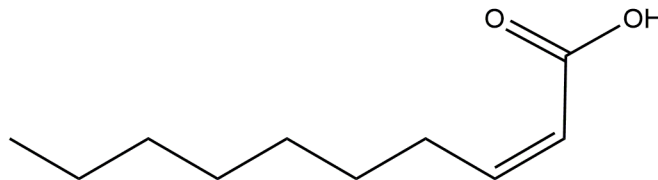


Abb. 3: Strukturformel von *cis*-2-Decensäure. Darstellung der *cis*-2-Decensäure (C2DA). C2DA ist eine einfach ungesättigte Fettsäure, welche von *Pseudomonas aeruginosa* produziert wird und zur Auflösung von Biofilmen führen kann. Die Summenformel ist $C_{10}H_{18}O_2$.

C2DA führte bei Untersuchungen an Biofilmen von *P. aeruginosa* dazu, dass die minimale inhibitorische Konzentration des Antibiotikums Tobramycin reduziert wurde [49]. Desweiteren wurde beschrieben, dass C2DA bestehende Biofilme von *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* auf Katheteroberflächen reduzieren kann. Dieser Effekt wurde durch die Gabe von Ciprofloxacin oder Ampicillin verstärkt [45]. Die gleiche Arbeitsgruppe um Rahmani-Badi stellte ebenfalls fest, dass dentaler Plaque durch eine Kombination von Chlorhexidin und C2DA effektiv reduziert werden konnte [50]. Dies zeigt, dass C2DA auf ein breites Spektrum bakterieller Spezies wirkt. Untersuchungen der Wirksamkeit gegen anaerobe Bakterien fehlen jedoch.

1.2.2 D-Aminosäuren

Aminosäuren sind α -Kohlensäuren, bei denen an das α -Kohlenstoffatom, neben einer α -Carboxylgruppe (-COOH), eine Aminogruppe (-NH₂), ein Wasserstoffatom (-H) und eine variable Seitenkette gebunden ist. Je nach Position der Aminogruppe in der Fisher-Projektion unterscheidet man L- und D-Aminosäuren. Dabei bedeutet die L-Konfiguration, dass die Aminogruppe links vom α -Kohlenstoffatom positioniert ist, wohingegen sie sich in der D-Konfiguration rechts befindet [51, 52]. Moleküle, die diese Eigenschaften besitzen werden auch als Enantiomere bezeichnet [52]. Eine Ausnahme bildet die Aminosäure Glycin, welche als funktionelle Seitenkette Wasserstoff trägt und somit kein chirales Zentrum enthält. Ein Beispiel für die beiden Enantiomere von Alanin ist in **Abb. 4** dargestellt.

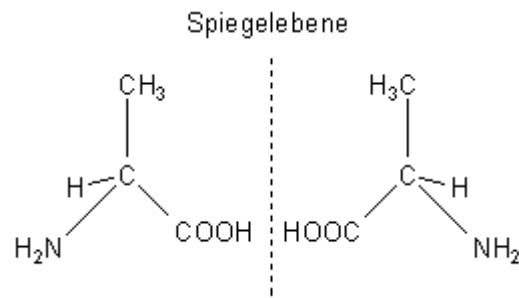


Abb. 4: Schematische Darstellung von D- und L-Alanin. Es sind die Strukturformeln an der Spiegelebene der Enantiomere L- (links) und D-Alanin (rechts) dargestellt.

Aminosäuren sind Bestandteile einer Vielzahl von Strukturen wie Peptiden, Strukturproteinen, Enzymproteinen und Immunproteinen [53]. Dabei sind L-Aminosäuren die Bausteine von Proteinen, wohingegen D-Aminosäuren über die ribosomale Proteinbiosynthese nicht inkorporiert werden können. [52, 54] Trotz der überwiegenden Mehrheit von L-Aminosäuren in der Proteinbiosynthese wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Prozesse beschrieben, in denen D-Aminosäuren eine wichtige Rolle spielen. D-Aminosäuren, insbesondere D-Alanin und D-Glutaminsäure, sind wichtige Bestandteile der bakteriellen Zellwand [55]. Desweiteren ist D-Serin die am häufigsten vorkommende Aminosäure im menschlichen Urin und verändert die Genexpression von uropathogenen *Escherichia coli* (UPEC) [56]. D-Aminosäuren sind ebenfalls Bestandteil einiger Peptidantibiotika wie Gramicidin S, Polymyxin B oder Bacitracin A [57–59]. Einen antimikrobiellen Effekt von D-Aminosäuren konnten auch Kolodkin-Gal *et al.* nachweisen. Sie untersuchten den Effekt von verschiedenen D-Aminosäuren auf die Biofilmbildung von *Bacillus subtilis*. Ein Gemisch aus D-Leucin, D-Methionin, D-Tyrosin und D-Tryptophan konnte sowohl die Biofilmbildung reduzieren als auch bestehende Biofilme auflösen [60]. Nachfolgende Untersuchungen durch Leiman *et al.* führten zu der Annahme, dass diese inhibitorischen Effekte durch den Einfluss der D-Aminosäuren auf die Proteinbiosynthese entstehen [61]. Desweiteren wurde beschrieben, dass D-Aminosäuren die Biofilmbildung von klinischen *Enterococcus faecalis* Isolaten reduzieren konnten [62]. Im Widerspruch dazu publizierten Sarkar und Pires, dass D-Aminosäuren nicht in der Lage sind die Biofilmbildung von *B. subtilis*, *S. aureus* und *S. epidermidis* zu verhindern [63]. Trotz dieser widersprüchlichen Aussagen wurden D-Aminosäuren in dieser Arbeit untersucht, insbesondere da es kaum Informationen über deren Wirksamkeit auf die Biofilmbildung anaerober Mikroorganismen gibt.

1.2.3 Schistosomale Proteine

Schistosomen sind Saugwürmer, die als Parasiten im menschlichen Körper die Schistosomiasis verursachen. Theodor Maximilian Bilharz beschrieb dies erstmals 1851 nach einer Autopsie verstorbener Soldaten in Kairo. Ihm zu Ehren wurden die Begriffe „Bilharzia“ und „Bilharziose“ geprägt. 1858 wurden jedoch die Synonyme „Schistosomen“ bzw. „Schistosomiasis“ von David F. Weinand eingeführt [64].

Die drei wichtigsten Spezies, die zu Infektionen beim Menschen führen sind *S. haematobium*, *S. japonicum* und *S. mansoni* [65].

Der Lebenszyklus von Schistosomen ist durch zwei Wirte geprägt. Zunächst findet die asexuelle Fortpflanzung in Süßwasserschnecken (*Biomphalaria spp.*) als Zwischenwirt statt. Die sich in der Schnecke entwickelnden Zerkarien können dann über die Haut in den Endwirt (Säugetiere) eintreten [66]. Im Endwirt entwickeln sie sich zu Larven, welche zunächst zur Lunge migrieren und dann über die Herzzirkulation in den hepatoportalen Kreislauf gelangen. Dort paaren sie sich und wandern in die Venen des Dünndarms (*S. haematobium*), der Harnblase (*S. japonicum*) oder des Dickdarms (*S. mansoni*) [65, 67].

Die vom Weibchen gelegten Eier führen zu Entzündungen, die intestinale, hepatosplenische oder urogenitale Erkrankungen auslösen können [67].

Die adulten Schistosomen selbst haben Immunevasionsstrategien entwickelt, um sich vor dem Immunsystem zu maskieren. Dabei spielt insbesondere das Tegument eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass Schistosomen Wirtsantigene über spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche inkorporieren können [68–70]. Eine weitere Strategie ist die Produktion von Molekülen, welche signifikante Homologien zu Wirtsmolekülen wie adrenocorticotropen Hormonen, Morphin und Codein aufweisen. Durch diese Moleküle wird die Aktivierung von Th1 Zellen oder Leukozyten vermindert [71, 72].

Um antiinfektive Beschichtungen für Implantatoberflächen zu entwickeln, sind Tegumentproteine ein innovativer und vielversprechender Ansatz. Jedoch muss dabei darauf geachtet werden, dass die veränderte Oberflächenstruktur die Biofilmbildung von Pathogenen nicht fördert. Für diese Arbeit wurden drei schistosomale Tegumentproteine ausgewählt um deren Effekt auf die Biofilmbildung zu untersuchen. Das Protein Sm22.6 wurde in der Literatur als immunogen beschrieben und dient im Rahmen des Projektes als Kontrollprotein für

Immunproteomanalysen. [73, 74]. Zwei Kandidatenproteine, SmEno und SmNPP-5 zeigen antithrombogene und antikoagulatorische Wirkungen, aber es ist nicht bekannt, ob sie eine Immunreaktion auslösen. SmEno ist eine schistosomale Enolase, welche Plasminogen bindet und dessen Aktivierung fördert, sodass der Thrombenbildung entgegengewirkt wird [75]. SmNPP-5 ist eine Ekto-Phosphodiesterase, welche die Aggregation von Blutplättchen verhindert und als Anti-Koagulant wirkt [76].

1.3 Der Teufelskreis aus Infektion und Antibiotikatherapie - die „leaky gut“ Hypothese

Der demografische Wandel in Deutschland führt zur Veränderung der Altersstruktur. Durch die zunehmend ältere Bevölkerung muss auch die medizinische Versorgung darauf ausgerichtet und sich vermehrt auf ältere und teils auch multimorbide Patienten eingestellt werden. Herz-Kreislaufkrankungen nehmen dabei einen besonderen Stellenwert ein, da sie die häufigste Todesursache darstellen [77]. Dazu gehören Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen sowie Herzklappenerkrankungen. Bei Erkrankungen, welche nicht medikamentös behandelt werden können, wie es bei Aortenklappenstenosen der Fall ist, muss ein chirurgischer Einsatz durchgeführt werden. Bei Aortenklappenstenosen ist der Ersatz der Herzklappe über einen minimalinvasiven Eingriff möglich. Die sogenannte TAVI (engl.: *transcatheter aortic valve implant*) kann über ein katheterbasiertes Verfahren eingebracht werden, sodass eine Operation am offenen Herzen vermieden werden kann [78].

Trotz der minimalinvasiven Operationsmethodik bleiben Komplikationen wie Myokardinfarkte, Schlaganfälle und infektiöse Endokarditis nicht aus [79, 80]. Darüber hinaus kann auch die Implantatoberfläche von unterschiedlichsten Biofilmbildenden Mikroorganismen besiedelt werden, welche Infektionen auslösen. Im kardiovaskulären Bereich sind *S. aureus* und *S. epidermidis* die Hauptvertreter [81].

Implantat-assoziierte Infektionen sind schwierig zu diagnostizieren, benötigen teilweise einen erneuten chirurgischen Eingriff und sind mit einer verlängerten Antibiose verbunden [36]. Diese systemisch applizierten Antibiotika führen zu einer Dysbalance des Darmmikrobioms [82]. Dies kann zu Diarrhöen führen, welche

durch den Verlust von Darmbakterien und der Kolonisation und Wachstum des Toxin-produzierenden Bakteriums *Clostridioides difficile* ausgelöst werden [83].

C. difficile ist ein stäbchenförmiges, sporenbildendes anaerobes Bakterium [84]. Durch den Rückgang der natürlichen Darmflora keimen die Sporen von *C. difficile* aus, die vegetativen Zellen produzieren Toxine, welche zu Entzündungen der Darmwand und schließlich zur Durchlässigkeit dieser führen können [83]. Es wird spekuliert, dass durch diese erhöhte intestinale Durchlässigkeit, auch „leaky gut“ genannt, Darmbakterien in den Blutstrom gelangen und weitere Bereiche des Körpers besiedeln können [85–87].

Der beginnende Teufelskreis aus Infektion, Biofilmbildung und Antibiose ist schematisch in **Abb. 5** dargestellt und kann zu einer langwierigen Therapie mit Implantatversagen führen.

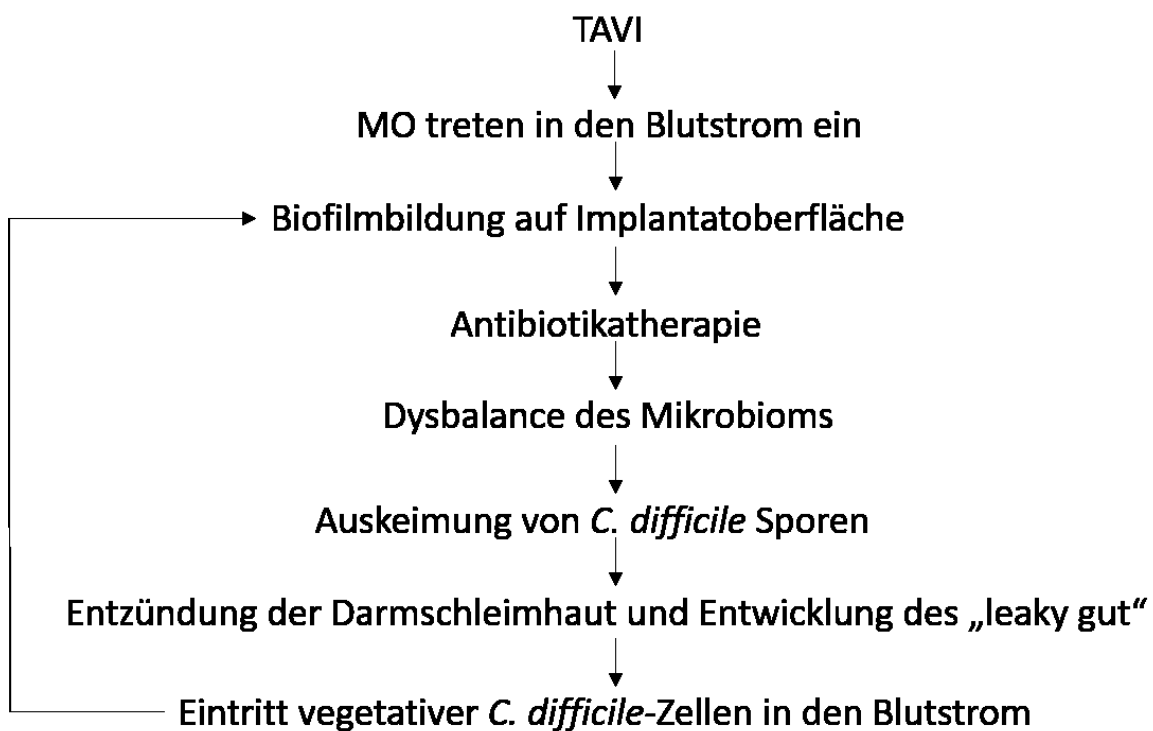


Abb. 5: „Leaky Gut“-Hypothese. Schematisch Darstellung der „leaky gut“ Hypothese nach Implantation einer Herzklappe mit anschließender Infektion und Biofilmbildung auf der Implantatoberfläche.

Da *C. difficile* eine bedeutende Rolle in diesem Infektionsgeschehen spielt, wird auf diesen Organismus im folgenden Abschnitt genauer eingegangen.

1.4 *Clostridioides difficile*

Die Erstbeschreibung des Organismus *Clostridium difficile* erfolgte 1935 durch Hall und O'Toole [88]. 2016 wurde er als *Clostridioides difficile* reklassifiziert [89]. *C. difficile* ist ein sporenbildendes, anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium, welches der Hauptauslöser nosokomialer infektiöser Diarrhöen ist [90]. Bei 1-3 % der gesunden Erwachsenen sowie bei 15 – 20 % der Kinder ist *C. difficile* Teil der normalen Darmflora [91]. Zu den Risikofaktoren, die eine Infektion mit *C. difficile* begünstigen gehören ein Alter über 65 Jahre, Komorbiditäten oder auch medizinische Maßnahmen, welche einen verlängerten Krankenhausaufenthalt nach sich ziehen [92]. Aber auch die Einnahme von Medikamenten kann den Ausbruch einer *C. difficile* Infektion fördern, wie es für Protonenpumpeninhibitoren und Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten beschrieben ist [93, 94]. Darüber hinaus sind Clindamycin, Cephalosporine der dritten Generation und Fluoroquinolone am häufigsten mit einer Infektion assoziiert [95]. Durch die Einnahme der Antibiotika entsteht eine Dysbiose der Darmflora. Dadurch werden Bedingungen geschaffen, welche das Auskeimen der *C. difficile* Sporen begünstigen, sodass die vegetativen Zellen eine Infektion auslösen [96]. Die Pathogenität von *C. difficile* ist unter anderem in seinen Toxinen TcdA und TcdB begründet. Einige hypervirulente Stämme verfügen zusätzlich über ein drittes Toxin, CDT (*C. difficile* Transferase) [97].

Die Toxine führen durch die Zerstörung der Darmbarriere zu leichten bis schweren Durchfallerkrankungen, toxischem Megakolon oder sind an der Entwicklung von entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn beteiligt [98, 99].

Neben der Produktion von Toxinen können verschiedene Stämme hinsichtlich ihrer Virulenz auch durch die Schwere der von ihnen verursachten Infektionen begutachtet werden. In **Tab. 2** sind vier klinische Isolate dargestellt und hinsichtlich ihrer gebildeten Toxine, dem Grad der Sporenbildung sowie der Auswirkungen auf den Gewichtsverlust und den Epithelzellschaden in einem C57BL/6 Mausmodell kategorisiert worden.

Die Behandlung einer *C. difficile* Infektion erfolgt zunächst durch das Absetzen bereits verordneter Antibiotika, sofern dies möglich ist. Wenn eine weitere Behandlung nötig ist, werden konventionell Metronidazol oder Vancomycin

eingesetzt [100]. Bei milden bis moderaten Verläufen empfiehlt die Europäische Gesellschaft für klinische Mikrobiologie eine dreimal tägliche orale Gabe von 500 mg Metronidazol für 10 Tage. In schweren und komplizierten Fällen ist die orale Gabe von Vancomycin viermal täglich für insgesamt 10 Tage vorgesehen [101].

Tab. 2: Charakterisierung klinischer *C. difficile* Isolate [102–105].

Stamm	630	BI17	K14	VPI10463
Ursprung des Patientenisolates	Schweiz 1982	Kanada 2004	USA 1994	USA 1980
Gewichtsverlust*	-	Hoch	Gering	Hoch
Epithelzellschaden*	-	Gering	Gering	Hoch
Gebildete Toxine	A,B	A,B, CDT	A,B	A,B
Sporenbildung	Sehr gering	Hoch	Gering	Gering

*(C57BL/6 Mausmodell)

Die Biofilmbildung von *Clostridioides difficile*

Ein weiterer Faktor, der die Behandlung von *C. difficile* erschwert ist, dass es in der Lage ist Biofilme zu bilden [106]. Insbesondere ist die Behandlung mit Metronidazol nur eingeschränkt möglich, da eine hundertfach erhöhte Resistenz von *C. difficile* innerhalb eines Biofilms beschrieben wurde [107].

Untersuchungen zur Biofilmbildung von *C. difficile* zeigten, dass für die Kolonisation des Darmes verschiedene Proteine eine Rolle spielen. Dazu gehören das Fibronectin-bindende Protein A, Surface Layer Proteine sowie die Zellwandproteine Cwp66 und Cwp84 [108–111].

Die EPS von *C. difficile*-Biofilmen enthält, neben Proteinen, Polysaccharid II sowie extrazelluläre DNA, vegetative Zellen, Sporen und Toxine [107, 112]. Durch die gebildete EPS sind die im Biofilm lebenden Zellen auch besser gegenüber Sauerstoff geschützt, als planktonisch lebende Vertreter [106].

Weiterhin wurde beschrieben, dass die Biofilmbildung von *C. difficile* zeit- und stammabhängig ist [113]. Pantaléon *et al.* untersuchten 37 Stämme hinsichtlich ihres Biofilmverhaltens und kategorisierten diese nach 72 Stunden Inkubation in geringe, moderate oder hohe Biofilmbildner. Dabei konnte keine Korrelation zwischen der Menge des Biofilms und der Virulenz festgestellt werden [114].

Zusätzlich zur Kolonisation des Darmes ist *C. difficile* auch in der Lage, abiotische Oberflächen zu besiedeln und Biofilme zu bilden. In Biofilmen auf explantierten Gallengangstents wurde neben anderen anaeroben Mikroorganismen auch *C. difficile* isoliert [115]. In einem anderen Fall wurde eine Infektion mit *C. difficile* auf einem Herzschrittmacher festgestellt [87]. Dies zeigt, dass *C. difficile* und dessen Biofilme nicht nur im Darmbereich sondern im gesamten Organismus eine Gesundheitsgefährdung darstellt.

1.5 Zielstellung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die führende Todesursache in Deutschland. Die Behandlung von Herzklappenfehlfunktionen durch Implantate wird durch die zunehmend älter werdende Bevölkerung immer wichtiger. Problematisch sind dabei auftretende Infektionen, insbesondere, wenn sie mit Biofilmen assoziiert sind. Durch die Lebensweise im Biofilm zeigen die verursachenden Mikroorganismen eine erhöhte Antibiotikaresistenz, wodurch die Behandlung der Infektion erschwert wird. Dies macht deutlich, dass alternative Behandlungsmöglichkeiten von Infektionen, welche mit der Biofilmbildung assoziiert sind, notwendig sind bzw. eine Biofilmbildung verhindert werden muss. Im Rahmen des Projektes Card-ii-Omics liegt der Fokus in dieser Arbeit auf den Untersuchungen zur Biofilmbildung des pathogenen, anaeroben und multiresistenten Mikroorganismus *C. difficile*. Zunächst soll ein Kultivierungssystem etabliert werden, in welchem die Biofilmmasse der klinischen Isolate 630, BI 175, EK 14 und VPI 1063 von *C. difficile* quantifiziert werden kann. Im etablierten System sollen anschließend alternative Substanzen zu Antibiotika hinsichtlich ihres biofilminhibitorischen Potentials auf *C. difficile* getestet werden. Zu diesen gehören verschiedene D-Aminosäuren, die *cis*-2-Decensäure sowie Tegumentproteine von *S. mansoni*. Für die Untersuchungen mit den Tegumentproteinen ist es notwendig, diese in einem eukaryotischen Expressionssystem rekombinant herzustellen und anschließend aufzureinigen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

Die verwendeten Geräte, Materialien und Chemikalien sind im Anhang in den **Tab. 9 - Tab. 11** aufgelistet.

2.2 Verwendete Software

Die zur Datenanalyse verwendete Software ist in **Tab. 12** im Anhang aufgelistet.

2.3 Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

Alle verwendeten Organismen, Vektoren, Plasmide oder Oligonukleotide sind in den **Tab. 13 - Tab. 18** aufgelistet.

2.4 Stammhaltung und Kultivierung

Die Sterilisation hitzestabiler Lösungen und Nährmedien erfolgte durch autoklavieren bei 121 °C für 20 min. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm). Für die Herstellung von Festmedien erfolgte die Zugabe von 20 g/l Agar.

Bei Bedarf wurden den verwendeten Nährmedien die in **Tab. 3** aufgeführten Antibiotika zugesetzt. Die Lagerung erfolgte als Aliquots bei -20 °C. Die Zugabe erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Medien auf unter 50 °C unter sterilen Bedingungen.

Tab. 3: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Wirkkonzentration
Ampicillin (Amp)	50 mg/ml in <i>A.dest.</i> *	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in <i>A.dest.</i> *	50 µg/ml

*sterilfiltriert

2.4.1 *C. difficile*

Alle Arbeiten, für die die Vitalität der Bakterien nicht beeinflusst werden durfte, erfolgten in einer Anaerobenbox (MACS-MG-500 Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific) bei 37 °C unter einer Stickstoffatmosphäre mit maximal 5 % Wasserstoff. Alle für die Arbeiten benötigten Kulturmedien und Lösungen wurden mindestens 24 h vor Nutzung in die Anaerobenbox gestellt. Für die Messung der optischen Dichte und die Mikroskopie wurden Aliquots der Kulturen aus der Anaerobenbox entnommen.

Für die Langzeitkultivierung wurde eine Übernachtskultur mit Glycerin (20 % [v/v] finale Konzentration) versetzt, aliquotiert und bei -70 °C gelagert. Diese Glycerinstocks wurden für die Herstellung von Stammpplatten verwendet. Mittels einer sterilen Impföse wurde Material auf eine BHIS-Agarplatte aufgetragen.

2.4.1.1 Kultivierung von Biofilmen

Zur Kultivierung von Biofilmen wurde eine Übernachtskultur auf eine OD von 0,2 verdünnt und je 1 ml in die Vertiefung der 24-Well Multiwellplatte pipettiert. Die Biofilme wurden für 24 h bis 72 h inkubiert. Zur Optimierung des Kultivierungssystems wurde im Verlauf dazu übergegangen, einen einen täglichen Austausch des Kultivierungsmediums durchzuführen.

BHIS (Brain Heart Infusion, supplementiert) Medium

Brain Heart Infusion Broth	37 g
Hefeextrakt	5 g
L-Cystein-HCl	0,1 %
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 1000 ml

2.4.2 *E. coli*

Die Stammhaltung von *E. coli* erfolgte durch die Zugabe von Glycerin (20 % [v/v] finale Konzentration) zu einer Übernachtskultur und der Lagerung von Aliquots bei -70 °C. Für die Herstellung von Stammpplatten wurde Material der Glycerinstocks mittels einer sterilen Impföse auf eine entsprechende Agarplatte aufgetragen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Anzucht der *E. coli* Stämme erfolgte schüttelnd bei 180 UpM und 37 °C in LB-Flüssigmedium oder auf Festmedium im Brutschrank. Sowohl den Flüssig- als auch den Festmedien wurden die entsprechenden Medienzusätze vor ihrer Verwendung hinzugegeben.

LB (Luria-Bertani) Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 1000 ml

2.4.3 *S. cerevisiae*

Für die zur Langzeitkultivierung verwendeten Glycerinstocks wurde eine Übernachtskultur mit Glycerin versetzt (20 % [v/v] finale Konzentration) und bei -70 °C gelagert. Für die Herstellung von Stammpplatten wurde Material aus den Glycerinstocks mittels einer sterilen Impföse entnommen und auf dem entsprechenden Festmedium ausgestrichen. Die Inokulation im Flüssigmedium erfolgte jeweils mit einer Kolonie von der Stammpplatte. Flüssigkulturen wurden bei 30 °C und 170 rpm inkubiert.

YPD (Yeast Pepton Dextrose) Medium

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
Dextrose (Glucose) [v/v]	2 %
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 1000 ml

Für die Selektion plasmidtragender *S. cerevisiae* Klone wurden folgende Selektionsmedien verwendet.

YDO w/o uracil (Yeast Drop Out ohne Uracil) Medium

Yeast Nitrogen Base w/o amino acids	6,7 g
Yeast Synthetic Drop Out Supplement w/o uracil	1,92 g
50 % Glucose [v/v]*	40 ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 1000 ml

* Die Glucose wird nach dem Autoklavieren aus einer 50 %igen sterilen Stammlösung hinzugegeben

YDO w/o leucin (Yeast Drop Out ohne Leucin) Medium

Yeast Nitrogen Base w/o amino acids	6,7 g
Yeast Synthetic Drop Out Supplement w/o leucin	1,62 g
50 % Glucose [v/v]*	40 ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 1000 ml

* Die Glucose wird nach dem Autoklavieren aus einer 50 %igen sterilen Stammlösung hinzugegeben

2.5 Bestimmung physiologischer Parameter

2.5.1 Optische Dichte

Mit Hilfe der optischen Dichte (OD) kann auf das Wachstum einer Bakterienkultur in Flüssigmedien geschlossen werden. Dabei korreliert die Abnahme des durchtretenden Lichts mit dem zunehmenden Wachstum der Kultur. Die OD wird bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Spektrophotometer gegen einen Blindwert (uninokuliertes Medium) gemessen.

2.5.2 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Für die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) wurde die entsprechende Bakteriensuspension gut gemischt und eine Verdünnungsreihe in 1 x PBS hergestellt. 100 µl der entsprechenden Verdünnungsstufen konnten dann auf Festmedien mit einem sterilen Einmalspatel ausplattiert und inkubiert werden. Die Zählung der KBE erfolgte händisch.

2.5.3 Ermittlung der Zelllänge

Zur Ermittlung der Zelllänge wurden mikroskopische Aufnahmen eines resuspendierten Biofilmes angefertigt. Pro Kultivierungsbedingung wurden mindestens 100 Zellen gezählt und diese mit dem Programm Nikon Ni-U vermessen.

2.5.4 Quantifizierung der Biofilmmasse

Zur Quantifizierung der Biofilmmasse erfolgte die Kultivierung der Biofilme wie in 2.4.1.1 beschrieben. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde das Kristallviolett-Assay angewendet. Dazu wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, der Biofilm einmal mit 1 x PBS gewaschen und unter der Sterilwerkbank getrocknet. Im Anschluss wurden je 400 µl einer 0,1 % Kristallviolettlösung für 15 min hinzugegeben. Nach der Inkubation bei RT wurde die überschüssige Kristallviolettlösung abgenommen und verworfen. Es erfolgte eine zweimalige Waschung des gefärbten Biofilmes mit 1 x PBS zur Entfernung von ungebundenem Kristallviolett. Zur Lösung des Biofilmes wurde je 1 ml 1% SDS-Lösung in die Vertiefungen gegeben und die Platte 20 min auf einem Thermoblock bei RT geschüttelt. Die Lösungen wurde in eine 96-Well Mikrotiterplatte überführt und ggf. mit SDS verdünnt. Die Messung erfolgte in einem Mikroplattenreader bei einer Wellenlänge von 540 nm gegen einen Blindwert (1 % SDS).

Beschichtung oder Zugabe von potentiell biofilminhibierenden Wirkstoffen

Der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Biofilmbildung wurde untersucht. Dabei wurden entweder die Vertiefungen der Multiwellplatten beschichtet oder die Substanzen direkt ins Medium gegeben. D-Aminosäuren wurden in *A. dest.* gelöst, die *cis*-2-Decensäure in 70 % EtOH, 96 % EtOH, EtOH/MetOH oder Dimethylsulfoxid (DMSO). Das schistosomale Tegumentprotein Sm22.6 verblieb nach Aufreinigung im Elutionspuffer (2.8.3). Für die Beschichtung der Oberflächen wurden je 1 ml der Lösung in die Vertiefungen der Zellkulturplatte gegeben und anschließend bei 4 °C ü.N. inkubiert. Der Überstand wurde danach verworfen und die Platte unter der Sterilwerkbank getrocknet. Sofern die Substanzen mittels Zugabe ins Medium getestet werden sollten, wurden diese in der notwendigen Konzentration innerhalb des Inkubationszeitraumes mit dem täglichen Medienwechsel hinzugegeben.

2.5.5 Vitalitätsuntersuchungen nach Lebend/Tot Färbung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Für die Vitalitätsuntersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden in die Vertiefungen der Multiwell-Platte sterile Deckgläschen (ThermoFisher) gelegt und die Biofilme wie in 2.5.4 beschrieben kultiviert. Für die Lebend/Tot Färbung wurde das LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (ThermoFisher) verwendet. Das Kit enthält den grün fluoreszierenden Nukleinsäurefarbstoff Syto® 9 und den rot fluoreszierenden Nukleinsäurefarbstoff Propidiumiodid. Syto® 9 färbt sowohl lebende als auch tote Zellen an, was zu einem grünen Fluoreszenzsignal führt. Propidiumiodid kann nur in Zellen eindringen, welche eine geschädigte Membran aufweisen. Bei einer simultanen Färbung verdrängt das Propidiumiodid durch die höhere Affinität zu Nukleinsäuren das vorhandene Syto® 9, sodass ein rotes Fluoreszenzsignal zu erkennen ist. Grünfluoreszierende Zellen werden somit als lebend, rotfluoreszierende Zellen als tot angesehen [116]. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen, der Biofilm einmal mit PBS gewaschen und die Färbelösung (1 µl Farbstoff auf 1 ml PBS) hinzugegeben. Nach 15 min Inkubationszeit im Dunkeln wurde die Lösung abgenommen und das Deckgläschen auf einem Objektträger platziert. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem Nikon Eclipse vorgenommen.

2.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels des NucleoSpin® Plasmid Kits von Macherey Nagel. In der Regel wurde für die Zellgewinnung nacheinander zweimal 1,5 ml einer Übernachtskultur pelletiert und die Isolierung im Anschluss nach den Herstellervorgaben durchgeführt.

2.6.2 Isolierung von RNA aus *Schistosoma mansoni*

Für die Untersuchungen wurden in Lysispuffer (RNeasyMicro Kit, Qiagen, Deutschland) schockgefrorene Shistosomen durch die Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt. Fünf Würmer wurden zusammengeführt und die RNA wurde mittels des RNeasy Micro Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die RNA-Konzentration wurde mit einem Colibri Mikrovolumen Spektrophotometer (Titertek-Berthold, Pforzheim, Deutschland) gemessen. Die isolierte RNA wurde anschließend für die cDNA Synthese verwendet.

2.6.3 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Die Reverse Transkriptase ist eine retrovirale RNA-abhängige DNA-Polymerase, mit deren Hilfe aus RNA die komplementäre cDNA hergestellt werden kann. Im Gegensatz zur Standard-PCR können neben genspezifischen Primern auch Oligo-dT Primer oder random hexamer Primer verwendet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten random hexamer Primer bestanden aus sechs zufällig zusammengesetzten Basen, welche an beliebigen komplementären Stellen der template RNA binden. Die Transkription erfolgte unter Verwendung des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFischer, Deutschland) nach den Vorgaben des Herstellers. Die synthetisierte cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.6.4 PCR-Techniken

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction* (PCR)) diene in dieser Arbeit zur Erzeugung von DNA-Fragmenten sowie zur Verifikation erzeugter rekombinanter Organismen. Die Amplifikation wurde in Thermocyclern mit Deckelbeheizung (Biometra TAdvance, Jena Analytik, Jena, Deutschland) durchgeführt. Für die Amplifikation des Zielgens auf Grundlage der cDNA wurde die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt a.M.,

Deutschland) verwendet. Für die Durchführung der Kolonie-PCR fand die Terra™ PCR Direct Polymerase (Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) Anwendung.

2.6.4.1 Primerdesign

Das Primerdesign erfolgte mittels des Programmes „StarPrimer D’Signer“ (IBA Lifesciences, Göttingen, Deutschland). Die Sequenz des Zielgens wurde ohne Start- und Stopcodon eingefügt und das Programm errechnete die notwendigen Primer. Dabei erzielte das Programm Primer, welche eine theoretische Schmelztemperatur von 60 °C bis 63 °C aufwiesen. Weiterhin musste dabei beachtet werden, dass eine *combinatorial site* für die Subklonierung des Zielgens vom ENTRY-Vektor in den Akzeptorvektor und die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *LgUI* enthalten sind. Die Primer für die Sequenzierung konnten kommerziell von IBA Lifesciences erworben werden.

2.6.4.2 2-Schritt-PCR

Die PCR zur Amplifikation des Zielgens für die Klonierung in den ENTRY-Vektor wurde mit der Q5® High Fidelity DNA Polymerase durchgeführt. Diese Polymerase benötigt häufig höhere Anlagerungstemperaturen als andere Polymerasen. Bei Temperaturen ab 72 °C wird eine 2-Schritt-PCR statt einer 3-Schritt-PCR empfohlen. Der Reaktionsansatz für eine 2-Schritt-PCR mit der Q5-Polymerase setzt sich wie folgt zusammen:

5 x Q5 Reaktionspuffer	5 µl
dNTPS [10 µM]	0,5 µl
Primer forward [10 µM]	1,25 µl
Primer reverse [10 µM]	1,25 µl
Template DNA [100 ng/ml]	2 µl
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,25 µl
A. dest. steril	ad 25 µl

Die PCR-Reaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung	98 °C	30 s
Denaturierung	98 °C	10 s
Anlagerung und Elongation	72 °C	15 - 30 s/kb
Elongation	72 °C	2 min
Lagerung	4 °C	∞

2.6.4.3 Kolonie-PCR

Für die Überprüfung der Plasmidaufnahme in *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte durch das Aufkochen einer einzelnen Kolonie in 50 µl *A. dest.* für 5 min bei 99 °C, die mittels einer sterilen Impföse von einer Agarplatte entnommen wurde. Für die Kolonie-PCR von *E. coli* wurden die aufgekochten Proben bei 13.000 rpm für 2 min pelletiert und 3 µl des Überstandes verwendet. Für die Kolonie-PCR von *S. cerevisiae* wurde der aufgekochte Probenansatz gevortext und 3 µl für die PCR verwendet.

