

**Aus dem Institut für  
Medizinische Mikrobiologie und Immunologie  
der Universität Hamburg  
Direktor: Prof. Dr. R. Laufs**

Phänotypische Charakterisierung biofilmbnegativer Transposonmutanten: Identifizierung  
des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins als Hämagglutinin von *Staphylococcus  
epidermidis*

**Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg**

**vorgelegt von  
Joachim Riedewald  
aus Hamburg**

**Hamburg 2001**

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 23.10.2001

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Medizin  
der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagner

Referent: Prof. Dr. D. Mack

Koreferent: Prof. Dr. R. Laufs

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>1.1</b>	<b>Koagulasenegative Staphylokokken</b>	<b>3</b>
1.1.1	Einteilung und Vorkommen der Staphylokokken	3
1.1.2	Klinische Bedeutung koagulasenegativer Staphylokokken	5
1.1.3	Pathogenese fremdkörperassoziierter Infektionen durch <i>S. epidermidis</i>	8
<b>1.2</b>	<b>Ziele dieser Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>15</b>
2.1.1	Geräte	15
2.1.2	Chemikalien	16
2.1.3	Bakterienstämme	17
2.1.4	Nährmedien	18
2.1.5	Lösungen	19
2.1.6	Puffer	19
2.1.7	Antiseren	20
2.1.8	Erythrozyten	20
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>21</b>
2.2.1	Kolonienmorphologie und Mukoidbildung	21
2.2.2	Darstellung der Zellclusterbildung mittels Gram-Färbung	21
2.2.3	Adhärenztest zur Quantifizierung der Biofilmbildung durch photometrische Messung	22
2.2.4	Bestimmung der primären Bindung von in Schüttelkulturen angezüchteten <i>S. epidermidis</i> Stämmen	23
2.2.5	Bestimmung der primären Bindung von auf Gewebekulturschalen angezüchteten <i>S. epidermidis</i> Stämmen	23
2.2.6	Präparation der IgG-Fraktionen	24
2.2.7	Antikörpernachweis in IgG-Fraktionen mittels indirektem Immunfluoreszenz-test	25
2.2.8	Präparation von Bakterienextrakten zur Bestimmung des PIA-Gehaltes durch Ultraschallbehandlung	26
2.2.9	Herstellung des Koagglutinationsreagenz	27
2.2.10	Koagglutinationstest zur Bestimmung des PIA-Gehaltes in Bakterienextrakten	28
2.2.11	Präparation und Reinigung von PIA	28
2.2.12	Hexosamintest	30
2.2.13	Hämagglutinationstest	30
2.2.14	Hämagglutinationshemmung durch Antikörper	31
2.2.15	Hämagglutinationshemmung durch PIA	32

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Phänotypische Charakterisierung der biofilmbnegativen Mutanten</b>	<b>33</b>
3.1.1	Vorbemerkung	33
3.1.2	Adhärenztest zur Biofilmquantifizierung durch photometrische Messung	34
3.1.3	Kolonienmorphologie, Mukoid- und Zellclusterbildung der Tn917 Mutanten	36
3.1.4	Quantifizierung der PIA-Synthese in Bakterienextrakten	39
3.1.5	Bestimmung der primären Bindung von in Schüttelkulturen angezüchteten <i>S. epidermidis</i> Stämmen	41
3.1.6	Bestimmung der primären Bindung von auf Gewebekulturschalen angezüchteten <i>S. epidermidis</i> Stämmen	43
3.1.7	Weiterführende Untersuchungen zur primären Bindung der Mutante M12	45
<b>3.2</b>	<b>Funktioneller Zusammenhang zwischen dem Hämagglutinin und PIA</b>	<b>49</b>
3.2.1	Vorbemerkung	49
3.2.2	Hämagglutinationstest in PBS	49
3.2.3	Hämagglutinationshemmung durch spezifische Antikörper	51
3.2.4	Hämagglutinationshemmung durch PIA	54
3.2.5	Kontrollversuche zum Antikörpernachweis in den jeweiligen IgG-Fraktionen mittels indirektem Immunfluoreszenztest sowie PIA-Nachweis im Hexosamintest	56
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>87</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Koagulasenegative Staphylokokken

### 1.1.1 Einteilung und Vorkommen der Staphylokokken

In seinem Vortrag „Über Abscesse“ beschrieb der schottische Chirurg A. Ogston 1880 in Haufen liegende traubenförmig angeordnete Kokken. Aufgrund ihres Erscheinungsbildes nannte er sie nach dem griechischen Wort *staphylé* (Weintraube) Staphylokokken.

Staphylokokken sind grampositive einzeln, in Paaren, kleinen Ketten oder Haufen vorkommende Kokken mit einem Durchmesser von ca. 0,5 bis 1,5 µm. Sie sind unbeweglich, bilden keine Sporen und sind normalerweise nicht bekapselt. Mit Ausnahme von *S. saccharolyticus* und *S. aureus* subsp. *anaerobius* sind sie katalasepositiv und fakultativ anaerob. Die Pigmentierung der runden, glänzenden ca. 1-2 mm durchmessenden Kolonien variiert von grau über weiß bis goldgelb. Die Farbe der Kolonien wird durch zu den Karotinoiden gehörende Pigmente hervorgerufen, die schädigendes Licht und UV-Strahlen abhalten sollen (Peters und Pulverer, 1994). In den Zellwänden der Staphylokokken lassen sich Peptidoglykane und Teichonsäuren finden. Die Interpeptidbrücken der Peptidoglykane bestehen aus Oligoglycinen. Die abhängig von der Spezies aus verschiedenen Polyphosphaten bestehenden Teichonsäuren der Zellwände können durch Glucose, N-Acetylgalactosamin und N-Acetylglucosamin substituiert sein (Schleifer, 1986a).

Taxonomisch zählt die Gattung *Staphylococcus* zusammen mit den Gattungen *Micrococcus*, *Planococcus* und *Stomatococcus* zur Familie der *Micrococcaceae* (Schleifer, 1986b). Insgesamt umfaßt die Gattung *Staphylococcus* bisher 32 Spezies, die anhand ihrer physiologischen, morphologischen, biochemischen, enzymatischen Merkmale und ihrer chemotaxonomischen Zellwandzusammensetzungen unterschieden werden (Kloos und Bannerman, 1994; Schumacher-Perdreau et al., 1983). Die weitere Unterteilung der Staphylokokken erfolgt in plasmakoagulasenegative und -positive Staphylokokken. Bereits 1926 beschrieb J. v. Darányi einen Zusammenhang zwischen dem pathogenen Potential einiger Staphylokokkenarten und deren Fähigkeit Plasma zu verklumpen. Für die Verklumpung des Plasmas wurde die Plasmakoagulase verantwortlich gemacht, ein

extrazelluläres Enzym, das durch Bindung an Prothrombin das sogenannte Staphthrombin bildet. Dieses bewirkt die Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin. Die so entstehenden Fibrinpolymere bilden einen Schutzwall um die eingedrungenen Bakterien, die sich ungestört vermehren und schwere Infektionen verursachen können. Die Einteilung in koagulasepositive und pathogene (*S. aureus*-Gruppe) sowie koagulasenegative und apathogene Staphylokokken hat sich in der klinischen Praxis bewährt und wird bis heute aus Gründen der Praktikabilität beibehalten.

Zur Gruppe der koagulasepositiven Staphylokokken gehören die Spezies *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus* und *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, von denen *S. aureus* eine bedeutende humanpathogene und klinische Bedeutung besitzt. Die anderen Arten finden sich normalerweise nur im Tierreich. Die Gruppe der koagulasenegativen Staphylokokken läßt sich weiter in Novobiocin empfindliche (*S. epidermidis*-Gruppe) und Novobiocin resistente (*S. saprophyticus*-Gruppe) Stämme unterteilen. Die folgende Tabelle enthält eine Übersicht der bekannten koagulasenegativen Staphylokokken (Kloos und Bannermann, 1994).

<b>Tabelle 1</b>	<b>Zur Zeit bekannte koagulasenegative Staphylokokken</b>
------------------	---

<b>Koagulasenegative Staphylokokken</b>			
<u>Novobiocin-sensibel</u>		<u>Novobiocin-resistent</u>	
Vorkommen		Vorkommen	
Mensch-Primaten	Tier-Lebensmittel	Mensch-Primaten	Tier-Lebensmittel
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. hominis</i>	<i>S. caseolyticus</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. xylosus</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. felis</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. sciuri</i>
<i>S. capitis</i>	<i>S. chromogenes</i>		<i>S. lentus</i>
<i>S. auricularis</i>	<i>S. piscifermentans</i>		<i>S. gallinarum</i>
<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. muscae</i>		<i>S. arlettae</i>
<i>S. schleiferi</i>	<i>S. schleiferi</i>		<i>S. kloosii</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. caprae</i>		<i>S. equorum</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>		<i>S. vitulus</i>
<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i>		
<i>S. saccharolyticus</i>			
<i>S. pasteurii</i>			

Staphylokokken sind in der Natur weit verbreitet. Sie besiedeln vorzugsweise die Haut, Hautdrüsen und Schleimhäute von Säugetieren und Vögeln. Seltener trifft man sie im Mund, Blut, der Brustdrüse und im Gastro-, Urogenital- und oberen Respirationstrakt an. Die den Menschen besiedelnden Stämme finden sich in unterschiedlicher Häufigkeit an verschiedenen Körperarealen und Öffnungen (Kloos, 1986; Kloos und Musselwhite, 1975). *S. capitis* besiedelt vornehmlich die seborrhoischen Areale im Kopfbereich des Erwachsenen (Kloos, 1986). Der äußere Gehörgang ist reich an *S. auricularis*, wohingegen *S. hominis* und *S. haemolyticus* die Axillen und die Schamgegend bevorzugen (Kloos, 1986; Kloos und Schleifer, 1983; Kloos und Musselwhite, 1975). Durch die Fähigkeit zur Adhäsion an Urothelzellen und der Bildung von Urease, ist es *S. saprophyticus* möglich im Urogenitaltrakt zu existieren (Colleen et al., 1979).

Der mit 65-90 % am häufigsten beim Menschen isolierte Stamm ist *S. epidermidis* mit einer Ausdehnung über den gesamten Körper, wobei feuchte Regionen bevorzugt besiedelt werden (Kloos, 1997; Kloos, 1986; Kloos und Musselwhite, 1975). Weitaus seltener lassen sich *S. warneri* und *S. lugdunensis* von der gesamten Körperoberfläche isolieren. *S. schleiferi*, *S. intermedius* und *S. felis* findet man üblicherweise auf Carnivoren. Ein Hundebiß kann Ursache einer *S. intermedius*-Infektion darstellen und *S. schleiferi* ist auch beim Menschen in der Lage schwere Infektionen hervorzurufen. Huftiere und deren Milch und Fleischprodukte werden gewöhnlich von *S. lentus*, *S. vitulus*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. sciuri* und *S. caseolyticus* besiedelt.

### 1.1.2 Klinische Bedeutung koagulasenegativer Staphylokokken

Koagulasenegative Staphylokokken wurden lange Zeit als Prototyp apathogener Erreger angesehen. In klinischen Untersuchungsmaterialien nachgewiesene koagulasenegative Staphylokokken galten bis zu den 70er Jahren üblicherweise als Kontamination. Daran vermochten auch frühere Veröffentlichungen über Zusammenhänge zwischen koagulasenegativen Staphylokokken und einigen Erkrankungen nichts zu ändern.

Erstmals beschrieben Smith et al. (1958) anhand von Sepsis-Patienten das pathogene Potential von koagulasenegativen Staphylokokken. Sowohl Pulverer und Halswick (1967) als auch Brandt und Swahn (1960) machten koagulasenegative Staphylokokken für das Auftreten von Endokarditisfällen verantwortlich. Wundinfektionen (Wilson und Stuart, 1965), Eiterherde (Pulverer und Pillich, 1971), Harnwegsinfekte (Pereira, 1962; Gallagher

et al., 1965; Mabeck, 1969), Kolonisation von ventrikulo-atrialen und -peritonealen Shunts mit folgender Sepsis (Holt, 1971; Pulverer, 1985) wurden mit koagulasenegativen Staphylokokken in Verbindung gebracht. Durch die wachsende Zahl von Berichten veränderte sich das Bild der koagulasenegativen Staphylokokken und seit Anfang der 80er Jahre haben Infektionen mit koagulasenegativen Staphylokokken kontinuierlich an Bedeutung gewonnen (Martin et al., 1989; Stillman et al., 1987; Ponce de Leon und Wenzel, 1984). In einem Bericht des National Nosocomial Infections Surveillance Systems standen koagulasenegative Staphylokokken zwischen den späten 80ern und den frühen 90ern an fünfter Stelle der am häufigsten isolierten nosokomialen Erreger (Jarvis und Martone, 1992; Schaberg et al., 1991). Koagulasenegative Staphylokokken rangierten bei Blutkulturisolaten nosokomialer Bakteriämien mit 27 bis 27,9 % sogar an erster Stelle, wobei *S. aureus* mit 16 bis 16,5 % an zweiter Stelle lag.

Mittlerweile sind koagulasenegative Staphylokokken im klinischen mikrobiologischen Labor die am häufigsten isolierten Erreger überhaupt. *S. epidermidis* ist die am häufigsten isolierte Spezies der Gruppe der koagulasenegativen Staphylokokken und verursacht durch seine Fähigkeit an Polymeroberflächen zu adhären mehr fremdkörperassoziierte Infektionen als jedes andere Bakterium. Zu dem breiten Spektrum *S. epidermidis* bedingter, meist chronischer Infektionen gehören Bakteriämie (Baumgart et al., 1983; Martin et al., 1989), Pyoarthritiden (Males et al., 1985), Osteomyelitis (Males et al., 1985; Paley et al., 1986), Mediastinitis (Bor et al., 1983), Peritonitis durch Infektion eines CAPD-Katheters (Kraus und Spector, 1983; Rubin et al., 1980), Infektionen intravaskulärer Katheter (Peters et al., 1982 und 1984), natürlicher und künstlicher Herzklappen (Archer et al., 1980; Baddour et al., 1986; Richardson et al. 1978), künstlicher Schrittmacher (Choo et al., 1981), Gefäßprothesen (Bandyk et al., 1984), Liquorshunts (George et al., 1979), Gelenkprothesen (Brause, 1986; Clarke, 1979; Morris et al., 1986), künstlicher Linsen (Driebe et al., 1986), Silikonprothesen nach Mammoplastik (Jansen und Peters, 1993) und des künstlichen Herzens (Gristina et al., 1988).

Nach *S. epidermidis* wird *S. haemolyticus* am zweithäufigsten im klinischen Labor isoliert. Infektionen der natürlichen Herzklappen (Caputo et al., 1987), Peritonitis (Gruer et al., 1984), Sepsis (Gill et al., 1983), Harnwegsinfekte (John et al., 1978), Wund-, Gelenk- und Knocheninfektionen (Fleurette et al., 1987; Nord et al., 1976) gehören zu den durch *S. haemolyticus* verursachten Krankheitsbildern. *S. saprophyticus* ist verantwortlich für das Dysurie-Syndrom bei jungen, sexuell aktiven Frauen (Anderson et al., 1981; Marrie et al.,

1982; Wallmark et al., 1978) und für einen Teil der unspezifischen Urethritis bei sexuell aktiven Männern. Des Weiteren werden *S. warneri*, *S. hominis* und *S. simulans* in geringer Häufigkeit mit verschiedenen Infektionen des Menschen in Zusammenhang gebracht (Dan et al., 1984; Leighton und Little, 1986; Fleurette et al., 1987; Males et al., 1985).

Koagulasenegative Staphylokokken machen einen großen Teil der menschlichen Haut- und Schleimhautflora aus und rufen unter normalen Umständen beim gesunden, immunkompetenten Menschen keinerlei Infektionen hervor (Lowy und Hammer, 1983; Kloos, 1997; Noble, 1997). Durch eine Verletzung der Haut (z. B. Nadelstich, Katheter, Wunde, Implantation von Fremdkörpern) können die Bakterien ins Innere des Körpers gelangen. Die Entstehung einer Infektion hängt von unterschiedlichen Fähigkeiten der Bakterien ab. Dazu gehört die Anlagerung an körpereigene oder körperfremde Oberflächen sowie die Sezernierung gewebeschädigender Substanzen. Des Weiteren bilden die Bakterien Faktoren oder Stoffe, die einen schützenden Effekt vor der körpereigenen Abwehr oder einer angesetzten Antibiotikatherapie zu haben scheinen. So ist *S. epidermidis* in der Lage sich an Polymeroberflächen von Fremdkörpern anzulagern und durch Ausbildung eines Biofilms der körpereigenen Abwehr oder einer Antibiotikatherapie zu widerstehen (Archer, 1994; Raad et al., 1998).

Da die Implantation und das Einführen von Fremdkörpern (Gelenke, Katheter, Herzklappen usw.) für begrenzte und auch unbegrenzte Zeit in der modernen Medizin in den letzten Jahrzehnten einen immer größeren Stellenwert eingenommen hat, ist die Zunahme der durch koagulasenegative Staphylokokken verursachten Infektionen keineswegs verwunderlich. Neben dem häufigsten Weg der endogenen Infektion durch auf der Haut des Patienten lebende koagulasenegative Staphylokokken, sind Berichte über jahrelang auf Stationen persistierende Bakterien und damit verbundenen nosokomialen Infektionen bekannt geworden (Hübner et al., 1994; Rupp und Archer, 1994).

Die wachsende Zahl immungeschwächter hospitalisierter Patienten (Frühgeborene, Intensiv-, Tumor- und Transplantationspatienten) die mit Fremdmaterialien versorgt werden, begünstigt zusätzlich die Entstehung fremdkörperassoziiierter Infektionen. Bei diesen Patienten können Infektionen mit koagulasenegativen Staphylokokken häufig eine lebensbedrohliche Situation bedeuten.

### 1.1.3 Pathogenese fremdkörperassoziierter Infektionen durch *S. epidermidis*

Als das pathogene Potential koagulasenegativer Staphylokokken erkannt worden war, suchte man nach Faktoren, Mechanismen und Eigenschaften die den gewöhnlich apathogenen Bakterien ihre krankheitsverursachenden Fähigkeiten verliehen. In einem Bericht von Bayston und Penny (1972) wurde zum erstenmal ein möglicher Zusammenhang zwischen der Pathogenität koagulasenegativer Staphylokokken und der Ausbildung eines „mukoiden“ Filmes beschrieben. Sie fanden heraus, daß von Kindern mit einer Liquorshuntinfektion isolierte koagulasenegative Staphylokokken in vitro die Fähigkeit besaßen, festhaftende „mukoide“ Ablagerungen auf Shunts zu bilden.

Diese Beobachtung veranlaßte sie zu der Annahme, daß dieses „mukoide“ Material wichtig für die Entstehung von Liquorshuntinfektionen sei. Die Fähigkeit zur Bildung „mukoiden“ oder auch als „Schleim“ beschriebenen Materials vieler koagulasenegativer Staphylokokken beobachteten bereits sowohl Baird-Parker (1965) als auch Jones und seine Mitarbeiter (1963). Sie maßen diesem Phänomen jedoch für die Pathogenität koagulasenegativer Staphylokokken keine Bedeutung zu.

