



Master-Abschlussarbeit

Thema: Entwicklung eines neuen Testsystems für die PNAG-Deacetylase (IcaB) aus *Staphylococcus epidermidis*

Zusammenfassung:

Biofilmbedingte Infektionen machen einen erheblichen Anteil an nosokomialen Infektionen aus. Ein weit verbreiteter Erreger ist das ansonsten nicht-pathogene Bakterium *Staphylococcus epidermidis*. Dieses ist in der Lage, durch eine Umstellung des Stoffwechsels eine extrazelluläre Matrix auszubilden und sich damit als bakterieller Biofilm auf Kunststoffoberflächen anzusiedeln. Hauptbestandteil dieser extrazellulären Matrix ist das Polysaccharid PNAG (Poly- β -(1,6)-N-Acetylglucosamin), das in der Zelle gebildet und dann ausgeschleust wird. Außerhalb der Zellmembran werden durch das Enzym PNAG-Deacetylase (IcaB) ca. 20 % der Acetylgruppen abgespalten, was die chemische Struktur des Polymers ändert und entscheidend für die Biofilmbildung ist. Eine Hemmung dieses Enzyms wäre eine wirksame Möglichkeit, die Biofilmbildung auf Implantaten, Kathetern und ähnlichem zu verhindern. Um Inhibitoren für dieses Enzym, zum Beispiel Naturstoffe aus Algen, identifizieren zu können, wird ein Testsystem benötigt. Dieses soll bei physiologischen Bedingungen funktionieren und mit dem natürlichen Substrat PNAG arbeiten, das aus *Staphylococcus epidermidis*-Biofilm isoliert wird und dann reacyliert wird. Das zu untersuchende Enzym, IcaB aus *Staphylococcus epidermidis*, kann rekombinant aus einem *E. coli*-Produktionsstamm gewonnen werden. Dabei wird eine Affinitätschromatographie eingesetzt, bei der das Zielprotein auf der Chitinsäule vom Intein-Tag abgespalten wird.

In dieser Arbeit konnte für die Proteinaufreinigung eine FPLC-Methode entwickelt werden, mit der reproduzierbar und in hoher Reinheit IcaB für den Aktivitätstest gewonnen werden konnte. Für den Aktivitätstest wurde ein diskontinuierliches Verfahren etabliert, bei dem die Enzymaktivität über die Produktbildung bestimmt wird. Mit einem enzymatischen Nachweisverfahren kann die Menge der durch IcaB abgespalteten Acetationen erfasst werden. Neben dem natürlichen Substrat PNAG, das frisch aus *S. epidermidis*-Biofilm gewonnen wurde, konnten synthetische PNAG-Oligomere als Vergleich eingesetzt werden. Um einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen, wird der hier entwickelte Test im Mikrotiterplattenformat durchgeführt.

Verfasser/in: Ralph Müller

Betreuer/in: Prof Dr. Uwe Englisch; Dr. Britta Beyerlein

Datum der Abgabe: 10.07.2018