Die Zusammensetzung des Mastermixes lautet wie folgt:

2 x Terra PCR Direct buffer	25 µl
Primer forward [10 µM]	1,5 µl
Primer reverse [10 µM]	1,5 µl
Sample	3 µl
Terra PCR Direct Polymerase Mix	1 µl
<i>A. dest.</i> steril	ad 50 µl

Das nachfolgende PCR-Programm wurde durchgeführt:

Denaturierung	98 °C	2 min
Anlagerung	98 °C	10 s
Elongation	60 °C	15 s
Elongation	68 °C	1 min/kb
Lagerung	4 °C	∞

2.6.5 Enzymatische Modifikation von DNA

Um linearisierte DNA Fragmente zu erzeugen, wurden diese mit Restriktionsendonuklasen behandelt. Diese Fragmente dienen zur Größenabschätzung mittels Agarose-Gelelektrophorese sowie für Ligationsreaktionen. Für die Behandlung wurde nach Herstellervorgaben vorgegangen. Die Restriktionsendonukleasen *LgUI* und *Esp3I* gehören zu den Typ IIS Restriktionsenzymen, welche in einem definierten Abstand von ihrer Erkennungsstelle schneiden. Die Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XbaI* gehören zu den Typ II Restriktionsenzymen. Die verwendeten Enzyme mit ihren Erkennungsstellen und dem verwendeten Puffersystem sind in **Tab. 4** aufgelistet.

Tab. 4: Verwendete Restriktionsendonuklease mit Erkennungsstellen

Restriktionsendonuklease	Schnittstelle	Puffersystem
<i>LgUI</i>	5'...GCTCTTC(N) ₁ ...3' 3'...CGAGAAG(N) ₄ ...5'	1 x Tango™-Puffer
<i>Esp3I</i>	5'...CGTCTC(N) ₁ ^...3' 3'...GCAGAG(N) ₅ ^...5'	1 x CutSmart™ Puffer
<i>HindIII</i>	5'...A^AGCTT...3' 3'...TTCGA^A ...5	1 x CutSmart™ Puffer
<i>XbaI</i>	5'...T^CTAGA...3' 3'...AGATC^T ...5	1 x CutSmart™ Puffer

2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

2.6.6.1 Standard-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese diente zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten. Die Konzentration der Agarosegele wurde an die Größe der DNA-Fragmente angepasst und variierte zwischen 0,8-1,5 %. Als Puffer für die Gele und auch als Laufpuffer fand 1 x TAE Anwendung. Um ein vollständiges Einsinken der Proben in die Geltaschen zu gewährleisten, sowie zur Visualisierung der Lauffront, wurden die Proben mit 0,2 Vol. 6 x Loading Dye (NEB) versetzt. Zur Größenabschätzung wurde zusätzlich ein Längenstandard (NEB) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Agarosegel-

Mini-Kammern (Whatman Biometra) bei einer Spannung von 90 V (PowerPack P 25) für ca. 60 min. Im Anschluss konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente nach einer 20-minütigen Färbung im Ethidiumbromidbad (1 µg/ml in *A. dest.*) bei einer Wellenlänge von 312 nm mittels einer Photodokumentationsanlage (DarkHood DH-50, Biostep GmbH) visualisiert werden.

50 x TAE (Sambrook & Russel, 1998) [117]

Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

2.6.6.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion der DNA-Fragmente (PCR Produkte oder linearisierte Vektoren) erfolgte unter UV-Licht mit einem Skalpell. Die Aufreinigung der DNA aus dem Gelstück wurde nach Herstellerangaben des Monarch® DNA Extraktions Kits (NEB) oder des Gene Jet Gel Extraktions Kits (ThermoFisher) durchgeführt.

2.7 Erzeugung rekombinanter Organismen

Für die Erzeugung rekombinanter *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* Stämme wurde das StarGate® System von IBA Lifesciences verwendet. Dieses System basiert auf einem Zwei-Schritte-Klonierungsprozedere. Im ersten Schritt wird ein Spendervektor erzeugt, welcher das Zielgen enthält. Das Zielgen wird dann in einen Akzeptorvektor übertragen, der die optimale genetische Umgebung bietet. Dieser entstandene Expressionsvektor kann in den jeweiligen Organismus eingebracht werden. Der Ablauf der Reaktionen ist in **Abb. 6** dargestellt.

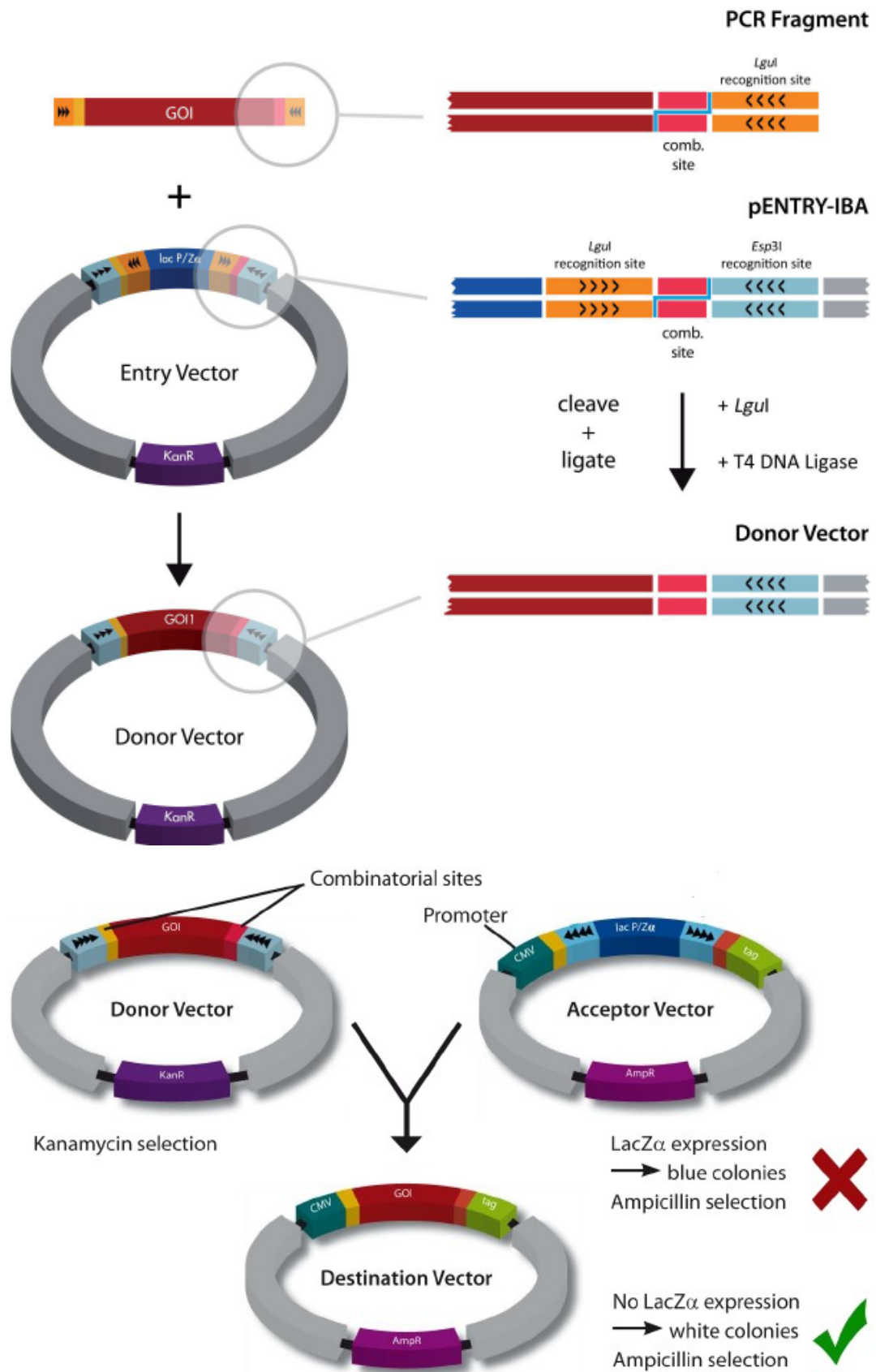


Abb. 6: Schematische Darstellung des Klonierungsprozesses mit dem StarGate System von IBA LifeSciences. Oben: Generierung des Spendervektors über das Einbringen des Zielgens in den Entry-Vektor. Unten: Generierung des Zielvektors durch Einbringung des Zielgens aus dem Spendervektor in den Akzeptorvektor.

2.7.1 Erzeugung des Spendervektors

Für die Erzeugung des Spendervektors wurde nach den Herstellervorgaben vorgegangen und das in **Abb. 7** dargestellte Plasmid verwendet. Die Restriktions- und Ligationsreaktionen konnten in einem Schritt durchgeführt werden. Der Reaktionsmix enthielt folgende Bestandteile:

Entry Vector pENTRY-IBA51 [5 ng]	7,5 μ l
PCR Produkt (GOI) (2nM)	12 μ l
T4-DNA-Ligase Puffer mit ATP [10 mM]	1 μ l
T4-DNA-Ligase [1 U/ μ l]	1 μ l
<i>Lgul</i> [5 U/ μ l]	1 μ l
<i>Lgul</i> Puffer	2,5 μ l

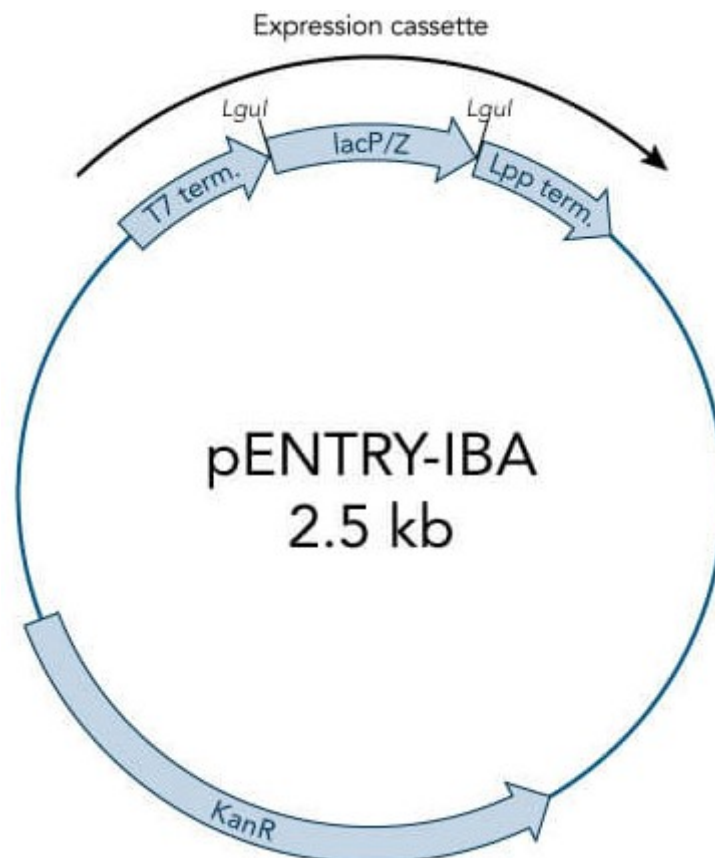


Abb. 7: Plasmidkarte des ENTRY-Vektors pENTRY-IBA51. Das hier dargestellte Plasmid diente der Erzeugung des Spendervektors. Die Expressionskassette enthält die T7 Terminationssequenz, Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *Lgul*, die Sequenz für das lacP/Z-Element sowie die LPP Terminationssequenz. Zwischen den Schnittstellen der Restriktionsendonuklease wird das Zielgen eingefügt. Das Plasmid enthält außerdem eine Kanamycin-Resistenzkassette.

2.7.2 Erzeugung des Zielvektors

Zur Erzeugung des Zielvektors wurden folgende Komponenten miteinander vermischt. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen und das in **Abb. 8** dargestellte Plasmid verwendet.

Zielvektor pYSG-IBA143 [5 ng]	7,5 μ l
Spendervektor mit GOI (2 ng/ μ l)	12,5 μ l
T4-DNA-Ligase Puffer mit ATP [10 mM]	1 μ l
T4-DNA-Ligase [1 U/ μ l]	1 μ l
EsP3I [5 U/ μ l]	1 μ l
Cutsmart Puffer	2,5 μ l

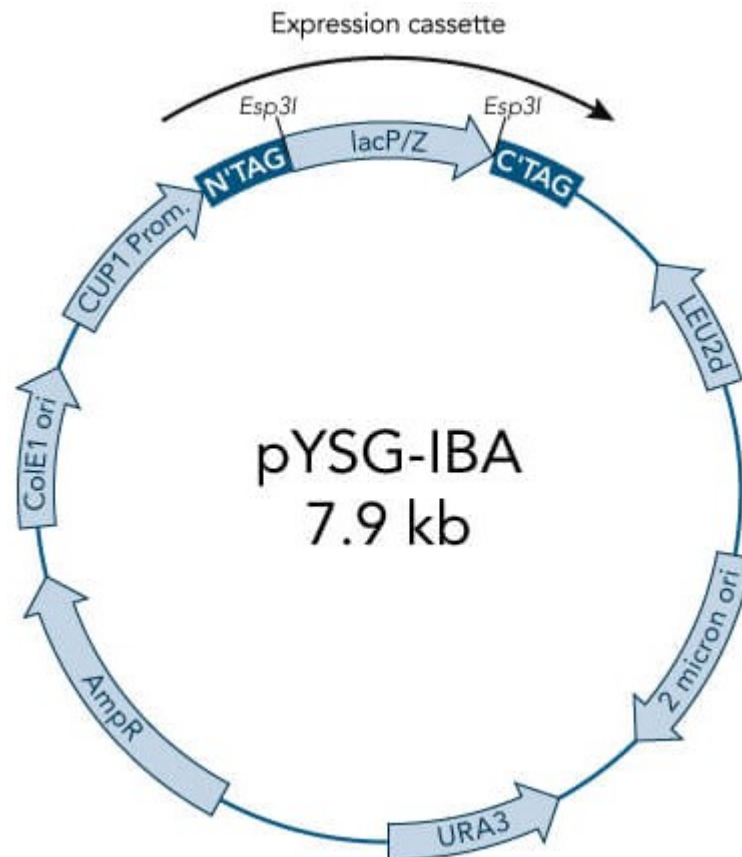


Abb. 8: Plasmidkarte des Zielvektors pYSG-IBA 143. Dargestellt ist die Plasmidkarte des Acceptorvektors pYSG-IBA, welcher für die Herstellung des Zielvektors benötigt wird. Zwischen die Schnittstellen der Restriktionsendonuklease *Esp3I* wird das Zielgen ligiert. Der N-terminale Tag (N'TAG) ist in dieser Arbeit ein 6x-Histidin-Tag, der C-terminale Tag (C'TAG) ein Twin-Streptag. Weiterhin sind der induzierbare CUP1 Promotor, die Ampicillinresistenzkassette, die Auxotrophiemarker LEU2d und URA3 sowie die Replikationsursprünge ColE1 ori (*E. coli*) und 2 micron ori (*S. cerevisiae*) dargestellt.

2.7.3 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Transformation der gewünschten Vektoren in *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* ist die Verwendung kompetenter Zellen nötig. Sofern die Zellen keine natürliche Kompetenz aufweisen, können diese durch verschiedene Behandlungen die Kompetenz erwerben. Für die CaCl_2 -vermittelte Transformation in *E. coli* wurden kommerziell erworbene Zellen verwendet (*E. coli* Top10, IBA Lifesciences). Für die Elektroporation in *S. cerevisiae* wurden frische elektrokompetente Zellen wie nachfolgend beschrieben hergestellt.

Eine Hauptkultur in YPD wurde auf eine Start OD von 0,3 eingestellt und bei 30 °C, 170 rpm schüttelnd inkubiert bis eine OD von 1,6 erreicht wurde. Es folgte eine Zentrifugation bei 3000 rpm (Biofuge Fresco, Heraeus) und 4 °C für 20 min. Das Zellpellet wurde zweimal mit 50 ml eiskaltem, sterilem *A. dest.* und einmal mit eiskaltem Elektroporationspuffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Konditionierung der Zellen mit 20 ml Konditionierungspuffer für 30 min bei 30 °C und 170 rpm. Nach dem erneuten Waschen mit 50 ml eiskaltem, sterilem Elektroporationspuffer wurde das Zellpellet in Elektroporationspuffer aufgenommen, sodass das finale Volumen 1 ml betrug. Die Zellen wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Elektroporationspuffer

Sorbitol	27,33 g
CaCl_2 [1 M]	150 μl
<i>A. dest.</i>	ad 150 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert (Porengröße 0,2 μm) und bei RT gelagert.

1 M CaCl_2

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	7,35 g
<i>A. dest.</i>	ad 50 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert (Porengröße 0,2 μm) und bei RT gelagert.

Konditionierungspuffer

$\text{LiAc} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	510,1 mg
DTT	77,1 mg
<i>A. dest.</i>	ad 50 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert (Porengröße 0,2 μm), mit Alufolie abgedeckt und kühl gelagert.

2.7.4 CaCl₂-vermittelte Transformation in *E. coli*

Für die CaCl₂-vermittelte Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* wurden kommerziell erworbene kompetente Zellen (*E. coli* Top10, IBA Lifesciences) verwendet. 10 µl des Ligationsansatzes wurden zu einem Aliquot der kompetenten Zellen gegeben. Es folgte die Inkubation für 30 min auf Eis mit dem anschließenden Hitzeschock für 5 min bei 37 °C. Zur Regeneration wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 900 µl LB Medium schloss sich eine schüttelnde Inkubation für 45 min bei 37 °C an.

α-Komplementation (Blau-Weiß-Screening)

Die für die Mutagenese eingesetzten Plasmide enthalten eine LacP/Z Kasette, die für die α-Untereinheit der β-Galactosidase kodiert. Bei erfolgreicher Insertion des Zielgens in das Plasmid, geht die β-Galactosidase-Aktivität verloren. Somit ist das Bakterium nicht mehr in der Lage, die chromogene Substanz X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) umzusetzen. Die auf dem Festmedium wachsenden Kolonien erscheinen weiß. Falls das Bakterium ein Plasmid ohne enthaltenes Zielgen aufgenommen hat, bleibt die LacP/Z-Kasette vollständig, X-Gal wird in den blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo und Galactose gespalten, die Kolonien erscheinen blau. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide enthalten eine LacP/Z Kasette, welche unter der Kontrolle eines separaten Promoters steht. Die Verwendung von IPTG ist daher nicht notwendig. Bakterien, welche kein Plasmid aufgenommen haben können aufgrund der fehlenden Antibiotikaresistenz nicht auf dem Festmedium wachsen.

Zur Durchführung wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Festmedium mit 50 mg/l Kanamycin (pENTRY-IBA51) bzw. 100 mg/l Ampicillin (pYSG-IBA143) und 50 mg/l X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.7.5 Transformation von *S. cerevisiae* mittels Elektroporation

Die Transformation von Plasmid-DNA in *S. cerevisiae* erfolgte mittels Elektroporation. 400 µl der kompetenten Zellen (siehe 2.7.3) wurden in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0.2 cm) pipettiert, 100 ng Plasmid in einem Volumen von max. 5 µl hinzugegeben, vorsichtig durchmischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mittels des Gen Pulser XCell™ Electroporation Systems (BioRad, München) bei 1,5 kV, 25 µF und 200 Ω. Das gesamte Volumen aus der Küvette wurde in 8 ml YPD:1M Sorbitol (1:1) pipettiert

mit anschließender Inkubation für 1 h bei 30 °C und 170 rpm. Zur Selektion wurde die Suspension auf YDO w/o uracil Festmedium aufgetropft oder 100 µl ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert.

2.8 Arbeiten mit Proteinen

2.8.1 Überexpression von Proteinen in *S. cerevisiae*

Die transformierten Hefezellen sind in der Lage, das Zielprotein zu exprimieren. Wenn nicht anders angegeben, wurde mittels einer Vorkultur (in YDO w/o uracil) eine Hauptkultur (in YDO w/o leucin) auf eine OD von 0,2 angeimpft und bei 30 °C, 170 rpm kultiviert, bis eine OD von ca. 1 erreicht wurde. Im Anschluss erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von CuSO₄ mit einer finalen Konzentration von 0,5 mM und der weiteren Inkubation über Nacht.

2.8.2 Zellaufschluss von *S. cerevisiae* mittels Hochgeschwindigkeits-homogenisation

Für den Nachweis der heterolog exprimierten Proteine wurden die Zellen der entsprechenden rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme mittels eines Hochgeschwindigkeitshomogenisierers (FastPrep-24™ 5G, MP Biomedicals™) aufgeschlossen. Die Zellpellets (2.8.1) wurden in je 2 ml Homogenisationspuffer aufgenommen, bei 13000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 1200 µl des Homogenisationspuffers und 12 µl Proteaseinhibitorcocktail (Sigma-Aldrich) aufgenommen. In ein Tallprep™ Röhrchen (Vol.4,5 ml) (MP Biomedicals™) mit der Lysematrix Y (Yttria-stabilisierte Zirkoniumoxid-Beads mit 0.5 mm Durchmesser) wurden 1200 µl der Zellsuspension pipettiert. Die Zellyse erfolgte im Hochgeschwindigkeitshomogenisator bei 6,5 m/s für 45 sec. Dieser Zyklus wurde sechsmal wiederholt. Zwischen den Zyklen wurden die Röhrchen für 60 sec auf Eis inkubiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues 2 ml Reagiergefäß überführt. Die Lysematrix wurde mit 800 µl Homogenisationspuffer (inkl. 8 µl Proteaseinhibitorcocktail) überschichtet und gevortext. Nach Absenken der Lysematrix wurde der Überstand in das 2 ml Reagiergefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm für 2 min. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reagiergefäß überführt und für die Aufreinigung mittels Affinitätschromatografie eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Homogenisationspuffer

Tris HCl [20 mM]	2,4 g
Na-Phosphat-Puffer	20 ml
NaCl [50 mM]	2,92 g
Imidazol [10 mM]	0,68 g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 1000 ml

Na-Phosphat-Puffer

1 M NaH₂PO₄: 15,6 g in 100 ml *A. dest* lösen

1 M Na₂HPO₄: 1708 g in 100 ml *A. dest* lösen

91,5 ml NaH₂PO₄ mit 8,5 ml Na₂HPO₄ mischen und den pH-Wert auf 8 einstellen.

2.8.3 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatografie

Zur Proteinaufreinigung wurde die immobilisierte Metall-Affinitätschromatografie angewendet. Die Verwendung eines Expressionsvektors (pYSG-IBA 143) in welchen die codierenden Bereiche schistosomaler Tegumentproteine kloniert wurden, erzeugten ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen Twin-Strep-Tag und einem C-terminalen 6x-His-Tag. Der His-Tag bindet unter spezifischen Pufferkonditionen an immobilisierte Metallionen wie z.B. Nickel. Für die Aufreinigung wurde ein Nickel-NTA-Harz in entsprechenden Säulen verwendet.

1 -2 ml des Nickel-NTA-Harzes, welches in 20 % Ethanol gelöst war, wurde auf die Säulen gegeben, sodass sich das Harz absetzen und das Ethanol aus der Säule herauslaufen konnte. Im Anschluss erfolgte die Äquilibrierung der Säule mit Homogenisationspuffer. Dafür wurden 2- bis 3-mal je 5 ml des Puffers auf die Säule gegeben. 100 µl des Lysats wurden für die nachfolgende SDS-PAGE entnommen und bei 4 °C gelagert. Das restliche Lysat der aufgeschlossenen Zellkulturen wurde auf die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Die Säule wurde im Anschluss dreimal mit je 5 ml Waschpuffer gewaschen, dabei wurde der letzte Durchfluss (3. Waschung) aufgefangen. Die gebundenen Proteinfractionen wurden durch dreimaliges Auftragen von je 1 ml des Elutionspuffers von der Nickel-NTA Matrix gelöst und in separaten Reagiergefäßen aufgefangen. Zur Reinigung von verbliebenen Proteinfractionen erfolgte das Auftragen von zweimal je 5 ml Elutionspuffer. Zur Aufbewahrung der Säule folgte ein Waschschrift mit 5 ml 20 % Ethanol und die Lagerung bei 4 °C.

Waschpuffer

Tris HCl [20 mM]	1,2 g
Na-Phosphat-Puffer	10 ml
NaCl [1 M]	29,22 g
Imidazol [40 mM]	1,36 g
<i>A. dest.</i>	<i>ad 500 ml</i>

Elutionspuffer

Tris HCl [20 mM]	1,2 g
Na-Phosphat-Puffer	10 ml
NaCl [500 mM]	14,61 g
Imidazol [300 mM]	10,21 g
<i>A. dest.</i>	<i>ad 500 ml</i>

2.8.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Bradford [118] mittels ROTI®Nanoquant (Roth). Es wurde nach den Herstellervorgaben vorgegangen. Zunächst wurde eine einfach konzentrierte Arbeitslösung aus der fünffach konzentrierten ROTI®Nanoquant Stocklösung mit *A. dest.* hergestellt. Für die Messung erfolgte die Zugabe von 200 µl der ggf. verdünnten Proteinlösung zu 800 µl der ROTI®Nanoquant Arbeitslösung mit anschließender photometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 590 nm und 450 nm (Smartspec™ 3000, Bio-Rad). Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Eichreihe im Bereich von 0-100 µg/ml mit BSA als Standardreferenz im gleichen Verfahren hergestellt. Sowohl bei der Eichreihe als auch bei den Proben wurde der Quotient der OD₅₉₀ und OD₄₅₀ ermittelt und dieser für die Berechnung der Konzentration genutzt.

2.8.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die aufgereinigten Proteinproben (2.8.3) wurden 1:1 mit 3x Laemmli-Puffer versetzt und bei 95 °C für

10 min inkubiert. Die Proben wurden entweder direkt auf das Gel aufgetragen oder bei 4 °C gelagert.

Solange sich die Proben im Sammelgel befanden, wurde eine Stromstärke von 10 mA je Gel angelegt. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte im Anschluss bei 20 mA je Gel. Zur Größenabschätzung wurde der Proteinmarker (Color Prestained Protein Standard Range, NEB) verwendet.

3x Laemmli-Puffer

Tris-HCl [0,5 mM] pH 6,8	3 ml
Glycerol (68 %)	2,4 ml
2-Mercaptoethanol	80 µl
Bromphenolblau	12 mg
SDS	480 mg
<i>A. dest.</i>	<i>ad 8 ml</i>

Sammelgel (4 %ig)

Wasser	1,81 ml
4 x Sammelgelpuffer	0,75 ml
Acrylamid [30 % (v/v)]	0,4 ml
APS [10 % (v/v)]	37,5 µl
TEMED	7,5 µl

Sammelgelpuffer, pH 6,8

Tris (1,5 M)	6,06 g
SDS (0,4 % [w/v])	0,4 g
<i>A. dest.</i>	<i>ad 100 ml</i>

Trenngel (12 %ig)

Wasser	1,69 ml
Glycerin [99 % (v/v)]	0,3 ml
4 x Trenngelpuffer	1,5 ml
Acrylamid [30 % (v/v)]	2,4 ml
APS [10 % (v/v)]	100 µl
TEMED	10 µl

Trenngelpuffer, pH 8,8

Tris (1,5 M)	18,17 g
SDS (0,4 % [w/v])	0,4 g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 100 ml

10x SDS-Gelelektrophoresepuffer

Tris-HCl	75 g
Glycin	360 g
SDS	25 ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 2500 ml

Zur Verwendung 1:10 mit *A. dest* verdünnen.

2.8.6 Kolloidale Coomassie-Färbung

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung der Proteine (2.8.5) wurden die SDS-Polyacrylamid-Gele aus den Glaträgern gelöst und in einer Coomassie-Brillant Blau R-250 Lösung über Nacht gefärbt. Überschüssiges Coomassie wurde durch mehrmaliges Waschen in Entfärberlösung aus den Gelen gelöst. Wenn die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren, erfolgte ein Waschschrift mit *A. dest.* und anschließend die Dokumentation durch das Einscannen der Gele.

Coomassie Färbelösung

Coomassie-Brillant Blau R-250	100	mg
Coomassie Entfärberlösung	200	ml

Coomassie Entfärberlösung

Methanol	400	ml
Eisessig	100	ml
<i>A. dest.</i>	500	ml

2.8.7 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Der Transfer von Proteinen auf eine Membran wird auch als Western Blot bezeichnet. In einer Blotkammer wurden 2 in Transferpuffer äquilibrierte Whatman Papiere, eine in Transferpuffer äquilibrierte Nitrocellulose Membran (Amersham™ Protran™ 0,45 µm, GE Healthcare Life Sciences), das SDS-Polyacrylamid-Gel (2.8.5) sowie erneut zwei in Transferpuffer äquilibrierte Whatman Papiere luftblasenfrei aufeinandergestapelt. Der Transfer erfolgte bei 6 V für 90 min. Im Anschluss wurde die Membran in 1x TBS gewaschen und für 1 h in Blockierlösung inkubiert. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen erfolgte ein fünfmaliges Waschen in TBS. Die Membran wurde bis zur weiteren Verwendung in TBS bei 4 °C gelagert.

10 x Transferpufferstammlösung

Glycin	29	g
Tris	58	g
SDS	3,7	g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 1000	ml

Zur Verwendung 100 ml der Stammlösung mit 200 ml Methanol und 700 ml *A. dest* versetzen.

10 x TBS

Tris	24,3 g
NaCl	80,1 g
A. dest.	ad 1000 ml

Zur Verwendung 1:10 mit A. dest verdünnen.

Blockierlösung

Magermilchpulver	1 g
1 x TBS	20 ml

Die Lösung wurde für 10 min bei RT auf einem Magnetrührer gerührt.

2.8.8 Detektion von 6x-His-Tag Fusionsproteinen

Die Detektion der immobilisierten Proteine erfolgte kolorimetrisch über Antikörpergebundene Alkalische Phosphatase. Diese setzt ein artifizielles chromogenes Substrat (BCIP – 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat) in Kombination mit NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) zu einem blauen Farbstoff um. Nach der Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran (2.8.7) wurde diese in der Primärantikörperlösung (Maus Anti-His-Tag 1:1000, Agrisera) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es erfolgten fünf Waschschrte in 1 x TBS für jeweils 10 min um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde die Membran in der Sekundärantikörperlösung (Rabbit anti mouse alkaline phosphatase conjugat 1:5000, Sigma-Aldrich) für 1 h bei RT inkubiert und anschließend fünfmal in 1 x TBS für jeweils 10 min gewaschen. Die Visualisierung erfolgt durch die an den Sekundärantikörper konjugierte alkalische Phosphatase. Dafür wurde die Membran zunächst für 10 min im Detektionspuffer inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 10 ml NBT-BCIP Lösung (66 µl NBT, 33 µl BCIP) und eine Inkubation für 5 min im Dunkeln. Bei Erreichen einer ausreichenden Bandenintensität wurde die Reaktion durch Spülen der Membran mit A. dest. gestoppt, die Membran dann zwischen zwei Filterpapieren getrocknet, zwischen zwei Folien eingeschweißt und zur Dokumentation eingescannt.

Detektionspuffer

Tris-HCl	1,2114 g
NaCl	0,5844 g
MgCl ₂	1,0165 g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 100 ml

Den pH-Wert auf 9,5 einstellen.

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel und GraphPad Prism 6. Die Daten wurden als unabhängige Mehrfachbestimmungen erhoben und als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Zur Bestimmung der Signifikanzen wurde der Student's t-Test bzw. der Mann-Whitney-Test verwendet. Ein *P*-Wert von $P < 0,05$ wurde als signifikant gewertet (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$).

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss verschiedene Substanzen auf die Biofilmbildung von *C. difficile* haben.

Zunächst erfolgte die Etablierung eines Kultivierungssystems, um die Biofilmbildung von vier klinischen Isolaten von *C. difficile* zu untersuchen. Die Biofilme wurden hinsichtlich ihrer Biofilmmasse und der optischen Dichte quantifiziert. Außerdem wurden qualitative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach einer Lebend-Tot-Färbung angefertigt.

Mittels der etablierten Methoden wurde im Anschluss untersucht, welchen Effekt die Fettsäure C2DA, D-Aminosäuren sowie Tegumentproteine von *S. mansoni* auf die Biofilmbildung von *C. difficile* ausüben.

3.1 Die Biofilmbildung klinischer *C. difficile* Isolate *in vitro* ist variabel

Es wurden vier *C. difficile* Isolate (*C. difficile* 630, *C. difficile* BI 175, *C. difficile* EK 14 und *C. difficile* VPI 10463) ausgewählt, welche sich in ihrer Virulenz unterscheiden und auf ihre Fähigkeit Biofilme zu bilden untersucht. Die Kultivierung der Biofilme erfolgte für 24 h bzw. 72 h unter anaeroben Bedingungen im Komplexmedium BHIS (2.4.1.1). Nach der angegebenen Inkubationszeit wurde die Biofilmmasse mittels Kristallviolett Assay photometrisch bei 540 nm bestimmt (2.5.4). Die ermittelten Daten sind in **Abb. 9** dargestellt und zeigen, dass die Quantität der Biofilmmasse isolatabhängig ist. Beim Stamm EK 14 konnte am meisten Biofilmmasse quantifiziert werden, gefolgt vom Stamm BI 175. Die Stämme 630 und VPI 10463 haben die gleiche Menge an Biofilm gebildet. Nach 72 h bleibt diese Verteilung bestehen. Allerdings ist die Biofilmmasse bei allen Stämmen deutlich reduziert. Insbesondere bei den Stämmen 630 und VPI 10463 reduzierte sich die Biofilmmasse um etwa 50 % verglichen mit den Werten nach 24 h. Dies führte zu der Frage, inwieweit das Zellwachstum einen Einfluss auf die Biofilmmasse hat.

Mittels der optischen Dichte bei 600 nm wurde das Zellwachstum analysiert (**Abb. 10**). Dafür wurden die Stämme, wie in 2.4.1.1 beschrieben, kultiviert und nach den entsprechenden Inkubationszeiten der gesamte Inhalt einer Vertiefung der Zellkulturplatte resuspendiert. Es folgte die Messung der optischen Dichte bei 600 nm gegen einen Blindwert (2.5.1). Nach 24 h Inkubation wurde beim Isolat BI 175

die höchste OD mit einem Wert von 2,62 detektiert. Die Isolate 630 und VPI 10463 zeigen ähnliche OD Werte bei jeweils 1,96. Den niedrigsten Wert weist das Isolat EK 14 mit 1,24 auf. Die Messungen nach 72 h zeigen, dass die Werte aller Isolate niedriger sind als nach 24 h. Die geringste OD zeigt das Isolat EK 14 mit 0,54. Die höchste OD wurde beim Isolat VPI 10463 mit 1,06 ermittelt. Somit korreliert die inkubationsbedingte Abnahme der Biofilmmasse nach 72 h mit einer Abnahme der Zelldichte.