Erst gegen Ende der 70er und Anfang der 80er Jahre, als sich die Bedeutung koagulasenegativer Staphylokokken als nosokomialer Sepsis-Erreger etablierte, begannen intensive Forschungen zur Aufklärung dieser Pathogenitätsfaktoren. Die Gruppe um Christensen (1982) beschrieb erstmals einen möglichen Zusammenhang zwischen der Produktion von Schleim und der Besiedlung von Fremdkörpern mit daraus resultierender Infektion. Da unterschiedliche Autoren den Begriff „Schleim“ für verschiedene Phänomene benutzten (Bayston und Rogers, 1990; Christensen et al., 1982; Hussain et al., 1993; Peters et al., 1987), findet heute allgemein die Bezeichnung „Biofilm“ im Zusammenhang mit dieser Eigenschaft von *S. epidermidis* Verwendung.

In den nachfolgenden Jahren erschienen verschiedene Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Ausbildung eines Biofilms und der klinischen Relevanz der Erreger zeigten (Ponce de Leon et al., 1986; Richter, 1987; Etienne et al., 1988; Skoutelis et al., 1990). Dieser Zusammenhang konnte sowohl bezüglich der Entwicklung einer Infektion als auch ihrer Persistenz beobachtet werden (Younger et al., 1987; Davenport et al., 1986). Des weiteren zeigte sich eine Korrelation zwischen Biofilmbildung und dem Versagen therapeutischer Maßnahmen, wie z. B. einer Antibiotikatherapie (Raad et al., 1998; Archer, 1994; Diaz-Mitoma et al., 1987; Kristinsson et al., 1986; Deighton et al., 1990;

Beaman et al., 1987). Darüberhinaus wurde *in vitro* eine Suppression der lymphoproliferativen Antwort durch im Biofilm enthaltene Substanzen beobachtet (Gray et al., 1984). Einen Zusammenhang zwischen der Interaktion des Biofilms mit Funktionen (Chemotaxis, Degranulation, Phagozytose) neutrophiler Granulozyten und der Persistenz von *S. epidermidis* verursachten Fremdkörperinfektionen entdeckten Johnson et al. (1986). Zur Unterscheidung biofilmm negativer von biofilmm positiven *S. epidermidis* Stämmen wurden semiquantitative Tests entwickelt, mit deren Hilfe biofilmm positive Stämme wesentlich häufiger bei klinisch relevanten Infektionen nachgewiesen werden konnten (Christensen et al., 1982; Davenport et al., 1987; Deighton und Balkau, 1990; Ishak et al., 1985; Younger et al., 1987; Ziebuhr et al., 1997). Kürzlich veröffentlichte Tier-Infektionsmodelle unterstreichen ebenfalls den Zusammenhang zwischen Pathogenität und Biofilmbildung von *S. epidermidis* (Rupp et al., 1999a und 1999b). Die Bildung eines Biofilms scheint demnach für die Pathogenese fremdkörperassoziiierter Infektionen eine zentrale Bedeutung zu haben.

Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte *in vitro* die Entstehung des Biofilms auf Polymeroberflächen beobachtet werden (Christensen et al., 1982; Peters et al., 1981; Costerton et al., 1987; Marrie und Costerton, 1984; Franson et al., 1984). Nach heutigem Wissen läuft die Biofilmbildung in verschiedenen aufeinanderfolgenden Schritten ab. *In vitro* kommt es sowohl durch unspezifische als auch spezifische Faktoren in einem ersten Schritt, der auch als primäre Bindung bezeichnet wird, zu einer Anlagerung der Bakterien an künstliche Polymeroberflächen.

Zu den unspezifischen Faktoren gehören unter anderem elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, die Gravitationskraft, die Dynamik des flüssigen Mediums sowie das Kunststoffmaterial (Fleer and Verhoef, 1989; Jansen et al., 1989; Hogt et al., 1985; Ludwicka et al., 1984b). Des Weiteren wird die primäre Bindung von verschiedenen Wirtsproteinen beeinflusst. So inhibieren Serum, Plasma, oder Albumin die Bindung an Polymeroberflächen (Espersen et al., 1990; Hogt et al. 1986; Pascual et al., 1986). Fibronectin und in abgeschwächter Form Fibrinogen verstärken die Bindung an eine mit Albumin vorbehandelte Polymeroberfläche (Herrmann et al., 1988). Ob eine unbehandelte oder eine mit Wirtsmatrixproteinen besetzte Polymeroberfläche für die Bindung von *S. epidermidis* *in vivo* entscheidend ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

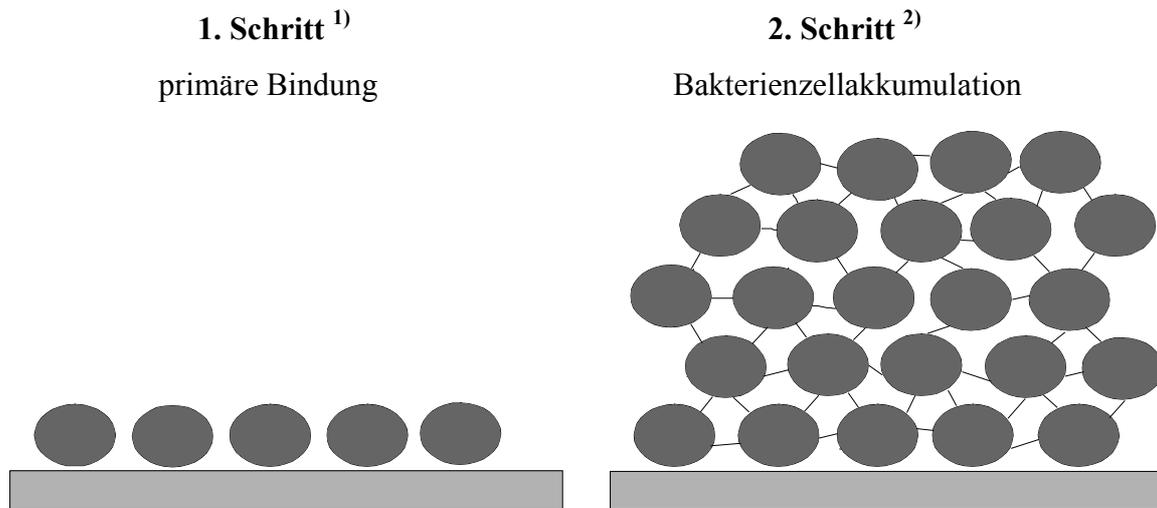
Der Suche nach spezifischen Faktoren widmeten sich verschiedene Arbeitsgruppen. Tojo und seine Mitarbeiter (1988) stellten ein kapsuläres Polysaccharid-Adhäsin (PS/A) vor,

welches sie für die spezifische Bindung von *S. epidermidis* RP62A an Silastic-Kathetern verantwortlich machten. PS/A besteht zu gleichen Teilen aus Galaktose und Arabinose und besitzt ein Molekulargewicht von mehr als 500000. In nachfolgenden Tiermodellen wurde die Bedeutung von PS/A als ein Virulenzfaktor koagulasenegativer Staphylokokken nachgewiesen (Kojima et al., 1990; Takeda et al., 1991; Shiro et al., 1994; Shiro et al., 1995). Nahezu die Hälfte der PS/A positiven *S. epidermidis* Stämme war biofilmbnegativ, was zusätzliche Faktoren für die Biofilmbildung forderte (Muller et al., 1993b). Bei *S. epidermidis* 354 konnte mittels spezifischer monoklonaler Antikörper ein zellwandständiges 220 kDa proteinhaltiges Oberflächenantigen (staphylococcal surface proteins: SSP-1 und SSP-2) identifiziert werden, das die Adhäsion an Polystyrolkugeln vermittelt (Timmerman et al., 1991). Mitarbeiter der gleichen Gruppe zeigten, daß dieses Antigen an fimbrienartigen Fortsätzen der Bakterienoberfläche sitzt (Veenstra et al., 1996). Heilmann und Mitarbeiter (1996) machten ein 60 kDa Protein, welches sie aus Tn917 Mutanten von *S. epidermidis* O-47 isolierten, für die Adhäsion an Glas verantwortlich. Die reduzierte Bindungsfähigkeit der Tn917 Mutante Mut1 an Polystyrol führte zu der Entdeckung eines 148 kDa Proteins AtlE. Dieses Protein wird auf der Bakterienoberfläche exprimiert und besteht aus einer Amidase und Glucosaminidase Domäne. Ob AtlE eine direkte Bindung vermittelt oder das eigentliche Adhäsion exponiert, ist bislang noch unklar (Heilmann et al., 1997).

Ein kürzlich isoliertes Protein Fbe mit einem Molekulargewicht von 119 kDa ist in der Lage an Fibrinogen zu binden. Es weist eine Ähnlichkeit mit dem Clumpingfaktor von *S. aureus* auf. Da die *fbe*-positiven Stämme sehr unterschiedlich an Fibrinogen adhärirten, könnte eine verschieden stark ausgeprägte Expression des Proteins oder ein noch unbekannter Kofaktor für die Bindung an Fibrinogen verantwortlich sein (Nilsson et al., 1998). Sowohl kohlenhydrathaltige als auch proteinhaltige Faktoren konnten demnach für die primäre Bindung identifiziert werden (Heilmann et al., 1996a; Heilmann et al., 1996b).

Diesem ersten, wenige Minuten dauernden Schritt folgt eine akkumulative Phase, in der die Zellen in eine extrazelluläre Matrix eingebettet, untereinander adhärirten und mehrschichtige Zellcluster ausbilden (Peters et al., 1982). Die Anzahl der an der Polymeroberfläche adhärirten Zellen ist im Vergleich zu den Vernetzungen der Zellen untereinander relativ gering (s. Abbildung 1).

**Abbildung 1 Schritte der Biofilmbildung**



<sup>1)</sup> Wenige Minuten dauernder erster Schritt, bei dem sich ein Teil der Bakterien an die Polymeroberfläche anlagert.

<sup>2)</sup> Zweiter Schritt, in dem eine intensive Vernetzung der Bakterienzellen untereinander und die Einbettung in eine extrazelluläre Matrix erfolgt.

Da die für die primäre Bindung verantwortlich gemachten spezifischen Faktoren sowohl bei Biofilmbildnern als auch bei biofilmmnegativen *S. epidermidis* Stämmen gefunden wurden (Muller et al., 1993b), mußte es weitere Faktoren geben, die eine Bindung der Zellen untereinander vermitteln konnten.

Ein Ansatz war die Analyse der von den Zellen gebildeten extrazellulären amorphen Substanz verschiedener *S. epidermidis* Stämme (Arvaniti et al., 1994; Christensen et al., 1990; Ludwicka et al., 1984a). Es ließen sich komplexe Kohlenhydratverbindungen aus der Extrazellulärschicht isolieren (Kotilainen et al., 1990), deren ursächliche Zusammenhänge mit der Biofilmbildung jedoch nicht eindeutig gezeigt werden konnten. Erschwerend kamen Kontaminationen aus den verwendeten Nährmedien hinzu (Drewry et al., 1990; Hussain et al., 1991).

Nachdem in späteren Studien durch Verwendung chemisch definierter Medien und Dialysemembranen die Gefahr von Kontaminationen verringert werden konnte, erwies sich die Zusammensetzung der Extrazellulärschicht als hauptsächlich aus Teichonsäuren und diversen Proteinen bestehend (Hussain et al., 1992a; Hussain et al., 1993).

Zur Aufklärung der Pathogenitätsfaktoren erzeugten Mack und seine Arbeitsgruppe isogene Transposonmutanten M10 und M11 von dem biofilmpositiven Wildtyp 13-1.

Dabei handelt es sich um Mutanten, die sich durch Insertion eines Tn917 Transposons in das *icaADBC* Gencluster in nur einem Merkmal von ihrem Wildtyp unterscheiden (Mack et al., 1994; Mack et al., 1999). Mit Hilfe dieser isogenen Mutanten und eines spezifischen Antiserums konnte ein Polysaccharid identifiziert werden, das aus  $\beta$ -[1,6]-verknüpften N-Acetylglucosamineinheiten aufgebaut ist (Mack et al., 1992; Mack et al., 1994; Mack et al., 1996a; Mack et al., 1996b). Die funktionelle Bedeutung dieses interzellulären Polysaccharid-Adhäsins (PIA) für die Entstehung eines Biofilms konnte anhand von 179 klinischen *S. epidermidis*-Isolaten und verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden (Mack et al., 1996a; Rupp et al., 1999a und 1999b).

Die Transposoninsertion in das *icaADBC* Gencluster führte bei den ursprünglich biofilmpositiven *S. epidermidis*-Wildtypen zu einem Verlust der Biofilmbildung, der Zellaggregation und der PIA-Bildung (Mack et al., 1994; Heilmann et al., 1998; Heilmann et al., 1996b). Diese Gensequenz kodiert ein Transmembranprotein *IcaA*, das Ähnlichkeiten zu Acetylglucosaminyltransferasen aufweist, ein Sekretionsprotein *IcaB*, ein hydrophobes integrales Membranprotein *IcaC* und ein *IcaD*-Protein, das einen wichtigen Kofaktor für die Bildung von N-Acetylglucosamin-Oligomeren darstellt (Heilmann et al., 1996a; Gerke et al., 1998). Diese vier Gene sind für die PIA-Synthese verantwortlich, wobei noch andere unabhängige Enzyme die teilweise Deacetylierung der Glucosaminbausteine herbeiführen müssen. Zusätzlich zum *icaADBC* Gencluster konnten drei andere Genorte identifiziert werden, die einen direkten oder indirekten regulatorischen Einfluß auf die PIA produzierenden Gene auf der Ebene der Transkription zu haben scheinen (Mack et al., 2000).

Bei dem Versuch den Faktoren der Biofilmbildung auf die Spur zu kommen benutzten Christensen et al. (1990) einen polyklonalen Antikörper, mit dessen Hilfe sie eine Mischung aus Proteinen und Kohlenhydraten des Stammes RP62A entdeckten, die sie slime-associated antigen (SAA) nannten. Eine Ähnlichkeit in der chemischen Zusammensetzung von SAA und PIA fanden Baldassari und seine Mitarbeiter, als sie SAA in einer der PIA-Isolierung ähnlichen Prozedur analysierten (Baldassari et al., 1996). Demnach ist N-Acetylglucosamin eine wesentliche Komponente von SAA und somit dem PIA verwandt. Eine Ähnlichkeit des zuvor isolierten glucosereichen SAA mit PIA ist jedoch nach immunologischen Untersuchungen und weiterer Strukturaufklärung sehr unwahrscheinlich (Mack et al., 1994).

Des weiteren konnte ein von PIA und SAA unabhängiger Faktor für die Entstehung eines Biofilms isoliert werden. Durch Mitomycin-Mutagenese des biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stammes RP62A wurde eine Mutante M7 erzeugt, die die Fähigkeit zur Akkumulation bei erhaltener primärer Bindung verloren hatte. Die Mutante M7 wies verglichen mit dem Wildtyp ein Fehlen eines 140 kDa Proteins bei gleicher Wachstumsrate, Zellwandzusammensetzung, gleichem DNA-Fragmentmuster und Antibiotikaresistenzprofil auf. Dieses accumulation-associated protein (AAP) genannte Protein wird als weiterer Faktor für die Akkumulation biofilmpositiver Staphylokokken z. B. durch lectin-ähnliche Vernetzung von PIA diskutiert (Hussain et al., 1997).

Einen weiteren für die Besiedelung von Polymeroberflächen bedeutsamen Faktor stellten Rupp et al. (1992) vor. Sie zeigten einen Zusammenhang zwischen der Bindung von *S. epidermidis*-Stämmen an Plastikoberflächen und der Fähigkeit Erythrozyten zu agglutinieren. Unter Hämagglutination versteht man die Aggregation von Erythrozyten, die durch eine Bindung von Zellen oder Faktoren (in diesem Fall Bakterien) an zwei oder mehr Erythrozyten hervorgerufen wird.

Rupp und seine Mitarbeiter postulierten ein mögliches Hämagglutinin als weiteren wichtigen Virulenzfaktor von *S. epidermidis*-Stämmen. Sie beobachteten, daß klinisch relevante Isolate infizierter Venenkatheter wesentlich häufiger hämagglutinierten als Hautisolate präoperativer Herzpatienten. Des weiteren zeigte sich eine Korrelation zwischen Hämagglutination und Bindung an Plastikoberflächen. Eine unspezifische hydrophobische Interaktion zwischen den Bakterien und den Erythrozyten konnte nicht beobachtet werden. Bei weitergehenden Untersuchungen zeigte sich nach Perjodatoxidation oder Behandlung mit Glykosidasen ein Verlust der Hämagglutinationsfähigkeit. Diese Beobachtungen sowie die Charakterisierung des Hämagglutinins in einem zellfreien Überstand deuteten auf ein Polysaccharid mit einem Molekulargewicht zwischen 50000 und 100000 hin (Rupp et al., 1995). Ein Effekt von Albumin, Fibronectin, Fibrinogen oder Gelatine auf die Hämagglutination konnte nicht beobachtet werden. Die genaue Struktur und der Vernetzungsmechanismus des Hämagglutinins sind weiterhin unklar.

## 1.2 Ziele dieser Arbeit

Anhand der beschriebenen Forschungsergebnisse scheint die Ausbildung eines Biofilms für die Pathogenität von *S. epidermidis*-Stämmen eine entscheidene Rolle zu spielen. Zusätzlich zu den oben beschriebenen isolierten isogenen Transposonmutanten M10 und M11 des biofilmpositiven Wildtyps 13-1 wurden 11 weitere Transposonmutanten des biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stammes 1457c isoliert. Durch Pulsfeldgelelektrophorese und Southern Blot Analyse konnten die Transposonmutanten genotypisch in verschiedene Klassen unterteilt werden (Mack et al., 1994; Mack et al., 2000).

Ein Ziel dieser Arbeit war eine weitergehende phänotypische Charakterisierung der isolierten Transposonmutanten, um entstandene Veränderungen und deren Auswirkungen auf die Biofilmbildung differenzieren zu können. Dabei standen mir 9 biofilmmegative und 2 biofilmpositive Transposonmutanten des Wildtyps 1457c sowie die Wildtypen 1457, 9142 und 8400 mit ihren biofilmm negativen isogenen Mutanten zur Verfügung. Um die Eigenschaften der Transposonmutanten herauszufinden, wurden diese zusammen mit ihren Wildtypen und internationalen Referenzstämmen in unterschiedlichen Experimenten auf primäre Bindung, Biofilm- und Zellclusterbildung, PIA-Produktion, Kolonienmorphologie und Mukoidbildung untersucht.