Die gemessene Reduzierung der Biofilmmasse und der OD_{600 nm} entsteht durch die artifizielle *in vitro* Kultivierung. Um dem *in vivo* Status näher zu kommen, wurde das Kultivierungssystem im nächsten Schritt angepasst.

Dabei wurde sich bei den folgenden Experimenten auf die Isolate 630 und VPI 10463 konzentriert. Diese beiden Isolate zeigten im Vergleich zu den Isolaten BI 17 und K 14 eine signifikant geringe Biofilmbildung. Weiterhin unterscheiden sich diese Isolate stark hinsichtlich ihrer Virulenz (Vgl. **Tab. 2**). Für die Optimierung des Kultivierungssystems und zur Untersuchung, ob die Biofilmbildung im Zusammenhang mit der Virulenz steht, sind diese Isolate für die folgenden Experimente geeignete Kandidaten.

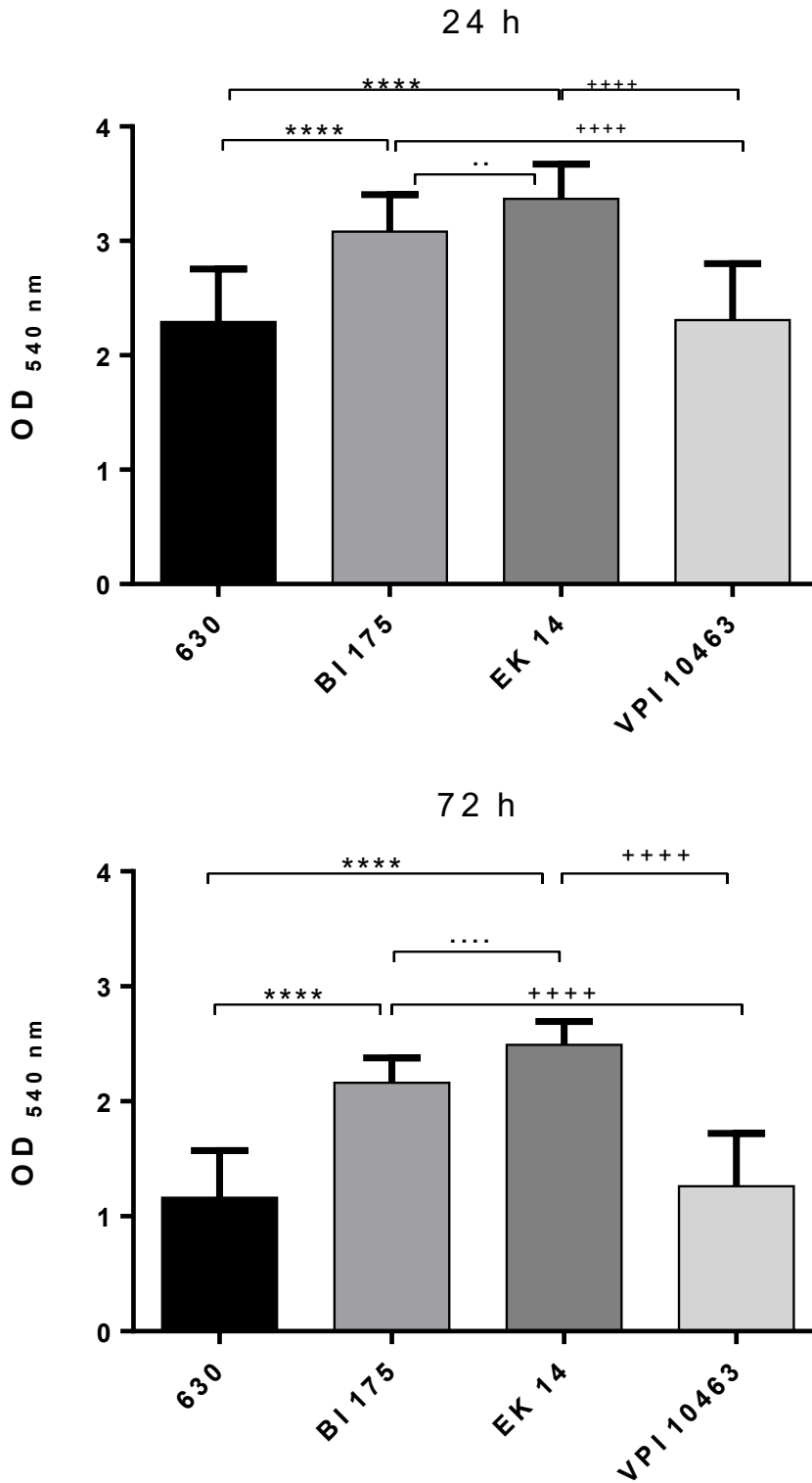


Abb. 9: Biofilmbildung verschiedener *C. difficile* Isolate. Kultivierung der Biofilme für 24 h (oben) bzw. 72 h (unten) unter anaeroben Bedingungen in BHIS. Photometrische Quantifizierung der Biofilmmasse bei 540 nm nach Kristallviolett-färbung. n ≥ 5, ** p < 0,01, **** p < 0,0001, Mann-Whitney-U.

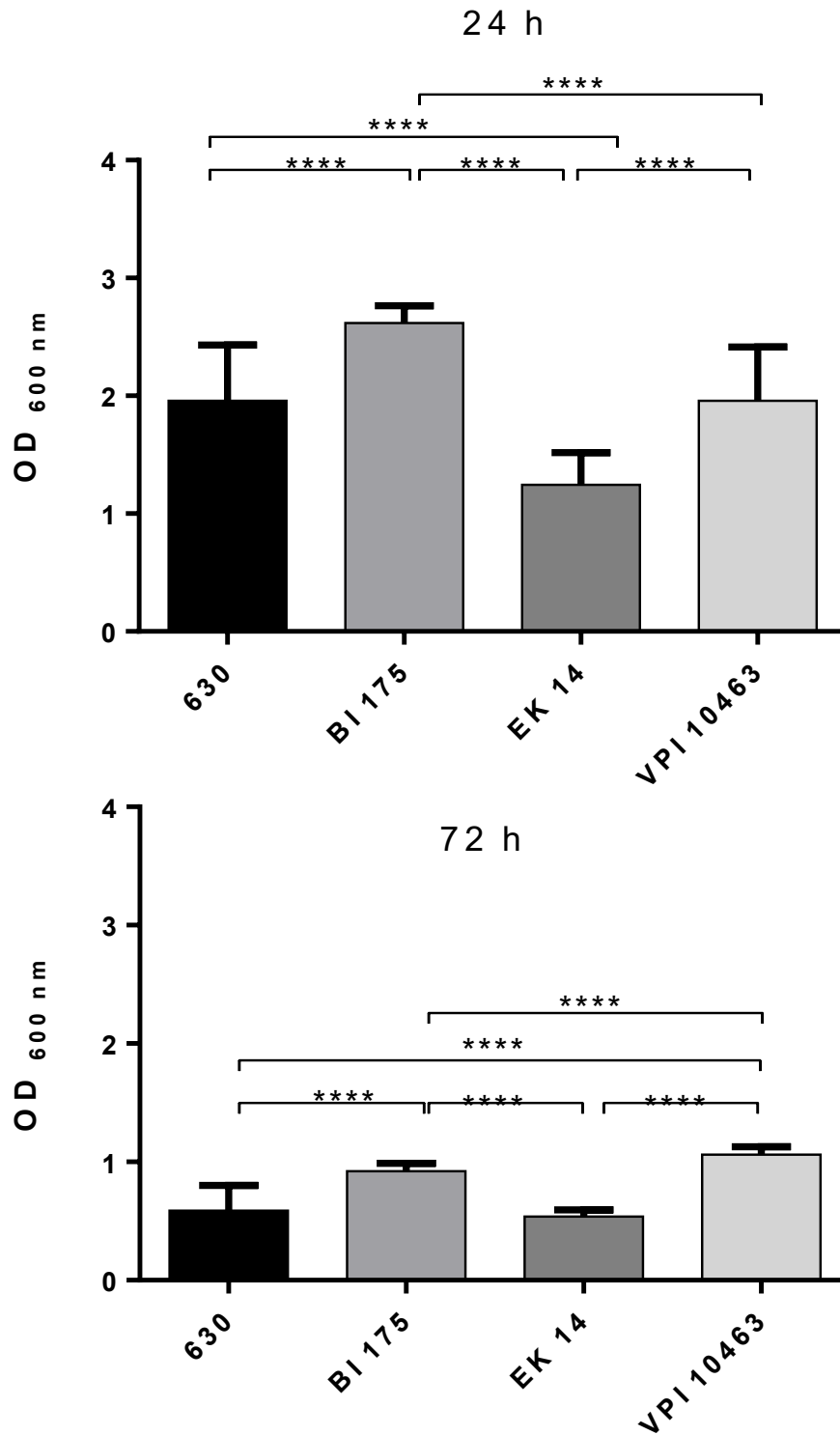


Abb. 10: Messung der optischen Dichte bei 600 nm. Kultivierung der Biofilmmasse für 24 h (oben) bzw. 72 h (unten) unter anaeroben Bedingungen in BHIS. Photometrische Messung bei 600 nm nach resuspendieren des Wellinhaltes. $n \geq 5$, **** $p < 0,001$, Mann-Whitney-U

Bei der Optimierung des Systems erfolgte die Kultivierung wie in (2.4.1.1) beschrieben, jedoch fand zusätzlich alle 24 h ein Austausch des Mediums statt. Der Überstand wurde abgenommen und frisches BHIS Medium vorsichtig in die Vertiefungen gegeben. Die Ergebnisse der Quantifizierung der Biofilmmasse (2.5.4) und der optischen Dichte (2.5.1) sind in den **Abb. 11** und **Abb. 12** zusammengefasst.

Für das Isolat 630 zeigte sich, dass ein Austausch des Mediums die Reduzierung des Biofilms nach 72 h aufhebt. Nach 24 h wurde eine $OD_{540\text{ nm}}$ von 2,61 ermittelt, die nach 72 h auf 1,22 abfiel. Bei erfolgtem Medienwechsel (+MW) wurde eine Biofilmmasse von 2,89 quantifiziert. Somit ist die Biofilmmasse nach 72 h + MW signifikant höher als nach 72 h ohne MW und nach 24 h. Das Zellwachstum zeigt ein ähnliches Verhalten in diesem Kultivierungssystem. Die $OD_{600\text{ nm}}$ nimmt von 1,96 (24 h) nach 0,59 (72 h) ab. Die Durchführung des täglichen Medienwechsels führt zu einer signifikant erhöhten $OD_{600\text{ nm}}$ (1,38) verglichen mit den 72 h-Werten. Die Werte sind jedoch geringer als nach 24 h.

Die gleichen Untersuchungen wurden für das Isolat VPI 10463 durchgeführt. Die Biofilmmasse sinkt auch bei diesem Isolat von 2,44 nach 24 h Inkubation auf 1,32 nach 72 h Inkubation ab. Der Medienwechsel führt zu einer signifikanten Erhöhung der Biofilmmasse auf 3,29 und übersteigt damit die Werte nach 24 h und nach 72 h. Die Ermittlung des Zellwachstums mittels der $OD_{600\text{ nm}}$ ergab, dass der Medienwechsel bei einer Inkubation über 72 h zu vergleichbaren Werten wie nach 24 h führt (2,21 vs. 2,19). Damit führt der Medienwechsel zu einem signifikant höheren Zellwachstum als die Kultivierung ohne Medienwechsel (1,06).

Insgesamt führt das angepasste Kultivierungssystem zu einer Stabilisierung der Biofilmbildung beider *C. difficile* Isolate über 72 h. Somit konnte im Folgenden mit den Experimenten zur Hemmung der Biofilmbildung begonnen werden.

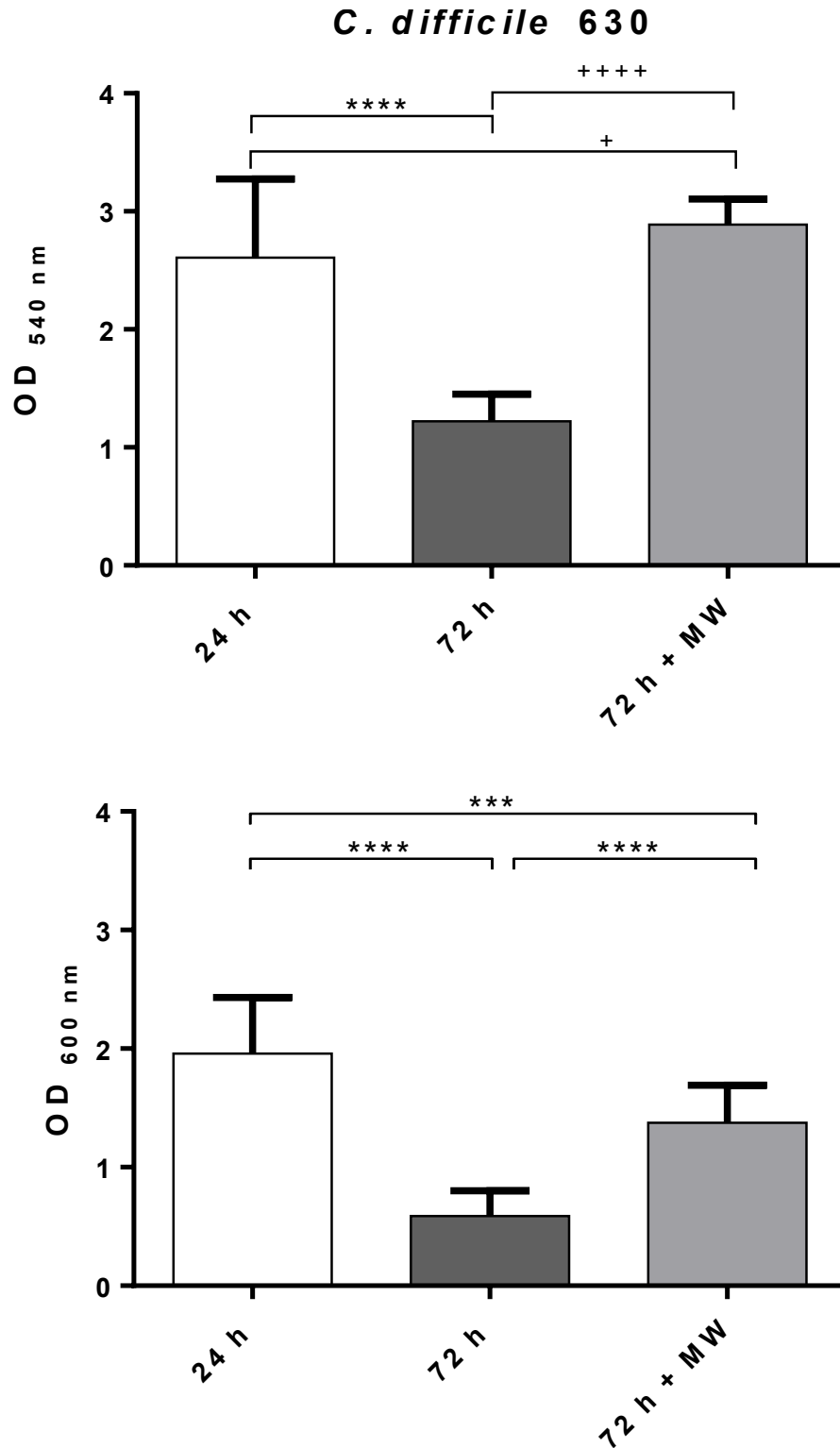


Abb. 11: Optimierung des Kultivierungssystems für *C. difficile* 630 durch Medienwechsel. Die Biofilme von *C. difficile* 630 wurden für 24 h bis 72 h ohne oder mit Medienwechsel (+MW) anaerob in BHIS kultiviert. Die Biofilmmasse wurde nach Färbung mit Kristallviolett photometrisch bei 540 nm quantifiziert (oben). Die Gesamtzellmasse wurde nach dem Resuspendieren des Well-Inhaltes bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch gemessen (unten). + $p < 0,05$; *** $p < 0,01$; ****/++++ $p < 0,001$, Mann-Whitney-U

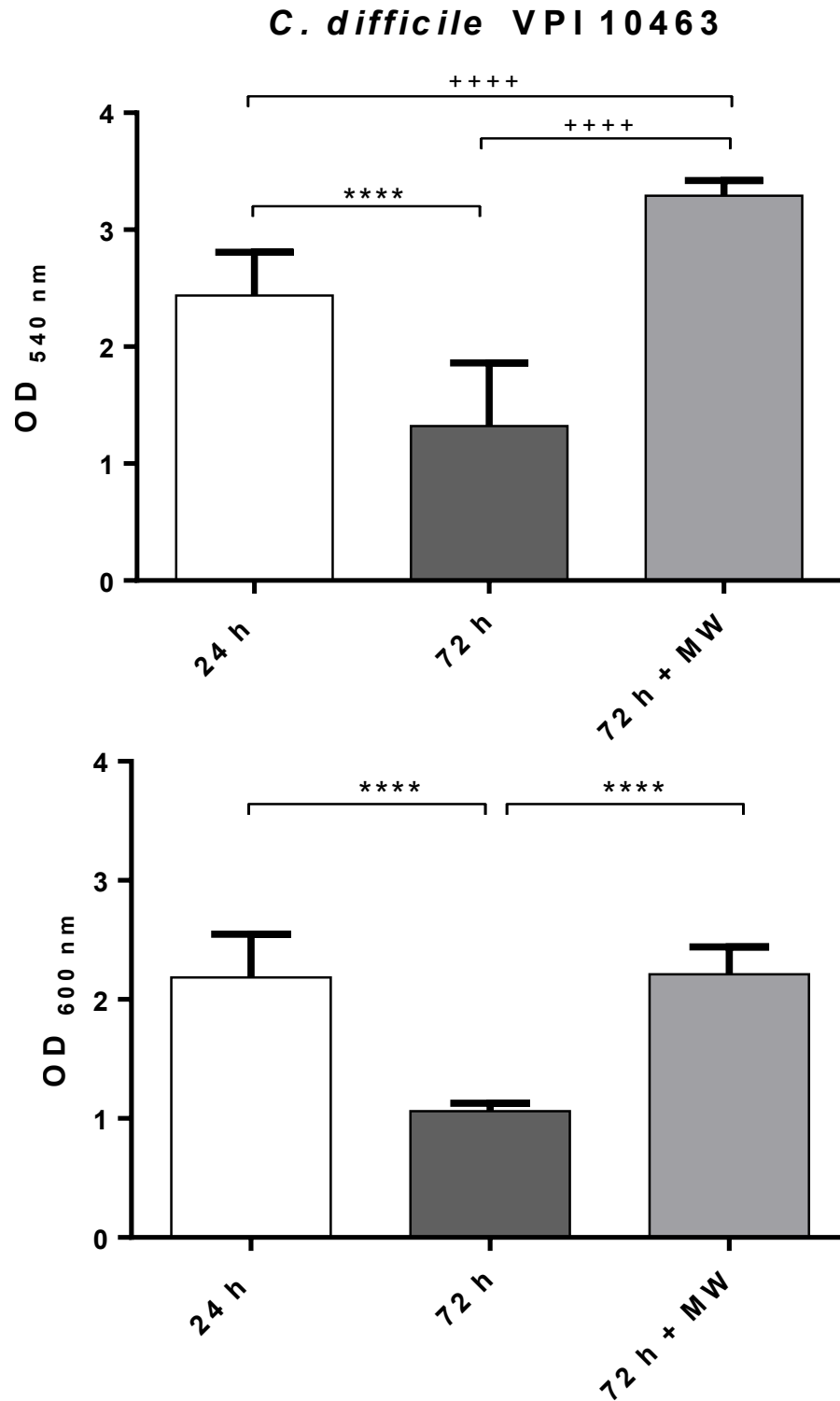


Abb. 12: Optimierung des Kultivierungssystems für *C. difficile* VPI 10463 durch Medienwechsel. Die Biofilme von *C. difficile* VPI 10463 wurden für 24 h bis 72 h ohne oder mit Medienwechsel (+MW) anaerob in BHIS kultiviert. Die Biofilmmasse wurde nach Färbung mit Kristallviolett photometrisch bei 540 nm quantifiziert (oben). Die Gesamtzellmasse wurde nach dem Resuspendieren des Well-Inhaltes bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch gemessen (unten). ****/++++ $p < 0,001$, Mann-Whitney-U

3.2 Wachstums- und Biofilmmhemmende Effekte von *cis*-2-Decensäure

Fettsäure-Signalmoleküle haben einen Einfluss auf das Wachstum, die Virulenz, die Motilität sowie die Biofilmbildung und -auflösung. Insbesondere die *cis*-2-Decensäure (C2DA), welche von *P. aeruginosa* produziert wird, konnte Effekte auf die Biofilmbildung von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie *Candida albicans* aufweisen. Dies macht diese Substanz zu einem potentiellen Kandidaten für die Beschichtung von Implantatoberflächen. Da in der Literatur noch keine Daten über die Wirksamkeit bei anaeroben Bakterien zu finden sind, wurde der Einfluss von C2DA auf die Biofilmbildung des anaeroben Bakteriums *C. difficile* untersucht.

3.2.1 Der Einfluss von *cis*-2-Decensäure nach Beschichtung der Oberfläche auf die Biofilmbildung von *C. difficile*

Um die Wirksamkeit von C2DA als biofilminhibierende Beschichtung zu untersuchen, musste zunächst ein passendes Lösungsmittel für die Fettsäure sowie eine Methodik zur Beschichtung etabliert werden. Dafür wurden zwei verschiedene Ansätze zur Beschichtung der Oberflächen von Multiwell-Platten mit C2DA verfolgt. Das Vorgehen ist zur Veranschaulichung in **Abb. 13** schematisch dargestellt.

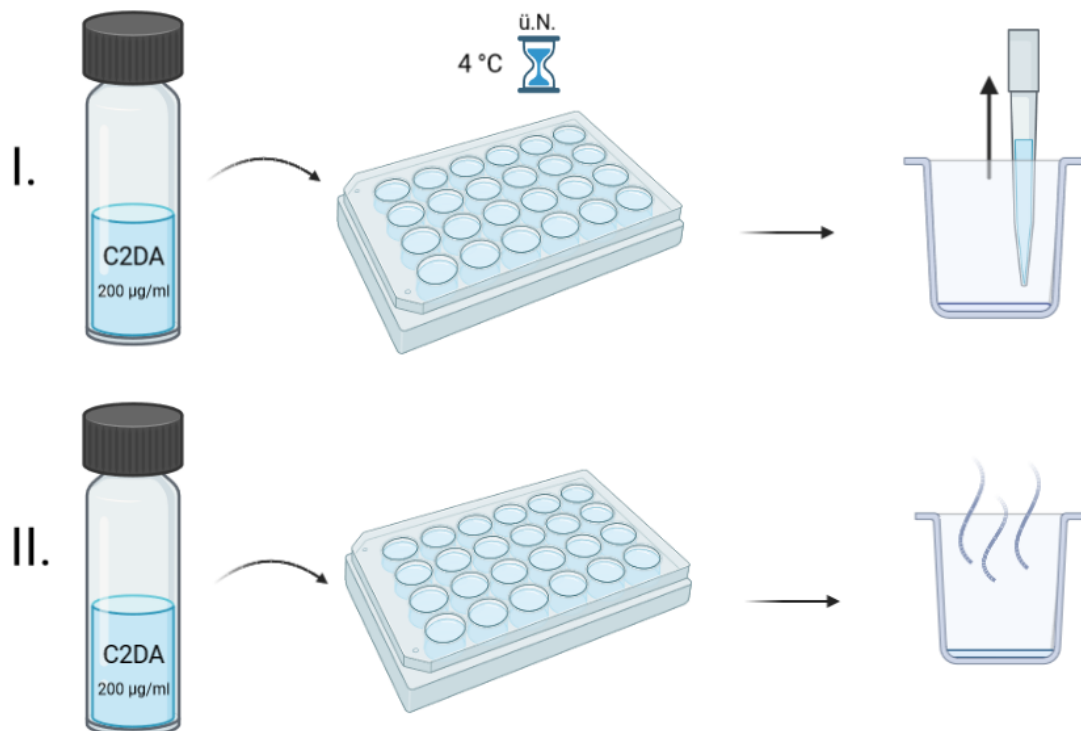


Abb. 13: Schematische Darstellung der Oberflächenbeschichtung mit C2DA. Die in Ethanol gelöste C2DA (200 µg/ml) wurde in die Vertiefungen einer 24-Well-Zellkulturplatte gegeben. Nach der Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen (I.) oder das Lösungsmittel verdampfen gelassen (II.). Danach erfolgte die Inokulation mit *C. difficile*. Abbildung mit „BioRender“.

Bei Ansatz I (abgenommen) wurden die Lösungen in die Vertiefungen gegeben und die Platte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die überschüssige Lösung abgenommen und die Platte trocken gelassen. Bei Ansatz II (abgedampft) wurde die Lösung in die Vertiefung gegeben und das Lösemittel unter der Sterilwerkbank verdampfen gelassen. Der Vergleich der Ansätze I und II sollte zeigen, ob durch das Verdampfen lassen des Lösungsmittels mehr C2DA an der Oberfläche haften bleibt, als es beim Abpipettieren der Fall ist. Dies sollte sich durch eine verringerte Biofilmbildung darstellen. Als Lösungsmittel wurden 70 % sowie 96 % Ethanol verwendet. Die Konzentration der C2DA betrug 200 µg/ml.

In **Abb. 14** sind die Ergebnisse der Quantifizierung der Biofilmmasse (2.5.4) für *C. difficile* 630 und *C. difficile* VPI 10463 als relative Werte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die schraffierten Balken zeigen die Werte der Lösungsmittelkontrollen. Bei der Verwendung von 70 % Ethanol als Lösungsmittel konnte sowohl bei Ansatz I (90,05 %) als auch bei Ansatz II (95,74 %) kein Einfluss auf die Biofilmmasse von *C. difficile* 630 festgestellt werden. Die Zugabe von 200 µg/ml C2DA führt ebenfalls zu keinem Effekt bei der Biofilmbildung. Bei Ansatz I konnten nach 24 h Inkubation 89,98 % der Biofilmmasse detektiert werden, bei Ansatz II 107,92 %. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Verwendung von 96 % Ethanol gemacht. Sowohl die Lösemittelkontrolle als auch der Einsatz von C2DA führt zu keiner Veränderung der Biofilmmasse. Bei Ansatz I wurden 105,96 % bei der Lösemittelkontrolle und 106,51 % bei der Verwendung von C2DA detektiert. Bei Ansatz II ergaben die Messungen 100,24 % (Lösemittelkontrolle) bzw. 94,77 % (C2DA).

Die Effekte der Lösungsmittel sowie der C2DA wurden auch auf die Biofilmmasse von *C. difficile* VPI 10463 untersucht. Bei der Inkubation der Biofilme mit 70 % Ethanol wurden relative Biofilmmassen von 111,64 % (Ansatz I) bzw. 107,79 % (Ansatz II) gemessen. Die Inkubation mit C2DA führte zu Werten von 103,15 % (Ansatz I) bzw. 114,80 %. Die Kultivierung der Biofilme mit 96 % Ethanol führte tendenziell zu einer Erhöhung der Biofilmmasse auf 139,89 % bei Ansatz I. Bei Zugabe der C2DA lag die OD_{540 nm} bei 110,85 %. Bei Durchführung der Beschichtung nach Ansatz II mit 96 % Ethanol bzw. C2DA in 96 % Ethanol gelöst lagen die Werte der Biofilmmassen bei 98,30 % bzw. 107,15 %.

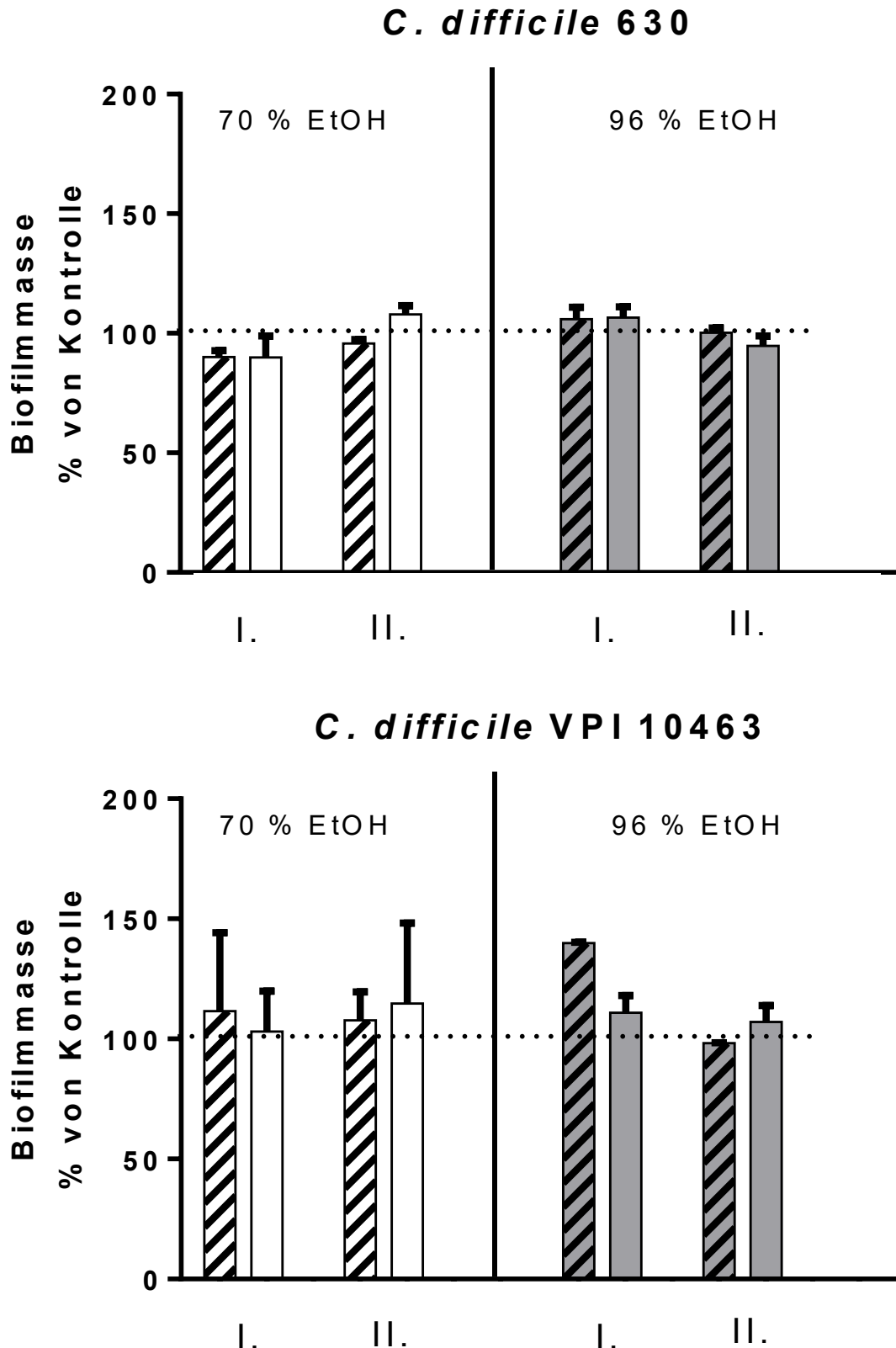


Abb. 14: Quantifizierung der Biofilmmasse von *C. difficile* nach Oberflächenbeschichtung mit C2DA. Die Kultivierung der Biofilme erfolgte für 24 h unter anaeroben Bedingungen in BHIS. Die Oberflächen wurden vor der Inokulation über Nacht 200 µg/ml mit C2DA beschichtet und der Überstand entweder abgenommen (I.) oder verdampfen gelassen (II.). Es sind die relativen Ergebnisse der Lösemittelkontrolle (schraffiert) sowie die Ergebnisse mit 200 µg/ml C2DA (blanko) dargestellt. Die unbehandelte Kontrolle wurde als Referenzwert auf 100 % gesetzt (gepunktete Linie).

Insgesamt konnte kein Effekt der C2DA, der Methodik des Beschichtens oder der Wahl des Lösungsmittels auf die Biofilmbildung von *C. difficile* festgestellt werden. Auch wenn in der Literatur die Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel beschrieben ist, wurde aufgrund der ermittelten Daten für das weitere Vorgehen DMSO als Lösungsmittel verwendet, welches vom Hersteller der C2DA empfohlen wurde. Desweiteren zeigten auch die beiden Beschichtungsmethodiken keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Im Weiteren wurde also auf die Beschichtung der Oberflächen verzichtet und die C2DA direkt ins Kultivierungsmedium gegeben.

3.2.2 Der Einfluss von *cis*-2-Decensäure auf die Biofilmbildung von *C. difficile* nach Zugabe zum Medium

Um den Effekt der C2DA auf die Biofilmbildung von *C. difficile* untersuchen zu können, wurde für die weiteren Experimente DMSO als Lösungsmittel verwendet. Außerdem wurde dazu übergegangen, die Fettsäure in das Kultivierungsmedium zu geben, statt die Oberflächen zu beschichten. Der konzentrationsabhängige Effekt der C2DA konnte dann durch die Quantifizierung der Biofilmmasse (2.5.4), fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Live-Dead-Färbung (2.5.5), Bestimmung des Zellwachstums (2.5.1), der Zelllänge (2.5.3) sowie der Quantifizierung der KBE (2.5.2) ermittelt werden.

Die **Abb. 15** fasst die Ergebnisse der Untersuchungen zur Quantifizierung der Biofilmmasse von *C. difficile* 630 nach Zugabe von C2DA beim täglichen Medienwechsel zusammen. Die Ergebnisse des Einflusses von 250 µg/ml, 150 µg/ml und 125 µg/ml C2DA sowie des Lösungsmittels DMSO sind prozentual im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Biofilm in BHIS) dargestellt. Es konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt von C2DA nachgewiesen werden. Eine Konzentration von 125 µg/ml zeigt nach 24 h und 72 h keinen Einfluss auf die Biofilmbildung. 150 µg/ml reduzierte die Biofilmmasse um 29,01 % nach 24 h bzw. um 17,92 % nach 72 h. Die stärkste Reduzierung der Biofilmmasse wurde bei einer Konzentration von 250 µg/ml detektiert. Die Biofilmmasse reduzierte sich auf 7,42 % bzw. 5,69 %. Der Effekt von C2DA auf die KBE, die Zelllänge und die OD_{600 nm} für *C. difficile* 630 ist in **Tab. 5** dargestellt. Die Anzahl der KBE nach 24 h zeigt eine konzentrationsabhängige Reduktion. Während bei der Kontrolle $6,82 \cdot 10^7$ KBE/ml quantifiziert wurden, sind bei 125 µg/ml $8,26 \cdot 10^6$ und bei 150 µg/ml $1,03 \cdot 10^3$ KBE/ml detektiert worden. Die Zelllänge wird durch C2DA ebenfalls beeinflusst. Mit steigender C2DA Konzentration nimmt die Zelllänge von

durchschnittlich 5,74 μm auf 12,49 μm zu. Im Gegensatz dazu nimmt die OD_{600 nm} mit steigender C2DA Konzentration ab. Insgesamt ist festzustellen, dass der Einfluss der C2DA nach 24 h größer ist, als nach 72 h.

C. difficile 630

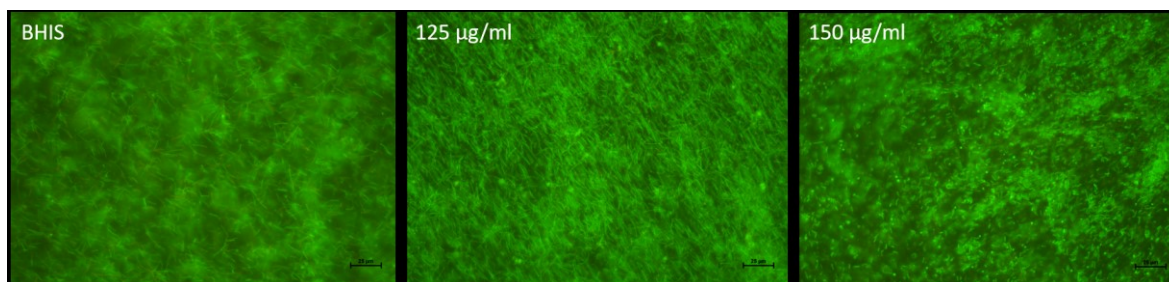
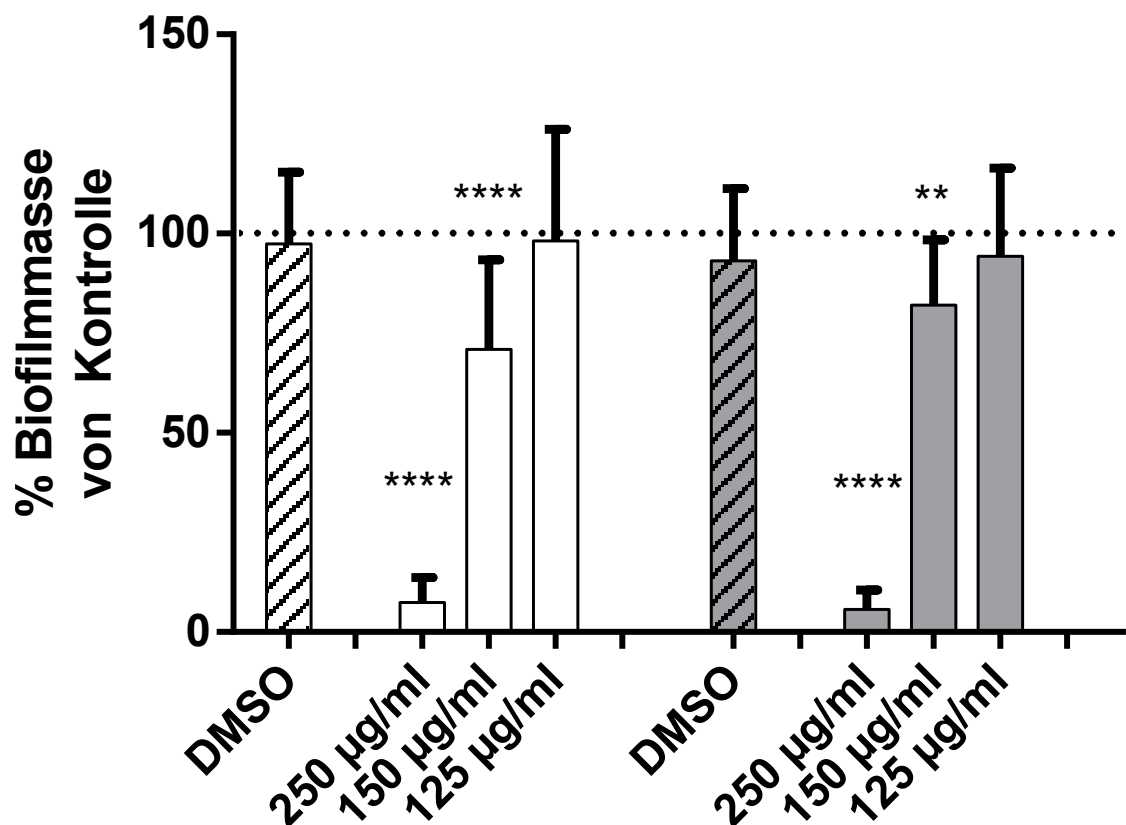


Abb. 15: Der konzentrationsabhängige Einfluss von C2DA auf die Biofilmbildung von *C. difficile* 630. Oben: Kultivierung der Biofilme für 24 h (weiß) bzw. 72 h (grau) in BHIS mit täglichem Medienwechsel und jeweils erneuter Zugabe von C2DA. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch bei 540 nm nach Kristallviolett-färbung. Prozentuale Darstellung bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (gepunktete Linie). Die Lösemittelkontrolle ist schraffiert dargestellt. n = 4, Mann-Whitney-U Test, ** p < 0,01; **** p < 0,0001. Unten: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Nikon Ni-U) nach 72 h Inkubation auf Coverslips. Die Färbung erfolgte mittels des LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (ThermoFisher).

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Biofilmmasse von *C. difficile* VPI 10463 nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von C2DA sind in Abb. 16 dargestellt. Nach

24 h Inkubation ist die Biofilmmasse bei einer Konzentration von 125 µg/ml um 22,7 % reduziert. Eine Konzentration von 150 µg/ml führt zu einer Reduktion der Biofilmmasse um 41,57 %, eine Konzentration von 250 µg/ml um 91,74 %.

C. difficile VPI 10463

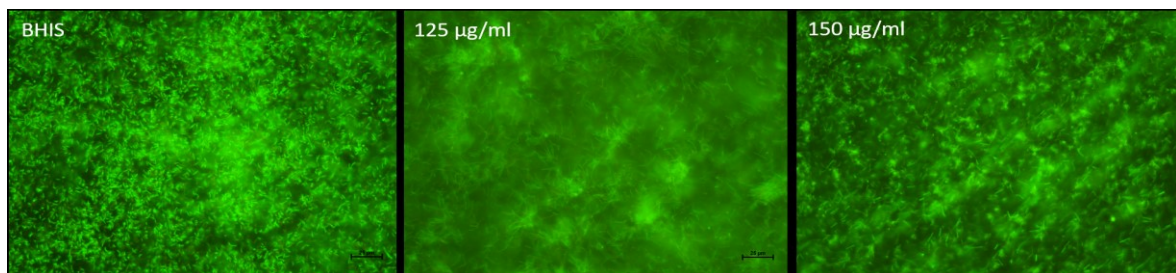
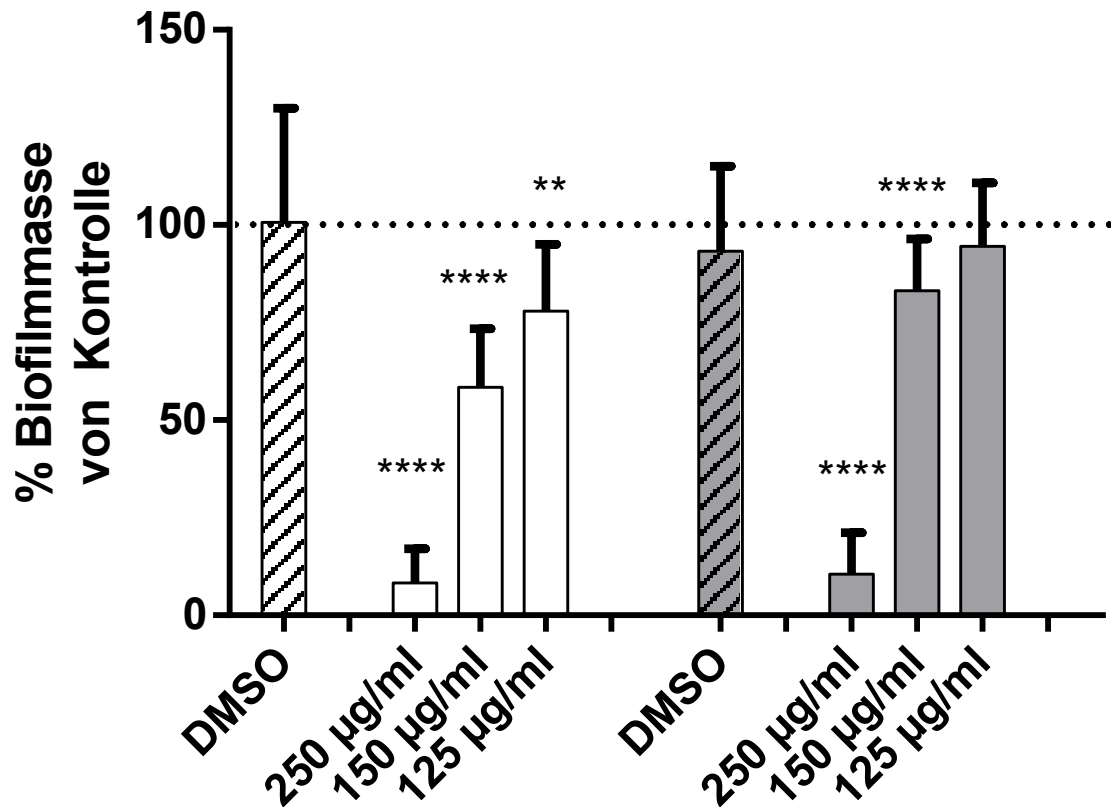


Abb. 16: Der konzentrationsabhängige Einfluss von C2DA auf die Biofilmbildung von *C. difficile* VPI 10463. Oben: Kultivierung der Biofilme für 24 h (weiß) bzw. 72 h (grau) in BHIS mit täglichem Medienwechsel und jeweils erneuter Zugabe von C2DA. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch bei 540 nm nach Kristallviolett-färbung. Prozentuale Darstellung bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (gepunktete Linie). Die Lösemittelkontrolle ist schraffiert dargestellt. n = 4, Mann-Whitney-U Test, ** p < 0,01; **** p < 0,0001. Unten: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Nikon Ni-U) nach 72 h Inkubation auf Coverslips. Die Färbung erfolgte mittels des LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (ThermoFisher).

Nach 72 h Inkubation hat eine Konzentration von 125 µg/ml keinen signifikanten Effekt auf die Biofilmmasse. Die Zugabe von 150 µg/ml reduziert die Biofilmmasse um 16,80 %, die Zugabe von 250 µg/ml um 89,39 %.

Tab. 5: Biofilm von *C. difficile* 630. Dargestellt sind die koloniebildenden Einheiten, die Zelllänge sowie das Zellwachstum nach Kultivierung der Biofilme für 24 h oder 72 h unter anaeroben BD-Bedingungen in BHIS mit täglichem Medienwechsel und erneuter Zugabe von C2DA.

C2DA [µg/ml]	Koloniebildende Einheiten		Zelllänge [µm]		OD _{600 nm}	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
150	1,03*10 ³	2,56*10 ⁷	12,49	9,54	0,13	0,5
125	8,26*10 ⁶	2,16*10 ⁷	10,37	9,51	0,43	1,33
0	6,82*10 ⁷	1,69*10 ⁷	5,74	6,76	2,04	1,46

Tab. 6: Biofilm von *C. difficile* VPI 10463. Dargestellt sind die koloniebildenden Einheiten, die Zelllänge sowie das Zellwachstum nach Kultivierung der Biofilme für 24 h oder 72 h unter anaeroben Bedingungen in BHIS mit täglichem Medienwechsel und erneuter Zugabe von C2DA

C2DA [µg/ml]	Koloniebildende Einheiten		Zelllänge [µm]		OD _{600 nm}	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
150	1*10 ⁵	4,41*10 ⁷	10,44	8,59	0,14	0,9
125	k.D.	3,47*10 ⁷	7,96	7,70	0,26	1,73
0	3,37*10 ⁶	1,46*10 ⁷	5,33	5,82	1,97	1,93

Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (**Tab. 6**) wird durch die Zugabe von C2DA nach 24 h reduziert. Hingegen ist dieser Effekt nach 72 h Inkubation nicht mehr feststellbar. Bei der Ermittlung der Zelllänge sind sowohl nach 24 h als auch nach 72 h Unterschiede festzustellen. Mit zunehmender Konzentration nimmt auch die Zelllänge zu. 125 µg/ml C2DA führen zu einer Zelllänge von 7,96 µm bzw. 7,70 µm, 150 µg/ml zu einer Zelllänge von 10,44 µm bzw. 8,59 µm. Die OD_{600 nm} wird durch die Zugabe von C2DA negativ beeinflusst und nimmt

konzentrationsabhängig ab. Nach 24 h reduziert die Zugabe von 125 µg/ml C2DA die OD_{600 nm} auf 0,26. Nach 72 h ist der Effekt geringer und es wurde eine OD_{600 nm} von 1,73 ermittelt. Eine Konzentration von 150 µg/ml hat sowohl nach 24 h als auch nach 72 h einen reduzierenden Effekt, sodass Werte von 0,14 bzw. 0,9 gemessen wurden.

Die Zugabe von C2DA führt zu einer Reduzierung des Wachstums und der Biofilmmasse. Weiterhin zeigte *C. difficile* eine Stressreaktion auf die Zugabe der Fettsäure, welche sich durch die signifikant größere Zelllänge äußert. C2DA zeigt also eine hemmende Wirkung auf die Biofilmbildung von *C. difficile*.

3.3 Kultivierungsbedingte Effekte von D-Aminosäuren auf die Biofilmbildung von *C. difficile*

D-Aminosäuren sind ein wesentlicher Bestandteil der Zellwände von Bakterien und es wurde eine antimikrobielle bzw. biofilminhibierende Wirkung in der Literatur beschrieben. Sie sind somit potentielle Kandidaten um als Beschichtung auf Implantaten biofilmassoziierte Infektionen zu verhindern. Für die Auswirkung von D-Aminosäuren auf die Biofilmbildung anaerober Mikroorganismen fehlen Daten in der Literatur. In dieser Arbeit wurde der Effekt von D-Phenylalanin, D-Methionin, D-Tyrosin und D-Prolin auf die Biofilmbildung von *C. difficile* untersucht.

3.3.1 Die Biofilmbildung von *C. difficile* auf mit D-Aminosäuren beschichteten Oberflächen

Um die Wirksamkeit von D-Aminosäuren als Oberflächenbeschichtung zur Vermeidung von Biofilmen auf Implantatoberflächen zu untersuchen, wurden in die Vertiefungen von Multiwell-Zellkulturplatten D-Aminosäure-Lösungen gegeben, die Platten bei 4° C über Nacht inkubiert und nachfolgend die überschüssige Flüssigkeit verworfen. Die Biofilme wurden wie in 2.4.1.1 beschrieben kultiviert und die Biofilmmasse quantifiziert (2.5.4), allerdings wurde in dieser Versuchsreihe kein Medienwechsel vorgenommen. In **Abb. 18** sind die Ergebnisse der Quantifizierung der Biofilmmasse für *C. difficile* 630 und *C. difficile* VPI 10463 zusammengefasst. Die Oberflächenbeschichtung erfolgte mit 500 µM D-Phenylalanin, D-Methionin, D-Tyrosin oder D-Prolin für 24 h bzw. 72 h. Beim Isolat 630 war die Biofilmmasse nach 24 h Inkubation auf der mit D-Phenylalanin beschichteten Oberfläche signifikant um 14,96 % reduziert, während bei den anderen D-Aminosäuren kein Effekt beobachtet werden konnte. Im Vergleich dazu führten nach 72 h Inkubation

alle verwendeten D-Aminosäuren zu einer signifikanten Reduktion der Biofilmmasse. D-Phenylalanin führte zur größten Reduktion der Biofilmmasse um 30,49 %. D-Methionin und D-Tyrosin reduzierten die Biofilmmasse um 24,32 % bzw. 21,48 %. Die Inkubation auf mit D-Prolin beschichteten Oberflächen reduzierte die Biofilmmasse um 14,48 %.

Bei den Ergebnissen für die Biofilmmasse von *C. difficile* VPI 10463 zeigte sich, dass nach 24 h keine der Beschichtungen mit D-Aminosäuren zu einer Reduktion der Biofilmmasse führt. Ganz im Gegensatz führte die Beschichtung mit D-Prolin zu einer signifikanten Erhöhung der Biofilmmasse um 10,7 %. Eine signifikante Reduktion der Biofilmmasse um 12,41 % konnte nach 72 h auf der mit D-Tyrosin beschichteten Oberfläche festgestellt werden.

Zur Visualisierung der Biofilme erfolgten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach einer Live-Dead-Färbung (siehe 2.5.5). Eine Übersicht ist in **Abb. 17** dargestellt.

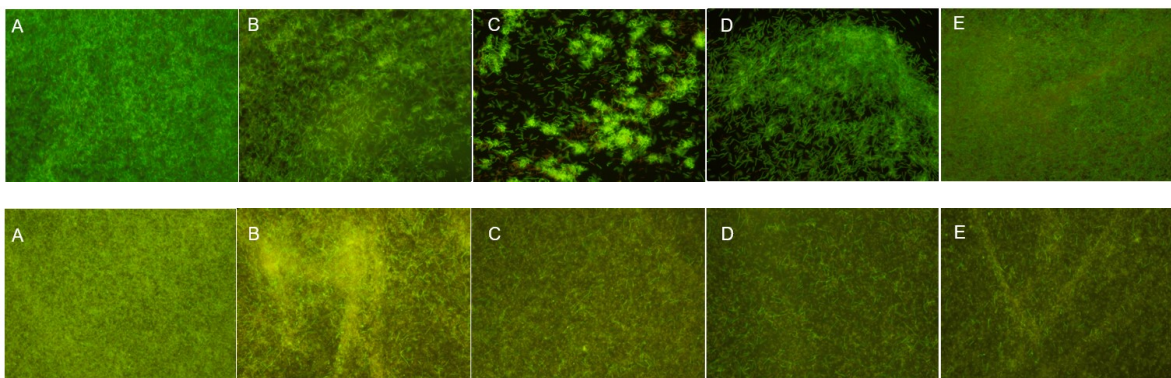


Abb. 17: Lebend-Tot-Färbung von *C. difficile* 630 Biofilmen nach Beschichtung mit D-Aminosäuren. A) Kontrolle B) D-Phenylalanin C) D-Methionin D) D-Tyrosin E) D-Prolin. Oben: 24 h. Unten: 72 h

Um einen konzentrationsabhängigen Effekt der D-Aminosäuren untersuchen zu können, wurden im Weiteren 1000 μM D-Aminosäuren als Oberflächenbeschichtung verwendet. Die Ergebnisse sind in **Abb. 19** dargestellt. D-Phenylalanin wirkt sowohl nach 24 h (-14,48 %) als auch nach 72 h (-19,48 %) reduzierend auf die Biofilmmasse von *C. difficile* 630. Im Gegensatz zu der Beschichtung mit 500 μM (**Abb. 18**) führen die Beschichtungen mit D-Methionin, D-Tyrosin und D-Prolin zu keiner Reduktion der Biofilmmasse. Die Biofilmbildung von *C. difficile* VPI 10463 wird nach 72 h sowohl durch die Beschichtung mit D-Tyrosin (-23,92 %) als auch durch die Beschichtung mit D-Prolin (-24,18 %) signifikant reduziert. Die Beschichtung der Oberflächen mit D-Aminosäuren hat die

Biofilmmasse von *C. difficile* 630 und *C. difficile* VPI 10463 teilweise (aminosäureabhängig) reduzieren können.

Zusammenfassend konnten bei den Experimenten stammspezifische Effekte der D-Aminosäuren auf die Biofilmbildung festgestellt werden, jedoch keine Konzentrationsabhängigkeit. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde auf das Beschichten der Oberflächen verzichtet und die D-Aminosäuren direkt zum Kultivierungsmedium gegeben.

3.3.2 Die Biofilmbildung von *C. difficile* bei Zugabe von D-Aminosäuren

Für diese Untersuchungen wurden D-Phenylalanin und D-Prolin ausgewählt, da diese den größten reduzierenden Effekt in den vorherigen Untersuchungen bewirkt haben. Weiterhin wurde untersucht, ob eine Kombination der beiden D-Aminosäuren einen synergistischen Effekt bewirkt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 20** dargestellt. Die Zugabe der einzelnen D-Aminosäuren sowie die Kombination dieser führte bei *C. difficile* 630 weder nach 24 h noch nach 72 h zu einer signifikanten Reduzierung der Biofilmmasse. Die Kultivierung von *C. difficile* VPI 0463 mit D-Prolin zeigt nach 72 h eine signifikante Reduktion der Biofilmmasse um 10,24 %. Die Kombination von D-Phenylalanin und D-Prolin reduzierte die Biofilmmasse um 14,37 %. Nach 24 h Inkubation mit den D-Aminosäuren konnte keine signifikante Reduktion der Biofilmmasse festgestellt werden.

Die Untersuchungen zeigten zusammenfassend nach 72 h einen größeren Effekt auf die Biofilmbildung von *C. difficile*, als nach 24 h. Die Kombination der D-Aminosäuren D-Phenylalanin und D-Prolin zeigte keinen synergistischen Effekt. Außerdem konnte bei der Zugabe der D-Aminosäuren ins Kultivierungsmedium kein höherer inhibierender Effekt festgestellt werden als bei der Beschichtung der Oberflächen.

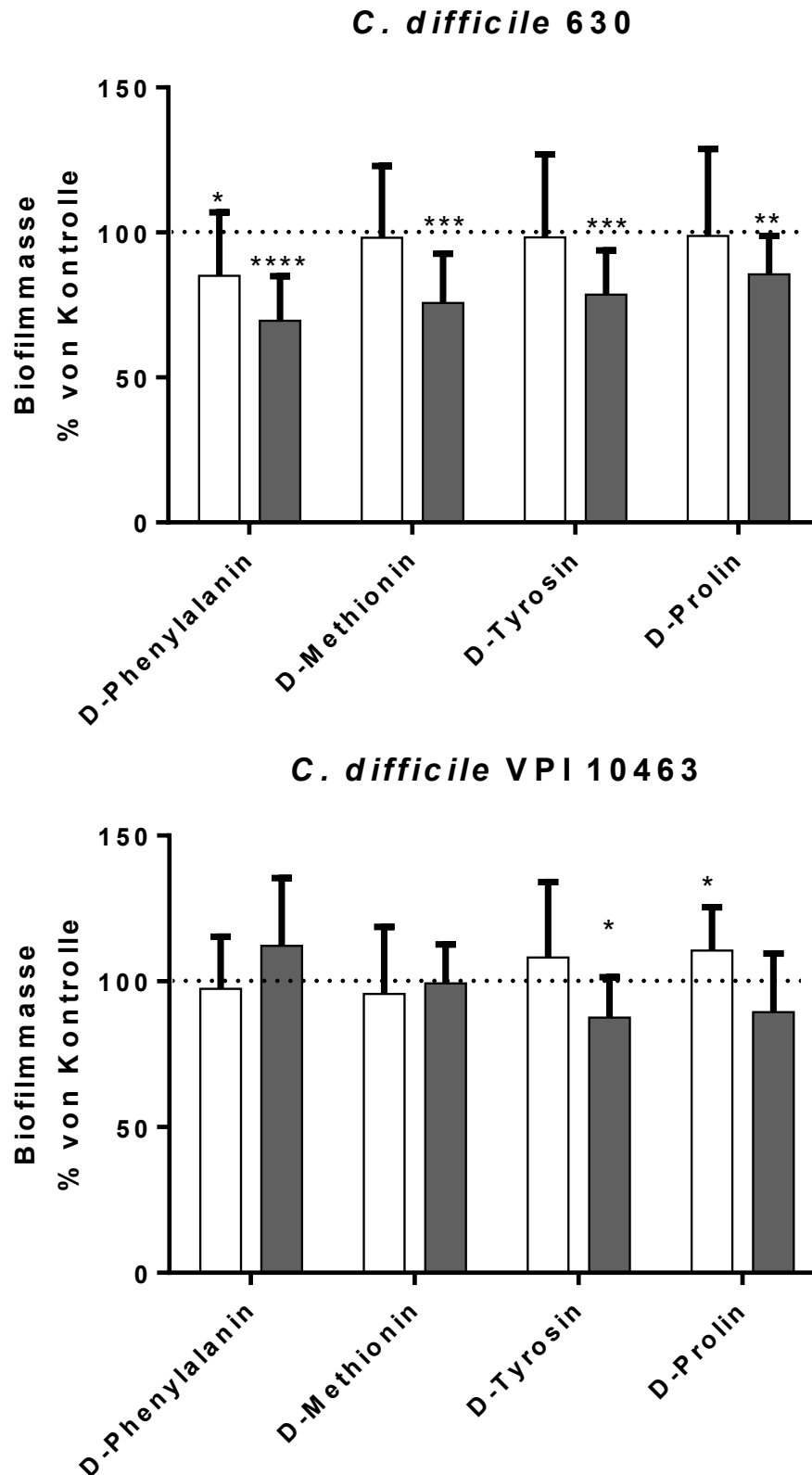


Abb. 18: Biofilmbildung von *C. difficile* auf mit 500 µM D-Aminosäuren beschichteter Oberfläche. Die Kultivierung der Biofilme erfolgte für 24 h (weiß) bzw. 72 h (grau) unter anaeroben Bedingungen in BHIS. Vor der Inokulation wurde die Oberfläche über Nacht mit 500 µM der entsprechenden D-Aminosäure inkubiert und der Überstand im Anschluss verworfen. Die Quantifizierung der Biofilmmasse erfolgte photometrisch bei 540 nm nach Kristallviolettffärbung. Prozentuale Darstellung bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (gepunktete Linie). $n > 3$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, Mann-Whitney-U

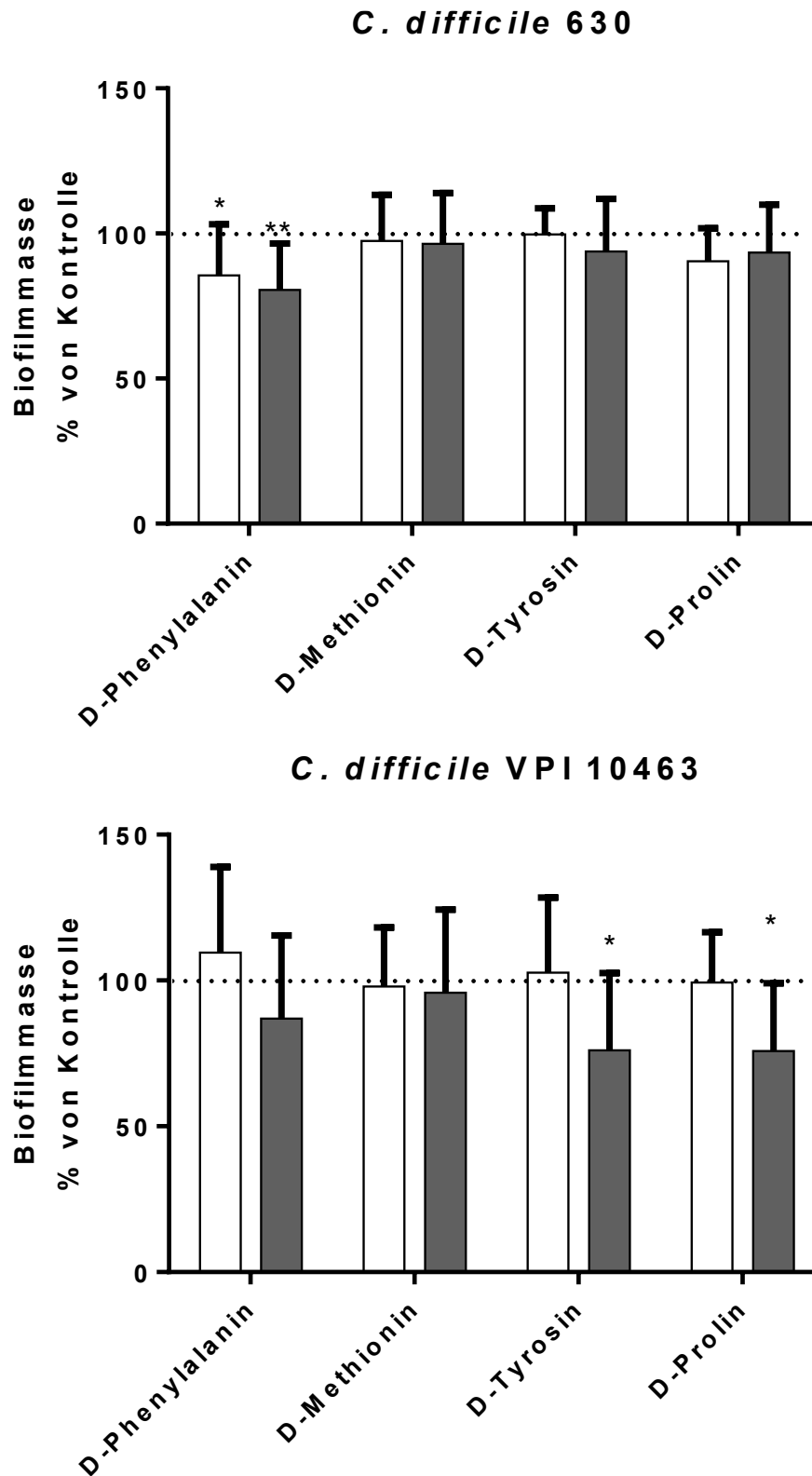


Abb. 19: Biofilmbildung von *C. difficile* auf mit 1000 μ M D-Aminosäuren beschichteter Oberflächen. Die Kultivierung der Biofilme erfolgte für 24 h (weiß) bzw. 72 h (grau) unter anaeroben Bedingungen in BHIS. Vor der Inokulation wurde die Oberfläche über Nacht mit 1000 μ M inkubiert und der Überstand im Anschluss verworfen. Die Quantifizierung der Biofilmmasse erfolgte photometrisch bei 540 nm nach Kristallviolett-färbung. Prozentuale Darstellung bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (gepunktete Linie). n >3, * p < 0,05, **, Mann-Whitney-U

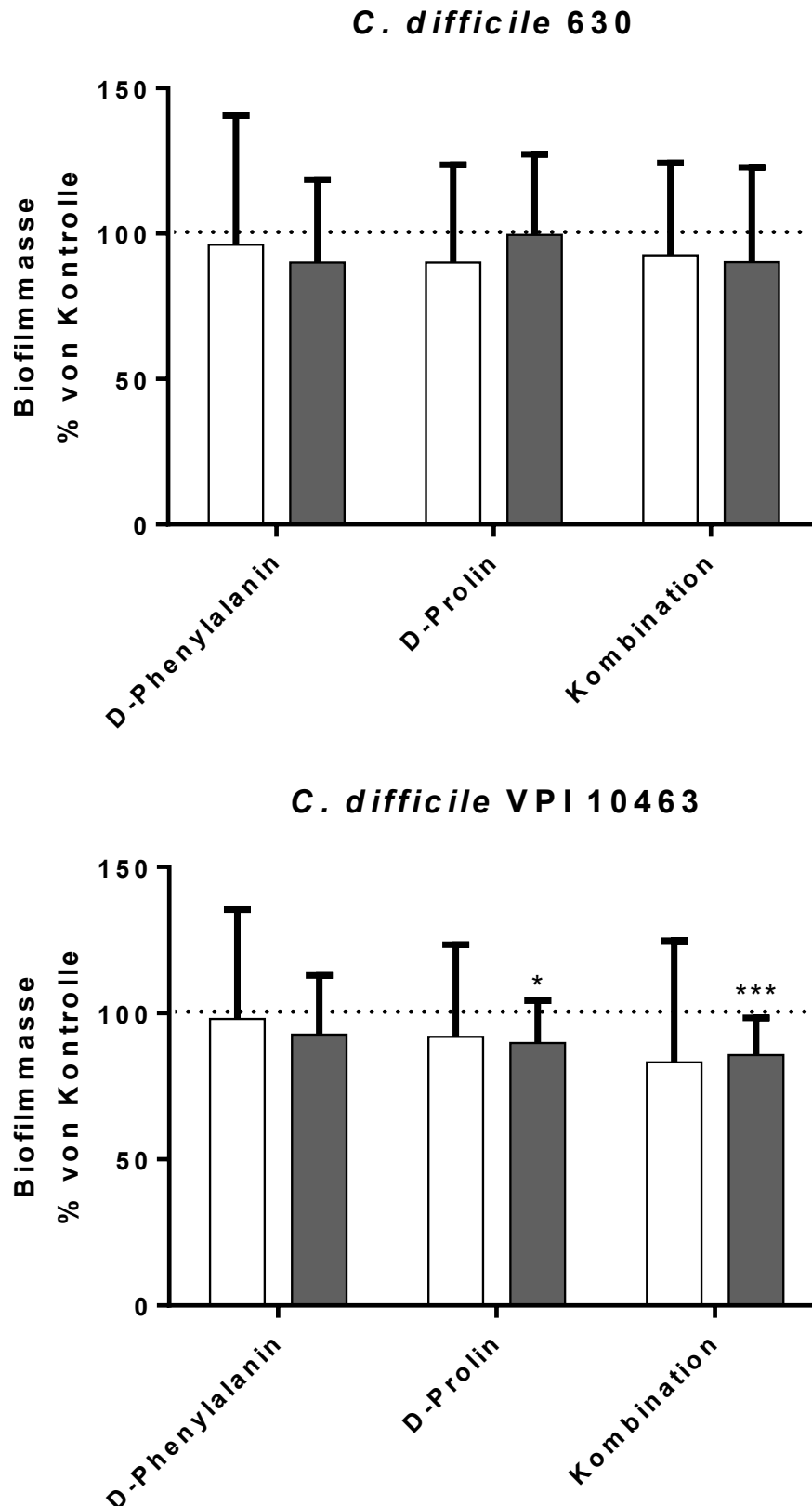


Abb. 20: Quantifizierung der Biofilmmasse von *C. difficile* nach Zugabe von D-Aminosäuren. Die Kultivierung der Biofilme erfolgte für 24 h (weiß) bzw. 72 h (grau) unter anaeroben Bedingungen in BHIS. 500 μ M D-Aminosäuren wurden bei täglichem Medienwechsel hinzugegeben. Die Quantifizierung der Biofilmmasse erfolgte photometrisch bei 540 nm nach Kristallviolettffärbung. Prozentuale Darstellung bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (gepunktete Linie). n = 4 * p < 0,05, ** p < 0,01; Mann-Whitney-U

3.4 Der Effekt von Tegumentproteinen des Saugwurmes *Schistosoma mansoni* auf die Biofilmbildung von *C. difficile*

Schistosomale Tegumentproteine verhelfen dem Parasiten im menschlichen Körper zu leben ohne dass er vom Immunsystem erkannt und bekämpft wird. Das Tegument weist also Eigenschaften auf, welche für Implantatoberflächen ideal wären, sodass Entzündungs- und Abstoßungsreaktionen verringert werden würden. Im Rahmen des Projektes Card-*ii*-Omics war ein Ziel, antiinfektive Tegumentproteine zu identifizieren und zu charakterisieren. Es wurden drei Proteine ausgewählt (Sm 22.6, SmEno, SmNPP-5) um diese rekombinant herzustellen und deren Einfluss auf die Biofilmbildung von *C. difficile* zu untersuchen.

3.4.1 Die rekombinante Herstellung schistosomaler Tegumentproteine

Das schistosomale Material wurde von der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt und die RNA, wie in 2.6.2 beschrieben, isoliert. Die Ergebnisse der RNA-Isolation sind in **Tab. 7** dargestellt und erreichten Konzentrationen von bis zu 196,63 ng/μl. Die Reinheit der isolierten RNA wurde photometrisch bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm bestimmt (**Tab. 7**). Für die Amplifikation der Zielgene mittels PCR musste die isolierte RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden (siehe 2.6.3). Die erzielten Konzentrationen und Reinheiten sind in **Tab. 8** dargestellt. Auf der Grundlage der cDNA konnten die Zielgene mittels PCR amplifiziert und im Agarosegel nachgewiesen werden. Die **Abb. 21** zeigt die Banden der amplifizierten Gene entsprechend der errechneten Gengrößen in den Agarosegelen. Für das Gen *Sm22.6* konnte eine Bande in Höhe von 597 bp (A), für das Gen *SmEno* in Höhe von 1329 bp (B) und für das Gen *SmNPP-5* in Höhe von 1401 bp (C) nachgewiesen werden.