In einem zweiten Teil meiner Arbeit sollte die Hämagglutinationsfähigkeit der verschiedenen Transposonmutanten und ein möglicher funktioneller Zusammenhang zwischen PIA und dem Hämagglutinin von *S. epidermidis* untersucht werden. Hierzu wurde das Hämagglutinationsverhalten der biofilmpositiven Stämme 1457, 9142, 8400, SE-5, RP62A und der biofilmm negativen Mutante 1457-M11 unter Zugabe verschiedener spezifischer Antikörper beobachtet. Die verwendeten Antikörper waren gegen biofilmpositive und biofilmm negative *S. epidermidis*-Stämme sowie gegen gereinigtes PIA gerichtet. Zusätzlich wurde der Einfluß gereinigten PIAs auf die Hämagglutination geprüft.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Laborgeräte**

Laborgerät	Hersteller
Kühlzentrifuge Cryofuge 6-6 Brutschrank 5050E	Heraeus-Christ, Osterode
Kühlzentrifuge J2-21 Rotor JA-17 Rotor JA-10 Spectrophotometer 34	Beckmann, München
Eppendorfcentrifuge 5415 Eppendorfcytophotometer 1101M Eppendorfschüttler	Eppendorf, Hamburg
Thermoinkubator5320	Fa. Nettler-Hinz, Hamburg
Tischzentrifuge Rotana / S	Fa. Hettich, Tuttlingen
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co., New Brunswick
Ultraschallzertrümmerer W185F	Heatsystems-Ultrasonics Inc., Plainview, NY
Ultraschallwasserbad 35 kHz, 120 W	Sonorex TK 52 H, Bandelin Electronics, Berlin
Schüttelinkubator Lab-Shaker	B. Braun, Melsungen
Inkubator F / 30	Dr. Groß KG, Neuß am Rhein
Schüttelwasserbad GFL1083	AD Krauth, Hamburg
Waage PC4400	Mettler Waagen GMBH, Gießen
Orthoplan-Fluoreszenzmikroskop Stereomikroskop Feinwaage 2432	Leitz, Wetzlar
Spectrophotometer ELISA Processor II	Behring, Marburg
Fraction Collector FRAC-300	Pharmacia, Freiburg
20-Loch Mikrotiterplatte	Abbott, Wiesbaden-Delkenheim
Polystyrolkugeln	Precision Plastic Balls Co., Chicago, Ill.
Einwegzellschaber Zellkulturschale mit Abdeckung Gewegekulturschale mit Abdeckung	NUNC, Roskilde, Dänemark
U-förmige 96-Loch Mikrotiterplatte	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Immunfluoreszenzobjektträger	Biomérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Dialyseschlauch Servapor (21 mm Durchmesser)	Serva, Heidelberg
Centriprep 10 Röhrchen	Amicon, Witten
Sterilfilter 0,2 µm Porengröße	Sartorius, Göttingen

### 2.1.2 Chemikalien

Tabelle 3 enthält eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

**Tabelle 3    Übersicht der verwendeten Chemikalien**

Chemikalie	Hersteller
HCL 0,1 M Essigsäure 96 %ige Essigsäure N-Acetylglucosamin 2 M NaOH NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NaCl 85 %ige Phosphorsäure 95 %iges Ethanol Coomasie Brilliant Blue G 250 37 %iges Formaldehyd Pikrinsäure Acetonlösung 0,05 % Natriumazid 2,5 % (w/v) Natriumnitrit Glycerin	Merck, Darmstadt
1,5 % Bacto Agar	Difco, Detroit, Mi.
12,5 % (w/v) Ammoniumsulfamat	Fluka, Buchs Schweiz
0,1 % Rinderserumalbumin-Lösung Schaf-Erythrozyten 3-Methyl-2-benzothiazolon-hydrazon- hydrochlorid Fluorescein Isothiocyanat-konjugierte anti- Kaninchen-IgG-Lösung	Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.
Kaninchenserum	Gibco BRL, Eggenstein, Germany
Protein A-Sepharose CL-4B	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden
Q-Sepharose Säule	
Trishydroxyaminomethane (TRIS)	Serva, Heidelberg
Antibiotikaplättchen	Boehringer, Mannheim

### 2.1.3 Bakterienstämme

Die folgende Tabelle enthält eine Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und deren Herkunft.

**Tabelle 4 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme**

<b><i>S. epidermidis</i> Stämme aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und der Universitätsklinik Eppendorf</b>		
<b>Stämme</b>	<b>Herkunft</b>	
5179	Blutkultur-Isolat	(Mack et al., 1992)
1457	Isolat eines infizierten Zentralvenenkatheter	(Mack et al., 1992)
1457-M10	Transduktante von M10 in 1457	(Mack et al., 1999)
1457-M11	Transduktante von M11 in 1457	
9142	Blutkultur-Isolat	(Mack et al., 1992)
9142-M10	Transduktante aus M10 in 9142	(Mack et al., 1999)
9142-M11	Transduktante aus M11 in 9142	
8400	Blutkultur-Isolat	(Mack et al., 1992)
8400-M10	Transduktante aus M10 in 8400	(Mack et al., 1999)
8400-M11	Transduktante aus M11 in 8400	
1457c	1457, von kryptischem Plasmid gereinigt	(Mack et al., 1992)
M12	Tn917 Transposonmutante von 1457c	(Mack et al., 2000)
M13	Tn917 Transposonmutante von 1457c	
M15	Tn917 Transposonmutante von 1457c	
M16	Tn917 Transposonmutante von 1457c	
M17	Tn917 Transposonmutante von 1457c	
M19	Tn917 Transposonmutante von 1457c	
M20	Tn917 Transposonmutante von 1457c	
M21	Tn917 Transposonmutante von 1457c	
M22	Tn917 Transposonmutante von 1457c	
M23	Tn917 Transposonmutante von 1457c	
M24	Tn917 Transposonmutante von 1457c	
T5	Transduktante aus M12 in 1457	
T6	Transduktante aus M13 in 1457	
T8	Transduktante aus M15 in 1457	
T9	Transduktante aus M16 in 1457	
T10	Transduktante aus M17 in 1457	
T12	Transduktante aus M19 in 1457	
T13	Transduktante aus M20 in 1457	
T14	Transduktante aus M21 in 1457	
T15	Transduktante aus M22 in 1457	
T16	Transduktante aus M23 in 1457	
T17	Transduktante aus M24 in 1457	

---

***S. epidermidis* Referenzstämme**

<b>Stämme</b>	<b>Herkunft</b>
RP62A (ATCC 35984)	von G. Peters (Hygiene-Institut der Universität Münster)
RP62A-M7	Mutante von RP62A durch Mitomycin C-Mutagenese
SE-5	von M. E. Rupp (University of Nebraska, Omaha, Nebraska)
<hr/>	
<i>S. aureus</i> Cowan I	wurde von J. Heesemann (Würzburg) zur Verfügung gestellt

Alle Bakterienstämme wurden unter Zusatz von Gefriermedium (1,5 % Bacto-Peptide ad 100 ml bidestilliertes Wasser mit 60 ml Glycerin) bei -80 °C aufbewahrt. Subkulturen wurden über Nacht bei 37 °C auf Blutagar oder TSB-BBL Agar angezüchtet und bei 4 °C gelagert. Antibiogramme wurden in regelmäßigen Abständen zur Überprüfung der Stämme durchgeführt.

#### **2.1.4 Nährmedien**

##### Flüssigmedien

Nach den Angaben der Hersteller wurden die Medien in demineralisiertem Wasser gelöst und autoklaviert.

TSB-BBL	Trypticase Soy Broth (BBL), Cockeysville, Md., USA
TSB-OXOID	Trypticase Soy Broth (Oxoid), Basingstone, England
BHI	Brain Heart Infusion (Oxoid)
PB	Purple Broth Base (Difco, Detroit, Michigan, USA)

Die verschiedenen TSB Medien werden in den nachfolgenden Kapiteln mit dem Zusatz ihrer Herstellungsfirmen versehen.

##### Agarmedien

Den aufgeführten Flüssigmedien wurde zur Herstellung von Agarmedien 1,5 % Bacto Agar (Difco) hinzugefügt. Des Weiteren wurden Columbia Blutagar und PA (Purple Agar, Difco) verwendet.

### 2.1.5 Lösungen

Bouin's Fixierungslösung: 0,5 g Pikrinsäure  
37,5 ml demineralisiertes Wasser  
12,5 ml 37 %iges Formaldehyd  
2,5 ml 96 %ige Essigsäure

Bradford'sches Reagenz: 35 mg Coomasie Brilliant Blue G 250  
25 ml 95 %iges Ethanol  
425 ml bidestilliertes Wasser  
50 ml 85 %ige Phosphorsäure

### 2.1.6 Puffer

PBS-CMF Puffer: 8,5 g NaCl  
0,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,75 g  $\text{Na}_3\text{PO}_4$   
ad 1000 ml mit bidestilliertem  $\text{H}_2\text{O}$   
pH 7,4

0,1 M Phosphatpuffer: 93,2 ml 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
6,8 ml 1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
ad 1000 ml mit bidestilliertem  $\text{H}_2\text{O}$   
pH 8,0

50 mM Tris-HCL, pH 7,5, Puffer

### 2.1.7 Antiseren

Die verwendeten Antiseren wurden von Mack et al. (1992) nach folgender Anleitung gewonnen. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte nach Entnahme von Präimmunsereen durch dreimal wöchentliche intravenöse Injektionen von 0,2 ml der Bakteriensuspensionen in der ersten Woche, 0,4 ml in der zweiten Woche, 0,8 ml in der dritten Woche und 1,0 ml in den nächsten drei Monaten. Die aus dem Kaninchenblut gewonnenen Antiseren wurden bei -20 °C aufbewahrt. Als Kontrollserum wurde Kaninchenserum (Gibco BRL, Eggenstein, Germany) verwendet, welches nachfolgend Normal-Serum genannt wird.

<b>Tabelle 5    Herstellung der Antiseren</b>
---

<b>Antigen</b>	<b>gewonnenes Antiserum</b>
-	Normal-Serum <sup>1)</sup>
<i>S. epidermidis</i> 5179 (biofilmbnegativ)	Anti-5179 (biofilmbnegativ)
<i>S. epidermidis</i> 1457 (biofilmbpositiv)	Anti-1457 (biofilmbpositiv)
<i>S. epidermidis</i> 1457 (biofilmbpositiv)	Anti-1457 <sub>abs</sub> <sup>2)</sup>
gereinigtes PIA	Anti-PIA <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Im Normal-Serum sind keine Antikörper gegen *S. epidermidis* enthalten.

<sup>2)</sup> Das gegen *S. epidermidis* 1457 gewonnene Antiserum wurde anschließend an *S. epidermidis* 1457-M11 absorbiert, so daß lediglich AK gegen von 1457-M11 nicht mehr produzierte Faktoren in dem Antiserum vorhanden waren.

<sup>3)</sup> Antiserum mit Antikörpern gegen gereinigtes PIA.

### 2.1.8 Erythrozyten

Eine 1 %ige Suspension von Schaf-Erythrozyten (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) in Natriumphosphatpuffer (PBS) wurde für die Hämagglutinationstests verwendet. Um eine unspezifische Agglutination der roten Blutkörperchen zu verhindern, enthielt die Erythrozyten-Suspension 0,1 % Rinderserumalbumin (Sigma Chemical Co.).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Kolonienmorphologie und Mukoidbildung**

Zur Darstellung morphologischer Unterschiede der Transposonmutanten und deren Wildtypen bezüglich ihrer Kolonienbildung wurden die Stämme auf Columbia Blutagar 3 Tage bei 37 °C und weitere 4 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ausbildung eines mukoiden Wachstums wurde auf unterschiedliche N-Acetylglucosamin-Konzentrationen enthaltendem Purple Agar untersucht. Hierzu wurde Purple Broth Base ohne, mit 0,1 %, 0,4 %, und 1 % steril filtriertem N-Acetylglucosamin sowie Agar supplementiert. Anschließend wurden diese Platten mit den zu untersuchenden Stämmen 1457, 9142, 8400 und ihren biofilmmnegativen Transduktanten M11 beimpft und ebenfalls 3 Tage bei 37 °C und weitere 4 Tage bei Raumtemperatur bebrütet. Als mukoidpositiv wurden Stämme bezeichnet, die auf Purple Agar eine schleimige, zusammenfließende Masse bildeten, die angrenzende Kolonien miteinander verband und eine Abgrenzung dieser voneinander unmöglich machte. Der Ausprägungsgrad der Mukoidbildung wurde mit abnehmender Stärke von MMM bis M festgelegt. Stämme, die kein derartiges Wachstumsverhalten zeigten, wurden als mukoidnegativ bezeichnet.

### **2.2.2 Darstellung der Zellclusterbildung mittels Gram-Färbung**

Über Nacht in TSB-BBL bei 37 °C geschüttelte Vorkulturen wurden in einer Gewebekulturschale (6 cm Durchmesser, NUNC, Roskilde, Dänemark) 100fach in 5 ml TSB-BBL verdünnt. Nach 22 stündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Medium abgesaugt. Nach Zugabe von 2 ml frischem PBS wurden die Zellen mit einem Einwegzellschaber vom Boden der Schale getrennt. Die Bakteriensuspension wurde mit einer Pipette in Glasröhrchen überführt und 1:10 in PBS verdünnt. Objektträger wurden mit 20 µl Aliquots beschickt, getrocknet und hitzefixiert. Anschließend erfolgte eine Färbung der Zellen nach Gram. Unter mikroskopischer Betrachtung ließ sich eine Aussage über die Fähigkeit der verschiedenen Stämme zur Zellclusterbildung treffen. Als Zellcluster wurden in dichten Haufen aneinanderliegende Bakterienformationen definiert, die mit abnehmender Größe und Häufigkeit mit +++ bis + bewertet wurden. Als nicht

fähig (-) zur Clusterbildung wurden Bakterien gewertet, die unter dem Mikroskop nur einzeln oder in kleinen Grüppchen auftraten.

### **2.2.3 Adhärenztest zur Quantifizierung der Biofilmbildung durch photometrische Messung**

Puffer 1: PBS

Reagenz 1: Bouin'sches Reagenz

Reagenz 2: Gentianaviolett

Der Test zur Quantifizierung des Biofilms wurde von Christensen et al. (1985) und Mack et al. (1992) beschrieben. Die in 2 ml TSB bei 37 °C mit 130 Upm über Nacht inkubierten Vorkulturen wurden 100fach in TSB verdünnt. Pro Stamm wurden jeweils vier 200 µl Aliquots der verdünnten Bakteriensuspensionen in eine 96-Loch Zellkulturschale (NUNC, Roskilde, Dänemark) gegeben und 22 h bei 37 °C inkubiert. Nach Verwerfen des Nöpfcheninhaltes und viermaligem Waschen mit jeweils 200 µl PBS wurden die am Nöpfchenboden haftenden Bakterien mit 150 µl Bouin'schem Reagenz für 15 min fixiert. Nach erneutem Waschen mit 200 µl PBS wurden zur Anfärbung des Biofilms 150 µl Gentianaviolett für 5 min in die Nöpfchen gegeben. Durch fünfmaliges Waschen der Zellkulturschale unter laufendem Leitungswasser wurde die Gentianaviolettlösung wieder entfernt. Nach anschließender Trocknung erfolgte eine photometrische Messung zur Quantifizierung des Biofilms mit einem Photometer (ELISA Processor II, Behring, Marburg) bei einer Wellenlänge von 570 nm. Diejenigen Stämme, die eine aus den vier Parallelansätzen gemittelte OD<sub>570</sub> von mehr als 0,1 aufwiesen, wurden als biofilmpositiv bezeichnet. Bakterienstämme, bei denen eine gemittelte OD<sub>570</sub> von weniger als 0,1 gemessen wurde, galten als biofilmmnegativ. Die Adhärenztests wurden sowohl mit TSB-BBL als auch mit TSB-OXOID durchgeführt.

#### **2.2.4 Bestimmung der primären Bindung von in Schüttelkulturen angezüchteten *S. epidermidis* Stämmen**

Dieser Test wurde durchgeführt, um eine Aussage über die Fähigkeit der verschiedenen Transposonmutanten zur primären Bindung an Polymeroberflächen treffen zu können. Hierzu wurden die bei 37 °C über Nacht in TSB-BBL angezüchteten Vorkulturen der Bakterienstämme 1:100 in 20 ml TSB-BBL verdünnt und 18 h bei 37 °C und 130 Upm inkubiert. Anschließend wurden die Schüttelkulturen 1:400 in TSB-BBL verdünnt. Es wurden pro Bakterienstamm jeweils 0,5 ml Aliquots und eine Polystyrolkugel (6 mm Durchmesser, Precision Plastic Balls Co., Chicago, Ill.) in drei Nöpfchen einer 20-Loch Mikrotiterplatte (Abbott, Wiesbaden-Delkenheim) gegeben, mit Zellophan abgedeckt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Eine Bestimmung der Bakterienkonzentration des Inokulums, welches auf die Polystyrolkugeln gegeben wurde, erfolgte durch  $10^{-4}$  fache Verdünnung in PBS und hiernach folgende Ausplattierung von je 100 µl. Das Medium wurde anschließend abgesaugt und die Polystyrolkugeln in Reagenzgläser überführt. Daran schloß sich eine viermalige Waschung der Kugeln mit je 5 ml PBS an. Nach Absaugen der letzten Waschlösung wurden zu jeder Kugel 2 ml PBS gegeben und die Bakterienzellzahlen durch Ausplattierung von je 100 µl bestimmt. Um die an der Polystyrolkugel haftenden Bakterien wieder abzulösen, wurden die Kugeln einer zweiminütigen Ultraschallbehandlung in einem Ultraschallwasserbad (35 kHz, 120 W; Sonorex TK 52 H, Bandelin Electronics, Berlin) unterzogen. Durch Subtraktion der Bakterienzellzahl vor der Ultraschallbehandlung von der Bakterienzellzahl nach Ultraschallbehandlung läßt sich die Anzahl der tatsächlich an jeder Polystyrolkugel haftenden Bakterien bestimmen. Die Bakteriensuspensionen wurden nach der Ultraschallbehandlung zur Bestimmung der Bakterienzellzahlen 10fach in PBS verdünnt und anschließend je 100 µl auf TSB-Agar ausplattiert. Für jeden Meßpunkt wurden zwei TSB-Agar Platten verwendet.

#### **2.2.5 Bestimmung der primären Bindung von auf Gewebekulturschalen angezüchteten *S. epidermidis* Stämmen**

Diese Versuchsanordnung untersuchte bei veränderten Wachstumsbedingungen ebenfalls die primären Bindungseigenschaften der verschiedenen Bakterienstämme. Die bei 37 °C in

TSB-BBL über Nacht inkubierten Vorkulturen wurden 1:100 mit 10 ml TSB-BBL in einer Gewebekulturschale (9 cm Durchmesser, NUNC, Roskilde, Dänemark) verdünnt und bei 37 °C 18 h bebrütet. Nach Absaugen des Mediums und Zugabe von 4 ml TSB-BBL wurden die am Boden der Zellkulturschale haftenden Bakterien mit einem Einwegzellschaber abgeschabt, durch eine 23 G Kanüle aufgezogen und in ein Reagenzglas überführt. Einer 10fachen Verdünnung in TSB-BBL folgte eine Einstellung der OD<sub>578</sub> mit TSB-BBL auf 0,4. In einer unabhängigen Dreifachbestimmung wurden jeweils 0,5 ml der eingestellten Lösung in die Näpfchen einer 20-Loch Mikrotiterplatte (Abbott, Wiesbaden-Delkenheim) zu einer Polystyrolkugel (Precision Plastic Balls Co., Chicago, Ill.) gegeben, mit Zellophan abgedeckt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Bakterienzellzahl im Inokulum wurde eine 10<sup>-5</sup> fache Verdünnung des Inokulums in PBS mit anschließender Ausplattierung von je 100 µl auf TSB-Agar durchgeführt. Das weitere Vorgehen entspricht der Versuchsanleitung von 2.2.4. Zur Quantifizierung der Bakterienzellzahlen vor Ultraschallbehandlung wurden die Waschlösungen 1:10 in PBS verdünnt und anschließend je 100 µl ausplattiert. Die Bakterienzellzahlen nach Ultraschallbehandlung wurden nach 10facher Verdünnung der biofilmpositiven und 100facher Verdünnung der biofilmm negativen Stämme in PBS durch Ausplattierung von je 100 µl bestimmt. Für jeden Meßpunkt wurden ebenfalls 2 TSB-Agar Platten verwendet.

### 2.2.6 Präparation der IgG-Fraktionen

Puffer 1: 0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,0

Puffer 2: 0,5 M Phosphatpuffer, pH 8,0

Reagenz 1: 0,1 M Essigsäure

Reagenz 2: 2 M NaOH

Reagenz 3: Bradford'sches Reagenz

Die für die Hämagglutinationstests benötigten IgG-Fraktionen wurden aus den unter 2.1.7 beschriebenen Antiseren isoliert. Zur Gewinnung der IgG-Fraktionen wurde Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,0, äquilibriert und in eine Chromatographiesäule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit dem 1/5 Vol. 0,5 M Phosphatpuffer, pH 8,0, versetzten Antiserum beschickt. Durch



1457 und *S. epidermidis* 1457-M11 wurden 22 h in einer TSB-BBL Schüttelkultur angezüchtet. Es wurden 100 µl der Vorkultur zu 10 ml TSB-BBL in einer Zellkulturschale (9 cm Durchmesser, NUNC, Roskilde, Dänemark) gegeben und wiederum 22 h inkubiert. Nach Aspiration des Mediums und Zugabe von 4 ml PBS wurde der Zellrasen mit einem Einwegzellschaber vom Boden der Zellkulturschale getrennt. Die Bakteriensuspensionen wurden in Reagenzgläser überführt und auf eine OD<sub>578</sub> von 0,4 mit PBS eingestellt. Aliquots der Bakteriensuspensionen wurden auf Immunfluoreszenzobjektträger (Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) aufgebracht, luftgetrocknet und anschließend mit 4 °C kalter Acetonlösung 2 min fixiert. Von den zu untersuchenden IgG-Fractionen (Normal-Serum, Anti-5179, Anti-1457 und Anti-PIA) wurden Verdünnungsreihen in PBS von 1:8 bis 1:2048 angefertigt. Die präparierten Immunfluoreszenzobjektträger wurden mit jeweils 20 µl der Verdünnungsreihen beschickt und 30 min in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Hiernach wurden die Objektträger dreimal in PBS gewaschen und 10 min bei 37 °C getrocknet. Nach Zugabe von jeweils 20 µl einer 1:80 in PBS verdünnten Fluorescein Isothiocyanat-konjugierten anti-Kaninchen-IgG-Lösung inkubierten die Objektträger nochmals 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Abschließend wurden die Objektträger nach dreimaligem Waschen in PBS und zuletzt einmaligem Waschen in H<sub>2</sub>O 10 min bei 37 °C getrocknet. Die Auswertung erfolgte mit einem Orthoplan (E. Leitz, Wetzlar) Fluoreszenzmikroskop.

### **2.2.8 Präparation von Bakterienextrakten zur Bestimmung des PIA-Gehaltes durch Ultraschallbehandlung**

Zur Bestimmung des PIA-Gehaltes mittels semiquantitativem Koagglutinationstest wurden Rohextrakte der verschiedenen Bakterienstämme hergestellt.

Über Nacht bei 37 °C in TSB-BBL inkubierte Vorkulturen wurden 1:100 in 2 Gewebekulturschalen (9 cm Durchmesser, Nunc, Roskilde, Dänemark) in je 10 ml TSB-BBL verdünnt und 22 h bei 37 °C bebrütet. Der am Boden der Gewebekulturschale gebildete Bakterienfilm wurde mit einem Einwegzellschaber vom Schalenboden gelöst und mitsamt Medium in jeweils ein Reagenzglas überführt. Nach 15minütiger Sedimentierung bei 3000 Upm in der Heraeus 6-6 Zentrifuge wurde der Überstand dekantiert. Die Zellen beider Reagenzgläser eines Stammes wurden in insgesamt 5 ml PBS resuspendiert und in ein Plastikröhrchen überführt. Die durch Eis kühl gehaltenen Zellen wurden anschließend

durch 2x30 sec dauernde Ultraschallbehandlungen (Heatsystems-Ultrasonics Inc., Plainview, NY) mit einer 30 sec andauernden Pause auf Stufe 7 homogenisiert. Um die Zellkonzentrationen in den verschiedenen Proben zu überprüfen, wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm in 1:30 in PBS verdünnten Aliquots bestimmt. Die Bakterienzellen wurden durch 15minütige Zentrifugation bei 3000 Upm sedimentiert und der Überstand in 2 ml Eppendorfhütchen überführt. Nach nochmaliger einstündiger Zentrifugation bei 14000 Upm und 4 °C wurde der geklärte Überstand in frischen Eppendorfhütchen bei -20 °C aufbewahrt. Die Präparation der Bakterienextrakte wurde ebenfalls mit dem Nährmedium TSB-OXOID zur Anzucht der Vor- und Hauptkulturen durchgeführt.

### 2.2.9 Herstellung des Koagglutinationsreagenz

Puffer 1: PBS-CMF mit 0,05 % Natriumazid

Die über ihr Fc-Fragment an *S. aureus* gebundenen Antikörper gegen PIA sind für die Koagglutination verantwortlich. Dazu wurden 1 ml einer formaldehydfixierten 10 %igen (wt/vol) *S. aureus* Cowan I-Suspension 1 min bei 14000 Upm sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit je 1 ml PBS-CMF + 0,05 % Natriumazid gewaschen (Mack et al., 1992). Anschließend wurden 100 µl des unter 2.1.7 beschriebenen Anti-PIA Serums der *S. aureus* Cowan I-Suspension zugesetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Sedimentieren und anschließendem Waschen mit 900 µl PBS-CMF + 0,05 % Natriumazid wurden die Bakterien in 1 ml PBS-CMF + 0,05 % Natriumazid aufgenommen. Die Aufbewahrung des in ein Plastikröhrchen überführten und mit PBS-CMF + 0,05 % Natriumazid auf 10 ml aufgefüllten Koagglutinationsreagenz erfolgte bei 4° C. Das Reagenz war am nächsten Tag gebrauchsfertig. Parallel erfolgte die Herstellung eines Koagglutinationsreagenz auf der Grundlage des Anti-1457<sub>abs</sub> Kaninchenantiserums (s. 2.1.7).

### 2.2.10 Koagglutinationstest zur Bestimmung des PIA-Gehaltes in Bakterienextrakten

Puffer 1: PBS-CMF mit 0,05 % Natriumazid

Um eine quantitative Vorstellung der Menge des von den jeweiligen *S. epidermidis*-Stämmen produzierten PIA's zu erhalten, wurden Verdünnungsreihen der unter 2.2.8 gewonnenen Bakterienextrakte angefertigt.

Extrakte biofilmpositiver Stämme wurden unverdünnt, 1:16 und von 1:256 bis 1:4096 in Zweierverdünnungsstufen in PBS-CMF + 0,05 % Natriumazid verdünnt, wohingegen Extrakte biofilmm negativer Stämme nur unverdünnt und 1:16 verdünnt eingesetzt wurden. Anschließend wurden 15 µl des hergestellten Koagglutinationsreagenz auf einen Objektträger aufgebracht, mit je 5 µl der zu untersuchenden Probe vermischt und 3 min in oval kreisenden Bewegungen geschwenkt. Zur Verbesserung der visuellen Beurteilbarkeit wurde das Ergebnis vor einem schwarzen Hintergrund unter heller Beleuchtung abgelesen. Dabei wurde eine positive Koagglutination durch sichtbare weiße Verklumpungen in unterschiedlichem Ausprägungsgrad [+++ bis (+)] und eine ausbleibende Koagglutination anhand eines homogenen weißlich-trüben Gemisches definiert. Als Negativkontrolle wurde das Koagglutinationsreagenz mit PBS-CMF + 0,05 % Natriumazid versetzt.

### 2.2.11 Präparation und Reinigung von PIA

Puffer 1: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

Puffer 2: 1000 mM NaCl in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

Im Gegensatz zu den in 2.2.8 gewonnenen Bakterienextrakten wurde mit diesem Verfahren eine Isolierung des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins erreicht (Verfahren nach Mack et al., 1996). Zur Präparation des gereinigten Antigens wurden in unabhängigen Ansätzen die Stämme 1457 und RP62A verwendet. Es wurde ein 2,5 m Dialyseschlauch (21 mm Durchmesser, Servapor) 1 h in demineralisiertem Wasser gekocht. Anschließend mit 200 ml 10fach konzentriertem TSB-BBL gefüllt und in einen mit 1,8 l demineralisiertem Wasser gefüllten 3 l Kolben eingebracht. Nach folgender Autoklavierung wurde der Kolbeninhalt 19 h gerührt, wobei nach 5 h jeweils 20 ml des dialysierten TSB-Mediums

entnommen und als Nährlösung für die Vorkultur verwendet wurden. Die Vorkultur wurde bei 37 °C und 100 Upm inkubiert. Die 1,8 l dialysiertes TSB wurden auf fünf 600 ml Bechergläser verteilt und mit der 1:100 verdünnten Vorkultur versetzt. Nach 22 h wurden die bei 37 °C und 100 Upm bebrüteten Zellen mit einem Einwegzellschaber vom Becherglas getrennt und in Zentrifugenbecher (Rotor Beckmann JA-10) überführt. Aliquots wurden zur Erstellung eines AntibioGramms entnommen, um eine Identitätsüberprüfung des Bakterienstammes vorzunehmen. Der Überstand der nach 15 min bei 6000 Upm sedimentierten Bakterienlösung wurde dekantiert. Die auf Eis gestellten Zellen wurden erneut mit einem Einwegzellschaber vom Zentrifugenbecher getrennt und in insgesamt 20 ml PBS aufgenommen. Hiernach wurde die Bakterienlösung in auf Eis gestellte JA-17 Röhrchen überführt. Nach einer 4 mal 30 sec mit jeweils 30 sec Pause dauernden Ultraschallbehandlung mit dem Ultraschallzertrümmerer (Heatsystems-Ultrasonics Inc., Plainview, NY) wurden die Röhrchen in der Kühlzentrifuge Beckmann J-21 unter Verwendung des Rotors JA-17 bei 4 °C 15 min mit 6000 Upm zentrifugiert. Nach Überführung des Überstandes in frische JA-17 Röhrchen wurden diese abermals 60 min bei 4 °C und 12000 Upm zentrifugiert. Der das PIA enthaltene Überstand wurde in ein Falcon-Röhrchen dekantiert und in Eis gekühlt. Der Überstand wurde anschließend in einen Dialyseschlauch steril filtriert (Sartorius, 0,2 µm) und gegen 4 l eines 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, Puffers über Nacht bei 4 °C dialysiert. Eine Konzentration der PIA-Lösung erfolgte mit Centriprep 10 Röhrchen (Amicon) durch Zentrifugation in der Heraeus-Zentrifuge (Cryofuge 6-6) für 20 min bei 2500 Upm.

Zur weiteren Reinigung wurde die konzentrierte PIA-Lösung aus den Centriprep 10 Röhrchen auf eine 1,6 x 11 cm Q-Sepharose Säule (Pharmacia) aufgetragen, die mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, äquilibriert war. Die Säule wurde zunächst mit 40 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, gewaschen und anschließend mit 200 ml eines linearen Gradienten von 0 bis 1000 mM NaCl in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, eluiert. Das Eluat wurde mittels des Fraction Collectors (FRAC-300) in Fraktionen von ca. 2,4 ml aufgefangen. Es zeigten sich in den Fraktionen zwei Antigenmaterial-Gipfel Peak I und Peak II, die jeweils zusammengeführt und gegen PBS dialysiert wurden. Das so gewonnene Material von Peak I wurde bei 4 °C aufbewahrt. Die Säule wurde anschließend wieder mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, äquilibriert. Anhand des Koagglutinationstests (s. 2.2.10) wurde die PIA-Konzentration semiquantitativ bestimmt.

### 2.2.12 Hexosamintest

- Standard: N-Acetylglucosamin  
Reagenz 1: 2,5 % (w/v) Natriumnitrit  
Reagenz 2: 12,5 % (w/v) Ammoniumsulfamat  
Reagenz 3: 0,25 % (w/v) 3-Methyl-2-benzothiazolon-hydrazonhydrochlorid (MBTH)  
Reagenz 4: 0,5 % (w/v) Eisen-(III)-chlorid

Zur kolorimetrischen Bestimmung der Hexosamin-Konzentration der in 2.2.11 präparierten PIA-Lösung wurde ein Hexosamintest nach der Methode von Lane-Smith und Gilkerson (1979) durchgeführt. Zur Deacetylierung wurden 300 µl der PIA-Lösung mit 300 µl 1 M HCL gemischt und 2 h bei 110 °C in PYREX-Röhrchen inkubiert. Von dieser Lösung wurden 200 µl abgenommen und mit 400 µl 2,5 % (w/v) Natriumnitrit versetzt. Die Lösungen wurden bis zum Ausbleiben einer Gasbildung offen stehen gelassen (ca. 15 min). Anschließend wurden 200 µl einer 12,5 %igen Ammoniumsulfamat-Lösung hinzugefügt und 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann wurden 200 µl einer 0,25 % (w/v) 3-Methyl-2-benzothiazolon-hydrazonhydrochlorid-Lösung dazugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden 200 µl einer 0,5 %igen Eisen-(III)-chlorid-Lösung hinzugefügt und 5 min bei 37 °C stehengelassen. Abschließend erfolgte sofort die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 650 nm. Der Hexosamingehalt der hergestellten PIA-Lösung wurde anhand der Standarddeichkurve ermittelt.

### 2.2.13 Hämagglutinationstest

Erythrozytenlösung: 1 % Schaf-Erythrozyten (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) in  
PBS-CMF + 0,1 % Rinderserumalbumin

Die im Test verwendeten Bakterienstämme wurden in jeweils 2 ml TSB-BBL inokuliert und ca. 20 h bei 37 °C und 130 Upm inkubiert. Hiernach wurden in eine Gewebekulturschale (9 cm Durchmesser, NUNC, Roskilde, Dänemark) jeweils 100 µl Vorkultur in 10 ml TSB-BBL gegeben und 22 h bei 37 °C inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden 12 ml PBS-CMF Puffer der Schale zugesetzt. Die am Boden der Schale

haftenden Bakterienzellen wurden mit einem Einwegzellschaber von dem Schalenboden getrennt, durch eine 23 G Kanüle aufgezogen und in ein Reagenzglas überführt. Anschließend wurden die Bakterienzellsuspensionen auf eine  $OD_{578}$  von 1,0 mit PBS-CMF Puffer eingestellt. In jedes Nöpfchen einer U-förmigen 96-Loch Mikrotiterplatte (Greiner, Nürtingen, Deutschland) wurden 50  $\mu$ l PBS-CMF vorgelegt. Pro Stamm wurden je 50  $\mu$ l Aliquots der verschiedenen Bakteriensuspensionen in jeweils 2 Nöpfchen der ersten Reihe gegeben. Anschließend erfolgte eine Verdünnungsreihe mit der Mehrkanalpipette, wobei aus der ersten Reihe 50  $\mu$ l des jeweiligen PBS-Bakteriengemisches entnommen und den Nöpfchen der zweiten Reihe zugegeben wurde. Nach Durchmischung der Lösungen der zweiten Reihe wurden erneut jeweils 50  $\mu$ l entnommen und der dritten Reihe zugegeben. Die 50  $\mu$ l der letzten Reihe wurden verworfen, so daß nach der Verdünnungsreihe jedes Nöpfchen ein Volumen von insgesamt 50  $\mu$ l enthielt. Die Nöpfchen wurden nach Zugabe von je 50  $\mu$ l der 1 %igen Erythrozytenlösung durchmischt und anschließend mit einem Plastikdeckel abgedeckt. Die Auswertung erfolgte nach 2 h. Zu einer positiven Hämagglutination wurde ein gleichmäßiger hellroter den Boden bedeckender Film gezählt. Bei ausbleibender Hämagglutination sanken die Erythrozyten in dem U-förmigen Nöpfchen auf den Boden und bildeten einen kompakten dunkelroten kleinen Knopf.

#### **2.2.14 Hämagglutinationshemmung durch Antikörper**

Zum weiteren Verständnis des Hämagglutinationsverhaltens der *S. epidermidis* Stämme 1457, 1457-M11, 9142, 8400, SE-5 und RP62A wurde die Hämagglutination unter Zugabe verschiedener Antikörper untersucht. Die Präparation der Bakteriensuspensionen wurde wie unter 2.2.13 beschrieben durchgeführt. Es erfolgte ebenfalls eine Einstellung der Bakteriensuspensionen auf eine  $OD_{578}$  von 1,0 mit PBS-CMF Puffer. Für die Hämagglutinationshemmtests wurden die unter 2.2.6 beschriebenen IgG-Fraktionen (Normal-Serum IgG, Anti-5179 IgG, Anti-1457 IgG und Anti-PIA IgG) verwendet. Die IgG-Fraktionen wurden 1:16 in PBS-CMF verdünnt. In einer 96-Loch (U-förmig) Mikrotiterplatte wurden in jedes Nöpfchen jeweils zweier Spalten 50  $\mu$ l der einzelnen verdünnten IgG-Fraktionen gegeben. Der ersten Reihe wurden zusätzlich 50  $\mu$ l der Bakteriensuspensionen der jeweiligen Stämme hinzugefügt. Anschließend erfolgten wie unter 2.2.13 beschriebene Verdünnungsreihen mit der Mehrkanalpipette. Die erstellten Verdünnungsreihen wurden bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Anschließend wurden zu

jedem Loch 50 µl der 1 %igen Erythrozytenlösung hinzugegeben, durchmischt und nach 2 h die Hämagglutinationstiter bestimmt. Die Konzentration der IgG-Fractionen in jedem Loch vor Zugabe der Erythrozytenlösung betrug ca. 75 µg/ml. Als Kontrollen wurden die entsprechenden Bakterienstämme in PBS-CMF austitriert sowie die verwendeten IgG-Fractionen mit PBS-CMF und Erythrozyten versetzt.