Tab. 7: Konzentration und Reinheit der isolierten RNA

Probennummer	Konzentration [ng/μl]	Reinheit (260 nm / 280 nm)
1	143,39	2,18
2	133,05	2,17
3	196,63	2,16
4	73,56	2,16

Tab. 8: Konzentration und Reinheit der synthetisierten cDNA

Probennummer	Konzentration [ng/μl]	Reinheit (260 nm / 280 nm)
1.1	1190,82	1,84
1.2	1200,18	1,84
2.1	1139,15	1,84
2.2	1123,61	1,84
3.1	1143,97	1,84
3.2	1168,36	1,84
4.1	1206,31	1,84
4.2	1171,49	1,84

Die Banden wurden im Anschluss aus den Gelen ausgeschnitten, aufgereinigt (2.6.6.2) und in einer One-Tube-Reaktion in das Plasmid pENTRY-IBA 51 ligiert (2.7.1). Die erzeugten Plasmide konnten im Anschluss in kompetente *E. coli* transformiert werden (2.7.4). Nach Selektion durch ein Blau-Weiß-Screening wurden die Plasmide wieder isoliert und zur Überprüfung sequenziert (Firma LGC Genomics GmbH, Berlin). Plasmide, welche das Zielgen enthielten wurden im nächsten Schritt genutzt, um das Zielgen über eine weitere One-Tube-Reaktion in das Plasmid pYSG-IBA 143 zu ligieren (2.7.2). In der **Abb. 22** ist das Agarosegel nach Restriktion des Plasmids pYSG-IBA143::*Sm22.6* mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI dargestellt. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme liegen vor und hinter der Multiple Cloning Site. Da innerhalb der Sequenz von *Sm22.6* eine weitere Schnittstelle von HindIII liegt, werden insgesamt

3 Fragmente erwartet. Zum einen das linearisierte Plasmid (errechnete Größe 8006 bp) sowie zwei Fragmente in Höhe von 302 bp bzw. 305 bp. Diese beiden Fragmente sind in einem Agarosegel nicht voneinander zu unterscheiden und laufen auf gleicher Höhe, daher sind in dieser Abbildung nur zwei Signale in der richtigen Größenordnung erkennbar. Da auch die Sequenzierung zu einem übereinstimmenden Ergebnis kam, wurde das Plasmid im Folgenden in *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C transformiert. Die Überprüfung der Transformation erfolgte zum Einen durch das Ausplattieren des Transformationsansatzes auf Selektionsmedium (2.4.3), zum Anderen mittels einer Kolonie-PCR (2.6.4.3). Die Ergebnisse dieser PCR sind in **Abb. 23** dargestellt. Die PCR mit den genspezifischen Primern für das Gen *Sm 22.6* erzielte DNA-Fragmente in der erwarteten Größe von 597 bp. Im weiteren Verlauf konnte daher mit der Expression des Proteins rSm22.6 begonnen werden.

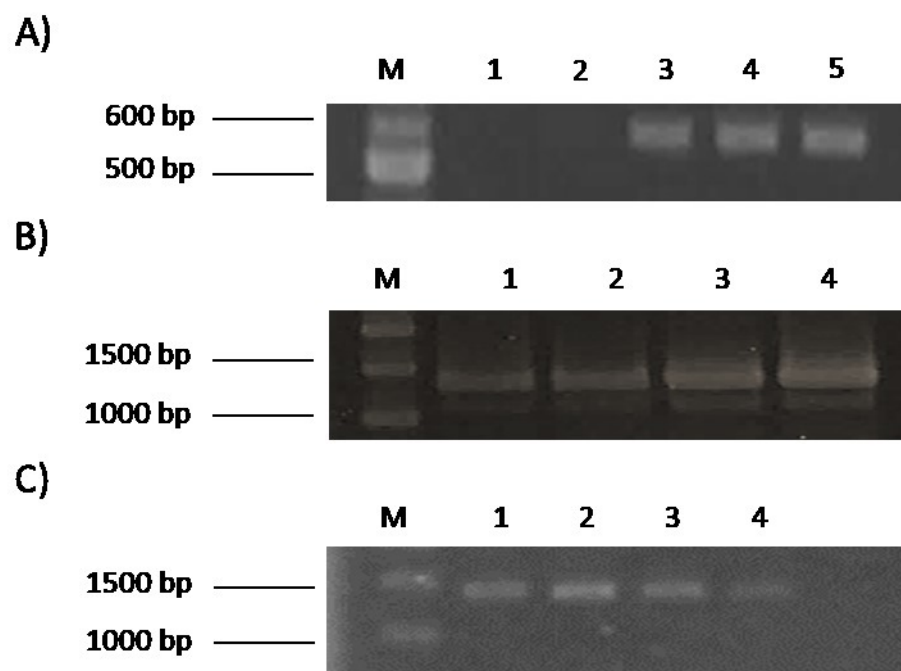


Abb. 21: Agarosegelelektrophorese nach Amplifikation der Zielgene.. A) Zielgen: *Sm22.6*. 1,5 % Agarosegel in TAE nach Färbung im Ethidiumbromidbad. Erwartete Fragmentgröße 597 bp. Spuren: M: 100 bp Marker, 1: leere Kontrolle, 2: Sample 1.1, 3: Sample 1.2, 4: Sample 1.3, 5: Sample 1.-5. B) Zielgen: *SmEno*. 0,8 % Agarosegel in TAE nach Färbung im Ethidiumbromidbad. Erwartete Fragmentgröße 1329 bp. Spuren: M: 1 kb Marker, 1: Sample 2.1 ohne GC Enhancer, 2: Sample 2.1 ohne GC Enhancer, 3: Sample 2.1 mit GC Enhancer, 4: Sample 2.1 mit GC Enhancer. C) Zielgen: *SmNPP-5*. 0,8 % Agarosegel in TAE nach Gradienten-PCR. Erwartete Fragmentgröße: 1401 bp. Spuren: M: 1 kbp Marker. Die Amplifikation fand unter unterschiedlichen Temperaturen statt. 1: 60,4 °C; 2: 61,2 °C; 3: 62,4 °C; 4: 63,8 °C.

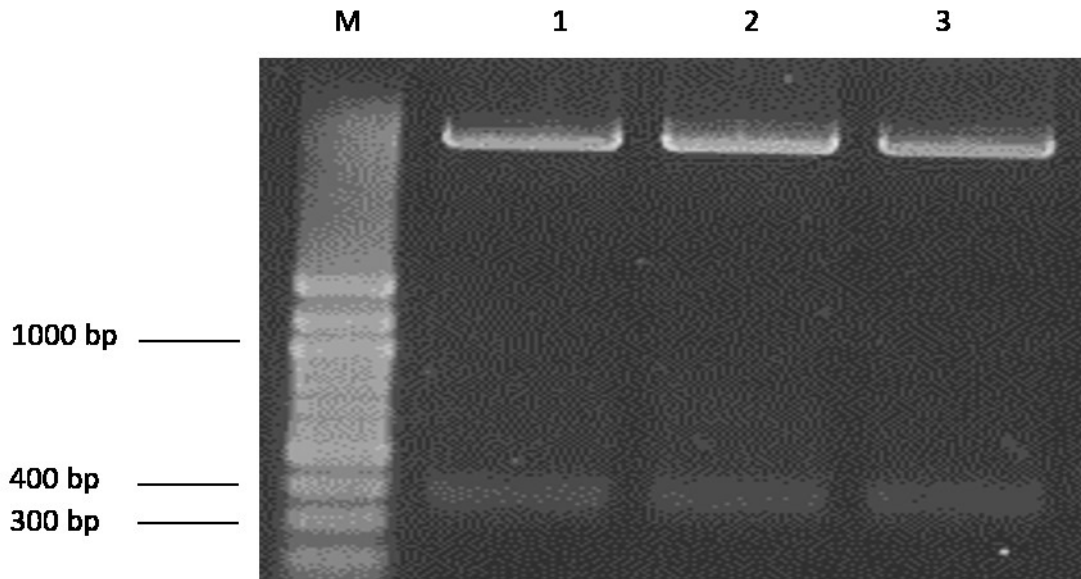


Abb. 22: Gelelektrophorese nach Restriktion des Vektors pYSG-IBA143::Sm22.6. Die Restriktion erfolgte mittels HindIII und XbaI. Die errechneten Größen der erwarteten Fragmente lagen bei 302 bp, 305 bp und 8006 bp. 1,5 %iges Agarosegel nach Färbung im Ethididumbromidbad. M: Marker (100 bp ladder), 1 bis 3: Plasmid pYSG-IBA143::Sm22.6.

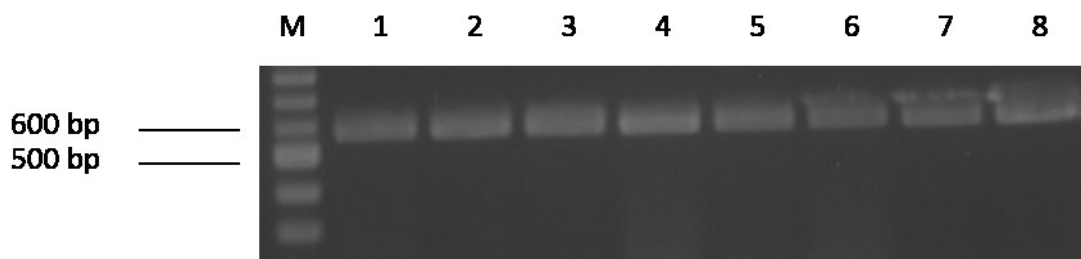


Abb. 23: Agarosegelelektrophorese nach Kolonie PCR. *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C pYSG-IBA143::Sm 22.6. 1,5 % Agarosegel in TAE. Erwartete Fragmentgröße 597 bp. Spuren: M: 100 bp Marker, 1-8: Kolonie 1-8

Die Insertion der Zielgene *SmEno* und *SmNPP-5* erfolgte nur durch Blau-Weiß-Screening und Sequenzierung. Bei 100 %iger Übereinstimmung der Sequenzierungsergebnisse wurden die Plasmide pENTRY-IBA143::*SmEno* und pENTRY-IBA143::*SmNPP-5* für die Transformation in *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C verwendet. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte über einen auxotrophen Selektionsmarker. Ohne die Aufnahme des entsprechenden Plasmids ist die gewählte Hefe nicht in der Lage, auf oder in Medien zu wachsen, welche kein Uracil bzw. Leucin enthalten. Die Uracildefizienz des Stammes wird für die Selektion der Transformation, die Leucindefizienz bei der Proteinexpression genutzt. Da die transformierten Zellen auf Festmedien ohne Uracil gewachsen sind, wurde davon

ausgegangen, dass die Transformation erfolgreich war, sodass im nachfolgenden Schritt ebenfalls mit der Proteinexpression von rSmEno und rSmNPP-5 begonnen wurde.

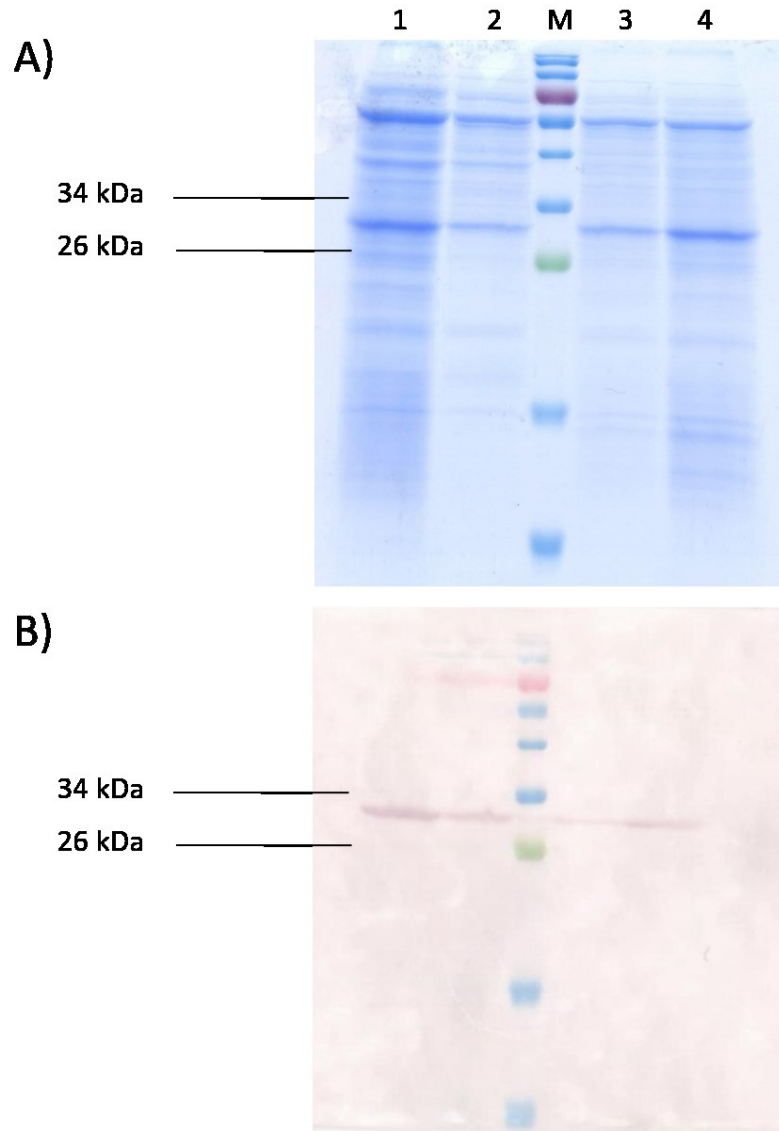


Abb. 24: SDS-PAGE und korrespondierender Westernblot von rSm22.6. Lane 1: uninduziert, Wachstum für 24 h bei 30°C, 2: Induziert bei OD 1, Wachstum üN bei 20°C, 3: Induziert bei OD 1, Wachstum üN bei 25 °C, 4: Induziert bei OD 1, Wachstum üN bei 30 °C. 16 % iges SDS-Gel. Induktion mit 0.5 M Kupfersulfat.

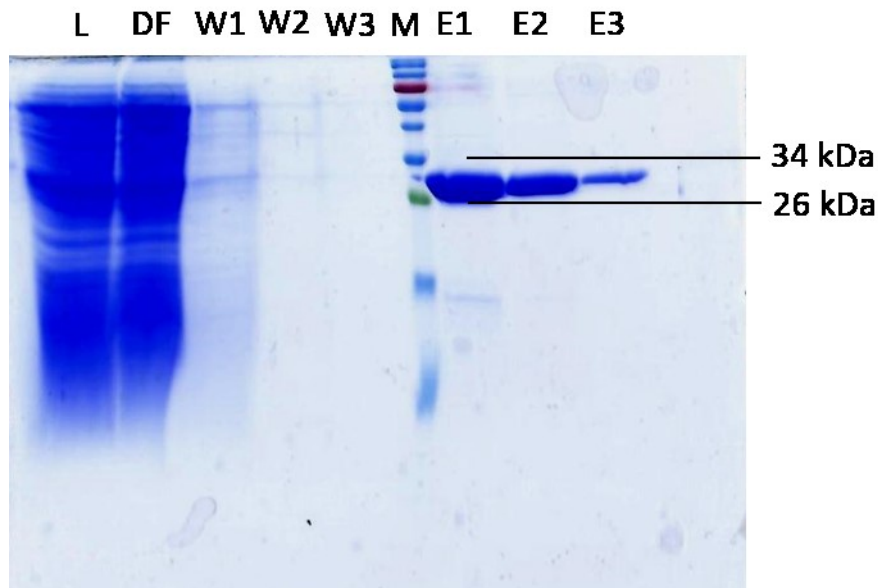


Abb. 25: SDS-PAGE nach Affinitätschromatografie von rSm22.6. L: Lysat, DF: Durchfluss, W1-W3: Waschungen, E1-E3: Elutionen, M: Marker. 16 %iges SDS-Gel nach Färbung mit Coomassie.

Nachdem das Expressionsplasmid erfolgreich in *S. cerevisiae* transformiert wurde (0), erfolgte der Nachweis der Proteine mittels Westernblot (2.8.7) und Antikörperdetektion (2.8.8). Die Proteine SmEno und SmNPP-5 konnten nicht detektiert werden. Die Ergebnisse der SDS-PAGE sowie des Western Blots für das Protein rSm22.6 sind in **Abb. 24** dargestellt. Zunächst sollten die optimalen Induktions- und Inkubationsbedingungen für die Proteinexpression ermittelt werden. In Spur 1 ist das Ergebnis nach 24 h Zellwachstum ohne Induktion bei 30 °C zu sehen. In den Spuren 2 bis 4 sind die Ergebnisse nach Induktion der Zellen mit 0.5 M Kupfersulfat bei einer OD von 1 und der weiteren Inkubation über Nacht zu sehen. Spur 2 zeigt die Inkubation nach der Induktion bei 20 °C, Spur 3 bei 25 °C und Spur 4 bei 30 °C.

In allen Spuren ist eine Bande in der Höhe von 28 kDa ersichtlich, welche der errechneten Größe des Proteins inklusive der C- und N-terminalen Tags entspricht. Die Abbildung zeigt weiterhin, dass die Induktion der Zellen mit Kupfersulfat zu keiner erhöhten Expression des Proteins führt (Vgl. Spur 1 vs. Spur 4). Dies liegt vermutlich daran, dass im Kultivierungsmedium der Zellen von Herstellerseite aus bereits Kupfersulfat vorhanden ist. Der Promotor ist also dauerhaft aktiv und für eine Induktion nicht mehr so empfänglich. Für die weiteren Versuche wurde demnach auf die Induktion der Zellen verzichtet. Mittels eines Anti-His-Antikörpers, konnte im Westernblot verifiziert werden, dass es sich bei den benannten Banden um rSm22.6 handelt.

Im nächsten Schritt wurde das Protein mittels Affinitätschromatografie aufgereinigt (2.8.3). Die einzelnen Fraktionen sind im SDS-Gel (**Abb. 25**) dargestellt. Die Elution des Proteins war erfolgreich, wie es in den Banden E1 bis E3 bei einer Höhe von 28 kDa zu sehen ist. Dabei nimmt die Menge an eluiertem Protein nach jedem Elutionsschritt ab. Im ersten Elutionsschritt konnte eine Konzentration von 4238 $\mu\text{g/ml}$ erreicht werden. In den Elutionen 2 und 3 lagen die Konzentrationen bei 2168 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 1930 $\mu\text{g/ml}$.

Die eluierten Fraktionen wurden aufgefangen und für ein weiteres SDS-Gel und zur Verifizierung für einen Westernblot verwendet. In diesem Fall wurde ein definiertes Volumen von 5 bzw. 10 μl des Proteins auf das Gel aufgetragen (**Abb. 26**) und rSm22.6 nachgewiesen werden.

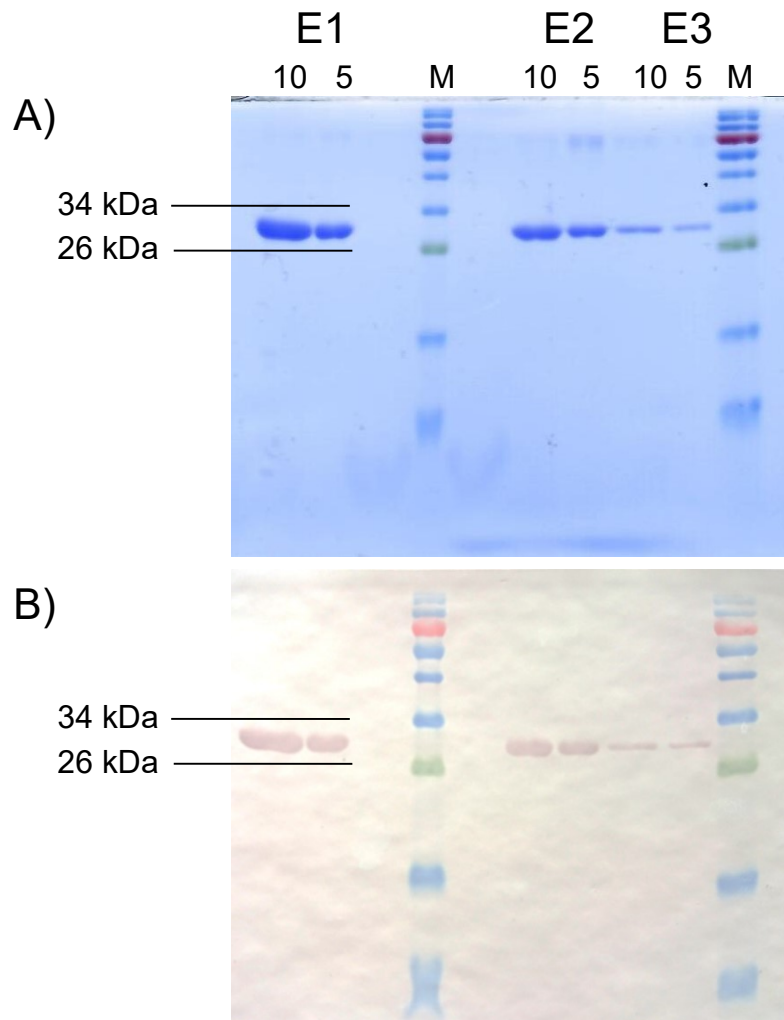


Abb. 26: SDS-PAGE und korrespondierender Westernblot der Elutionsfraktionen von rSm22.6. E1: Elutionsfraktion 1, E2: Elutionsfraktion 2, E3: Elutionsfraktion 3. 10 bzw. 5: Auftragung von 10 μl bzw. 5 μl . 16 %iges SDS-Gel nach Färbung mit Coomassie.

3.5 Die Effekte von rSm22.6 auf die Biofilmbildung von *C. difficile*

In diesem Abschnitt werden die Untersuchungen des Effekts von rSm22.6 auf die Biofilmbildung von *C. difficile* beschrieben und sind in **Abb. 27** dargestellt.

Es wurden Konzentration von 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml des Proteins eingesetzt und diese sowohl beim Animpfen als auch beim täglichen Medienwechsel hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 24 h (weiße Balken) oder 72 h (graue Balken). Die Ergebnisse sind als relative Werte zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

Die Biofilmmasse von *C. difficile* 630 wird durch die Zugabe des Proteins nicht signifikant beeinflusst. Nach 24 h konnten Werte von 106,20 % (1µg/ml), 117,14 % (10 µg/ml) und 98,60 % (100 µg/ml) detektiert werden. Nach 72 h Inkubation ist die Biofilmmasse tendenziell höher als nach 24 h und nimmt mit steigender Proteinkonzentration tendenziell zu. Die relativen Biofilmmassen von 121,86 % (1 µg/ml), 125,19 % (10 µg/ml) und 132,25 % (100 µg/ml) wurden erfasst.

Die Biofilmmasse des Isolates VPI 10463 wird durch die Zugabe des Proteins ebenfalls nicht signifikant beeinflusst. Nach 24 h Inkubation zeigt sich tendenziell eine Zunahme der Biofilmmasse bei steigender Proteinkonzentration (1 µg/ml: 104,40 %; 10 µg/ml: 107,17 %; 100 µg/ml: 120,36 %). Nach 72 h wurde bei 1 µg/ml eine relative Biofilmmasse von 112,68 %, bei 10 µg/ml von 99,57 % und bei 100 µg/ml von 112,71 % gemessen.

Das rekombinant hergestellte schistosomale Tegumentprotein rSm22.6 zeigte in dem gewählten *in vitro* Kultivierungssystem bei verschiedenen Konzentrationen keinen Effekt auf die Biofilmmasse klinischer *C. difficile* Isolate.

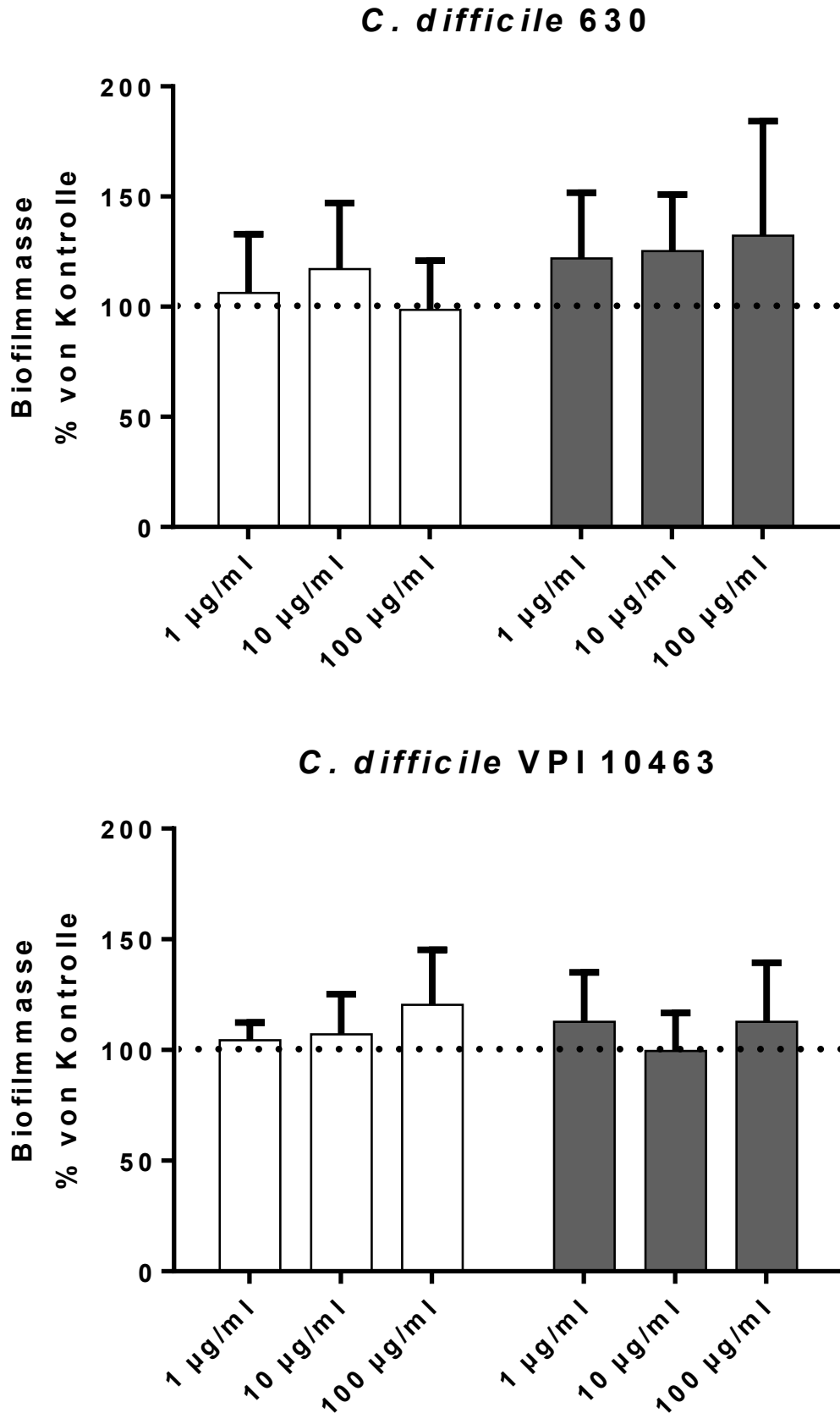


Abb. 27: Einfluss von rSm22.6 kDa auf die Biofilmbildung von *C. difficile*. Die Biofilme wurden für 24 h (weiß) bzw. 72 h (grau) unter anaeroben Bedingungen in BHIS kultiviert. Beim täglichen Medienwechsel wurde die entsprechende Konzentration an Protein in das Medium gegeben. Die Quantifizierung der Biofilmmasse erfolgte photometrisch bei 540 nm nach Kristallviolettffärbung. Prozentuale Darstellung bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (gepunktete Linie). n=3.

4 Diskussion und Ausblick

4.1 Anaerobier als Infektionserreger in Biofilmen auf Implantaten

Biofilme können zu schwer behandelbaren Infektionen führen, insbesondere, wenn sie durch pathogene Mikroorganismen gebildet werden. Wenn sich die Biofilme auf Implantatoberflächen bilden, können sie auch zum Versagen des Implantates und damit zu schweren gesundheitlichen Problemen führen. Durch die älter werdende Bevölkerung und der damit zunehmenden Anzahl an Implantaten wird deutlich, dass biofilmassoziierte Infektionen immer weiter an Bedeutung gewinnen.

Dass auch anaerobe Mikroorganismen zum Infektionsgeschehen auf Implantatoberflächen beitragen, konnte in mehreren Untersuchungen festgestellt werden. Bei der Untersuchung von 80 Patienten nach orthopädischer Implantation wurden in 61,2 % der Fälle Infektionen festgestellt, welche allein durch Anaerobier ausgelöst wurden. Dabei waren *Cutibacterium acnes*, *Finegoldia magna* und *Peptostreptococcus anaerobius* am häufigsten vertreten [119].

C. acnes und *F. magna*, sowie weitere Anaerobier, konnten auch auf Brustimplantaten identifiziert werden [120]. Und auch auf dentalen Implantaten wurden 13 verschiedene Anaerobier nachgewiesen [121].

Guaglianone *et al.* untersuchten 28 explantierte Gallengang Stents hinsichtlich der besiedelnden Mikroorganismen. 57 % der identifizierten Spezies waren Anaerobier, darunter auch *C. difficile* [115]. Eine Infektion mit *C. difficile* führt zu Durchfallerkrankungen und kann lebensbedrohlich werden [83]. Ältere, multimorbide Personen haben ein erhöhtes Risiko für eine *C. difficile*-Infektion. Ein verlängerter Krankenhausaufenthalt, wie es nach einer Implantation nötig sein kann, erhöht das Risiko zusätzlich.

Ein entscheidender Faktor für das Überleben des Patienten ist auch die Virulenz. Es gibt verschiedene Untersuchungen, die sich ebenfalls mit der Virulenz und der Biofilmbildung beschäftigten.

Für *E. faecalis*, ein Bakterium, welches zu Unfruchtbarkeit bei Männern führen kann, konnte gezeigt werden, dass eine höhere Biofilmbildung mit einer geringeren Fruchtbarkeit assoziiert ist [122].

Gajdács *et al.* untersuchten 302 *P. aeruginosa* Isolate hinsichtlich ihrer Antibiotikaresistenz, der Expression von Virulenzfaktoren sowie der Biofilmbildung

und konnten keine Korrelation zwischen der Virulenz und der Biofilmbildung feststellen [123].

Für *C. difficile* konnte bisher noch kein Zusammenhang zwischen der Virulenz und der Fähigkeit Biofilme zu bilden, festgestellt werden [114].

Entsprechend der Daten in **Tab. 2** führte das Isolat VPI 10463 zu den stärksten Epithelzellschäden und Gewichtsverlusten in einem C57BL/6 Mausmodell und kann somit als am meisten virulent eingestuft werden. Das Isolat K 14 führte zu geringen schädlichen Auswirkungen im Mausmodell und kann somit als am geringsten virulent eingestuft werden. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass es sich mit der gebildeten Biofilmmasse exakt anders herum verhält. Mit einer OD_{540 nm} von 2,3 bzw. 1,3 bildete das Isolat VPI 10463 sowohl nach 24 h als auch nach 72 h mit die geringste Biofilmmasse während beim Isolat K 14 mit einer OD_{540 nm} von 3,4 bzw. 2,5 die meiste Biofilmmasse quantifiziert werden konnte (**Abb. 9**).

Ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen der Virulenz und der gebildeten Biofilmmasse der in dieser Arbeit verwendeten Isolate gibt, kann nur durch die Quantifizierung der Biofilmmasse nicht beurteilt werden. Um eine Aussage treffen zu können, müssten weitere Untersuchungen wie die Genexpression virulenter Gene im Biofilm-State, die Toxinproduktion und die Antibiotikaresistenz untersucht werden. Dennoch wurde in den weiteren Arbeiten dazu übergegangen, das vermeintlich virulenteste Isolat (VPI 10463) zu verwenden. Weiterhin lag der Fokus auch auf dem Isolat 630.

4.2 Das Biofilmverhalten klinischer Isolate und der Einfluss der Kultivierungsbedingungen

In dieser Arbeit wurden vier verschiedenen klinische Isolate von *C. difficile* hinsichtlich ihres Biofilmverhaltens untersucht. Dafür wurden quantitative (Bestimmung der Biofilmmasse und des Wachstums) sowie qualitative (Fluoreszenzmikroskopie nach Lebend/Tot-Färbung) Messungen vorgenommen und Unterschiede zwischen den Isolaten festgestellt (**Abb. 9** und **Abb. 10**). Beim Isolat EK 14 konnte die meiste Biofilmmasse beim geringsten Wachstum quantifiziert werden. Die Isolate 630 und VPI zeigten die geringste Biofilmmasse bei einem mittleren Wachstum. Dass sich Isolate von *C. difficile* hinsichtlich der Bildung ihrer Biofilmmasse unterscheiden, zeigten auch Pantaléon *et al.* [114]. Sie

quantifizierten die Biofilmmasse von 37 Isolaten nach 72 h Inkubation und teilten diese in schwache ($OD_{570} < 1,1$), moderate ($1,1 < OD_{570} < 3,5$) und starke ($OD_{570} > 3,5$) Biofilmbildner ein. Nach dieser Definition gehören die in dieser Arbeit untersuchten klinischen Isolate zu den schwachen (*C. difficile* 630) und moderaten (*C. difficile* BI 175, *C. difficile* EK 14 und *C. difficile* VPI 10463) Biofilmbildnern.

Guaglianone *et al.* stellten fest, dass unter den anaeroben besiedelnden Mikroorganismen auf explantierten Gallengang Stents auch *C. difficile* vorhanden war. Sie untersuchten die Fähigkeit der Anaerobier zur Biofilmbildung und definierten starke Biofilmbildner ($OD_{570} > 0,240$), schwache Biofilmbildner ($0,120 < OD_{570} < 240$) und keine Biofilmbildner ($OD_{570} < 0,120$). *C. difficile* wurde als schwacher Biofilmbildner eingeteilt [115]. Die in dieser Arbeit verwendeten Isolate zeigten alle Werte über 0,240, sodass sie nach Definition von Guaglianone *et al.* (im Vergleich mit anderen Anaerobiern auf explantierten Gallengang Stents) als starke Biofilmbildner gelten. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass *C. difficile* in dieser Arbeit über 24 h in BHIS kultiviert wurde, während Guaglianone *et al.* die Kultivierung nur für 8 h bzw. 18 h in TSB + 1 % Glucose durchführte.