### **2.2.15 Hämagglutinationshemmung durch PIA**

Die Versuchsdurchführung entspricht der oben beschriebenen Vorgehensweise der Hämagglutinationshemmung durch Antikörper. Das von *S. epidermidis* 1457 extrahierte, gereinigte PIA wurde ebenfalls 1:16 in PBS-CMF verdünnt in alle Näpfchen vorgelegt. Den Näpfchen der ersten Reihe der 96-Loch (U-förmig) Mikrotiterplatte wurden zusätzlich 50 µl der jeweiligen auf eine OD<sub>578</sub> von 1,0 eingestellten Bakteriensuspensionen der *S. epidermidis*-Stämme 1457, 1457-M11, 9142, 8400, SE-5 und RP62A hinzugefügt. Anschließend erfolgten wie unter 2.2.13 beschriebene Verdünnungsreihen mit der Mehrkanalpipette. Als Kontrollen dienten Verdünnungsreihen der Bakteriensuspensionen in PBS-CMF sowie die in PBS-CMF 1:16 verdünnte PIA-Lösung. Die erstellten Verdünnungsreihen wurden anschließend mit 50 µl der 1 %igen Erythrozytenlösung versetzt und durchmischt. Der Hämagglutinationstiter wurde nach 2 h bestimmt. Die PIA-Konzentration in jedem Loch vor Zugabe der Erythrozytenlösung betrug ca. 9 µg/ml Hexosamin.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Phänotypische Charakterisierung der biofilmbnegativen Mutanten

#### 3.1.1 Vorbemerkung

Um die molekularen Mechanismen der Biofilmentstehung zu verstehen, isolierten Mack et al. mit Hilfe des *E. faecalis* Transposons Tn917 Insertionsmutanten des biofilmpositiven *S. epidermidis* 13-1, die die Fähigkeit zur Biofilmbildung vollkommen verloren hatten (Mack et al., 1994a). Die genetische Kopplung der isolierten Transposoninsertionen konnte mittels eines generalisierten Phagentransduktionssystems mit dem Phagen 48 nachgewiesen werden. Hierbei wurden die chromosomalen Tn917 Transposoninsertionsorte in den biofilmpositiven *S. epidermidis* Wildtyp 9142 transduziert. Auf diesem Wege konnte die genetische Kopplung des biofilmbnegativen Phänotyps der Mutanten M10 und M11 mit dem jeweils inaktivierten Genort nachgewiesen werden. Bei den anderen biofilmbnegativen Transposonmutanten konnte keine genetische Kopplung beobachtet werden, weshalb diese als Spontanvarianten bezeichnet wurden.

Darüber hinaus konnten mittels des Phagen 48 das Plasmid pTV1ts und die Transposoninsertionen der beiden biofilmbnegativen Mutanten M10 und M11 in die unabhängigen biofilmpositiven *S. epidermidis* Wildtypen 1457 und 8400 transduziert werden. Somit standen für die Untersuchungen in dieser Arbeit die drei unabhängigen biofilmbildenden Wildtypen *S. epidermidis* 1457, 9142 und 8400 mit ihren jeweils korrespondierenden isogenen biofilmbnegativen Mutanten 1457-M10, 1457-M11, 9142-M10, 9142-M11, 8400-M10 und 8400-M11 zur Verfügung. Des Weiteren wurde eine Transposonmutagenese in *S. epidermidis* 1457c durchgeführt. Aus dieser gingen 11 Transposonmutanten (biofilmpositiv: M16, M20; biofilmbnegativ: M12, M13, M15, M17, M19, M21, M22, M23, M24) und deren zugehörige isogene Transduktanten hervor.

### 3.1.2 Adhärenztest zur Biofilmquantifizierung durch photometrische Messung

Die Fähigkeit der Transposonmutanten zur Biofilmbildung und dessen Quantifizierung wurde anhand von Adhärenztests (s. 2.2.3) ermittelt. Dabei wurden die Bakterienstämme in Flüssignährmedien Trypticase soy broth (TSB) der Firmen BBL und OXOID angezüchtet. Es zeigte sich eine abgeschwächte Biofilmbildung der Stämme 1457, 9142, 8400, M16, M20 sowie der internationalen Referenzstämme RP62A und SE-5 unter Wachstumsbedingungen mit TSB-OXOID verglichen mit TSB-BBL. Einzig der Stamm 1457c zeigte eine ausgeprägtere Biofilmbildung unter TSB-OXOID.

Die isogenen Mutanten 1457-M10, 1457-M11, 9142-M10, 9142-M11, 8400-M10, 8400-M11 sowie die Mutanten M12, M13, M22, M23, M24 und die durch Mitomycin C-Mutagenese entstandene Mutante M7 des Stammes RP62A waren sowohl in TSB-BBL als auch in TSB-OXOID biofilmnegativ. Die Mutanten M15, M17, M19 und M21 zeigten in TSB-OXOID ebenfalls ein biofilmnegatives Verhalten. In TSB-BBL angezüchtet bildeten M15, M19 und M21 jedoch einen schwachen Biofilm aus. Bei der Mutante M17 ließ sich unter TSB-BBL sogar eine den Wildtypen vergleichbare Biofilmbildung beobachten.

Die Versuche wurden in unabhängigen Ansätzen mehrmals wiederholt. Tabelle 7 veranschaulicht die gemittelten Ergebnisse dreier unabhängiger repräsentativer Tests.

Um eine phänotypische Veränderung der Transposonmutanten ohne genetische Korrelation mit der Transposoninsertion auszuschließen, wurden die den Transposonmutanten zugehörigen Transduktanten ebenfalls einem Adhärenztest unterzogen. Wie Tabelle 8 zeigt, bildeten Transduktanten und Transposonmutanten nahezu identische Biofilmmengen unter Anzucht in TSB-BBL.

Daher sind die schwache Biofilmbildung der Mutanten M15, M19, M21 sowie der in TSB-BBL biofilmpositive Phänotyp der in früheren Experimenten biofilmnegativen Mutante M17 auf genetische Ursachen zurückzuführen. Die Transposonmutanten können demnach als isogen bezeichnet werden.

<b>Tabelle 7</b>	<b>Biofilmquantifizierung der in TSB-BBL und TSB-OXOID gewachsenen Transposonmutanten mittels Adhärenztest</b>
------------------	--

Stämme	Biofilmbildung OD 570 <sup>1)</sup>	
	TSB-BBL	TSB-OXOID
1457	2,469	1,649
1457-M10	0,044	0,004
1457-M11	0,045	0,002
9142	1,836	0,549
9142-M10	0,014	0,018
9142-M11	0,020	0,021
8400	2,080	1,168
8400-M10	0,056	0,073
8400-M11	0,054	0,032
1457c	1,565	1,836
M12	0,025	0,014
M13	0,071	0,005
M15	0,204	0,033
M16	1,557	0,973
M17	1,126	0,080
M19	0,277	0,038
M20	1,398	0,944
M21	0,155	0,068
M22	0,027	0,056
M23	0,027	0,045
M24	0,050	0,038
RP62A	1,798	1,612
RP62A-M7	0,015	0,025
SE-5	2,224	0,942

<sup>1)</sup> Bei Werten über 0,100 wurden die Bakterienstämme als biofilmpositiv und bei Werten unterhalb 0,100 als biofilmnegativ gewertet.

<b>Tabelle 8</b>	<b>Biofilmquantifizierung der Transposonmutanten verglichen mit ihren zugehörigen Transduktanten mittels Adhärenztest</b>
------------------	---

Transposonmutanten		Transduktanten	
Stämme	OD 570 <sup>1)</sup>	Stämme	OD 570 <sup>1)</sup>
1457	2,469		
1457-M10	0,044		
1457c	1,565		
M12	0,025	T5	0,066
M13	0,071	T6	0,017
M15	0,204	T8	0,490
M16	1,557	T9	1,878
M17	1,126	T10	1,640
M19	0,277	T12	0,594
M20	1,398	T13	2,500
M21	0,155	T14	0,097
M22	0,027	T15	0,019
M23	0,027	T16	0,009
M24	0,050	T17	0,016

<sup>1)</sup> Bei Werten über 0,100 wurden die Bakterienstämme als biofilmpositiv und bei Werten unterhalb 0,100 als biofilmnegativ gewertet.

<sup>2)</sup> n. u. := nicht untersucht

### 3.1.3 Kolonienmorphologie, Mukoid- und Zellclusterbildung der Tn917 Mutanten

Es wurden Versuche zur Kolonienmorphologie, Mukoid- und Zellclusterbildung durchgeführt. Die Mutanten M12, M15 und M19 bildeten nach dreitägiger Inkubation auf Blutagar bei 37 °C und anschließendem viertägigem Wachstum bei Raumtemperatur graue Kolonien, wohingegen die Kolonien der übrigen Stämme weiß waren (s. Tabelle 9).

Die Zellclusterbildung wurde nach Gram-Färbung unter dem Mikroskop bewertet. Als Zellcluster wurden in dichten Haufen aneinanderliegende Bakterienformationen definiert, die mit abnehmender Größe und Häufigkeit mit +++ bis + bewertet wurden. Als nicht fähig zur Clusterbildung (-) wurden Bakterien angesehen, die nur einzeln oder in kleinen

Grüppchen auftraten. Die Größe der Zellcluster korrelierte mit der im Adhärenztest ermittelten Biofilmmenge. M17 zeigte verglichen mit den biofilmpositiven Stämmen bei deutlicher Biofilmbildung unter Anzucht in TSB-BBL eine etwas reduzierte Clusterbildung (s. Tabelle 9).

Die Mukoidbildung wurde auf Purple Agar untersucht, der mit verschiedenen N-Acetylglucosamin-Konzentrationen supplementiert war. Als mukoidpositiv wurden Stämme bezeichnet, die auf Purple Agar eine schleimige, zusammenfließende Masse bildeten, die angrenzende Kolonien miteinander verband und eine Abgrenzung dieser untereinander unmöglich machte. Der Ausprägungsgrad der Mukoidbildung wurde mit abnehmender Stärke von MMM bis M festgelegt. Stämme die kein derartiges Wachstumsverhalten zeigten, wurden als mukoidnegativ bezeichnet.

Auf Purple Agar ohne und mit 0,1 % N-Acetylglucosamin zeigten alle Stämme ein Kolonienwachstum, jedoch ohne mukoiden Charakter. Bei einer N-Acetylglucosamin-Konzentration von 0,4 % ließen nur die Stämme 1457, 8400 und 1457c eine deutlich mukoide Struktur erkennen. 9142 zeigte erst bei einer 1 %igen N-Acetylglucosamin-Konzentration ein mukoides Wachstum. Diese Konzentration führte bei 1457, 8400 und 1457c zu einer noch stärkeren Mukoidbildung.

Alle anderen Mutanten waren bei jeder Konzentration von N-Acetylglucosamin mukoidnegativ. Interessanterweise waren auch die biofilmpositiven Mutanten M16 und M20 bei keiner N-Acetylglucosamin-Konzentration zu einer Mukoidbildung anzuregen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 9.

<b>Tabelle 9</b>	<b>Kolonienmorphologie, Zellcluster- und Mukoidbildung der Transposonmutanten</b>
------------------	---

Stämme	Kolonienmorphologie	Zellcluster	Mukoid bei 1 % N-Acetylglucosamin- Supplem.
1457	weiß	+++ <sup>1)</sup>	MMM <sup>2)</sup>
1457-M10	weiß	-	-
1457-M11	weiß	-	-
9142	weiß	+++	MM
9142-M10	weiß	-	-
9142-M11	weiß	-	-
8400	weiß	+++	MMM
8400-M10	weiß	-	-
8400-M11	weiß	-	-
1457c	weiß	+++	MMM
M12	<i>grau</i>	-	-
M13	weiß	-	-
M15	<i>grau</i>	+	-
M16	weiß	+++	-
M17	weiß	++	-
M19	<i>grau</i>	+	-
M20	weiß	+++	-
M21	weiß	+	-
M22	weiß	-	-
M23	weiß	-	-
M24	weiß	-	-

Phänotypische Charakterisierung der Transposonmutanten und Wildtypen bezüglich Kolonienmorphologie, Zellcluster- und Mukoidbildung.

<sup>1)</sup> Als Zellcluster wurden in dichten Haufen aneinanderliegende Bakterienformationen definiert, die mit abnehmender Größe und Häufigkeit mit +++ bis + bewertet wurden. Stämme, die keine Zellcluster bildeten, wurden mit (-) gekennzeichnet. Die Stämme wurden in TSB-BBL angezüchtet.

<sup>2)</sup> Als mukoidpositiv wurden Stämme bezeichnet, die eine schleimige, zusammenfließende Masse bildeten und eine Abgrenzung einzelner Kolonien unmöglich war. Der Ausprägungsgrad der Mukoidbildung wurde mit abnehmender Stärke von MMM bis M festgelegt. Mukoidnegative Stämme wurden mit (-) gekennzeichnet.

### 3.1.4 Quantifizierung der PIA-Synthese in Bakterienextrakten

In diesem Versuch wurde in Bakterienextrakten der verschiedenen Stämme eine semiquantitative Bestimmung des PIA-Gehaltes mit einem Koagglutinationsreagenz durchgeführt.

Dieses Reagenz enthielt Anti-PIA Antikörper, die über ihr Fc-Fragment an das Protein A von *S. aureus* Cowan I gebunden waren. Zur Herstellung der Bakterienextrakte, des Koagglutinationsreagenz und der Durchführung und Bewertung der Koagglutinationstests siehe 2.2.8, 2.2.9 und 2.2.10. Zwei verschiedene an *S. aureus* gebundene Kaninchenantiseren wurden verwendet: das Anti-PIA und Anti-1457<sub>abs</sub> Serum (s. 2.1.7). Da sich im Adhärenztest ein Unterschied in der Biofilmbildung bei den Mutanten M15, M17, M19 und M21 zwischen den TSB-Medien der Firmen BBL und OXOID gezeigt hatte, wurde der Koagglutinationstest ebenfalls mit beiden Medien durchgeführt. Es wurden jeweils zwei unabhängige Versuche durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen eine Titerreduktion der in TSB-OXOID angezüchteten Wildtypen und biofilmbildenden Mutanten verglichen mit den in TSB-BBL gewachsenen Stämmen um 2-3 Verdünnungsstufen. M15, M19 und M21 koagglutinierten unter Anzucht in TSB-OXOID Medium nicht. Bei Verwendung von TSB-BBL zeigte sich jedoch eine Koagglutination bei Titern zwischen 1:8 und 1:32.

Eine ähnliche Beobachtung konnte bei M17 gemacht werden. Unter Anzucht in TSB-OXOID ergab sich ein Titer von 1:16, wohingegen bei Verwendung von TSB-BBL ein Titeranstieg von 1:256 imponierte. Alle im Adhärenztest unter Verwendung von TSB-BBL biofilmbildenden Mutanten wiesen auch im Koagglutinationstest keine Reaktion auf.

Neben den Transposonmutanten wurden die internationalen Referenzstämme SE-5, RP62A und seine durch Mitomycin C-Mutagenese entstandene biofilmbildende Mutante M7 auf ihre PIA-Produktionsmenge überprüft. Dabei zeigten SE-5 und RP62A unter Anzucht in TSB-BBL einen reziproken Titer von 1024. RP62A-M7 produzierte trotz biofilmbildendem Phänotyp eine den Biofilmbildnern äquivalente PIA-Menge bei einem Titer von 1:512.

Die Titer bei Einsatz des Anti-PIA Serums waren, verglichen mit Anti-1457<sub>abs</sub>, bei manchen Stämmen um etwa eine Verdünnungsstufe niedriger. Tabelle 10 zeigt repräsentative Werte einer Versuchsreihe.

<b>Tabelle 10</b>	<b>Bestimmung der PIA-Konzentration in Bakterienzellextrakten</b>
-------------------	---

Stamm	Koagglutination mit Anti-1457 <sub>abs</sub> <sup>1)</sup> Serum		Koagglutination mit Anti-PIA <sup>1)</sup> Serum	
	TSB-BBL	TSB-OXOID	TSB-BBL	TSB-OXOID
1457	1024	256	1024	128
1457-M10	-	-	-	-
1457-M11	-	-	-	-
9142	512	128	1024	64
9142-M10	-	-	-	-
9142-M11	-	-	-	-
8400	1024	64	1024	64
8400-M10	-	-	-	-
8400-M11	-	-	-	-
1457c	1024	128	1024	128
M12	-	-	-	-
M13	-	-	-	-
M15	32	-	32	-
M16	1024	256	1024	256
M17	256	16	256	16
M19	32	-	32	-
M20	1024	256	1024	256
M21	8	-	8	-
M22	-	-	-	-
M23	-	-	-	-
M24	-	-	-	-
RP62A	1024	n. u. <sup>2)</sup>	1024	n. u.
RP62A-M7	512	n. u.	512	n. u.
SE-5	1024	n. u.	1024	n. u.

Koagglutinationstest, bei dem die gebildete PIA-Menge der jeweiligen *S. epidermidis* Stämme mit Hilfe der Antiseren Anti-1457<sub>abs</sub> und Anti-PIA ermittelt wurde. Die Bakterien wurden unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (in TSB-BBL und TSB-OXOID) untersucht. Stämme, bei denen keine Koagglutination eintrat, wurden mit (-) gekennzeichnet.

<sup>1)</sup> Siehe Herstellung der Seren unter 2.1.7

<sup>2)</sup> n. u. := nicht untersucht

### 3.1.5 Bestimmung der primären Bindung von in Schüttelkulturen angezüchteten *S. epidermidis* Stämmen

Die Biofilmbildung entsteht in zwei Schritten. Im ersten Schritt lagern sich einzelne Zellen dem Fremdmaterial an. Dieser Vorgang wird primäre Bindung genannt und erfolgt in den ersten Minuten der Biofilmentstehung (s. auch unter 1.1.3).

Um das Verhalten der Mutanten bezüglich der primären Bindung zu untersuchen, wurden die Transposonmutanten in Schüttelkulturen über Nacht inkubiert und anschließend Aliquots 30 min mit einer Polystyrolkugel bebrütet (s. 2.2.4). Zur Beurteilung der primären Bindungsfähigkeit wurde die Konzentration der innerhalb dieser 30 min an die Polystyrolkugeln gebundenen Bakterien ermittelt. Die in Tabelle 11 aufgeführten Werte zeigen die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche. Alle Stämme wurden in TSB-BBL angezüchtet.

Das „Inokulum“ bezeichnet die Anzahl der Zellen pro ml in der Ausgangslösung der Hauptkultur, die der Polystyrolkugel zugegeben wurde. Abgesehen von der Mutante M12 wiesen die Stämme eine relativ gleichmäßige Konzentration auf. M12 enthielt ca. 1/3 weniger Zellen im Inokulum.

Die „Zellzahl vor Ultraschall“ wurde nach dreimaliger Waschung der mit den Bakterien behafteten Polystyrolkugeln mit PBS bestimmt, bevor die Zellen durch die Ultraschallbehandlung von der Polystyrolkugel gelöst wurden. Die nach Ultraschallbehandlung ermittelten Zellzahlen pro 2 ml sind in der Spalte „Zellzahl nach Ultraschall“ angegeben. Um die tatsächlich an der Polystyrolkugel gebundenen Bakterien zu ermitteln wurde die „Zellzahl vor Ultraschall“ von der „Zellzahl nach Ultraschall“ subtrahiert.

Es ließ sich eine ähnliche Konzentrationsverteilung der Zellzahlen vor und nach der Ultraschallbehandlung in Bezug auf die Ausgangskonzentration im Inokulum feststellen. Die Mutante M12 zeigte jedoch eine um ein Vielfaches geringere Konzentration an gebundenen Bakterien bei nur leicht erniedrigter Bakterienkonzentration im Inokulum (Konzentration der an der Polystyrolkugel gebundenen Zellen: 5810 CFU/2ml).

Insgesamt war zu beobachten, daß die biofilmpositiven Stämme sich in ihrer primären Bindung nicht von den biofilmm negativen Mutanten unterschieden. Die Zellzahlen der gebundenen Bakterien rangierten bei allen Stämmen außer M12 zwischen 21348 und 51386 CFU/2ml.

<b>Tabelle 11</b>	<b>Bestimmung der primären Bindung der in Schüttelkulturen gewachsenen Mutanten</b>
-------------------	---

<b>Stamm</b>	<b>Inokulum <sup>1)</sup></b>	<b>Zellzahl vor Ultraschall <sup>2)</sup></b>	<b>Zellzahl nach Ultraschall <sup>3)</sup></b>	<b>Gebundene Zellen an der Polystyrol-Kugel <sup>4)</sup></b>
	<b>CFU <sup>5)</sup>/ml</b>	<b>CFU/2ml</b>	<b>CFU/2ml</b>	<b>CFU/2ml</b>
	<b>Mittelwert</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Mittelwert</b>
1457	3,7E+06	3396	39633	36237
1457-M10	4,4E+06	3169	40656	37487
1457-M11	4,1E+06	3033	40156	37123
9142	4,5E+06	3483	35056	31573
9142-M10	5,3E+06	3746	32067	28321
9142-M11	5,4E+06	3436	31400	27964
8400	2,5E+06	4781	56167	51386
8400-M10	2,7E+06	2441	36856	34415
8400-M11	3,1E+06	2278	35367	33089
1457c	3,7E+06	4779	46533	41754
M12	1,2E+06	734	6544	5810
M13	6,0E+06	3613	43811	40198
M15	6,3E+06	4086	26289	22203
M16	4,7E+06	4053	43267	39214
M17	5,6E+06	3984	34033	30049
M19	5,4E+06	2341	23689	21348
M20	4,6E+06	2484	26611	24127
M21	4,3E+06	3276	29833	26557
M22	4,1E+06	3173	43056	39883
M23	5,0E+06	3004	36189	33185
M24	5,0E+06	3209	40689	37480

<sup>1)</sup> Das **Inokulum** bezeichnet die Anzahl der Zellen pro ml in der Bakterienlösung, die der Polystyrolkugel zugegeben wurde.

<sup>2)</sup> Die **Zellzahl vor Ultraschall** wurde nach dreimaliger Waschung der mit den Bakterien behafteten Polystyrolkugel mit PBS bestimmt, bevor die Zellen durch die Ultraschallbehandlung von der Polystyrolkugel gelöst wurden.

<sup>3)</sup> Die **Zellzahl nach Ultraschall** bezeichnet diejenige Bakterienkonzentration, die nach Ablösung der Bakterien von der Polystyrolkugel mittels Ultraschallbehandlung bestimmt wurde.

<sup>4)</sup> Berechnung der **an den Polystyrolkugeln gebundenen Bakterienzellen** pro 2 ml erfolgte durch Subtraktion der Bakterienzellkonzentrationen vor Ultraschallbehandlung von den Bakterienzellkonzentrationen nach Ultraschallbehandlung.

<sup>5)</sup> **CFU**: colony forming unit

### 3.1.6 Bestimmung der primären Bindung von auf Gewebekulturschalen angezüchteten *S. epidermidis* Stämmen

Um die primäre Bindung der Mutanten weitergehend zu untersuchen, wurden die Bakterienstämme nicht als Schüttelkulturen, sondern als Biofilmkulturen in Gewebekulturschalen angezüchtet. Während sowohl bei den biofilmmnegativen als auch den biofilmpositiven Stämmen der Schüttelkulturen eine homogene Bakteriensuspension zu beobachten war, bildeten die biofilmpositiven Stämme auf dem Boden der Gewebekulturschale einen festhaftenden Biofilm aus. Die bis zur Zugabe der Polystyrolkugeln unterschiedliche Präparation der Bakteriensuspensionen ist unter 2.2.5 beschrieben. Die Begriffe „Inokulum, Zellzahl vor Ultraschall, Zellzahl nach Ultraschall und gebundene Zellen an der Polystyrolkugel“ entsprechen den unter 3.1.5 festgelegten Definitionen.

Im Gegensatz zu den Schüttelkulturen waren im Inokulum die Bakterienkonzentrationen der Biofilmkulturen etwa 10fach höher. So betrug die durchschnittliche Bakterienkonzentration aller Stämme bei den Schüttelkulturen  $4,2E+06$  und bei den Biofilmkulturen  $5,5E+07$ . Bei den biofilmpositiven Stämmen 1457, 8400, 9142, 1457c, M16 und M20 rangierten die Konzentrationen der gebundenen Zellen an den Polystyrolkugeln zwischen 95875 CFU/2ml und 470613 CFU/2ml. Im Gegensatz dazu lagen die Bakterienkonzentrationen der biofilmmnegativen Mutanten 1457-M10, 1457-M11, 8400-M10, 8400-M11, 9142-M10, 9142-M11, M12, M13, M15, M19, M20, M21, M22, M23 und M24 zwischen 9065 CFU/2ml und 24914 CFU/2ml. Die biofilmpositiven Stämme zeigten demnach eine ca. 10-50fach höhere Konzentration an gebundenen Zellen verglichen mit den biofilmmnegativen Mutanten. M17 lag in seiner primären Bindungsfähigkeit zwischen den biofilmpositiven und biofilmmnegativen Stämmen (Konzentration an der Polystyrol gebundener Zellen: 60358 CFU/2ml).

Tabelle 12 enthält eine Übersicht der ermittelten Werte. Den Unterschied zwischen den Daten der Schüttel- und Biofilmkulturen verdeutlicht Abbildung 2.

<b>Tabelle 12</b>	<b>Bestimmung der primären Bindung der in Gewebekulturschalen gewachsenen Biofilmkulturen</b>
-------------------	---

<b>Stamm</b>	<b>Inokulum <sup>1)</sup></b>	<b>Zellzahl vor Ultraschall <sup>2)</sup></b>	<b>Zellzahl nach Ultraschall <sup>3)</sup></b>	<b>Gebundene Zellen an der Polystyrol-Kugel <sup>4)</sup></b>
	<b>CFU <sup>5)</sup>/ml Mittelwert</b>	<b>CFU/2ml Mittelwert</b>	<b>CFU/2ml Mittelwert</b>	<b>CFU/2ml Mittelwert</b>
1457	6,3E+07	69171	499556	430385
1457-M10	5,4E+07	3957	25356	21399
1457-M11	7,2E+07	4171	22256	18085
9142	5,1E+07	56743	205000	148257
9142-M10	3,9E+07	3186	16511	13325
9142-M11	6,0E+07	2100	13267	11167
8400	6,5E+07	17886	123944	106058
8400-M10	3,4E+07	1943	14611	12668
8400-M11	5,5E+07	2500	17900	15400
1457c	4,3E+07	31929	269778	237849
M12	4,0E+07	1986	15467	13481
M13	5,6E+07	2457	11522	9065
M15	5,3E+07	1729	11322	9593
M16	6,6E+07	21814	117689	95875
M17	6,9E+07	7486	67844	60358
M19	5,5E+07	7743	25489	17746
M20	6,2E+07	134943	605556	470613
M21	5,6E+07	6500	22389	15889
M22	5,5E+07	7386	32300	24914
M23	5,5E+07	5929	26111	20182
M24	4,6E+07	5283	15600	10317

<sup>1)</sup> Das **Inokulum** bezeichnet die Anzahl der Zellen pro ml in der Bakterienlösung, die der Polystyrolkugel zugegeben wurde.

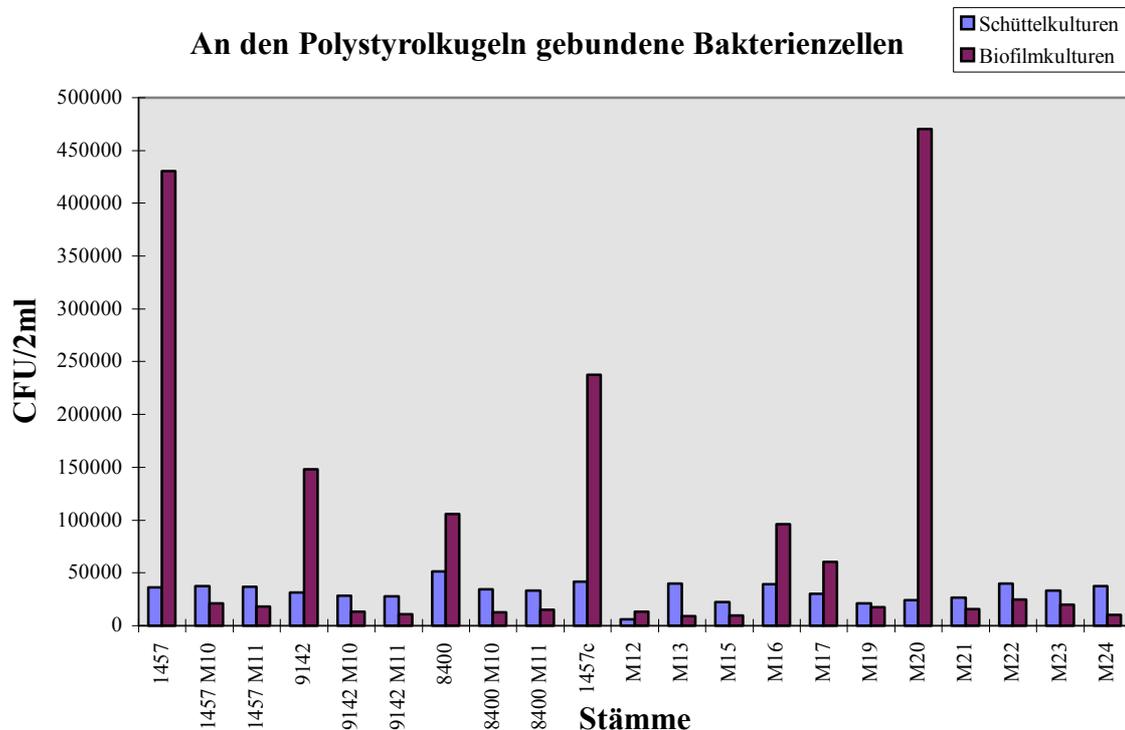
<sup>2)</sup> Die **Zellzahl vor Ultraschall** wurde nach dreimaliger Waschung der mit den Bakterien behafteten Polystyrolkugel mit PBS bestimmt, bevor die Zellen durch die Ultraschallbehandlung von der Polystyrolkugel gelöst wurden.

<sup>3)</sup> Die **Zellzahl nach Ultraschall** bezeichnet diejenige Bakterienkonzentration, die nach Ablösung der Bakterien von der Polystyrolkugel mittels Ultraschallbehandlung bestimmt wurde.

<sup>4)</sup> Berechnung der **an den Polystyrolkugeln gebundenen Bakterienzellen** pro 2 ml erfolgte durch Subtraktion der Bakterienzellkonzentrationen vor Ultraschallbehandlung von den Bakterienzellkonzentrationen nach Ultraschallbehandlung.

<sup>5)</sup> **CFU**: colony forming unit

**Abbildung 2 Vergleich der an den Polystyrolkugeln gebundenen Zellen der Schüttel- und Biofilmkulturen**



Die Abbildung zeigt den Vergleich der an den Polystyrolkugeln gebundenen Bakterienzellzahlen nach 30 minütiger Inkubation. Es sind sowohl die Werte der Biofilm- als auch der Schüttelkulturen abgebildet. Zu beachten ist, daß die Ausgangskonzentrationen im Inokulum der Schüttelkulturen ca. 10fach niedriger waren als die der Biofilmkulturen.

### 3.1.7 Weiterführende Untersuchungen zur primären Bindung der Mutante M12

Bei den Versuchen zur primären Bindung wies die Mutante M12 im Vergleich zu den anderen Stämmen eine erheblich niedrigere Zellzahl an gebundenen Bakterien auf (s. Tabelle 13). Daher wurden zur Aufklärung dieser Beobachtung weitere Untersuchungen durchgeführt. Für die Bakterien stellt die zur Ablösung der gebundenen Zellen von den Polystyrolkugeln notwendige Ultraschallbehandlung den höchsten Belastungsfaktor dar. Bei einer strukturellen Labilität der Mutante M12 könnte die Ultraschallbehandlung zu einem Untergang der Zellen führen. Um diese Annahme zu überprüfen wurden zwei unterschiedliche Populationen von M12 (M12a und M12b) und 1457 als Vergleichsstamm einer 2, 4 und 6 minütigen Ultraschallbehandlung ausgesetzt. Die Versuchsanordnung zur

Bestimmung der gebundenen Zellen entspricht ansonsten der unter 2.2.4 beschriebenen Anleitung.

**Tabelle 13 Primäre Bindung von M12**

<b>Stamm</b>	<b>Inokulum <sup>1)</sup></b>	<b>Zellzahl vor Ultraschall <sup>2)</sup></b>	<b>Zellzahl nach Ultraschall <sup>3)</sup></b>	<b>Gebundene Zellen an der Polystyrol- Kugel <sup>4)</sup></b>
	CFU <sup>5)</sup> /ml <b>Mittelwert</b>	CFU/2ml <b>Mittelwert</b>	CFU/2ml <b>Mittelwert</b>	CFU/2ml <b>Mittelwert</b>
1457	3,7E+06	3396	39633	36237
M12	1,2E+06	734	6544	5810

Werte entstammen der Tabelle 11 (Bestimmung der primären Bindung der in Schüttelkulturen gewachsenen Mutanten).

<sup>1)</sup> Das **Inokulum** bezeichnet die Anzahl der Zellen pro ml in der Bakterienlösung, die der Polystyrolkugel zugegeben wurde.

<sup>2)</sup> Die **Zellzahl vor Ultraschall** wurde nach dreimaliger Waschung der mit den Bakterien behafteten Polystyrolkugel mit PBS bestimmt, bevor die Zellen durch die Ultraschallbehandlung von der Polystyrolkugel gelöst wurden.

<sup>3)</sup> Die **Zellzahl nach Ultraschall** bezeichnet diejenige Bakterienkonzentration, die nach Ablösung der Bakterien von der Polystyrolkugel mittels Ultraschallbehandlung bestimmt wurde.

<sup>4)</sup> Berechnung der **an den Polystyrolkugeln gebundenen Bakterienzellen** pro 2 ml erfolgte durch Subtraktion der Bakterienzellkonzentrationen vor Ultraschallbehandlung von den Bakterienzellkonzentrationen nach Ultraschallbehandlung.

<sup>5)</sup> **CFU**: colony forming unit

Die Ergebnisse zeigen bei zunehmender Ultraschalldauer eine abnehmende Konzentration der beiden M12 Mutanten, bei nahezu konstanter Konzentration von 1457. Um den Einfluß der Ultraschallbehandlung auf jede einzelne, der in der Versuchsanordnung verwendeten Polystyrolkugel zu verdeutlichen, sind in Tabelle 14 neben dem Mittelwert auch die Werte der einzelnen Kugeln aufgeführt. Die Abbildung 3 zeigt die nach den Ultraschallbehandlungen ausplattierten Kolonienzahlen jeder Kugel und veranschaulicht die Werte aus Tabelle 14.

<b>Tabelle 14 M12 Schallfestigkeit nach 2, 4 und 6 minütiger Ultraschallbehandlung</b>
--

		<b>1457</b>	<b>M12a</b>	<b>M12b</b>
<b>Inokulum<sup>1)</sup></b>				
CFU <sup>4)</sup> /ml	Mittelwert	<b>9,2E+06</b>	<b>7,2E+06</b>	<b>7,2E+06</b>
<b>Zellzahl vor Ultraschall<sup>2)</sup></b>				
CFU/2 ml	Mittelwert	<b>2813</b>	<b>1237</b>	<b>1030</b>
	1. Kugel	2070	1150	1240
	2. Kugel	3260	1730	1030
	3. Kugel	3110	830	820
<b>Zellzahl der an der Polystyrolkugel gebundenen Bakterien nach 2 min Ultraschall<sup>3)</sup></b>				
CFU/2 ml	Mittelwert	<b>28254</b>	<b>23030</b>	<b>20303</b>
	1. Kugel	26130	24050	17860
	2. Kugel	27640	25970	29070
	3. Kugel	30990	19070	13980
<b>Zellzahl der an der Polystyrolkugel gebundenen Bakterien nach 4 min Ultraschall</b>				
CFU/2 ml	Mittelwert	<b>38420</b>	<b>15430</b>	<b>13370</b>
	1. Kugel	40130	15950	13960
	2. Kugel	39840	16870	20770
	3. Kugel	35290	13470	5380
<b>Zellzahl der an der Polystyrolkugel gebundenen Bakterien nach 6 min Ultraschall</b>				
CFU/2 ml	Mittelwert	<b>28120</b>	<b>10630</b>	<b>7870</b>
	1. Kugel	28130	11250	8160
	2. Kugel	30240	13870	10870
	3. Kugel	25990	6770	4580

Die Tabelle enthält die Bakterienkonzentrationen der Mutanten M12a, M12b und 1457 vor und nach 2, 4 und 6 minütiger Ultraschallbehandlung. Für jeden Stamm wurden 3 Polystyrolkugeln unabhängig voneinander untersucht. Es läßt sich eine Konzentrationserniedrigung mit zunehmender Ultraschalldauer bei M12a und M12b beobachten, nicht jedoch bei 1457.