Hunt *et al.* stellten fest, dass sich der Biofilm von *P. aeruginosa* nach dem Beenden der kontinuierlichen Nährstoffzufuhr innerhalb von 3 Tagen von der Oberfläche ablöst, mit einem Zellverlust von 90 % [124]. Die Ablösung des Biofilms nach Nährstoffmangel konnte in dieser Arbeit auch für die *C. difficile* Isolate 630 und VPI 10463 festgestellt werden. Die gemessene Biofilmmasse verminderte sich signifikant, konnte jedoch durch die tägliche Zugabe frischen Mediums wieder ausgeglichen werden (**Abb. 11** und **Abb. 12**). Anders verhält es sich mit der Messung der abgelösten Bakterien im Überstand. Die Untersuchungen von Hunt *et al.* zeigten, dass sich die abgelösten Bakterien im Überstand wiederfinden ließen. Die Messungen der $OD_{600\text{ nm}}$ in dieser Arbeit erfolgte mit dem ganzen Wellinhalt, nicht nur mit dem Überstand. Demnach müsste die $OD_{600\text{ nm}}$ gleichbleiben, fällt jedoch nach den 72 h ebenfalls wie die Biofilmmasse ab. Dieser Widerspruch lässt sich durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau erklären. In der Arbeit von Hunt *et al.* wurde ein Drip-Flow Biofilmreaktor verwendet, die Biofilme für 4 Tage kultiviert, der Biofilm dann in frischem Medium aufgenommen und 3 Tage „hungern“ gelassen. In dieser Arbeit wurden Batchkulturen in 24-Well-Platten verwendet, die Biofilme für 3 Tage mit einem täglichen Mediumwechsel inkubiert. Die aus dem Biofilm heraus gelösten Bakterien wurden durch den Medienwechsel entfernt. Zusätzlich muss

beachtet werden, dass in dieser Arbeit das Verhalten von *C. difficile* und nicht von *P. aeruginosa* untersucht wurde. Eine weitere mögliche Erklärung für den Rückgang der Zellen liegt in der Fähigkeit der Bakterien zur Autolyse. Die Autolyse ist eine Selbstverdauung der Zellwand. An dieser sind vorrangig Peptidoglykan-Hydrolasen beteiligt, welche die kovalenten Bindungen des Zellwand-Peptidoglykans spalten [125]. El Meouche *et al.* konnten zeigen, dass in *C. difficile* das Zellwandprotein Cwp19 eine Hauptrolle bei der Autolyse zu Beginn der stationären Wachstumsphase spielt [126].

Die Reduzierung der Biofilmmasse bei der Inkubation ohne Medienwechsel könnte auch durch selbstproduzierte Signalfaktoren ausgelöst werden. Um diese Theorie zu untersuchen, müsste der zellfreie Überstand der Biofilmkulturen zu frischen *C. difficile* Biofilmen gegeben und die Biofilmmasse anschließend quantifiziert werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten Isolate von *C. difficile* alle in der Lage sind, Biofilme auf abiotischen Oberflächen zu bilden, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Eine Erneuerung des Nährmediums über den Kultivierungszeitraum kann zur Erhöhung der Biofilmmasse führen.

4.3 Cis-2-Decensäure hemmt das Wachstum und die Biofilmbildung von *C. difficile*

Die Lebensweise im Biofilm bietet für Bakterien viele Vorteile, wie zum Beispiel den Schutz vor Austrocknung oder antimikrobiellen Substanzen [127]. Wenn die Zelldichte im Biofilm ihr Maximum überschritten hat oder die Umgebungsbedingungen ungünstig werden (z.B. durch Nährstoffmangel oder Akkumulation toxischer Stoffwechselendprodukte), werden Signalmoleküle ausgeschüttet, die zum Ablösen einzelner Zellen aus dem Biofilm führen. Ein in den letzten Jahren identifiziertes Signalmolekül dieser Art ist die *cis*-2-Decensäure (C2DA), welche durch *P. aeruginosa* produziert wird und auch auf andere Bakterienspezies wirken kann [48].

Der Einfluss von C2DA als mögliche Beschichtung für Implantatoberflächen zur Reduzierung der Biofilmbildung am Beispiel von *C. difficile* wurde in dieser Arbeit untersucht. Dafür wurde zunächst ein Verfahren zur Beschichtung von Multiwell-Platten mit C2DA getestet. Die in einer Konzentration von 200 µg/ml in 70 % oder

96 % gelöste C2DA konnte die Biofilmmasse weder bei *C. difficile* 630 noch bei *C. difficile* VPI 10463 signifikant reduzieren. Dabei zeigte auch die Beschichtungsweise (abnehmen der Lösung (I) vs. verdampfen des Lösungsmittels (II)) keinen Einfluss auf die Biofilmmasse der getesteten Stämme (**Abb. 14**).

Eine mögliche Erklärung ist, dass die C2DA nicht am Material der Multiwell-Platten haften bleibt, die Oberfläche mit der gewählten Methode also nicht beschichtet werden kann. Weiterhin ist es möglich, dass die verwendete Konzentration nicht ausreichend war, um einen Effekt auf die Biofilmbildung zu erzielen. Ob Ethanol als Lösungsmittel ungeeignet war, wurde nicht weiter untersucht, da es in der Literatur bereits als gängiges Lösungsmittel eingesetzt wird. Dennoch wurde in den weiteren Versuchen DMSO als Lösungsmittel verwendet, wie es vom Hersteller empfohlen wurde.

Da die Beschichtung der Oberflächen keinen Effekt auf die Biofilmmasse zeigte, wurde die C2DA in den weiteren Experimenten zum Kultivierungsmedium hinzugegeben. In Anlehnung an die Experimente von Jennings *et al.* wurde mit Konzentrationen ab 125 µg/ml gearbeitet. Diese Konzentration führte dort zu einer Verringerung der Biofilmmasse von *P. aeruginosa*. Ab einer Konzentration von 500 µg/ml wurde das Wachstum inhibiert [128]. Bei den Experimenten in dieser Arbeit zeigte eine Konzentration von 125 µg/ml noch keinen signifikant reduzierenden Effekt auf die Biofilmbildung. Bei einer Konzentration von 150 µg/ml konnten nach 72 h signifikante Reduzierungen der Biofilmmasse detektiert werden. Bei einer Konzentration von 250 µg/ml war die Biofilmmasse fast vollständig zurückgegangen (**Abb. 15** und **Abb. 16**). Es mussten also höhere Konzentration eingesetzt werden, als in der Literatur für andere Organismen beschrieben ist.

In **Tab. 5** sind die ermittelten KBE sowie die OD_{600 nm} von *C. difficile* 630 nach Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von C2DA dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die KBE und die OD_{600 nm} nach 24 h Inkubation mit höheren C2DA Konzentrationen abnimmt. Dieser Effekt verringert sich nach einer Inkubation von 72 h.

Im Gegensatz zu den Versuchen, bei denen die Oberflächen der Multiwell-Platten beschichtet wurden, konnten bei der Zugabe der C2DA ab einer Konzentration von 150 µg/ml zum Kulturmedium signifikante Reduzierungen der Biofilmmasse festgestellt werden. Bei einer Inkubationszeit von 72 h und einer Konzentration von

125 µg/ml bzw. 150 µg/ml wird die Anzahl der KBE nicht beeinflusst. Eine Mögliche Erklärung für die höhere Zahl an KBE nach längerer Inkubationszeit mit C2DA ist, dass sogenannte Persisterzellen wieder in einen metabolisch aktiven Zustand gebracht wurden und so detektiert werden konnten. Dass dieser Effekt durch C2DA ausgelöst werden kann, stellten Marques *et al.* bei ihren Untersuchungen an *P. aeruginosa* fest. [129]. In Kombination mit Antibiotika kann die Behandlung von Biofilmen mit C2DA zu einem effektiveren Ergebnis führen, da die im Biofilm „schlafenden“ Zellen wieder metabolisch aktiv werden und auf das Zellwachstum wirkende Antibiotika wieder wirken können.

Dieser Wirkmechanismus von C2DA führt auch dazu, dass die Kombination mit Antibiotika u.a. bei *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* und *S. aureus* zu einer höheren Effektivität gegenüber Biofilmen führt. [45, 130, 131].

Additive oder synergistische Effekte von C2DA mit Antibiotika werden auch dadurch erzielt, dass die Permeabilität der Zellmembran erhöht wird. Bei der Kombination von C2DA mit Antibiotika, welche auf die Zellwand wirken (Vancomycin, Daptomycin), werden additive Effekte erzielt, während synergistische Effekte bei der Kombination von C2DA mit intrazellulär wirkenden Antibiotika auftreten (Tetracyclin, Ciprofloxacin) [132]. Ob dieser kombinatorische Effekt auch bei *C. difficile* messbar ist, müsste in weiteren Untersuchungen festgestellt werden.

Ein weiterer Effekt, der nach der Gabe von C2DA zu erkennen war, war die deutliche Verlängerung der Zellen, was in **Tab. 5** und **Tab. 6** dargestellt ist. Die größte Zunahme der Zelllänge konnte bei *C. difficile* 630 nach 24 h festgestellt werden, wobei sie um mehr als das Doppelte zunahm. Aber auch bei geringeren Konzentrationen sowie nach 72 h Inkubation konnte eine Zunahme festgestellt werden. Dies gilt ebenso für *C. difficile* VPI 10463. Eine Zunahme der Zelllänge kann eine Reaktion der Bakterien auf unvorteilhafte Umgebungsbedingungen sein. Everis *et al.* zeigten, dass pH Stress zu einer Zelllängenzunahme bei *C. tyrobutyricum* führt [133]. *C. perfringens* reagiert mit einer Zunahme der Zelllänge auf Reaktionsprodukte von *Lactobacillus rhamnosus* und *L. gasseri* [134]. Für *C. difficile* 630 wurde beschrieben, dass es bei veränderten Umweltreizen mit einer Zellverlängerung reagiert. Ternan *et al.* zeigten in diesem Zusammenhang, dass die Zelllänge von *C. difficile* 630 innerhalb von 6 h um ca. 70 % zunahm, wenn es in einer Mixtur aus Kulturmedium und einem künstlichen fäkalen Wasser kultiviert wird [135].

Welcher Mechanismus genau zur Erhöhung der Zelllänge führt, müsste in weiteren Untersuchungen z.B. durch Genexpressionsanalysen festgestellt werden.

Dass C2DA einen inhibierenden Effekt auf die Biofilmbildung von *C. difficile* hat, konnte in dieser Arbeit festgestellt werden. Im Vergleich zu anderen Arbeiten mussten dafür höhere Konzentrationen angewendet werden. Die hier durchgeführten Experimente geben einen ersten Eindruck, hinsichtlich der Wirksamkeit von C2DA auf die Biofilmbildung von *C. difficile*. Für genauere Informationen sollte in folgenden Arbeiten zunächst die minimale Hemmkonzentration ermittelt werden. Weiterhin wäre auch die Untersuchung des Effektes auf bereits bestehende Biofilme interessant. Zusätzlich sollten Experimente durchgeführt werden, in denen die Wirksamkeit von C2DA in Kombination mit Antibiotika untersucht wird. Um als Beschichtung für eine Implantatoberfläche eingesetzt werden zu können, müsste zuerst eine geeignete Beschichtungsmethode gewählt sowie die Freisetzungskinetik bestimmt werden. Weiterhin wären Untersuchungen der Zytotoxizität mit anwendungsrelevanten Zellkultursystemen notwendig.

4.4 D-Aminosäuren und ihr Einfluss auf Biofilme

D-Aminosäuren sind ein wichtiger Bestandteil des Peptidoglykans der bakteriellen Zellwand und tragen zur Stabilität dieser bei [136]. Durch den Einbau der D-Aminosäuren in die Stammpeptide der Peptidoglykanschicht ist diese vor dem Abbau durch Proteasen geschützt [52]. Es ist weiterhin bekannt, dass der Einbau alternativer D-Aminosäuren wie D-Asp oder D-Ser in die Stammpeptide zu einer gewissen Toleranz der Bakterien gegenüber antimikrobiellen Substanzen, wie z.B. Vancomycin führt [137, 138].

Eine der ersten Untersuchungen zur Wirksamkeit von D-Aminosäuren gegen Biofilme wurde von Kolodkin-Gal *et al.* veröffentlicht. Da sich die von *B. subtilis* gebildeten Biofilmstrukturen nach Inkubationszeiten von 3 bis 5 Tagen wieder auflösten, nahmen sie an, dass *B. subtilis* Faktoren produziert, die zur Auflösung von Biofilmen führen. Sie stellten fest, dass D-Aminosäuren im Überstand von stationäre Phasen Bakterien vorhanden waren [60]. Diese Beobachtung konnten auch Lam *et. al.* bei *B. subtilis* und *V. cholerae* feststellen [139].

Weitere Studien zeigten, dass D-Aminosäuren, unter anderem D-Phenylalanin, D-Tyrosin, D-Methionin und D-Prolin eine inhibierende Wirkung auf die Biofilmbildung von z.B. *B. subtilis* oder *S. aureus* ausüben oder dazu beitragen, bestehende Biofilme aufzulösen [60, 61, 140–143].

In dieser Arbeit wurden die D-Aminosäuren D-Phe, D-Met, D-Tyr und D-Pro ausgewählt und untersucht, ob diese einen Effekt auf die Biofilmbildung von *C. difficile* ausüben. Die Ergebnisse zeigten, dass die Biofilmmasse bei allen verwendeten D-Aminosäuren nach 72 h reduziert wurde (**Abb. 18**). Allerdings gilt dies nur für das Isolat 630. Beim Isolat VPI 10463 konnte nur bei D-Tyrosin eine Reduzierung der Biofilmmasse beobachtet werden. Im Gegensatz zu den oben benannten Studien wurden die D-Aminosäuren nicht ins Kulturmedium gegeben, sondern die Oberfläche der Multiwellplatten mit 500 µM der entsprechenden D-Aminosäure beschichtet [60, 61, 140–143]. Die Menge an adsorbierten D-Aminosäuren wurde nicht quantifiziert, wodurch keine Aussage darüber getroffen werden kann, welche Wirkkonzentration an die Biofilme gelangte. Bei den durchgeführten Experimenten mit einer höheren D-Aminosäure-Konzentration (1000 µM) wurde eine Reduzierung der Biofilmmasse nur bei D-Phe detektiert (**Abb. 19**). Ein konzentrationsabhängiger Effekt, wie es z.B. durch Kolodkin-Gal *et al.* [60] beschrieben wurde, konnte demnach nicht festgestellt werden. Da diese Experimente ohne einen täglichen Medienwechsel durchgeführt wurden, kann nicht beurteilt werden, ob die beobachtete Reduzierung der Biofilmmasse an den vorhandenen D-Aminosäuren oder an der inkubationsbedingten Stresssituation liegt.

D-Phe und D-Pro führten in dieser Arbeit zum größten Effekt in der Reduzierung der Biofilmmasse. Da beschrieben ist, dass eine Kombination von D-Aminosäuren eine synergistische Wirkung haben kann, wurde dies ebenfalls getestet [140, 142]. Für diese Experimente wurde von der Beschichtung der Oberflächen abgesehen und die D-Aminosäuren direkt ins Kulturmedium gegeben. Der synergistische Effekt konnte nicht nachgewiesen werden. Zwar führte die Kombination von D-Phenylalanin und D-Prolin zu einer Reduzierung der Biofilmmasse von *C. difficile* VPI 10463, allerdings ist dieser Effekt nicht größer als bei der einzelnen Gabe der D-Aminosäuren (**Abb. 20**). Für das Isolat 630 konnte keine Reduzierung der Biofilmmasse nach der Zugabe der D-Aminosäurekombination festgestellt werden (**Abb. 20**).

Dass es stammspezifische Unterschiede in der Wirksamkeit der D-Aminosäuren gibt, wie es auch in dieser Arbeit der Fall ist, konnten bereits Ramon-Perez *et al.* bei ihren Untersuchungen an Biofilmen von *S. epidermidis* feststellen. Dabei führte D-Met bei 83,3 % der untersuchten Stämme zu einer Reduzierung der Biofilmmasse, während dies bei D-Leu nur bei 22,6 % der Fall war [142].

Ob die verwendeten D-Aminosäuren einen auflösenden Effekt auf bereits bestehende Biofilme von *C. difficile* haben, wurde nicht untersucht. Aufgrund der geringen und inkonsistenten Ergebnisse ist eher von keiner Wirksamkeit auszugehen.

Insgesamt ist die Wirksamkeit der D-Aminosäuren auf die Biofilmbildung bei verschiedenen Bakterienspezies sehr kontrovers diskutiert und scheint abhängig von der einzelnen Studie bzw. dem experimentellen Vorgehen zu sein. Kolodkin-Gal *et al.* untersuchten die Wirkung von D-Leucin, D-Methionin, D-Tyrosin und D-Tryptophan auf die Biofilmbildung von *B. subtilis*. Die D-Aminosäuren waren sowohl in der Lage, die Biofilmbildung von *B. subtilis* zu verhindern, als auch bereits bestehende Biofilme aufzulösen. Sie erklärten dieses Verhalten durch die Inkorporation der D-Aminosäuren in die bakterielle Zellwand, wodurch die Interaktion zwischen dem Protein TapA und amyloiden Fasern TasA gestört ist. TasA bildet die strukturelle Hauptkomponente der Biofilme von *B. subtilis* [60]. Leimann *et al.* widerlegten diese These, da sich herausstellte, dass der verwendete Stamm eine Mutation im *dtd* Gen enthielt. Bei Komplementierung mit dem Wildtyp Dtd Enzym konnte der Effekt der D-Aminosäuren auf die Biofilmbildung nicht bestätigt werden [61].

Ähnliche Untersuchungen wurden auch an *S. aureus* SC01 durchgeführt. D-Tyr, D-Pro oder D-Phe bzw. eine Kombination dieser D-Aminosäuren führten zu einer Verminderung der Biofilmbildung. Bei der Verwendung höherer Konzentrationen konnten Hochbaum *et al.* auch die Auflösung bereits bestehender Biofilme von *S. aureus* nachweisen [140]. Sarkar und Pires widerlegten diese Ergebnisse jedoch. Sie führten ebenfalls Versuche mit *S. aureus* SC01 durch und konnten trotz höherer Konzentrationen keinen inhibierenden Effekt der D-Aminosäuren auf die Biofilmbildung feststellen [63].

Die Biofilmbildung von *C. difficile* konnte durch Verwendung von D-Aminosäuren teilweise reduziert werden. Um diese Ergebnisse besser einordnen zu können, müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Dabei sollte ein definiertes Kulturmedium verwendet werden und zunächst der Einfluss der verwendeten D-Aminosäuren auf das Wachstum ermittelt werden, sodass wachstums- und biofilminhibierende Effekte voneinander unterschieden werden können. Desweiteren sollten die gleichen Experimente mit den korrespondierenden L-Aminosäuren durchgeführt werden. Auch die Verwendung anderer D-Aminosäuren oder Kombinationen sollten in Betracht gezogen werden. Bei positiven Effekten auf die Hemmung der Biofilmbildung kann dann untersucht werden, ob adulte Biofilme durch die Zugabe von D-Aminosäuren ebenfalls beeinflusst werden.

4.5 Schistosomale Proteine als Oberflächenbeschichtung für Implantate

Schistosoma mansoni ist ein Blutegelparasit, der Bilharziose verursacht, eine Krankheit von weltweiter Bedeutung für die öffentliche Gesundheit. Die Parasiten sind in der Lage, längere Zeit im menschlichen Blutgefäßsystem zu überleben, ohne vom Immunsystem erkannt zu werden. Insbesondere das Tegument dieser Saugwürmer kann sie vor dem Immunsystem maskieren. Diese antithrombogenen und antientzündlichen Eigenschaften sind ideal für die Oberflächen intravaskulärer Implantate.

Daher war ein Ziel des Projektes Card-ii-Omics, geeignete Tegumentproteine von *S. mansoni* zu identifizieren, um diese rekombinant herzustellen und sie als Beschichtung von z.B. Herzklappenimplantaten zu verwenden. In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsmedizin Rostock wurden drei schistosomale Tegumentproteine ausgewählt, um u.a. deren Effekt auf die Biofilmbildung zu untersuchen. Zwei der ausgewählten Proteine, SmEno und SmNPP-5, weisen antikoagulatorische und antithrombotische Eigenschaften auf. Ob durch diese Proteine eine Immunantwort im Wirt des Parasiten ausgelöst wird, ist nicht bekannt.

SmEno ist eine tegumentale Enolase. Wie Enolasen im Allgemeinen auch, katalysiert dieses Enzym die Reaktion von D-2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat, den vorletzten Schritt der Glykolyse. Darüber hinaus ist

SmEno in der Lage, Plasminogen zu binden und zu aktivieren. Dadurch werden Fibrinfasern gespalten und Thromben aufgelöst. Figureido *et al.* zeigten außerdem, dass ein Knock-Out von *SmEno* zur Reduzierung der mRNA-, Proteinexpression und Enzymaktivität führt. Da trotzdem eine Plasminogenaktivierung detektiert werden konnte, müssen zusätzlich zu SmEno weitere Proteine in der Plasminogenaktivierung involviert sein [75].

SmNPP-5, ist eine Ekto-Phosphodiesterase, welche als Virulenzfaktor für *S. mansoni* beschrieben wurde [144]. Phosphodiesterasen katalysieren die Hydrolyse von cAMP oder cGMP zu AMP und GMP [145]. Es besitzt weiterhin eine ADPase-Aktivität und ist in der Lage, die Aggregation von Blutplättchen zu verhindern und somit als Anti-Koagulant zu wirken [76]. Zusätzlich stellten Nation *et al.* fest, dass sowohl natürliches als auch rekombinantes SmNPP-5 im Stande ist, das Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) zu spalten, wodurch die NAD-induzierte Apoptose von T-Zellen verhindert wird. Sie spekulieren, dass dadurch regulatorische T-Zellen länger zirkulieren, sodass Immunreaktionen auf die Parasiten unterdrückt werden [146].

Beide Proteine wären durch ihre antikoagulatorischen Eigenschaften vielversprechende Kandidaten für die Oberflächenbeschichtung für kardiovaskuläre Implantate. Ein wichtiger Aspekt ist, dass durch diese Eigenschaften Thromben und somit Gefäßverschlüsse verhindert werden können. Weiterhin ist es möglich, dass durch die verminderte Plättchenaggregation bzw. das Auflösen solcher, die Biofilmbildung auf Implantatoberflächen vermindert werden könnte. Plasmaproteine und Plättchenaggregationen sind mit der Biofilmbildung verschiedener Bakterienspezies assoziiert. *Streptococcus mutans*, ein Auslöser der infektiösen Endokarditis, kann über seine *neutrophil extracellular traps* (NETs) die Plättchenaggregation und Aktivierung der Koagulation auslösen. Dies führt zur Bildung von Biofilmen in Aggregation mit Blutplättchen [147]. Für das anaerobe Bakterium *C. acnes* konnte gezeigt werden, dass es Biofilme auf Implantatoberflächen bilden kann [119]. Weiterhin ist es in der Lage, Blutplättchen zu aktivieren und mit ihnen Aggregate zu bilden [148]. Shannon *et al.* zeigten, dass die Biofilmbildung von *Aerococcus urinae*, welches ebenfalls zu infektiöser Endokarditis führen kann, durch humanes Plasma stimuliert wird und zur Aggregation und Aktivierung der Blutplättchen führt [149]. Jung *et al.* stellten in ihren Untersuchungen fest, dass die Thrombozytenaggregation nicht nur zu einer

vermehrten Biofilmbildung von *S. mutans* führt, sondern auch direkt die bakterielle Resistenz gegenüber Clindamycin erhöht [150].

Die Hemmung der Plättchenaggregation bzw. die Auflösung von Thromben könnten somit dazu beitragen, dass biofilm-assoziierte Infektionen auf Implantatoberflächen vermindert werden. Dass dieser Ansatz auch für die Behandlung von Biofilmen welche durch *C. difficile* gebildet werden sinnvoll ist, zeigen Phanchana *et al.* Sie stellten fest, dass der Wirkstoff Ticagrelor, welcher als Thrombozytenaggregationshemmer eingesetzt wird, in der Lage ist, das Wachstum und die Biofilmbildung von *C. difficile* zu hemmen [151].

Im Widerspruch zu den vorigen Untersuchung steht u.a. die Publikation von Kalivoda *et al.* Sie konnten nachweisen, dass eine Überexpression in einer cAMP-Phosphodiesterase in *S. marcescens* zu einer signifikant erhöhten Biofilmbildung führt [152]. Carneiro *et al.* zeigten, dass auf der Zelloberfläche von *S. aureus* eine α -Enolase exprimiert wird. Sie vermittelt die Bindung des Pathogens an Laminin, einem wesentlichen Bestandteil Basalmembran von Gefäßen, sodass es zur Invasion des Pathogens in das Gewebe kommen kann [153].

Die Funktion des schistosomalen Tegumentproteins Sm 22.6 kDa ist nicht bekannt. Es fungiert jedoch als Antigen für IgE-Antikörper und löst somit eine Immunreaktion aus [154, 155]. Für die Zielstellung im Projekt Card-ii-Omics sollte dieses Protein als Kontrolle für Immunproteomanalysen dienen. Es konnte rekombinant hergestellt und aufgereinigt werden (**Abb. 25** und **Abb. 26**). Die Ansprüche an das Protein für die Immunproteomanalysen wurden vom Verbundpartner vorgegeben. Für die Analysen werden mindestens 50 μ g des Proteins mit einer Reinheit von > 95 % benötigt. Da das Protein sowohl N- als auch C-terminal einen Tag enthält, wäre eine weitere Aufreinigung über den Twin-Strep-Tag der bereits eluierten Proteine möglich. Dies würde dazu führen, dass die Anzahl der unvollständig translatierten Proteine verringert wird. Da der für die erste Aufreinigung genutzte His-Tag am C-Terminus lokalisiert ist, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die eluierten Proteine vollständig transkribiert wurden.

Von den drei ausgewählten Proteinen war Sm22.6 das einzige, welches in dieser Arbeit rekombinant hergestellt und mittels Westernblot nachgewiesen werden konnte. Die möglichen Ursachen für die nicht detektierbare Expression der anderen Proteine sind vielfältig. Zunächst sollten die einzelnen Klonierungsschritte noch

einmal durch eine Plasmidisolierung mit nachfolgender Kontrollrestriktion erfolgen. Da die Kolonie-PCR der transformierten *S. cerevisiae* Zellen nicht erfolgreich war, sollten an dieser Stelle eine andere Polymerase verwendet oder eine Gradienten-PCR durchgeführt werden. Weiterhin wäre auch die Plasmidisolierung aus den transformierten Hefezellen mit nachfolgender Kontrollrestriktion eine Option. Der gewählte Stamm *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C weist sowohl eine Uracil- als auch eine Leucindefizienz auf. Das heißt, dass dieser Stamm nicht auf oder in Medien wachsen kann, welche kein Uracil bzw. Leucin enthalten. Dieser Auxotrophiemarker wurde für die Selektion der transformierten Zellen verwendet. Da Kolonien auf den uracilfreien Agarplatten wachsen konnten, ist davon auszugehen, dass die Transformation mit den im Vorfeld über Sequenzierung geprüften Plasmiden erfolgreich war. Das für die Proteinexpression verwendete Medium war wie im StarGate® (iba Lifesciences) Protokoll vorgeschrieben leucinfrei und somit ein Selektionsmedium. Auch in diesem Medium konnte ein Wachstum der Hefestämme beobachtet werden. Dennoch konnten die Proteine rSmEno und rSmNPP-5 mittels Westernblot nicht nachgewiesen werden. Ein mögliches Problem könnten die nicht idealen Expressionsbedingungen gewesen sein. Wie bereits bei der Expression bei rSm22.6 beschrieben (**Abb. 24**), führte die Induktion des CUP1 Promotors mit Kupfersulfat zu keiner Erhöhung der Proteinexpression. Dabei sollte beachtet werden, dass keine detaillierten Untersuchungen durchgeführt wurden, in welchem Wachstumsstadium eine Induktion am sinnvollsten wäre. Es muss auch in Betracht gezogen werden, dass der verwendete Lysispuffer (2.8.2) nicht geeignet ist. Eventuell wurden auch zum Großteil nur unvollständige Proteinfragmente transkribiert, sodass der C-terminale His-tag nicht exprimiert wurde. Dadurch wäre die Detektion mittels dem verwendeten Anti-His-Antikörper nicht möglich. Eine Aufreinigung über den N-terminalen Twin-Strep-Tag könnte darüber Aufschluss geben, ob generell eine Transkription und Expression der Proteine stattfindet. Falls ein Transkriptionsabbruch ursächlich wäre, könnte eine Anpassung der verwendeten Codons („Codonoptimierung“) für *S. cerevisiae* Abhilfe schaffen. Bei erfolgreicher Expression der Proteine rSmEno und rSmNPP-5 sollte zusätzlich die Funktionalität überprüft werden. Mögliche Funktionstest für rSmEno wären die Enzymaktivität bei der Spaltung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat zu messen oder auch Tests hinsichtlich der fibrinolytischen Eigenschaften zu machen. Da SmNPP-5 auch als ADPase fungiert, wäre dadurch auch eine Möglichkeit

gegeben, eine Enzymaktivität zu messen. Zwar ist die Funktion von Sm22.6 nicht bekannt, es könnte jedoch überprüft werden, ob das rSm22.6 ebenfalls von IgE Antikörpern erkannt wird.

Da rSm22.6 als Kontrollprotein gewählt wurde, wurde kein Biofilm-reduzierender Effekt erwartet. Dies bestätigen die gezeigten Ergebnisse (**Abb. 27**). Keine der gewählten Konzentrationen hatte Einfluss auf die Biofilmbildung von *C. difficile* 630 oder *C. difficile* VPI10463. Für die Anwendung als Beschichtung von Implantatoberflächen wäre die Reduzierung der Biofilmmasse bei allen hier besprochenen Proteinen wünschenswert. Doch sofern die Biofilmmasse im Vergleich zu bereits eingesetzten Oberflächenmodifikationen nicht zunimmt und die anti-thrombotischen Eigenschaften überwiegen, wäre die Anwendung dennoch vertretbar.

Die Verwendung schistosomaler Tegumentproteine ist ein vielversprechender Ansatz für Beschichtung der Oberfläche kardiovaskulärer Implantate. Die anti-thrombogenen Eigenschaften würden Komplikationen und Abstoßungsreaktionen durch das Immunsystem des Patienten vermindern. Ein möglicher Effekt gegen eine bakterielle Biofilmbildung würde die Lebensdauer des Implantates und somit den Behandlungserfolg vergrößern.

5 Zusammenfassung

1. Biofilm-assoziierte Infektionen auf Implantatoberflächen sind ein ernsthaftes medizinisches Problem. Auch anaerobe Bakterien, wie z.B. *Clostridioides difficile* sind in der Lage, zu diesem Infektionsgeschehen beizutragen.
2. In dieser Arbeit wurden vier untersuchten klinischen Isolate (630, K14, B1175, VPI 10463) von *C. difficile* hinsichtlich ihrer Biofilmbildung untersucht. Die gebildete Biofilmmasse war abhängig vom Isolat und den Kultivierungsbedingungen. Neben dem Isolat 630, einer der am besten untersuchten Stämme von *C. difficile*, lag der Fokus auf dem sehr virulenten Isolat VPI 10463. Die Etablierung eines optimierten Kultivierungssystems (täglicher Medienwechsel) wirkte der sonst beobachteten Reduzierung der Biofilmmasse nach 72 h entgegen.
3. Als potentielle Substanzen für die Beschichtung von Implantatoberflächen, die möglicherweise die Hemmung der Biofilmbildung durch *C. difficile* bewirken könne, wurden *cis*-2-Decensäure (C2DA), D-Aminosäuren sowie tegumentale Schistosomenproteine ausgewählt.
4. Eine Beschichtung der Oberflächen mit 200 µg/ml C2DA führte zu keinem feststellbaren Effekt auf die Biofilmbildung. Die Zugabe von 150 µg/ml ins Medium bewirkte eine Reduzierung der Biofilmmasse, eine Zugabe von 250 µg/ml führte zu Wachstumshemmungen.
5. Die Beschichtung der Oberflächen mit 500 µM D-Phenylalanin, D-Methionin, D-Tyrosin oder D-Prolin konnten die Biofilmbildung zum Teil reduzieren. Eine höhere Konzentration führte nicht zu einer weiteren Verringerung der Biofilmmasse. Synergistische Effekte einer D-Aminosäurekombination konnten nicht festgestellt werden.
6. Schistosomen sind Parasiten, welche sich vor dem Immunsystem des Wirtes maskieren können. Ursächlich dafür sind u.a. die Tegumentproteine, wie z.B. die Proteine SmEno und SmNPP-5. Diese können durch die Verminderung von Thrombenbildung auch zur Verringerung mikrobieller Ansiedlung führen. Die für die Hemmversuche zur Biofilmbildung von *C. difficile* notwendige rekombinante Herstellung dieser Proteine misslang. Das Protein Sm22.6, welches im Gegensatz zu SmEno und SmNPP-5 eine Immunreaktion auslöst, konnte in einem Hefeexpressionssystem rekombinant hergestellt

werden. Der Einfluss auf die mikrobielle Adhärenz ist nicht bekannt. Die Untersuchungen mit bis zu 100 µg/ml rSm22.6 zeigten keinen Effekt dieses Proteins auf die Biofilmbildung von *C. difficile*.