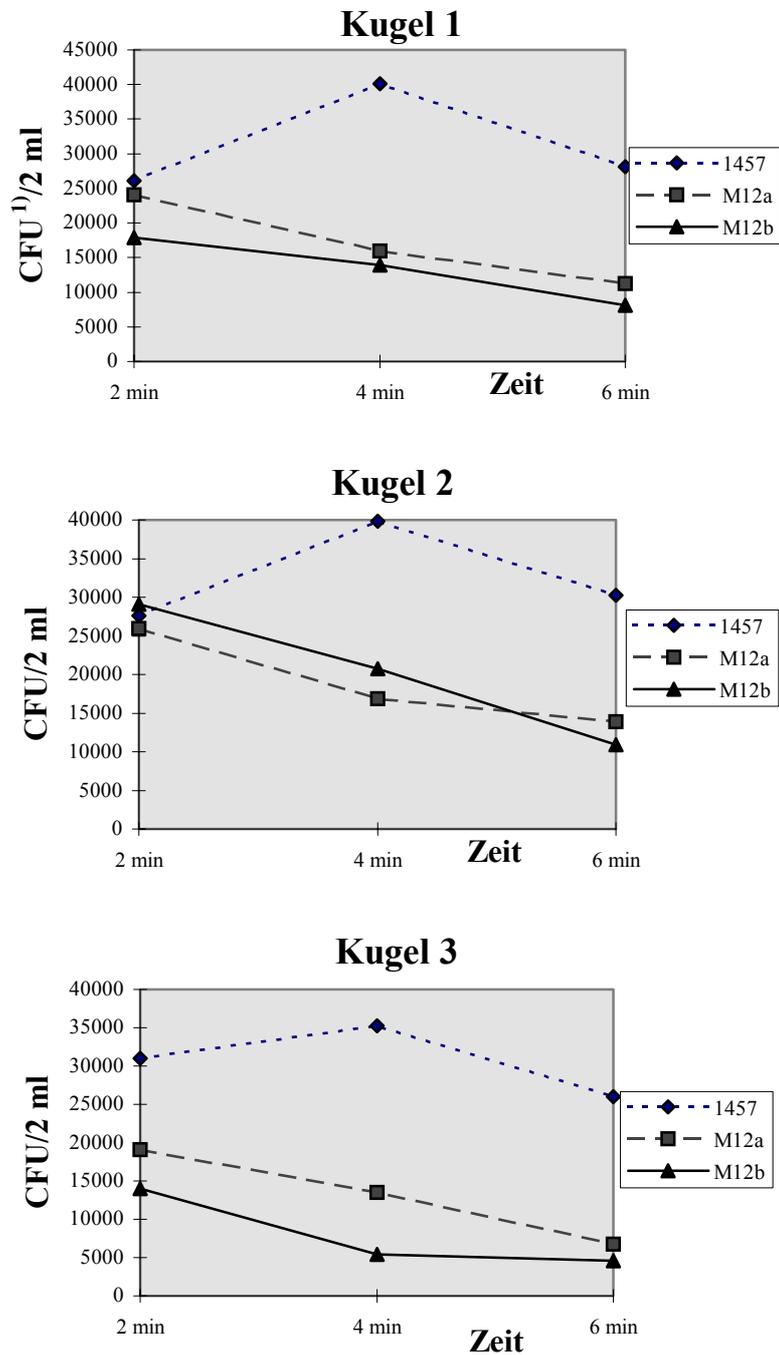
<sup>1)</sup> Das **Inokulum** bezeichnet die Anzahl der Zellen pro ml in der Bakterienlösung, die der Polystyrolkugel zugegeben wurde.

<sup>2)</sup> Die **Zellzahl vor Ultraschall** wurde nach dreimaliger Waschung der mit den Bakterien behafteten Polystyrolkugel mit PBS bestimmt, bevor die Zellen durch die Ultraschallbehandlung von der Polystyrolkugel gelöst wurden.

<sup>3)</sup> Berechnung der **an den Polystyrolkugeln gebundenen Bakterienzellen** pro 2 ml erfolgte durch Subtraktion der Bakterienzellkonzentrationen vor Ultraschallbehandlung von den Bakterienzellkonzentrationen nach Ultraschallbehandlung.

<sup>4)</sup> CFU: colony forming unit

**Abbildung 3 Bakterienkonzentrationen von 1457 und M12 nach 2, 4 und 6 minütiger Ultraschallbehandlung**



Die Diagramme zeigen für jede unabhängig voneinander untersuchte Polystyrolkugel die Bakterienkonzentrationen der drei Stämme 1457, M12a und M12b nach 2, 4 und 6 minütiger Ultraschallbehandlung. Es zeigt sich mit zunehmender Ultraschalldauer eine abnehmende Bakterienkonzentration bei M12a und M12b, nicht jedoch bei 1457.

<sup>1)</sup> CFU: colony forming unit

## **3.2 Funktioneller Zusammenhang zwischen dem Hämagglutinin und PIA**

### **3.2.1 Vorbemerkung**

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Hämagglutinationsfähigkeit der verschiedenen isogenen Mutanten zu vergleichen und einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen PIA und dem Hämagglutinin von *S. epidermidis* zu untersuchen (Rupp et al., 1992; Rupp et al., 1995). Hierzu wurden Hämagglutinationshemmtests mit verschiedenen IgG-Fraktionen (s. 2.2.6) sowie gereinigtem PIA des biofilmpositiven Stammes 1457 durchgeführt. Die Hämagglutinationshemmtests wurden mit den Stämmen 1457, 9142, 8400, ihren zugehörigen isogenen Mutanten sowie SE-5, RP62A und RP62A-M7 als internationale Referenzstämme durchgeführt. Die ermittelten Hämagglutinationstiter waren in voneinander unabhängigen Versuchen reproduzierbar.

### **3.2.2 Hämagglutinationstest in PBS**

Bei diesem Versuch wurde die Fähigkeit zur Agglutination von Schaferythrozyten in PBS-CMF der Wildtypen 1457, 9142, 8400, ihrer zugehörigen isogenen Mutanten, 1457c und ihrer der Tn917-Mutanten (M12, M13, M15, M17, M19, M20, M21, M22, M23, M24) sowie der internationalen Stämme SE-5, RP62A und seiner durch Mitomycin-Mutagenese biofilmbildner Mutante M7 untersucht. Die Biofilmbildner *S. epidermidis* 1457, 9142, 8400, 1457c, M16, M20, SE-5, RP62A wiesen deutliche Hämagglutinationstiter von 1:64 bis 1:512 auf. Die isogenen biofilmbildner Mutanten 1457-M10, 1457-M11, 9142-M10, 9142-M11, 8400-M10, 8400-M11 und die Transposonmutanten M12, M13, M22-M24 waren nicht in der Lage eine Hämagglutination hervorzurufen. Die Transposonmutanten M15, M17, M19 und M21 zeigten einen niedrigen Hämagglutinationstiter (1:2 bis 1:32). Die biofilmbildner Mutante RP62A-M7 war vollkommen hämagglutinationsnegativ, wobei ein deutlicher den biofilmpositiven Wildtypen entsprechender PIA-Titer nachweisbar war. Die in unabhängigen Tests reproduzierbaren Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammen mit den zugehörigen PIA-Koagglutinationstiter aufgeführt (s. 3.1.4).

<b>Tabelle 15 Hämagglutinationstest in PBS</b>
--

Bakterienstämme	Hämagglutinationstiter	Koagglutination mit Anti-1457 <sub>abs</sub> <sup>1)</sup> Serum
	(reziproker Wert)	(reziproker Wert)
	PBS	TSB-BBL
1457	128	1024
1457-M10	-	-
1457-M11	-	-
9142	64	512
9142-M10	-	-
9142-M11	-	-
8400	64	1024
8400-M10	-	-
8400-M11	-	-
1457c	512	1024
M12	-	-
M13	-	-
M15	16	32
M16	256	1024
M17	16	256
M19	16	32
M20	256	1024
M21	2	8
M22	-	-
M23	-	-
M24	-	-
SE-5	128	1024
RP62A	256	1024
RP62A-M7	-	512

Hämagglutinationsverhalten der biofilmpositiven Stämme 1457, 8400, 9142, 1457c, M16 und M20 sowie der biofilmnegativen Mutanten 1457-M10, 1457-M11, 8400-M10, 8400-M11, 9142-M10, 9142-M11, M12, M13, M15, M17, M19, M21, M22, M23 und M24. Des weiteren wurden die internationalen Referenzstämme SE-5, RP62A und seine biofilmnegative, jedoch PIA-positive Mutante RP62A-M7 untersucht. Es zeigt sich eine Korrelation zwischen den PIA-Koagglutinationstitern und dem Hämagglutinationsverhalten. Lediglich M17 und RP62A-M7 weisen eine erhebliche Differenz zwischen ihren Hämagglutinations- und Koagglutinationstitern auf. Stämme, bei denen keine Koagglutination bzw. Hämagglutination eintrat, wurden mit (-) gekennzeichnet.

<sup>1)</sup> Siehe Herstellung des Serums unter 2.1.7

### 3.2.3 Hämagglutinationshemmung durch spezifische Antikörper

Durch Zusetzen der verschiedenen unter 2.2.6 beschriebenen IgG-Fractionen zum Hämagglutinationstest zeigte sich eine Hämagglutinationshemmung der verwendeten Stämme. Die IgG-Fractionen Anti-PIA und Anti-1457 (PIA-positiv) verursachten eine deutliche Inhibition von bis zu sechs bzw. vier Verdünnungsstufen, wohingegen die Normal-Serum (PIA-negativ) und Anti-5179 (PIA-negativ) IgG-Fractionen nur eine geringe Hemmung von ein bzw. zwei Verdünnungsstufen bewirkten. Abbildung 4 und Abbildung 5 zeigen Hämagglutinationstests mit der beobachteten Titerreduktion der Stämme 1457 und RP62A. In Tabelle 16 sind die Werte eines repräsentativen Hämagglutinationshemmtests aufgelistet. Es ließ sich bei den reproduzierten Tests eine schwankende Titerhöhe von ein bis zwei Verdünnungsstufen beobachten, wobei das Verhältnis der Titerreduktionen konstant blieb. Die Hämagglutinationshemmung durch Anti-PIA bzw. Anti-1457 IgG zeigte sich bei allen untersuchten biofilmbildenden Stämmen. *S. epidermidis* 1457-M11 fungierte als Negativkontrolle und zeigte keinerlei Hämagglutination. Die Kontrollen der einzelnen IgG-Fractionen ohne Zugabe von Bakterien waren ebenfalls hämagglutinationsnegativ. Die Konzentration der IgG-Fractionen in jedem Loch vor Zugabe der Erythrozytenlösung betrug ca. 75 µg/ml.

**Tabelle 16 Hämagglutinationshemmung durch spezifische Antikörper**

Stämme	Hämagglutinationstiter (reziproker Wert)				
	PBS	Normal-Serum IgG (biofilmnegativ)	Anti-5179 IgG (biofilmnegativ)	Anti-1457 IgG (biofilmpositiv)	Anti-PIA IgG (PIA-positiv)
1457	128	64	64	8	2
1457-M11	-	-	-	-	-
9142	32	16	32	4	2
8400	64	32	32	4	2
SE-5	128	64	64	4	2
RP62A	128	64	64	16	4

Hämagglutinationsinhibition durch die IgG-Fractionen Anti-1457 und Anti-PIA bei den biofilmpositiven Stämmen 1457, 9142, 8400, SE-5 und RP62A. Eine signifikante Hämagglutinationshemmung konnte durch die IgG-Fractionen Normal-Serum und Anti-5179 nicht beobachtet werden. Die biofilmnegative Transposonmutante 1457-M11 zeigte als Negativkontrolle keine Hämagglutination.

**Abbildung 4** Hämagglutinationshemmung von *S. epidermidis* 1457 durch spezifische Antikörper

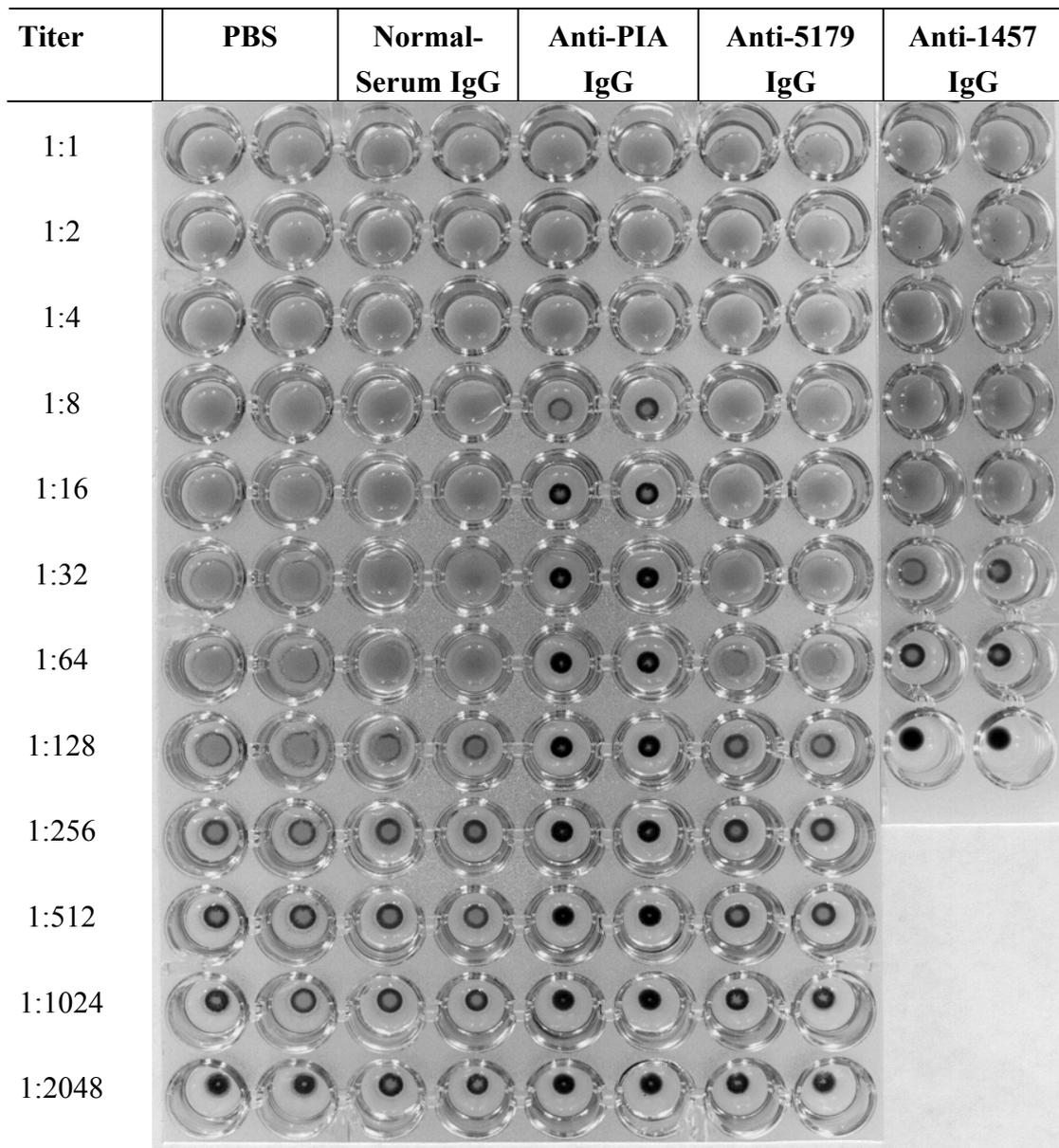
Titer	PBS	Anti-PIA IgG	Normal- Serum IgG	Kontrollen <sup>1)</sup>		Anti-1457 IgG	Anti-5179 IgG
				1457-M11	IgG/PBS		
1:1							
1:2							
1:4							
1:8							
1:16							
1:32							
1:64							
1:128							
1:256							
1:512							
1:1024							
1:2048							

Die Abbildung zeigt das Hämagglutinationsverhalten des biofilmpositiven Stammes *S. epidermidis* 1457 nach Zugabe unterschiedlicher IgG-Fractionen. So läßt sich bei den IgG-Fractionen Anti-PIA und Anti-1457 (PIA-positiv) eine deutliche Inhibition von sechs bzw. vier Verdünnungsstufen beobachten. Die Normal-Serum (PIA-negativ) und Anti-5179 (PIA-negativ) IgG-Fractionen verursachten nur eine geringe Hemmung von ein bzw. zwei Verdünnungsstufen.

<sup>1)</sup> Zur Kontrolle wurde in der ersten Spalte eine Verdünnungsreihe von *S. epidermidis* 1457-M11 erstellt, bei der keine Hämagglutination zu beobachten war.

In der zweiten Spalte unter der Bezeichnung **Kontrollen** wurden jeweils 50 µl der IgG-Fractionen sowie PBS in jeweils 2 Nöpfchen zu der Erythrozytenlösung gegeben. Von unten beginnend: PBS, Anti-PIA IgG, Normal-Serum IgG, Anti-5179 IgG, Anti-1457 IgG.

**Abbildung 5** Hämagglutinationshemmung von *S. epidermidis* RP62A durch spezifische Antikörper



Diese Abbildung zeigt das Hämagglutinationsverhalten des biofilmpositiven internationalen Referenzstammes *S. epidermidis* RP62A nach Zugabe unterschiedlicher IgG-Fractionen. So lässt sich wie bei *S. epidermidis* 1457 nach Zugabe der IgG-Fractionen Anti-PIA und Anti-1457 (PIA-positiv) eine deutliche Inhibition von fünf bzw. vier Verdünnungsstufen beobachten. Im Gegensatz dazu bewirkten die Normal-Serum (PIA-negativ) und Anti-5179 (PIA-negativ) IgG-Fractionen nur eine geringe Hemmung von einer Verdünnungsstufe.

### 3.2.4 Hämagglutinationshemmung durch PIA

Das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsın war ebenfalls in der Lage eine Hämagglutinationshemmung von 5 bis 6 Verdünnungsstufen bei den untersuchten Biofilmbildnern *S. epidermidis* 1457, 9142, 8400, SE-5 und RP62A hervorzurufen (s. Tabelle 17, Abbildung 6). Hierbei wurde die Peak I-Fraktion des zuvor gereinigten PIA von *S. epidermidis* 1457 verwendet (s. 2.2.11). Die PIA-Endkonzentration pro Nöpfchen vor Zugabe der Erythrozytenlösung lag bei ca. 9 µg/ml.

Der Versuch, bei der hämagglutinations- und biofilmmnegativen isogenen Mutante 1457-M11 durch Zugabe von gereinigtem PIA Peak I bis zu einer Konzentration von 18 µg/ml eine Hämagglutination zu erzeugen, war nicht möglich. Es stellte sich keine Agglutination der Schaferythrozyten ein. Bei den Hämagglutinationshemmtests wurde 1457-M11 als Negativkontrolle eingesetzt.

<b>Tabelle 17</b>	<b>Hämagglutinationshemmung durch PIA</b>
-------------------	---

Bakterienstämme	Hämagglutinationstiter (reziproker Wert)	
	PBS	gereinigtes PIA 1457
1457	128	2
1457-M11	-	-
9142	64	1
8400	64	2
SE-5	128	2
RP62A	256	4

Nach Zugabe von gereinigtem PIA zeigt sich bei allen biofilmpositiven *S. epidermidis* Stämmen 1457, 9142, 8400, SE-5 und RP62A eine deutliche Hämagglutinationshemmung von 5 bis 6 Verdünnungsstufen. Die biofilmmnegative Mutante 1457-M11 zeigt als Negativkontrolle weder in PBS noch nach Zugabe von PIA eine Hämagglutination.