Anhang

Tab. 9: Verwendete Geräte und Bezugsquellen

Anaerobenbox MACS-MG 500	Meintrup DWS Laborgeräte, Holte, Deutschland
Agarosegelelektrophorese-Kammern und Schlitten	Biometra GmbH, München, Deutschland
Autoklav Systec DX-65	Systec GmbH , Linden, Deutschland
Brutschrank Innova 4230	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Brutschrank Memmert	Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland
Elektrische Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Elektroporationssystem Gene Pulser Xcell	Biorad GmbH, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse Ti	Nikon Instruments Europe, Düsseldorf, Deutschland
Geldokumentationsanlage Dark Hood DH-50	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Gewindeflaschen DURAN	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Handdispenser Multipette® Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Hochgeschwindigkeitshomogenisator Fastprep-24 5G	MP Biomedicals über Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Kühl- und Gefrierschrank	Liebherr, Bieberach an der Riß, Deutschland
Lichtmikroskop CKX41	Olympus, Tokio, Japan
Lichtmikroskop DM IL LED	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
pH-Elektrode SenTix 61	Werner Hassa GmbH, Weilheim, Deutschland
pH-Meter	Werner Hassa GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipetten 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power-Pack P25	Biometra GmbH, München, Deutschland

Schüttler Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Schüttler Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Schwenkplatte IKA Rocker 2D digital	IKA®-Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Spektralphotometer Biowave II	WPA über Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Spektrophotometer Colibri Mikrovolumen	Titertek-Berthold, Pforzheim, Deutschland
Spektrophotometer NanoDrop Lite	IMPLEN GmbH, München, Deutschland
Spektrophotometer Smartspec 3000	BioRad, Hercules, CA, USA
Spektrophotometer SpectraMax M2	San José, CA, USA
Sterilwerkbank Herasafe	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Stromquelle PowerPac Basic	BioRad, Hercules, CA, USA
Thermocycler TProfessional und TAdvanced	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender & Holbein AG, Zürich, Schweiz
Waage Ohaus	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Waage Feinwaage XA205	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Westernblot Apparatur	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge Mini	Sprout Heathrow Scientific über Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 16 R	Heraeus, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Varifuge 3.0 R	Heraeus, Hamburg, Deutschland

Tab. 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Bezugsquellen

10 ml, 15 ml, 50 ml Falcons	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Combitips 10 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektroporationsküvetten	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Einmalimpfösen	Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland
Einmalspatel	Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland
Glascoverslips	Menzel, Branschweig, Deutschland
Impfschlingen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Küvetten 10 x 4 x 4,5 mm	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare Life Sciences
Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland
Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilfilter	Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland
Transfer Filterpapiere	BioRad, Hercules, CA, USA
Zellkulturplatten Cellstar24-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten Cellstar96-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Tab. 11: Verwendete Chemikalien und Bezugsquellen

2-Mercaptoethanol	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Agar-Agar	Difco Laboratories, Hamburg, Deutschland
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Brain Heart Infusion Broth	HiMedia Laboratories GmbH, Einhausen, Deutschland
Brilliant Blue G-250	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
D-Aminosäuren	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DTT	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gene Jet Gel Extraktionskit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Glukose	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Biolab Inc., Lawrenceville, GA, USA
Imidazol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kupfersulfat	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
L-Cystein-HCL	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Lithiumacetat			Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LIVE/DEAD™ Viability Kit	BacLight™	Bacterial	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Loading Dye			New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
Magermilchpulver			AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid			Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol			Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Monarch DNA Extraktionskit			New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
Natriumchlorid			Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat			Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat			Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid Kit			Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NBT/BCIP			Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Pepton			Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Polymerase Q5 High-Fidelity			New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
Polymerase Terra PCR Direct			Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Primärantikörper			Agrisera
Primer			Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Proteaseinhibitorcocktail			Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Restriktionsenzyme			New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
RNeasy Micro Kit			Qiagen, Hilden, Deutschland
RotiNanoquant			Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sekundärantikörper			Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Sorbitol	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
Technical Agar No.3	Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England
TEMED	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Trypton	Biolab Inc., Lawrenceville, GA, USA
X-Gal	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Yeast Nitrogen Base w/o amino acids	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Yeast Synthetic Drop Out Supplement w/o leucin	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Yeast Synthetic Drop Out Supplement w/o uracil	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Tab. 12: Verwendete Software und Bezugsquellen

Biostep Argus X1	Biostep, Burkhardtsdorf, Deutschland
ChemDraw	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Graph Pad Prism 6	Graph Pad Software Inc, La Jolla, CA, USA
Microsoft Excell 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
NIS-Elements BR.5.02.01	Nikon, Amstelveen, Niederlande
SoftMax Pro 6.4	Molecular Devices GmbH, Sunnyvale, CA, USA
StarPrimer D'Signer 3.0.0.3	IBA Lifesciences,, Göttingen, Deutschland

Tab. 13: Organismen

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>Clostridioides difficile</i> 630	Wildtyp	Laborsammlung S2 Nr. 7
<i>Clostridioides difficile</i> VP110463	Wildtyp	Laborsammlung S2 Nr. 4
<i>Clostridioides difficile</i> EK14	Wildtyp	Laborsammlung Nr. 1
<i>Clostridioides difficile</i> BI175	Wildtyp	Laborsammlung Nr. 6
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS- mcrBC), Φ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74 recA1 ara Δ 139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Iba Lifesciences Laborsammlung Nr. 944
<i>Escherichia coli</i> TOP10 pENTRY-IBA 51	pENTRY-IBA51 Kan ^R	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 759
<i>Escherichia coli</i> TOP10 pENTRY-IBA 51::Sm22.6 kDa	pENTRY-IBA51::Sm22.6 kDa Kan ^R	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 760
<i>Escherichia coli</i> TOP10 pENTRY-IBA 51::SmEno	pENTRY-IBA51::SmEno Kan ^R	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 761
<i>Escherichia coli</i> TOP10 pENTRY-IBA 51::SmNPP-5	pENTRY-IBA51::SmNPP-5 Kan ^R	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 762
<i>Escherichia coli</i> TOP10 pYSG-IBA143	pYSG-IBA143 N-terminaler His-tag C-terminaler Twin-Strep- tag® Amp ^R , LEU2d, URA3	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 763
<i>Escherichia coli</i> TOP10 pYSG-IBA143::Sm22.6 kDa	pYSG-IBA143::Sm22.6 kDa N-terminaler His-tag C-terminaler Twin-Strep- tag® Amp ^R , LEU2d, URA3	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 764
<i>Escherichia coli</i> TOP10 pYSG-IBA143::SmEno	pYSG-IBA143::SmEno N-terminaler His-tag C-terminaler Twin-Strep- tag® Amp ^R , LEU2d, URA3	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 765

<i>Escherichia coli</i> TOP10 pYSG-IBA143:: <i>SmNPP-5</i>	pYSG-IBA143:: <i>SmNPP-5</i> N-terminaler His-tag C-terminaler Twin-Strep-tag® Amp ^R	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 766
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C	MATa; his3D1; leu2-3_112; ura3-52; trp1-289; MAL2- 8c; SUC2	EUROSCARF Laborsammlung Nr. 721
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C pYSG-IBA143:: <i>Sm22.6 kDa</i>	pYSG-IBA143:: <i>Sm22.6 kDa</i> N-terminaler His-tag C-terminaler Twin-Strep-tag® Amp ^R , LEU2d, URA3	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 722
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C pYSG-IBA143:: <i>SmEno</i>	pYSG-IBA143:: <i>SmEno</i> N-terminaler His-tag C-terminaler Twin-Strep-tag® Amp ^R , LEU2d, URA3	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 723
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C pYSG-IBA143:: <i>SmNPP-5</i>	pYSG-IBA143:: <i>SmNPP-5</i> N-terminaler His-tag C-terminaler Twin-Strep-tag® Amp ^R	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 724

Tab. 14: Vektoren

Vektor	Genotyp	Herkunft/Referenz
pENTRY-IBA 51	Tet Promotor, 5' Lg _{ul} , 3' Lg _{ul} , Kan ^R ,	Iba Lifesciences Laborsammlung Nr. 759
pYSG-IBA143	CUP1 Promotor, 5' Esp3I, 3' Esp3I, N-terminaler 6xHis-tag, C-terminaler Twin-Strep-tag, LEU2d, URA3, ColEI ori, LacZ alpha fragment, Expression in <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	Iba Lifesciences Laborsammlung Nr. 763

Tab. 15: rekombinante Plasmide

Plasmid	Relevantes Merkmal	Insert	Herkunft/Referenz
pENTRY-IBA 51:: <i>Sm22.6 kDa</i>	Tet Promotor, 5' Lgul, 3' Lgul, Kan ^R , <i>Sm22.6</i>		Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 760
pENTRY-IBA 51:: <i>SmEno</i>	Tet Promotor, 5' Lgul, 3' Lgul, Kan ^R , <i>SmEno</i>	1305 bp	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 761
pENTRY-IBA 51:: <i>SmNPP-5</i>	Tet Promotor, 5' Lgul, 3' Lgul, Kan ^R , <i>SmNPP-5</i>	1401 bp	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 762
pYSG-IBA143:: <i>Sm22.6 kDa</i>	CUP1 Promotor, 5'Esp3I, 3'Esp3I, <i>Sm22.6</i> , N-terminaler 6xHis-tag, C- terminaler Twin-Strep- tag, Amp ^R , LEU2d, URA3, ColEI ori, LacZ alpha fragment, Expression in <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>		Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 764
pYSG-IBA143:: <i>SmEno</i>	CUP1 Promotor, 5'Esp3I, 3'Esp3I, <i>SmEno</i> , N-terminaler 6xHis-tag, C- terminaler Twin-Strep- tag, Amp ^R , LEU2d, URA3, ColEI ori, LacZ alpha fragment, Expression in <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	1305 bp	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 765
pYSG- IBA143:: <i>SmNPP-5</i>	CUP1 Promotor, 5'Esp3I, 3'Esp3I, <i>SmNPP-5</i> , N- terminaler 6xHis-tag, C-terminaler Twin- Strep-tag, Amp ^R , LEU2d, URA3, ColEI ori, LacZ alpha fragment, Expression in <i>E. coli</i> und <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	1401 bp	Diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 766

Tab. 16: Oligonukleotide für die Klonierung des GOI in den Entry Vector

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m (°C)	nt
CF Entry Sm22.6	AGCGGCTCTTCAATGGCAACCGAGACGAAATTA AGT	80,5	36
CR Entry Sm22.6	AGCGGCTCTTCTCCCTTGAGATGGTGTCTCCAT GC	83,2	36
CF Entry SmEno	AGCGGCTCTTCAATGTCCATTTTAACGATCCACG CT	81,1	36
CR Entry SmEno	AGCGGCTCTTCTCCCTACTTTGGGATGGCGGAA GT	82,7	35
CF Entry SmNPP- 5	AGCGGCTCTTCAATGTATTGCATTGAAACTATGC AAAAA	78,1	39
CR Entry SmNPP- 5	AGCGGCTCTTCTCCCATAATATAATCCATTGTGT ACCAT	76,3	39

Tab. 17: Oligonukleotide für die Kolonie PCR

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m (°C)	nt
Sm22.6 for	ATGGCAACCGAGACG	59,3	19
Sm22.6 rev	TGGTGTCTCCATGCTAAA	59,2	15
SmEno for	ATGTCCATTTTAACGATCCACG	54,0	22
SmEno rev	TTATACTTTGGGATGGCGGAA	55,0	21
SmNPP-5 for	TACATAACGTAACCTTTGATACG	53,8	22
SmNPP-5 rev	ATATAATCCATTGTGTACCAT	52,3	21

Tab. 18: Oligonukleotide für die Sequenzierung

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m (°C)	nt
ENTRY-Primer- for2	GCGAAACGATCCTCGAAGC	67,1	19
ENTRY-Primer-rev	CCCCTGATTCTGTGGATAACCG	68,4	22
YSG-Primer-for	CAATATCATATAGAAGTCATCGA	55	23
YSG-Primer-rev	GCAGCTACCACATTGGCATTGGC	73,2	23

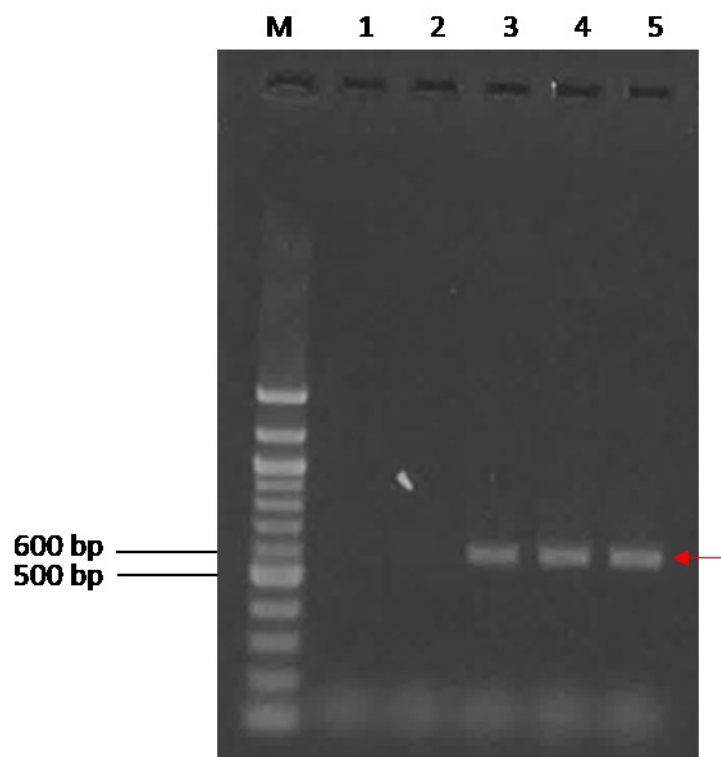


Abb. 28: Agarosegelelektrophorese Sm 22.6. 1,5 % Agarosegel in TAE. Erwartete Fragmentgröße 597 bp (roter Pfeil). Spuren: M: 100 bp Marker, 1: leere Kontrolle, 2: Sample 1.1, 3: Sample 1.2, 4: Sample 1.3, 5: Sample 1.-5 Proben.

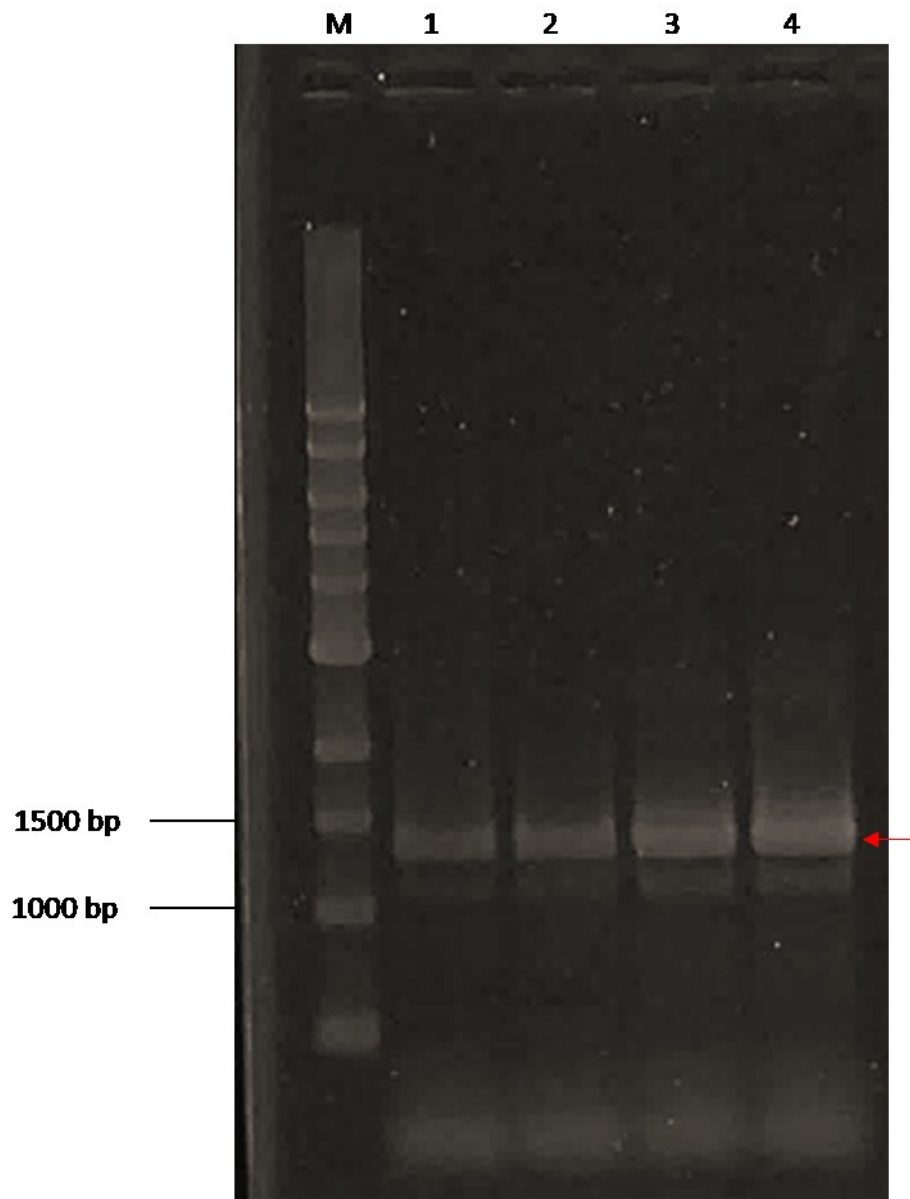


Abb. 29: Agarosegelelektrophorese SmEno. 0,8 % Agarosegel in TAE. Erwartete Fragmentgröße 1329 bp. Spuren: M: 1 kb Marker, 1: Sample 2.1 ohne GC Enhancer, 2: Sample 2.1 ohne GC Enhancer, 3: Sample 2.1 mit GC Enhancer, 4: Sample 2.1 mit GC Enhancer.

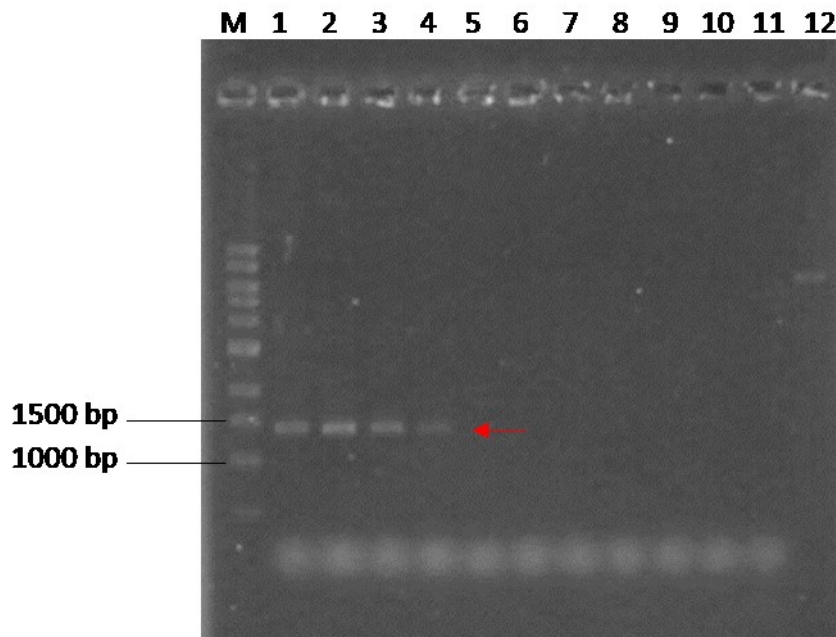


Abb. 30: Agarosegelelektrophorese nach Gradienten PCR SmNpp-5. . 0,8 % Agarosegel in TAE nach Gradienten-PCR. Erwartete Fragmentgröße: 1401 bp. Spuren: M: 1 kbp Marker. Die Amplifikation in den Spuren 1-12 fand unter unterschiedlichen Temperaturen statt. 1: 60,4 °C; 2: 61,2 °C; 3: 62,4 °C; 4: 63,8 °C; 5: 65,3 °C; 6: 66,7 °C; 7: 68,2 °C; 8: 69,6 °C; 9: 70,8 °C; 10: 71,6 °C; 11: Kontrollplasmid; 12: leer

```

AAATAGAAACAACACTGTACAATCAATCATCACATCAATCATCACATAAAATATTAGCGAATTGAATCTAGACCCACAATG
GCTAGCCATCACCATCACCATCACTCCGGAATGGCAACCGAGACGAAATTAAGTCAAATGGAAGAGTTTATTAGGGC
ATTTTGTAGAAATAGATGCAGATAGTAATGAAATGATTGATAAACAAGAATTAATTAATATTGTCAAAAATACCGTTTGGAT
ATGAAATTGATCGATCCATGGATAGCAAGGTTTGATACGGATAAAGATAATAAAATCAGTATAGAAGAGTTCTGTCGTGG
ATTTGGTTTAAAAGTATCAGAAATTCGACGTGAAAAAGATGAATTAATAAAAGAAAGAGATGGCAAATTCCTAAGCTT
CCACCGAATATTGAAATTATTGCAGCAACCATGTCCAAAACAAAACAATATGAAATATGTTGTCAATTTAAAGAGTATGTT
GATAATACTAGTCGAACAGGTAATGACATGAGAGAGGTAGCAAATAAAATGAAATCATTATTGGATAACACATATGGTCCG
TGTATGGCAAGTAGTTCTACTAACTGGTTCATATTGGATGAATTTTTACATGAACCATTTTATCAATACAATTTAAGTAT
AATAATTATGTCTGTTTAGCATGGAGAACACCATCTCAAGGGAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAGGTG
GAGGTTCTGGCGGTGGATCGGGAGGTTCACGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAATAAGCTTAATTCATTAACCTT
CCAAAATGAAGGTCATGAGTGCCAATGCCAATGTGGTAGCTGCAAAAATAATGAACAATGCCAAAATCATGTAGCTG
CCCAACGGGGTGTAAACAGCGACGACAAATGCCCTGCGGTAACAAGTCTGAAGAAACCAAGAAGTCATGCTGCTCT
GGGAAATGAAACGAATAGTCTTTAATATATTCACTAATTTGCTGTTTTAATTTTAAAAGGAGAAGGAAGTTAAT
CGACGATTCTACTCAGTTTGAGTACACTTATGTATTTGTTTAGATACTTTGTTAATTTATAGGTATACGT
    
```

Abb. 31: Nukleotidsequenz von Sm22.6 nach Sequenzierung positiver Plasmide. . Grün markierte Nukleotide zeigen den Beginn und das Ende des Gens. Die Nukleotidsequenz des 6x-His-Tags ist fett, die Nukleotidsequenz des Twin-Strep-Tags ist kursiv und fett hervorgehoben.

Tab. 19: Lokalisation wichtiger Sequenzen des Plasmids pYSG-IBA143

Eigenschaft	Von bp	Bis bp
LEU2d	1668	574
2 micron ori	2032	3194
URA3	4293	3490
Ampicillin Resistenzgen	4725	5585
ColEI ori	5756	6345
CUP1 Promotor	6873	6925
YSG <i>Forward primer</i> Bindestelle	6939	6961
6x Histidine-Tag	7049	7081
LacZ alpha Fragment	7310	7711
Twin-Strep-Tag®	7775	7867
YSG <i>Reverse primer</i> Bindestelle	7908	7930
Gesamtlänge		7931

Tab. 20: Lokalisation wichtiger Sequenzen des Plasmid pENTRY-IBA51

Eigenschaft	Von bp	Bis bp
Kanamycin Resistenzgen	1564	770
ENTRY-Primer-for2 Bindestelle	1565	1583
T7 Terminator	1695	1743
LacP/Z	1983	2384
LPP Terminator	2476	2507
ENTRY-Primer-rev Bindestelle	2535	2556
Gesamtlänge		2556

Sequenzen von Sm 22.6, SmEno, SmNPP-5

Sm 22.6

>DQ059818.1 Schistosoma mansoni strain NMRI 22.6 kDa tegument antigen mRNA, complete cds

```
ATGGCAACCGAGACGAAATTAAGTCAAATGGAAGAGTTTATTAGGGCATTTCCTTAGAAAATAGATGCAGATAGTA
ATGAAATGATTGATAAAACAAGAATTAATTAATATATTGTCAAAAATACCGTTTGGATATGAAATTGATCGATCC
ATGGATAGCAAGTTTGTATACGGATAAAAGATAATAAAAATCAGTATAGAAGAGTTCTGTCTGGATTGGTTTA
AAAGTATCAGAAATTCGACGTGAAAAAGATGAATTAAGAAAAGAAAGAGATGGCAAATTCCTAAGCTCCAC
CGAATATTGAAATTAATGCAGCAACCATGTCCAAAACAAAACAATATGAAATATGTTGTCAATTTAAAGAGTA
TGTTGATAATACTAGTCGAACAGGTAATGACATGAGAGAGGTAGCAAATAAAATGAAATCATTATTGGATAAC
ACATATGGTTCGTGTATGGCAAGTAGTTCTACTAACTGGTTCATATTGGATGAATTTTTTACATGAACCATTTT
TATCAATACAATTTAAGTATAATAATTATGTCTGTTTAGCATGGAGAACCACCATCTCAATAA
```

SmEno

>ENA|AAC46886|AAC46886.1 Schistosoma mansoni enolase

```
ATGTCCATTTTAAACGATCCACGCTCGTCAAATTTTCGATAGTCGGGGGAATCCCACAGTTGAGGTGGATTGTA
AAACATCTAAAGTTTGTTCGCGCTGCCGTTCCAAGTGGAGCTTCGACAGGTGTCCATGAGGCTCTTGAGTT
ACGTGATACAAAATTCAAAAGGCTTATATGAAGAAAAGGGTTTAAACAGCAGTCAGTAATGTGAATAAAATTAAT
GCTCCAGCTCTAATAAAACAAAAATATTCCTCGTAAACAAATCAGGCAGCTATTGACAAATATATGATTGATCTTG
ATGGTACGGAAAACAAGGAAAACTTGGAGCCAATGCTATATTGGGAGTGTCTTTGGCCGTGTGCAAAGCTGG
TGCAGCTGAAGCCGGTTTACCTCTCTATAGGTATATTGCGAGGTTAGCTGGGCATGAAGATGTTATAATGCCT
GTTCCAGATTCAATGTCATTAATGGTGGCAGTCATGCCGGCAACAAGCTAGCCATGCAAGAATTTATGATTC
TGCTACTGGGGCCAGCTCTTTCCTACTGAAGCAATGCAAATCGGTACTGAGGTGTACCACAATTTAAAGCTGT
TATCAAACGTGAATATGGACTGGATGCATGCAACGTTGGTGACGAAGGTGGTTTTGCACCAAATATACAGGAT
AATATGAAAGGTCTTCAGCTGCTTGAAGAGGCCATAAAAAATTGCTGGCTATACTGGGAAAGTAGAGATTGGTA
TGGATTGTGCGGCTTCTGAGTTCATAAAGAAATGGGAAATATGATTTAGATTTCAAGAACCCTCATTCTGCAGA
ATCAACCTGGCTTAGTCTGATGCAATGGCTAATATGTACAAGCAAATGATAAGCAAATTTCCAATTTGTGAGC
ATTGAAGATCCATTTGATCAGGATGATTGGGAAACCTGGCCCAAACCTAATCTTCAACAAATATTCAAATTTG
TTGGAGACGATTTGACTGTTACCAATCCAAAGCGCATTAACAGGCCATCGCTTCAAAGGCTTGAATTTGTCT
TCTTTTGAAGTAAACCAGATAGGTTTCAATTAACCGAGTCCATCGAAGCTTGAAGTTAGCACAAAGACTCAGGT
TGGGGTGTGATGTTTTCGCATCGATCTGGTGAACGGAAGATACTTTTCAATGCTGATCTAGTTGTTGGACTTT
GCACTGGACAGATAAAGACGGGTGCACCATGTCTTCTGATCGTTTGGCCAAATACAACCAACTTTTACGTAT
TGAAGAAGAGTTAGGAACAGCGGCAAAATATGCCGGGAAAACTTCCGCCATCCCAAAGTATAA
```

SmNPP-5

>EU769293.1 Schistosoma mansoni ecto-phosphodiesterase (PDE) mRNA, complete cds

```
ATGTATTGCATTGAAACTATGCAAAAAATGATTATCCTACTATTGATTTGTTTCTTTCTTATATTGAAAGAA
TCTATGCATCTGGTGTGTTGGGAAGGAACAGTTTTCTAAAGTAATACTTATTTCTCTTGATGGATTTTCGTTA
TGATTACTTTGATATGGCTAAGCAAAGAAAATAAAACATGTCAGCATTTGATAAGATATAAAATCAAGGAGTT
TATATAAGACGTATAGAAAATGAATTTCCCTACTTTAACATTTCCCATCACATTTTTTCAATTTAACAGGACTAC
ATCCTGGAAGTCATGGTATAGTAGATAATGTGTTTTATGATCCCAATAATTAATGCAACATTTCTCATCGAGAAA
TCAGTCTACAGCAACAGATTCTAGATTCTATGATGTTGGTGTGCTGAACCGATTTGGGTAACGAATCAGTTTCAT
GGTCATAAAAAGTGGAGTGACTTTCTGGATTGGAAAGTGGAGCGATAATCAAAGGTGAGAGACCAACTCATTATC
TAAACACCTTACAATGAAAGCATTACATTTCACTCAGAGAATTGATATTTTGGATGGATTGGTTTGAACATGAAA
TATTAACCTTGGTCTTATGTATTATCATCAACCTGATAGAGCAGGACATATTCATGGAGCGGCAAGTGATGAG
GTTTTCAAAGCTATCGAGGAGATAAATCATGGACTAGAATACCTCTTGACATCGATTGAAATGCGACCATCAC
TTAGTTGCTGCCCAATCTGATTATAACAAGTGATCATGGAATGACGAACATCAGTTCAGACAGAGTTATATA
TCTTCATGATTACATACATCCAAATGAGTATATATCTGCTCCTAAGAAGTCAGCAGAAATCTGGACACTTTGG
CCAAAGCAAGGCTATACTGTGCGATCATTATACAACAAATGAAAGATCGACACTTCAGGTTAAATGTCTATT
TGAAGGAGGAACTGCCAACACGTTTCTTTTATGGTTCAAGTGATCGAGTCGGTCTGTTGTTGTATATGCAGA
TATTGGATGGACGATTATTGCTGACAGAACGCTCTGGGATAACCCCTGAAAAATAAAGGTGCTCATGGTTATGAT
CCAGATTACAAAAGAGATGTCTCCATTTTTAATGGCGATGGGACCTCAGATAGCTAAAAGTCAACCAACAGAAT
TAAAAGAATCAATCAAGCTGATTGATATTTACTCACTGATTTGTCTCATGCTTGATTTGGAACCTGCTCCTAA
TAATGGTAGTGTGTTGTCGAGTTCTTCCCTTATTGAGTCAAGGAAGCTTTGCCAATATCAACAGATTATCTATC
ATATTCATCATCAAATTTATTTAATTTCTAAGTATTTTCATGGTACACAATGGATTATATTATTGA
```

Literaturverzeichnis

- [1] Costerton, J. W.; Geesey, G. G.; Cheng, K.-J.: How bacteria stick. In: *Scientific American* 238 (1978) 1, S. 86–95.
- [2] Costerton, J. W.; Cheng, K. J.; Geesey, G. G.; Ladd, T. I.; Nickel, J. C.; Dasgupta, M.; Marrie, T. J.: Bacterial biofilms in nature and disease. In: *Annual Reviews in Microbiology* 41 (1987) 1, S. 435–64.
- [3] Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-Scott, H. M.: Microbial biofilms. In: *Annual Reviews in Microbiology* 49 (1995) 1, S. 711–45.
- [4] Donlan, R. M.; Costerton, J. W.: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. In: *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2002) 2, S. 167–93.
- [5] Geesey, G. G.; Mutch, R. J.; Costerton, J.; Green, R. B.: Sessile bacteria: An important component of the microbial population in small mountain streams 1. In: *Limnology and oceanography* 23 (1978) 6, S. 1214–23.
- [6] Anderson-Glenna, M. J.; Bakkestuen, V.; Clipson, N. J. W.: Spatial and temporal variability in epilithic biofilm bacterial communities along an upland river gradient. In: *FEMS microbiology ecology* 64 (2008) 3, S. 407–18.
- [7] Hallam, N. B.; West, JR; Forster, C. F.; Simms, J.: The potential for biofilm growth in water distribution systems. In: *Water Research* 35 (2001) 17, S. 4063–71.
- [8] Wu, L.; Wei, W.; Xu, J.; Chen, X.; Liu, Y.; Peng, L.; Wang, D.; Ni, B.-J.: Denitrifying biofilm processes for wastewater treatment: developments and perspectives. In: *Environmental Science: Water Research & Technology* 7 (2021) 1, S. 40–67.
- [9] Li, L.; He, Z.; Liang, T.; Sheng, T.; Zhang, F.; Wu, D.; Ma, F.: Colonization of biofilm in wastewater treatment: A review. In: *Environmental Pollution* 293 (2022), S. 118514.
- [10] Sehar, S.; Naz, I.: Role of the biofilms in wastewater treatment. In: *Microbial biofilms-importance and applications* (2016), S. 121–44.
- [11] Simmons, R. B.; Rose, L. J.; Crow, S. A.; Ahearn, D. G.: The occurrence and persistence of mixed biofilms in automobile air conditioning systems. In: *Current microbiology* 39 (1999) 3, S. 141–45.
- [12] Motta, J.-P.; Wallace, J. L.; Buret, A. G.; Deraison, C.; Vergnolle, N.: Gastrointestinal biofilms in health and disease. In: *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 18 (2021) 5, S. 314–34.
- [13] Marsh, P. D.: Dental plaque as a biofilm and a microbial community-implications for health and disease: *BMC Oral health* 2006.
- [14] Costerton, J. W.; Montanaro, L.; Arciola, C. R.: Biofilm in implant infections: its production and regulation. In: *The International journal of artificial organs* 28 (2005) 11, S. 1062–68.
- [15] Monroe, D.: Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. In: *PLoS biology* 5 (2007) 11, e307.

- [16] Bryers, J. D.; Ratner, B. D.: Biomaterials approaches to combating oral biofilms and dental disease: BMC Oral Health 2006.
- [17] Flemming, H.-C.; Wingender, J.: The biofilm matrix. In: Nature Reviews Microbiology 8 (2010) 9, S. 623–33.
- [18] Nazir, R.; Zaffar, M. R.; Amin, I.: Bacterial biofilms: the remarkable heterogeneous biological communities and nitrogen fixing microorganisms in lakes. In: Freshwater Microbiology (2019), S. 307–40.
- [19] Costerton, J. W.; Irvin, R. T.; Cheng, K. J.: The bacterial glycocalyx in nature and disease. In: Annual Reviews in Microbiology 35 (1981) 1, S. 299–324.
- [20] Yin, W.; Wang, Y.; Liu, L.; He, J.: Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. In: International journal of molecular sciences 20 (2019) 14, S. 3423.
- [21] Ophir, T.; Gutnick, D. L.: A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. In: Applied and environmental microbiology 60 (1994) 2, S. 740–45.
- [22] Stewart, P. S.: Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. In: International journal of medical microbiology 292 (2002) 2, S. 107–13.
- [23] Suci, P. A.; Mittelman, M. W.; Yu, F. P.; Geesey, G. G.: Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 38 (1994) 9, S. 2125–33.
- [24] Hoyle, B. D.; Alcantara, J.; Costerton, J. W.: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 36 (1992) 9, S. 2054–56.
- [25] Dunne Jr, W. M.; Mason Jr, E. O.; Kaplan, S. L.: Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 37 (1993) 12, S. 2522–26.
- [26] Stewart, P. S.; Costerton, J. W.: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. In: The Lancet 358 (2001) 9276, S. 135–38.
- [27] Evans, D. J.; Allison, D. G.; Brown, M. R.; Gilbert, P.: Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy 27 (1991) 2, S. 177–84.
- [28] Duguid, I. G.; Evans, E.; Brown, M. R.; Gilbert, P.: Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis* evidence for cell-cycle dependency. In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy 30 (1992) 6, S. 791–802.
- [29] Stewart, P. S.: Diffusion in biofilms. In: Journal of bacteriology 185 (2003) 5, S. 1485–91.
- [30] Beer, D. de; Stoodley, P.; Roe, F.; Lewandowski, Z.: Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. In: Biotechnology and bioengineering 43 (1994) 11, S. 1131–38.
- [31] Rabin, N.; Zheng, Y.; Opoku-Temeng, C.; Du, Y.; Bonsu, E.; Sintim, H. O.: Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. In: Future medicinal chemistry 7 (2015) 4, S. 493–512.

- [32] Tack, K. J.; Sabath, L. D.: Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. In: *Chemotherapy* 31 (1985) 3, S. 204–10.
- [33] Lazar, V.: Quorum sensing in biofilms-how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? In: *Anaerobe* 17 (2011) 6, S. 280–85.
- [34] Römling, U.; Balsalobre, C.: Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. In: *Journal of internal medicine* 272 (2012) 6, S. 541–61.
- [35] Lam, J.; Chan, R.; Lam, K.; Costerton, J. W.: Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. In: *Infection and immunity* 28 (1980) 2, S. 546–56.
- [36] Darouiche, R. O.: Treatment of infections associated with surgical implants. In: *New England Journal of Medicine* 350 (2004) 14, S. 1422–29.
- [37] Cassini, A.; Högberg, L. D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G. S.; Colomb-Cotinat, M.; Kretzschmar, M. E.; Devleeschauwer, B.; Cecchini, M.; others: Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. In: *The Lancet infectious diseases* 19 (2019) 1, S. 56–66.
- [38] Zhang, R.; Eggleston, K.; Rotimi, V.; Zeckhauser, R. J.: Antibiotic resistance as a global threat: evidence from China, Kuwait and the United States. In: *Globalization and health* 2 (2006) 1, S. 1–14.
- [39] Centers for Disease Control and Prevention: Antibiotic resistance threats in the United States 2019 2019.
- [40] Ventola, C. L.: The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. In: *Pharmacy and therapeutics* 40 (2015) 4, S. 277.
- [41] Centers for Disease Control and Prevention: Antibiotic resistance threats in the United States 2013 2013.
- [42] Manyi-Loh, C.; Mamphweli, S.; Meyer, E.; Okoh, A.: Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. In: *Molecules* 23 (2018) 4, S. 795.
- [43] Marques, C. N. H.; Davies, D. G.; Sauer, K.: Control of biofilms with the fatty acid signaling molecule cis-2-decenoic acid. In: *Pharmaceuticals* 8 (2015) 4, S. 816–35.
- [44] Dow, J. M.; Crossman, L.; Findlay, K.; He, Y.-Q.; Feng, J.-X.; Tang, J.-L.: Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2003) 19, S. 10995–1000.
- [45] Rahmani-Badi, A.; Sepehr, S.; Mohammadi, P.; Soudi, M. R.; Babaie-Naiej, H.; Fallahi, H.: A combination of cis-2-decenoic acid and antibiotics eradicates pre-established catheter-associated biofilms. In: *Journal of medical microbiology* 63 (2014) 11, S. 1509–16.

- [46] Oh, K.-B.; Miyazawa, H.; Naito, T.; Matsuoka, H.: Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. In: Proceedings of the National Academy of Sciences 98 (2001) 8, S. 4664–68.
- [47] Ryan, R. P.; Fouhy, Y.; Garcia, B. F.; Watt, S. A.; Niehaus, K.; Yang, L.; Tolker-Nielsen, T.; Dow, J. M.: Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. In: Molecular microbiology 68 (2008) 1, S. 75–86.
- [48] Davies, D. G.; Marques, C. N. H.: A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. In: Journal of bacteriology 191 (2009) 5, S. 1393–403.
- [49] Soheili, V.; Oghaz, N. K.; Noughabi, Z. S.; Bazzaz, B. S. F.: The novel effect of cis-2-decenoic acid on biofilm producing *Pseudomonas aeruginosa*. In: Microbiology Research 6 (2015) 1.
- [50] Rahmani-Badi, A.; Sepehr, S.; Babaie-Naiej, H.: A combination of cis-2-decenoic acid and chlorhexidine removes dental plaque. In: Archives of oral biology 60 (2015) 11, S. 1655–61.
- [51] Aliashkevich, A.; Alvarez, L.; Cava, F.: New Insights Into the Mechanisms and Biological Roles of D-Amino Acids in Complex Eco-Systems. In: Frontiers in Microbiology 9 (2018), S. 683.
- [52] Cava, F.; Lam, H.; Pedro, M. A. de; Waldor, M. K.: Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. In: Cellular and Molecular Life Sciences 68 (2011) 5, S. 817–31.
- [53] Bastings, J. J.; van Eijk, H. M.; Olde Damink, S. W.; Rensen, S. S.: d-amino Acids in Health and Disease: A Focus on Cancer. In: Nutrients 11 (2019) 9, S. 2205.
- [54] Radkov, A. D.; Moe, L. A.: Bacterial synthesis of D-amino acids. In: Applied microbiology and biotechnology 98 (2014) 12, S. 5363–74.
- [55] Hancock, R.: The amino acid composition of the protein and cell wall of *Staphylococcus aureus*. In: Biochimica et Biophysica Acta 37 (1960) 1, S. 42–46.
- [56] Anfora, A. T.; Halladin, D. K.; Haugen, B. J.; Welch, R. A.: Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073 is adapted to acetatogenic growth but does not require acetate during murine urinary tract infection. In: Infection and immunity 76 (2008) 12, S. 5760–67.
- [57] Bodanszky, M.; Periman, D.: Peptide antibiotics. In: Science 163 (1969) 3865, S. 352–58.
- [58] Jack, R. W.; Jung, G.: Natural peptides with antimicrobial activity. In: CHIMIA International Journal for Chemistry 52 (1998) 1-2, S. 48–55.
- [59] Grishin, D. V.; Zhdanov, D. D.; Pokrovskaya, M. V.; Sokolov, N. N.: D-amino acids in nature, agriculture and biomedicine. In: All Life 13 (2020) 1, S. 11–22.
- [60] Kolodkin-Gal, I.; Romero, D.; Cao, S.; Clardy, J.; Kolter, R.; Losick, R.: D-amino acids trigger biofilm disassembly. In: Science 328 (2010) 5978, S. 627–29.

- [61] Leiman, S. A.; May, J. M.; Lebar, M. D.; Kahne, D.; Kolter, R.; Losick, R.: D-amino acids indirectly inhibit biofilm formation in *Bacillus subtilis* by interfering with protein synthesis. In: *Journal of bacteriology* (2013), JB-00975.
- [62] Zilm, P. S.; Butnejski, V.; Rossi-Fedele, G.; Kidd, S. P.; Edwards, S.; Vasilev, K.: D-amino acids reduce *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro and in the presence of antimicrobials used for root canal treatment. In: *PloS one* 12 (2017) 2, e0170670.
- [63] Sarkar, S.; Pires, M. M.: D-amino acids do not inhibit biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. In: *PloS one* 10 (2015) 2, e0117613.
- [64] Tan, S. Y.; Ahana, A.: Theodor Bilharz (1825-1862): discoverer of schistosomiasis. In: *Singapore medical journal* 48 (2007) 3, S. 184–85.
- [65] Colley, D. G.; Bustinduy, A. L.; Secor, W. E.; King, C. H.: Human schistosomiasis. In: *The Lancet* 383 (2014) 9936, S. 2253–64.
- [66] Nelwan, M. L.: Schistosomiasis: life cycle, diagnosis, and control. In: *Current Therapeutic Research* 91 (2019), S. 5–9.
- [67] McManus, D. P.; Dunne, D. W.; Sacko, M.; Utzinger, J.; Vennervald, B. J.; Zhou, X.-N.: Schistosomiasis. In: *Nature reviews. Disease primers* 4 (2018) 1, S. 13.
- [68] Smithers, SR; Terry, R. J.; Hockley, D. J.: Host antigens in schistosomiasis. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 171 (1969) 1025, S. 483–94.
- [69] Tarleton, R. L.; Kemp, W. M.: Demonstration of IgG-Fc and C3 receptors on adult *Schistosoma mansoni*. In: *The Journal of Immunology* 126 (1981) 1, S. 379–84.
- [70] Loukas, A.; Jones, M. K.; King, L. T.; Brindley, P. J.; McManus, D. P.: Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. In: *Infection and immunity* 69 (2001) 6, S. 3646–51.
- [71] Leung, M. K.; Dissous, C.; Capron, A.; Woldegaber, H.; Duvauxmiret, O.; Pryor, S.; Stefano, G. B.: *Schistosoma mansoni*: the presence and potential use of opiate-like substances. In: *Experimental parasitology* 81 (1995) 2, S. 208–15.
- [72] Salzet, M.; Capron, A.; Stefano, G. B.: Molecular Crosstalk in Host-Parasite Relationships: Schistosome-and Leech-Host Interactions. In: *Parasitology Today* 16 (2000) 12, S. 536–40.
- [73] El-Faham, M. H.; Eissa, M. M.; Igetei, J. E.; Amer, E. I.; Liddell, S.; El-Azzouni, M. Z.; Doenhoff, M. J.: Treatment of *Schistosoma mansoni* with miltefosine in vitro enhances serological recognition of defined worm surface antigens. In: *PLoS neglected tropical diseases* 11 (2017) 8, e0005853.
- [74] Pacifico, L. G. G.; Fonseca, C. T.; Chiari, L.; Oliveira, S. C.: Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. In: *Immunobiology* 211 (2006) 1-2, S. 97–104.
- [75] Figueiredo, B. C.; Da'dara, A. A.; Oliveira, S. C.; Skelly, P. J.: Schistosomes enhance plasminogen activation: the role of tegumental enolase. In: *PLoS pathogens* 11 (2015) 12, e1005335.

- [76] Elzoheiry, M.; Da'dara, A. A.; deLaforcade, A. M.; El-Beshbishi, S. N.; Skelly, P. J.: The essential ectoenzyme SmNPP5 from the human intravascular parasite *Schistosoma mansoni* is an ADPase and a potent inhibitor of platelet aggregation. In: *Thrombosis and Haemostasis* 118 (2018) 06, S. 979–89.
- [77] Statistisches Bundesamt (Destatis): Todesursachen. URL: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html. Abrufdatum 19.04.2022.
- [78] Howard, C.; Jullian, L.; Joshi, M.; Noshirwani, A.; Bashir, M.; Harky, A.: TAVI and the future of aortic valve replacement. In: *Journal of cardiac surgery* 34 (2019) 12, S. 1577–90.
- [79] Khan, A.; Aslam, A.; Satti, K. N.; Ashiq, S.: Infective endocarditis post-transcatheter aortic valve implantation (TAVI), microbiological profile and clinical outcomes: a systematic review. In: *PloS one* 15 (2020) 1, e0225077.
- [80] Neragi-Miandoab, S.; Michler, R. E.: A review of most relevant complications of transcatheter aortic valve implantation. In: *International Scholarly Research Notices* 2013 (2013).
- [81] Kandi, V.; Vadakedath, S.: Implant-associated infections: A review of the safety of cardiac implants. In: *Cureus* 12 (2020) 12.
- [82] Ramirez, J.; Guarner, F.; Bustos Fernandez, L.; Maruy, A.; Sdepanian, V. L.; Cohen, H.: Antibiotics as major disruptors of gut microbiota. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (2020), S. 731.
- [83] Mullish, B. H.; Williams, H. R. T.: *Clostridium difficile* infection and antibiotic-associated diarrhoea. In: *Clinical Medicine* 18 (2018) 3, S. 237.
- [84] Khan, F. Y.; Elzouki, A.-N.: *Clostridium difficile* infection: a review of the literature. In: *Asian Pacific journal of tropical medicine* 7 (2014), S6-S13.
- [85] Kinashi, Y.; Hase, K.: Partners in leaky gut syndrome: intestinal dysbiosis and autoimmunity. In: *Frontiers in Immunology* 12 (2021).
- [86] Stewart, A. S.; Pratt-Phillips, S.; Gonzalez, L. M.: Alterations in intestinal permeability: the role of the “leaky gut” in health and disease. In: *Journal of equine veterinary science* 52 (2017), S. 10–22.
- [87] Berkefeld, A.; Berger, F. K.; Gärtner, B. C.; Wantia, N.; Prinzing, A.; Laugwitz, K.-L.; Busch, D. H.; Rothe, K.: *Clostridioides (Clostridium) difficile* pacemaker infection: *Open Forum Infectious Diseases* 2020.
- [88] Hall, I. C.; O'toole, E.: Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. In: *American journal of diseases of children* 49 (1935) 2, S. 390–402.
- [89] Lawson, P. A.; Citron, D. M.; Tyrrell, K. L.; Finegold, S. M.: Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. In: *Anaerobe* 40 (2016), S. 95–99.
- [90] Karas, J. A.; Enoch, D. A.; Aliyu, S. H.: A review of mortality due to *Clostridium difficile* infection. In: *Journal of infection* 61 (2010) 1, S. 1–8.
- [91] Goudarzi, M.; Seyedjavadi, S. S.; Goudarzi, H.; Mehdizadeh Aghdam, E.; Nazeri, S.: *Clostridium difficile* infection: epidemiology, pathogenesis, risk factors, and therapeutic options. In: *Scientifica* 2014 (2014).

- [92] Eze, P.; Balsells, E.; Kyaw, M. H.; Nair, H.: Risk factors for *Clostridium difficile* infections-an overview of the evidence base and challenges in data synthesis. In: *Journal of global health* 7 (2017) 1.
- [93] Trifan, A.; Stanciu, C.; Girleanu, I.; Stoica, O. C.; Singeap, A. M.; Maxim, R.; Chiriac, S. A.; Ciobica, A.; Boiculese, L.: Proton pump inhibitors therapy and risk of *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis. In: *World journal of gastroenterology* 23 (2017) 35, S. 6500.
- [94] Tleyjeh, I. M.; Abdulhak, A. A. B.; Riaz, M.; Garbati, M. A.; Al-Tannir, M.; Alasmari, F. A.; AlGhamdi, M.; Khan, A. R.; Erwin, P. J.; Sutton, A. J.; others: The association between histamine 2 receptor antagonist use and *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. In: *PloS one* 8 (2013) 3, e56498.
- [95] Owens Jr, R. C.; Donskey, C. J.; Gaynes, R. P.; Loo, V. G.; Muto, C. A.: Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. In: *Clinical infectious diseases* 46 (2008) Supplement\ 1, S19-S31.
- [96] Gil, F.; Lagos-Moraga, S.; Calderón-Romero, P.; Pizarro-Guajardo, M.; Paredes-Sabja, D.: Updates on *Clostridium difficile* spore biology. In: *Anaerobe* 45 (2017), S. 3–9.
- [97] Aktories, K.; Schwan, C.; Jank, T.: *Clostridium difficile* toxin biology. In: *Annual review of microbiology* 71 (2017), S. 281–307.
- [98] Turner, N. A.; Anderson, D. J.: Hospital Infection Control: *Clostridioides difficile*. In: *Clinics in colon and rectal surgery* 33 (2020) 02, S. 98–108.
- [99] Irving, P. M.; Gibson, P. R.: Infections and IBD. In: *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 5 (2008) 1, S. 18–27.
- [100] Aljarallah, K. M.: Conventional and alternative treatment approaches for *Clostridium difficile* infection. In: *International journal of health sciences* 11 (2017) 1, S. 1.
- [101] Elbeddini, A.; Gerochi, R.: Treatment of *Clostridium difficile* infection in community teaching hospital: a retrospective study. In: *Journal of Pharmaceutical Policy and Practice* 14 (2021) 1, S. 1–11.
- [102] Chen, X.; Katchar, K.; Goldsmith, J. D.; Nanthakumar, N.; Cheknis, A.; Gerding, D. N.; Kelly, C. P.: A mouse model of *Clostridium difficile*-associated disease. In: *Gastroenterology* 135 (2008) 6, S. 1984–92.
- [103] Jafari, N. V.; Kuehne, S. A.; Bryant, C. E.; Elawad, M.; Wren, B. W.; Minton, N. P.; Allan, E.; Bajaj-Elliott, M.: *Clostridium difficile* modulates host innate immunity via toxin-independent and dependent mechanism (s). In: *PloS one* 8 (2013) 7, e69846.
- [104] Tenover, F. C.; Åkerlund, T.; Gerding, D. N.; Goering, R. V.; Boström, T.; Jonsson, A.-M.; Wong, E.; Wortman, A. T.; Persing, D. H.: Comparison of strain typing results for *Clostridium difficile* isolates from North America. In: *Journal of clinical microbiology* 49 (2011) 5, S. 1831–37.
- [105] Merrigan, M. M.: Hypervirulent *Clostridium difficile* strains: adherence, toxin production and sporulation 2010.

- [106] Dawson, L. F.; Valiente, E.; Faulds-Pain, A.; Donahue, E. H.; Wren, B. W.: Characterisation of *Clostridium difficile* biofilm formation, a role for Spo0A. In: *PloS one* 7 (2012) 12, e50527.
- [107] Semenyuk, E. G.; Laning, M. L.; Foley, J.; Johnston, P. F.; Knight, K. L.; Gerding, D. N.; Driks, A.: Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. In: *PloS one* 9 (2014) 1, e87757.
- [108] Barketi-Klai, A.; Hoys, S.; Lambert-Bordes, S.; Collignon, A.; Kansau, I.: Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonization. In: *Journal of medical microbiology* 60 (2011) 8, S. 1155–61.
- [109] Calabi, E.; Calabi, F.; Phillips, A. D.; Fairweather, N. F.: Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. In: *Infection and immunity* 70 (2002) 10, S. 5770–78.
- [110] Waligora, A.-J.; Hennequin, C.; Mullany, P.; Bourlioux, P.; Collignon, A.; Karjalainen, T.: Characterization of a Cell Surface Protein of *Clostridium difficile* with Adhesive Properties. In: *Infection and immunity* 69 (2001) 4, S. 2144–53.
- [111] Janoir, C.; Péchiné, S.; Grosdidier, C.; Collignon, A.: Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. In: *Journal of bacteriology* 189 (2007) 20, S. 7174–80.
- [112] Dapa, T.; Unnikrishnan, M.: Biofilm formation by *Clostridium difficile*. In: *Gut microbes* 4 (2013) 5, S. 397–402.
- [113] Dapa, T.; Leuzzi, R.; Ng, Y. K.; Baban, S. T.; Adamo, R.; Kuehne, S. A.; Scarselli, M.; Minton, N. P.; Serruto, D.; Unnikrishnan, M.: Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. In: *Journal of bacteriology* 195 (2013) 3, S. 545–55.
- [114] Pantaléon, V.; Monot, M.; Eckert, C.; Hoys, S.; Collignon, A.; Janoir, C.; Candela, T.: *Clostridium difficile* forms variable biofilms on abiotic surface. In: *Anaerobe* (2018).
- [115] Guaglianone, E.; Cardines, R.; Vuotto, C.; Di Rosa, R.; Babini, V.; Mastrantonio, P.; Donelli, G.: Microbial biofilms associated with biliary stent clogging. In: *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 59 (2010) 3, S. 410–20.
- [116] Rosenberg, M.; Azevedo, N. F.; Ivask, A.: Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. In: *Scientific reports* 9 (2019) 1, S. 1–12.
- [117] Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T.; others: *Molecular cloning: a laboratory manual* 1989.
- [118] Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical biochemistry* 72 (1976) 1-2, S. 248–54.
- [119] Liu, Y.; Su, Y.; Cui, Z.; Guo, Y.; Zhang, W.; Wu, J.: Clinical and microbiological features of anaerobic implant-related infection in 80 patients after orthopedic surgery. In: *Anaerobe* 71 (2021), S. 102413.

- [120] Seng, P.; Bayle, S.; Alliez, A.; Romain, F.; Casanova, D.; Stein, A.: The microbial epidemiology of breast implant infections in a regional referral centre for plastic and reconstructive surgery in the south of France. In: *International Journal of Infectious Diseases* 35 (2015), S. 62–66.
- [121] Savić, I.; Bošnjak, A.; Beader, N.; Lovrić, Ž.; Salihagić, A.; Gašparac, I.: Anaerobic Bacteria in Implants and Homologous Teeth 2-14 Years after Implantation. In: *Acta stomatologica Croatica: International journal of oral sciences and dental medicine* 52 (2018) 3, S. 193–202.
- [122] Shahroodian, S.; Mirshekar, M.; Talebi, M.; Toriki, A.; Amirmozafari, N.: Association between virulence factors and biofilm formation in *Enterococcus faecalis* isolated from semen of infertile men. In: *American Journal of Reproductive Immunology* (2022).
- [123] Gajdács, M.; Baráth, Z.; Kárpáti, K.; Szabó, D.; Usai, D.; Zanetti, S.; Donadu, M. G.: No correlation between biofilm formation, virulence factors, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: results from a laboratory-based in vitro study. In: *Antibiotics* 10 (2021) 9, S. 1134.
- [124] Hunt, S. M.; Werner, E. M.; Huang, B.; Hamilton, M. A.; Stewart, P. S.: Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. In: *Applied and environmental microbiology* 70 (2004) 12, S. 7418–25.
- [125] Lewis, K.: Programmed death in bacteria. In: *Microbiology and molecular biology reviews* 64 (2000) 3, S. 503–14.
- [126] El Meouche, I.; Peltier, J.: Toxin release mediated by the novel autolysin Cwp19 in *Clostridium difficile*. In: *Microbial Cell* 5 (2018) 9, S. 421.
- [127] Davey, M. E.; O'Toole, G. A.: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. In: *Microbiology and molecular biology reviews* 64 (2000) 4, S. 847–67.
- [128] Jennings, J. A.; Courtney, H. S.; Haggard, W. O.: Cis-2-decenoic acid inhibits *S. aureus* growth and biofilm in vitro: a pilot study. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 470 (2012) 10, S. 2663–70.
- [129] Marques, C. N. H.; Morozov, A.; Planzos, P.; Zelaya, H. M.: The fatty acid signaling molecule cis-2-decenoic acid increases metabolic activity and reverts persister cells to an antimicrobial-susceptible state. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (2014) 22, S. 6976–91.
- [130] Sepehr, S.; Rahmani-Badi, A.; Babaie-Naiej, H.; Soudi, M. R.: Unsaturated fatty acid, cis-2-decenoic acid, in combination with disinfectants or antibiotics removes pre-established biofilms formed by food-related bacteria. In: *PloS one* 9 (2014) 7, e101677.
- [131] Akhtari, H.; Fazly Bazzaz, B. S.; Golmohammadzadeh, S.; Movaffagh, J.; Soheili, V.; Khameneh, B.: Rifampin and Cis-2-Decenoic Acid Co-entrapment in Solid Lipid Nanoparticles as an Efficient Nano-system with Potent Anti-biofilm Activities. In: *Journal of Pharmaceutical Innovation* (2020), S. 1–9.
- [132] Masters, E.; Harris, M.; Jennings, J.: Cis-2-decenoic acid interacts with bacterial cell membranes to potentiate additive and synergistic responses against biofilm. In: *J Bacteriol Mycol* 3 (2016) 3, S. 1–8.

- [133] Everis, L.; Betts, G.: pH stress can cause cell elongation in *Bacillus* and *Clostridium* species: a research note. In: *Food Control* 12 (2001) 1, S. 53–56.
- [134] Kim, Y.; Kim, S.; Lee, S.; Ha, J.; Lee, J.; Choi, Y.; Oh, H.; Lee, Y.; Oh, N.; Yoon, Y.; others: Antimicrobial activity of fermented Maillard reaction products, novel milk-derived material, made by whey protein and *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus gasseri* on *Clostridium perfringens*. In: *Animal Bioscience* 34 (2021) 9, S. 1525.
- [135] Ternan, N. G.; Moore, N. D.; Smyth, D.; McDougall, G. J.; Allwood, J. W.; Verrall, S.; Gill, C. I. R.; Dooley, J. S. G.; McMullan, G.: Increased sporulation underpins adaptation of *Clostridium difficile* strain 630 to a biologically-relevant faecal environment, with implications for pathogenicity. In: *Scientific reports* 8 (2018) 1, S. 1–16.
- [136] Yi-Wei Tang; Max Sussman; Dongyou Liu; Ian Poxton; Joseph Schwartzman (Hrsg.): *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). Boston 2015.
- [137] Grohs, P.; Gutmann, L.; Legrand, R.; Schoot, B.; Mainardi, J. L.: Vancomycin resistance is associated with serine-containing peptidoglycan in *Enterococcus gallinarum*. In: *Journal of bacteriology* 182 (2000) 21, S. 6228–32.
- [138] Reynolds, P. E.; Courvalin, P.: Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-alanyl-D-serine. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (2005) 1, S. 21–25.
- [139] Lam, H.; Oh, D.-C.; Cava, F.; Takacs, C. N.; Clardy, J.; Pedro, M. A. de; Waldor, M. K.: D-Amino Acids Govern Stationary Phase Cell Wall Remodeling in Bacteria. In: *Science* 325 (2009) 5947, S. 1552–55.
- [140] Hochbaum, A. I.; Kolodkin-Gal, I.; Foulston, L.; Kolter, R.; Aizenberg, J.; Losick, R.: Inhibitory effects of D-amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development. In: *Journal of bacteriology* 193 (2011) 20, S. 5616–22.
- [141] Kolodkin-Gal, I.: Beyond the wall: can D-amino acids and small molecule inhibitors eliminate infections? (2017).
- [142] Ramón-Peréz, M. L.; Diaz-Cedillo, F.; Ibarra, J. A.; Torales-Cardena, A.; Rodríguez, S.; Jan-Roblero, J.; Cancino-Diaz, M. E.; Cancino-Diaz, J. C.: D-Amino acids inhibit biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* strains from ocular infections. In: *Journal of medical microbiology* 63 (2014) 10, S. 1369–76.
- [143] Yu, C.; Li, X.; Zhang, N.; Wen, D.; Liu, C.; Li, Q.: Inhibition of biofilm formation by D-tyrosine: Effect of bacterial type and D-tyrosine concentration. In: *Water Research* 92 (2016), S. 173–79.
- [144] Bhardwaj, R.; Krautz-Peterson, G.; Da'dara, A.; Tzipori, S.; Skelly, P. J.: Tegumental phosphodiesterase SmNPP-5 is a virulence factor for schistosomes. In: *Infection and immunity* 79 (2011) 10, S. 4276–84.
- [145] Stratakis, C. A.: Cyclic AMP, protein kinase A, and phosphodiesterases: Proceedings of an international workshop. In: *Hormone and metabolic research* 44 (2012) 10, S. 713–15.
- [146] Nation, C. S.; Da'dara, A. A.; Skelly, P. J.: The essential schistosome tegumental ectoenzyme SmNPP5 can block NAD-induced T cell apoptosis. In: *Virulence* 11 (2020) 1, S. 568–79.

- [147] Jung, C.-J.; Yeh, C.-Y.; Hsu, R.-B.; Lee, C.-M.; Shun, C.-T.; Chia, J.-S.: Endocarditis pathogen promotes vegetation formation by inducing intravascular neutrophil extracellular traps through activated platelets. In: *Circulation* 131 (2015) 6, S. 571–81.
- [148] Petersson, F.; Kilsgård, O.; Shannon, O.; Lood, R.: Platelet activation and aggregation by the opportunistic pathogen *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes*. In: *PloS one* 13 (2018) 1, e0192051.
- [149] Shannon, O.; Mörgelin, M.; Rasmussen, M.: Platelet activation and biofilm formation by *Aerococcus urinae*, an endocarditis-causing pathogen. In: *Infection and immunity* 78 (2010) 10, S. 4268–75.
- [150] Jung, C.-J.; Yeh, C.-Y.; Shun, C.-T.; Hsu, R.-B.; Cheng, H.-W.; Lin, C.-S.; Chia, J.-S.: Platelets enhance biofilm formation and resistance of endocarditis-inducing streptococci on the injured heart valve. In: *Journal of Infectious Diseases* 205 (2012) 7, S. 1066–75.
- [151] Phanchana, M.; Phetruen, T.; Harnvoravongchai, P.; Raksat, P.; Ounjai, P.; Chankhamhaengdecha, S.; Janvilisri, T.: Repurposing a platelet aggregation inhibitor ticagrelor as an antimicrobial against *Clostridioides difficile*. In: *Scientific reports* 10 (2020) 1, S. 1–8.
- [152] Kalivoda, E. J.; Brothers, K. M.; Stella, N. A.; Schmitt, M. J.; Shanks, R. M. Q.: Bacterial cyclic AMP-phosphodiesterase activity coordinates biofilm formation. In: *PloS one* 8 (2013) 7, e71267.
- [153] Carneiro, C. R. W.; Postol, E.; Nomizo, R.; Reis, L. F. L.; Brentani, R. R.: Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. In: *Microbes and Infection* 6 (2004) 6, S. 604–08.
- [154] Webster, M.; Fulford, A. J.; Braun, G.; Ouma, J. H.; Kariuki, H. C.; Havercroft, J. C.; Gachuhi, K.; Sturrock, R. F.; Butterworth, A. E.; Dunne, D. W.: Human immunoglobulin E responses to a recombinant 22.6-kilodalton antigen from *Schistosoma mansoni* adult worms are associated with low intensities of reinfection after treatment. In: *Infection and immunity* 64 (1996) 10, S. 4042–46.
- [155] Dunne, D. W.; Webster, M.; Smith, P.; Langley, J. G.; Richardson, B. A.; Fulford, A. J.; Butterworth, A. E.; Sturrock, R. F.; Kariuki, H. C.; Ouma, J. H.: The isolation of a 22 kDa band after SDS-PAGE of *Schistosoma mansoni* adult worms and its use to demonstrate that IgE responses against the antigen (s) it contains are associated with human resistance to reinfection. In: *Parasite immunology* 19 (1997) 2, S. 79–89.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Phasen der Biofilmbildung.....	- 6 -
Abb. 2: Schematische Darstellung von aeroben und anaerobe Zonen im Biofilm.....	- 8 -
Abb. 3: Strukturformel von <i>cis</i> -2-Decensäure.....	- 11 -
Abb. 4: Schematische Darstellung von D- und L-Alanin.....	- 12 -
Abb. 5: „Leaky Gut“-Hypothese.....	- 15 -
Abb. 6: Schematische Darstellung des Klonierungsprozesses mit dem StarGate System von IBA LifeSciences.....	- 29 -
Abb. 7: Plasmidkarte des ENTRY-Vektors pENTRY-IBA51.....	- 30 -
Abb. 8: Plasmidkarte des Zielvektors pYSG-IBA 143.....	- 31 -
Abb. 9: Biofilmbildung verschiedener <i>C. difficile</i> Isolate.....	- 44 -
Abb. 10: Messung der optischen Dichte bei 600 nm.....	- 45 -
Abb. 11: Optimierung des Kultivierungssystems für <i>C. difficile</i> 630 durch Medienwechsel.....	- 47 -
Abb. 12: Optimierung des Kultivierungssystems für <i>C. difficile</i> VPI 10463 durch Medienwechsel.....	- 48 -
Abb. 13: Schematische Darstellung der Oberflächenbeschichtung mit C2DA.....	- 49 -
Abb. 14: Quantifizierung der Biofilmmasse von <i>C. difficile</i> nach Oberflächenbeschichtung mit C2DA.....	- 51 -
Abb. 15: Der konzentrationsabhängige Einfluss von C2DA auf die Biofilmbildung von <i>C. difficile</i> 630.....	- 53 -
Abb. 16: Der konzentrationsabhängige Einfluss von C2DA auf die Biofilmbildung von <i>C. difficile</i> VPI 10463.....	- 54 -
Abb. 17: Lebend-Tot-Färbung von <i>C. difficile</i> 630 Biofilmen nach Beschichtung mit D-Aminosäuren.....	- 57 -
Abb. 18: Biofilmbildung von <i>C. difficile</i> auf mit 500 µM D-Aminosäuren beschichteter Oberfläche.....	- 59 -
Abb. 19: Biofilmbildung von <i>C. difficile</i> auf mit 1000 µM D-Aminosäuren beschichteter Oberflächen.....	- 60 -
Abb. 20: Quantifizierung der Biofilmmasse von <i>C. difficile</i> nach Zugabe von D-Aminosäuren.....	- 61 -
Abb. 21: Agarosegelelektrophorese nach Amplifikation der Zielgene.....	- 64 -
Abb. 22: Gelelektrophorese nach Restriktion des Vektors pYSG-IBA143:: <i>Sm22.6</i>	- 65 -
Abb. 23: Agarosegelelektrophorese nach Kolonie PCR.....	- 65 -
Abb. 24: SDS-PAGE und korrespondierender Westernblot von rSm22.6.....	- 66 -

Abb. 25: SDS-PAGE nach Affinitätschromatografie von rSm22.6.	- 67 -
Abb. 26: SDS-PAGE und korrespondierender Westernblot der Elutionsfraktionen von rSm22.6.....	- 68 -
Abb. 27: Einfluss von rSm22.6 kDa auf die Biofilmbildung von <i>C. difficile</i>	- 70 -
Abb. 28: Agarosegelelektrophorese Sm 22.6.	- 97 -
Abb. 29: Agarosegelelektrophorese SmEno.....	- 98 -
Abb. 30: Agarosegelelektrophorese nach Gradienten PCR SmNpp-5.....	- 99 -
Abb. 31: Nukleotidsequenz von Sm22.6 nach Sequenzierung positiver Plasmide.....	- 99 -

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Durchschnittliche Infektionsraten verschiedener Implantattypen	- 9 -
Tab. 2: Charakterisierung klinischer <i>C. difficile</i> Isolate	- 17 -
Tab. 3: Verwendete Antibiotika	- 19 -
Tab. 4: Verwendete Restriktionsendonuklease mit Erkennungsstellen	- 27 -
Tab. 5: Biofilm von <i>C. difficile</i> 630.....	- 55 -
Tab. 6: Biofilm von <i>C. difficile</i> VPI 10463.....	- 55 -
Tab. 7: Konzentration und Reinheit der isolierten RNA	- 63 -
Tab. 8: Konzentration und Reinheit der synthetisierten cDNA.....	- 63 -
Tab. 9: Verwendete Geräte und Bezugsquellen	- 87 -
Tab. 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Bezugsquellen	- 89 -
Tab. 11: Verwendete Chemikalien und Bezugsquellen	- 89 -
Tab. 12: Verwendete Software und Bezugsquellen	- 92 -
Tab. 13: Organismen	- 93 -
Tab. 14: Vektoren	- 94 -
Tab. 15: rekombinante Plasmide	- 95 -
Tab. 16: Oligonukleotide für die Klonierung des GOI in den Entry Vector	- 96 -
Tab. 17: Oligonukleotide für die Kolonie PCR	- 96 -
Tab. 18: Oligonukleotide für die Sequenzierung.....	- 96 -
Tab. 19: Lokalisation wichtiger Sequenzen des Plasmids pYSG-IBA143.....	- 100 -
Tab. 20: Lokalisation wichtiger Sequenzen des Plasmid pENTRY-IBA51	- 100 -

Abkürzungs – und Symbolverzeichnis

α	alpha
μ	mikro
Ω	Ohm
∞	unendlich
®	Eingetragene Handelsmarke
™	Handelsmarke
A.	Aqua
Abb.	Abbildung
<i>ad</i>	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
Bp	Basenpaar
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C.	<i>Clostridioides / Clostridium</i>
C2DA	<i>Cis-2-Decensäure</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CuSO ₄	Kupfersulfat
d	desoxy
D-Met	D-Methionin
D-Phe	D-Phenylalanin
D-Pro	D-Prolin
D-Tyr	D-Tyrosin
Da	Dalton
<i>dest.</i>	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-triphosphat
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (lat., und andere)
F	Farad
fw	<i>forward</i>
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
k	Kilo
l	Liter
Leu	Leucin

m	Meter
min	Minute
n	Nano, Anzahl der biologischen Replikate
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NEB	New England Biolabs
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	<i>reverse</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Ura	Uracil
V	Volt
w/o	ohne
x-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommene Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, 19. Juni 2023

Unterschrift:

Danksagung

Diese Arbeit entsammt zwar meiner Feder, dennoch wäre sie ohne die Unterstützung einiger Menschen nicht zustande gekommen. Diesen Personen gehört mein allergrößter Dank.

Herrn **Prof. Dr. Hubert Bahl** danke ich für die Möglichkeit, ein spannendes Projekt bearbeiten zu dürfen und für das in mich gesetzte Vertrauen.

Ich möchte mich auch für die Übernahme des Zweitgutachtens und den damit verbundenen Aufwand herzlich bedanken.

Ein großer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Klaus-Peter Schmitz** für die Unterstützung und Motivation bei der Fertigstellung der Dissertation. In diesem Atemzug möchte ich auch meinen neuen Kollegen am IIB e.V. danken. Insbesondere Herrn **Dr. Stefan Siewert** und Frau **Dr. Valeria Khaimov** danke ich für ihre Unterstützung.

Meiner ehemaligen Arbeitsgruppe der Mikrobiologie am Institut für Biowissenschaften der Universität Rostock möchte ich ebenfalls einen großen Dank aussprechen. Ihr habt mich herzlich bei euch aufgenommen und standet mir mit Rat und Tat stets zur Seite. Dabei möchte ich Herrn **Dr. Ralf-Jörg Fischer** für seine fachliche Unterstützung danken. Frau **Dr. Maria Lehmann** gehört mein Dank für die Einweisung in alle kleinen Feinheiten im Labor und die vielen selbstgebackenen oder organisierten Kuchen. Für die praktische Unterstützung im Labor danke ich Frau **Hella Goschke**, Frau **Ilona Boldt**, Frau **Manja Henneberg** und Frau **Anne Haberberger** sehr herzlich.

Frau **Alessa Knoop-Lübke** danke ich für alles. Für das was war und das was kommt.

Meiner **Familie** und meinen **Freunden** danke ich von Herzen für ihre Unterstützung über den gesamten Zeitraum.

Ein extragroßes Dankeschön gebührt dabei Frau **Dr. Katja Weiß**. Katja, du bist mit mir meine ersten Schritte in der Mikrobiologie gegangen und hast mich über die gesamte Zeit der Doktorarbeit immer unterstützt und an mich geglaubt. Du bist eine großartige Freundin!

Zum Schluss gehört mein großer Dank meinem Mann. **Hannes**, du warst die ganze Zeit an meiner Seite, hast mitgelitten dich mitgefremt und mich auf jede denkbare Art und Weise unterstützt. Ich freue mich auf unser weiteres gemeinsames Leben.