**Abbildung 6** Hämagglutinationshemmung von *S. epidermidis* 1457, 1457-M11 und RP62A durch PIA

Titer	1457 mit PBS	1457 mit PIA	1457-M11 mit PBS	1457-M11 mit PIA	RP62A mit PBS	RP62A mit PIA
1:1						
1:2						
1:4						
1:8						
1:16						
1:32						
1:64						
1:128						
1:256						
1:512						
1:1024						
1:2048						
	PBS- Kontrolle <sup>1)</sup>		PIA- Kontrolle <sup>2)</sup>			

Die Abbildung zeigt das Hämagglutinationsverhalten der biofilmpositiven Stämme 1457 und RP62A mit und ohne Zugabe von gereinigtem PIA. 1457 hämaggutiniert in PBS bis zu einem Titer von 1:128. Bei Zugabe von gereinigtem PIA erfolgt eine Hämagglutinationshemmung um 6 Verdünnungsstufen. Eine ähnliche Hämagglutinationshemmung läßt sich bei RP62A beobachten. Die biofilmnegative Mutante 1457-M11 zeigt als Negativkontrolle weder in PBS noch nach Zugabe von PIA eine Hämagglutination.

<sup>1)</sup> In die letzten beiden Nöpfchen wurde als Kontrolle nur PBS ohne Bakterien gegeben.

<sup>2)</sup> In die letzten beiden Nöpfchen wurde als Kontrolle nur PIA ohne Bakterien gegeben.

### 3.2.5 Kontrollversuche zum Antikörpernachweis in den jeweiligen IgG-Fraktionen mittels indirektem Immunfluoreszenztest sowie PIA-Nachweis im Hexosamintest

Die in den Hämagglutinationshemmtests verwendeten IgG-Fraktionen (Herstellung s. 2.2.6) wurden in einem indirekten Immunfluoreszenztest untersucht. Dieser Test war notwendig, um Antikörper in den jeweiligen Gesamt-IgG Fraktionen nachzuweisen, die gegen *S. epidermidis* Bakterien oder deren Bestandteile gerichtet waren. Des weiteren konnten Aussagen über deren Quantität in den IgG-Fraktionen getroffen werden. Hierzu wurden Verdünnungsreihen der IgG-Fraktionen aus 3 unabhängigen Präparationen erstellt (s. im Methodenteil 2.2.7).

Die Normal-Serum IgG-Fraktion zeigte eine äußerst schwach ausgeprägte Fluoreszenz bei *S. epidermidis* 1457 und ihrer Transduktanten 1457-M11 mit einem Titer von <1:32. Eine starke Fluoreszenz mit einem Titer von 1:512 war bei der Anti-5179 IgG-Fraktion zu beobachten. Anti-1457 IgG wies die stärkste Fluoreszenz bei einem Titer von 1:1024 auf. Bei diesen IgG-Fraktionen wiesen die Titer im Vergleich biofilmpositiver Wildtyp 1457 und biofilmbegleitende Transduktante 1457-M11 nur geringfügige Unterschiede auf. Im Gegensatz dazu konnte bei der Anti-PIA IgG-Fraktion ein deutlicher Unterschied festgestellt werden. 1457 wies eine intensive Fluoreszenz (1:128) auf, wohingegen 1457-M11 keine Fluoreszenz bei einem Titer von <1:32 zeigte.

**Tabelle 18 Immunfluoreszenztest der IgG-Fraktionen**

IgG-Fraktionen	Bakterienstämme als Antigen im Immunfluoreszenztest reziproker Titer	
	1457 (biofilmpositiv)	1457-M11 (biofilmbegleitend)
Normal-Serum	<32	<32
Anti-5179 (biofilmbegleitend)	512	512
Anti-1457 (biofilmpositiv)	1024	1024
Anti-PIA	128	<32

Die Tabelle enthält die unterschiedlichen reziproken Titer der verschiedenen IgG-Fraktionen im indirekten IFT. Es wurden sowohl der biofilmpositive Stamm 1457 als auch seine biofilmbegleitende Transduktante als Antigene eingesetzt. Hierdurch konnte die Spezifität der Antikörper gezeigt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß in der Normal-Serum IgG-Fraktion keine Antikörper gegen PIA bzw. Bestandteile von *S. epidermidis* Bakterien vorhanden waren. Die Anti-5179 und Anti-1457 IgG-Fraktionen enthielten eine hohe Konzentration an Antikörpern gegen *S. epidermidis* Bakterienbestandteile. In der Anti-PIA IgG-Fraktion befanden sich spezifische Antikörper gegen PIA, da eine deutliche Titerdifferenz zwischen dem biofilmpositiven Stamm 1457 und seiner biofilmnegativen isogenen Mutante 1457-M11 vorlag. Die Mutante 1457-M11 unterscheidet sich vom Wildtyp nur in der fehlenden Bildung von PIA. Zur PIA-Produktionsmenge der beiden Stämme sei auch auf die Koagglutinationstests unter 3.1.4 verwiesen.

Des weiteren ist der qualitative und quantitative Nachweis des PIA in den verwendeten Proben wichtig, um die spezifische Hämagglutinationsinhibition durch PIA zu zeigen. Da das PIA einheitlich aus  $\beta$ -[1-6]-verknüpften N-Acetylglucosamineinheiten aufgebaut ist, läßt sich die Konzentration des PIA in den zu untersuchenden Proben mittels des Hexosamintests bestimmen (s. Methoden 2.2.12). Hierzu wurde die PIA-Konzentration der zuvor isolierten gereinigten PIA Peak I-Fraktion (s. 2.2.11) als Hexosaminkonzentration ermittelt. Die aus *S. epidermidis* 1457 gewonnene Probe enthielt eine PIA-Konzentration von ca. 300  $\mu\text{g/ml}$ .

## 4 Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse verdeutlichen phänotypische Eigenschaften und Unterschiede der in unserer Arbeitsgruppe isolierten Tn917 Transposonmutanten bezüglich der Biofilmbildung, PIA-Produktion, primärer Bindung und der Hämagglutinationsfähigkeit. Des Weiteren wurde erstmals ein funktioneller Zusammenhang zwischen PIA und einem für die Agglutination von Erythrozyten verantwortlichen Hämagglutinin gezeigt (Rupp et al., 1992; Rupp et al., 1995).

Die Fähigkeit von *S. epidermidis* zur Ausbildung von Biofilmen wird als entscheidender Pathogenitätsfaktor bei der Entstehung polymerassoziierter Infektionen angesehen. Das mit Hilfe isogener Transposonmutanten isolierte interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin (PIA) konnte als entscheidender Faktor für die Entstehung eines Biofilms nachgewiesen werden (Mack et al., 1996). Durch genetische Untersuchungen konnten vier in einer Operon-artigen Struktur organisierte Gene *icaADBC* identifiziert werden, welche für die PIA-Synthese verantwortlich sind (Heilmann et al., 1996a, 1996b; Gerke et al., 1998).

Die Transposoninsertionen der isogenen Mutanten 1457-M10 und 1457-M11 liegen an den Nukleotiden 931 und 87 in der kodierenden Sequenz des *icaA* Gens (Mack et al., 1999). Die phänotypische Änderung zu einem biofilmnegativen Typus der übrigen Transposonmutanten erfolgte durch Insertionen an anderen Stellen des Genoms von *S. epidermidis* 1457c (Mack et al., 2000). Daher scheinen für die Biofilmbildung zusätzlich notwendige oder modulierende Faktoren in ihrer Synthese gestört zu sein.

Eine genotypische Einteilung der Transposonmutanten in verschiedene Klassen zeigt Tabelle 19 (Mack et al., 2000). Eine weitere phänotypische Charakterisierung der Transposonmutanten ist demnach für das Verständnis der Biofilmentstehung und die Isolierung weiterer Faktoren essentiell.

<b>Tabelle 19</b>	<b>Genotypische Klassifizierung der Transposonmutanten</b>
-------------------	--

Klassen	Bakterienstämme	Biofilmbildung <sup>1)</sup>	
		TSB-OXOID	TSB-BBL
wt <sup>2)</sup>	1457, 1457c	positiv	positiv
I	1457-M10, 1457-M11, M13, M21, M22, M23, M24	negativ	negativ
II	M12	negativ	negativ
III	M15, M19	negativ	eingeschränkt
IV	M17	negativ	positiv

Einteilung der Transposonmutanten nach genotypischer Charakterisierung in die Klassen I bis IV.

<sup>1)</sup> Messung der Biofilmbildung im Adhärenztest und Einteilung in biofilmpositive und biofilmnegative Stämme siehe unter 3.1.2.

<sup>2)</sup> wt := Wildtyp

In dem ersten Teil dieser Arbeit konnten verschiedene phänotypische Eigenschaften der Transposonmutanten beobachtet werden.

Der Einfluß von Bestandteilen des Nährmediums auf die Biofilmproduktion wurde schon in früheren Untersuchungen gezeigt (Christensen et al., 1982; Hussain et al., 1992b). Biofilmpositive Bakterien, die in TSB ohne Glucose angezüchtet wurden, zeigten einen biofilmnegativen oder sehr schwach biofilmbildenden Phänotyp. Andere Kohlenhydrate wie D-Fruktose, D-Galaktose, Saccharose, Laktose und Maltose sind ebenfalls in der Lage bei Supplementierung zu TSB ohne Glucose eine Biofilm- und PIA-Bildung hervorzurufen (Mack et al., 1992). Ähnliche Beobachtungen machten McKenney und Allison (1995 und 1997). Sie zeigten einen Zusammenhang zwischen den Anzuchtbedingungen des Bakterienstammes *Burkholderia cepacia* und einer veränderten Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika sowie dessen Ausbildung von Virulenzfaktoren. Die Zusammensetzung des Nährmediums scheint demnach eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung eines Biofilms zu sein.

Der zur Quantifizierung des Biofilms etablierte Adhärenztest zeigte bei Verwendung gleicher Nährmedien unterschiedlicher Hersteller zum Teil deutliche Unterschiede in der Biofilmbildung. Für die Transposonmutanten konnte die Kopplung der phänotypischen Veränderungen an die Transposoninsertionen durch Nachweis nahezu identischer

Ergebnisse im Adhärenztest der den Transposonmutanten zugehörigen Transduktanten gezeigt werden.

Außer bei *S. epidermidis* 1457c konnte eine generelle Reduktion des Biofilms aller biofilmpositiven Stämme unter Verwendung des Nährmediums TSB der Firma OXOID verglichen mit dem TSB-Medium der Firma BBL beobachtet werden. Die Mutante M17 veränderte ihren unter Anzucht in TSB-OXOID biofilmnegativen Typus bei Verwendung von TSB-BBL in einen den Wildtypen entsprechenden Phänotyp (TSB-OXOID: 1457c 1,836; M17 0,080; TSB-BBL 1457c 1,565; M17 1,126). Die Induktion eines Biofilms unter Wachstum im TSB-Medium der Firma BBL zeigt eine gesteigerte Sensibilität bzw. Abhängigkeit der für die Biofilmbildung aus dem Nährmedium benötigten Faktoren. Da die Zusammensetzung der Nährmedien beider Firmen identisch ist, kommen firmenspezifische Herstellungsunterschiede in Betracht. Mack et al. (1996a) entdeckten eine Korrelation zwischen der Biofilmbildung und der PIA-Produktion. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, daß der vom Transposon getroffene Genlocus der Mutante M17 z. B. einen Bereich für die Regelung der Stabilität oder Kofaktoren der PIA-Synthese kodieren könnte.

Ein ähnliches Phänomen ist bei der Mukoidbildung zu beobachten. Im Gegensatz zu den Wildtypen 1457, 9142, 8400 und 1457c haben die Mutanten M16 und M20 die Fähigkeit zur Mukoidbildung verloren. Bei gleichzeitig in den verschiedenen Nährmedien vollständig erhaltener Biofilm-, PIA- und Zellclusterbildung läßt sich ein zusätzlicher Faktor für die Mukoidbildung vermuten, dessen Synthese nach der Transposoninsertion eingeschränkt oder erloschen ist. PIA scheint bei der Mukoidbildung zumindest beteiligt bzw. eine Voraussetzung zu sein, da keine der biofilmnegativen Mutanten, aber alle biofilmpositiven Wildtypen eine Mukoidbildung aufwiesen.

Obwohl M17 in TSB-BBL eine reaktivierte PIA- und Biofilmproduktion zeigte, war sie nur eingeschränkt zur Hämagglutination fähig (reziproker Titer: M17 16, 1457 128). Demnach könnte man annehmen, daß das Hämagglutinin und PIA entgegen den weiter unten diskutierten Ergebnissen distinkt sind. Die durch Mitomycin C-Mutagenese erzeugte Mutante M7 des biofilmbildenden Stammes *S. epidermidis* RP62A produzierte in gleichem Maße PIA wie der Wildtyp. Obwohl ihre PIA-Produktion nicht eingeschränkt ist, war sie weder zur Biofilmbildung noch zur Hämagglutination fähig (Schumacher-Perdreau et al. 1994). Das von RP62A-M7 produzierte PIA scheint noch in seiner molekularen Struktur für die PIA-Antikörper als Antigen aktiv zu sein, aber seine Funktionalität zur

Zellvernetzung verloren zu haben. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch bei M17 denkbar, wobei das von dieser Mutante produzierte PIA noch in der Lage ist die eigenen Bakterienzellen zu vernetzen, aber zusätzlichen Belastungen, wie z. B. in den U-förmigen Nöpfchen des Hämagglutinationstests auftretende gravimetrische Kräfte, nicht standhalten zu können.

Eine weitere Erklärung wäre eine gestörte Produktion eines möglichen Membranverankerungsproteins, das die N-Acetylglucosaminoligomere des PIA mit der Zellwand verbindet. Bei einem Defekt dieses Proteins könnte das PIA durch äußere Einflüsse, wie z. B. Unterschiede in der Zusammensetzung der Nährmedien oder mechanische Kräfte, dem Bakterium leicht verloren gehen. Hussain et al. (1997) beschrieben eine lectin-ähnliche Vernetzung durch das accumulation-associated protein (AAP), welches der biofilmnegativen, jedoch PIA-positiven Mutante RP62A-M7 fehlte. Ein Mangel bzw. eine strukturelle Veränderung des AAP wäre demnach auch bei der Mutante M17 als Ursache für die gestörte Zellvernetzung denkbar.

Aufgrund genotypischer Untersuchungen wissen wir jedoch, daß bei M17 regulative Mechanismen durch die Transposoninsertion gestört sind (Mack et al., 2000).

Eine weitere Gruppe phänotypisch abweichender Mutanten besteht aus M15, M19 und M21. Bei diesen Mutanten konnte bei Anzucht in TSB-BBL in allen Tests (Adhärenz, Koagglutination, Hämagglutination, Zellcluster) eine schwache Reaktion in Richtung eines biofilmpositiven Phänotyps induziert werden. Die niedrigen Werte der Biofilmbildung (TSB-BBL 1457 2,469, M15 0,204, M19 0,277, M21 0,155), Zellclusterbildung und Hämagglutination (reziproker Wert: 1457 128, M15 16, M19 16, M21 2) korrelieren mit den gemessenen PIA-Koagglutinationstitern (reziproker Wert: 1457 1024, M15 32, M19 32, M21 8).

Es wäre denkbar, daß bei diesen Mutanten die Fähigkeit zur PIA-Synthese nicht verlorengegangen ist, sondern durch das Transposon ein Regulatorgen für die PIA-Produktion getroffen wurde. Die Synthese intakten PIAs reicht nicht aus, um einen dem Wildtyp entsprechenden Biofilm zu bilden. Genotypisch läßt sich bei M21 eine Transposoninsertion beim Nukleotid 1001 des *icaC* Gens beobachten. Diese Insertionsstelle liegt nur 67 Nukleotide vom Stop Codon des *icaC* Gens entfernt und scheint eine enzymatische Restaktivität des *icaADBC* Operons zu erlauben. Als Folge ist eine reduzierte PIA-Produktion und beschriebene abgeschwächte Biofilmbildung zu beobachten (Mack et al., 2000).

Eine Besonderheit der Mutanten M15 und M19 ist die graue Farbe ihrer auf Blutagar mehrere Tage bebrüteten Kolonien. Die Mutante M21 wies nach gleichlanger Inkubation eine weiße Kolonienfarbe auf, entsprechend den übrigen Mutanten und Wildtypen außer M12. Diese graue Farbe könnte Folge einer strukturellen Veränderung der für die Kolonienfarbe verantwortlichen Karotinoide sein.

Zur weiteren phänotypischen Charakterisierung der Transposonmutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Versuche bezüglich der primären Bindung durchgeführt. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede in der primären Bindungsfähigkeit bei verschiedenen Anzuchtbedingungen.

In Schüttelkulturen angezüchtete Bakterien verhielten sich bezüglich der primären Bindung an Polystyrolkugeln unabhängig von ihrer Fähigkeit zur Biofilm- oder PIA-Produktion nahezu identisch. Bakterien die in Gewebekulturschalen angezüchtet wurden, zeigten jedoch erhebliche Unterschiede bei ansonsten gleichem Versuchsaufbau. So waren nach Anzucht in Gewebekulturschalen die biofilmm negativen Mutanten zahlenmäßig um den Faktor zehn bis fünfzig weniger an die Polystyrolkugeln gebunden als die biofilm- und PIA-positiven Stämme.

Dieser Unterschied der biofilmpositiven Stämme könnte mit der Ausbildung des fest am Boden der Kulturschale haftenden Biofilms zusammenhängen. Hierbei wäre das von den biofilmpositiven Stämmen produzierte PIA als möglicher weiterer Faktor für die primäre Bindung zu diskutieren.

Es wäre jedoch auch denkbar, daß bei der Suspendierung des Zellrasens zahlreiche wenn auch kleinere Zellaggregate biofilmpositiver Stämme bestehen bleiben und dadurch bei der Bindung an die Polystyrolkugeln PIA unabhängige Faktoren das Anhaften ganzer Zellhaufen vermitteln. Der Großteil der Zellen wäre dann nicht mit der Oberfläche der Kugel sondern interzellulär verbunden. Nach der Ultraschallbehandlung könnten diese Zellen dann jeweils einzeln nachgewiesen werden und somit eine Erklärung für den deutlichen Unterschied zwischen den biofilmpositiven und -negativen Stämmen liefern.

Falls jedoch PIA tatsächlich einen Einfluß auf die primäre Bindung besäße, wäre ein Verlust dieses Einflusses bei den biofilmpositiven Stämmen der Schüttelkulturen zu beobachten. So könnte eine durch den Schüttelvorgang hervorgerufene mechanische Belastung der Zellen das auf der Bakterienoberfläche lokalisierte PIA von diesen entkoppeln. Die Zeit, um neues PIA zu bilden, könnte während der anschließenden 30 minütigen Inkubation mit der Polystyrolkugel nicht ausreichen.

Diese Erklärung deckt sich jedoch nicht mit den Ergebnissen zur primären Bindung der Schüttelkulturen. Die Konzentration der an die Polystyrolkugeln gebundenen Bakterien war bei allen Stämmen der Schüttelkulturen in etwa den biofilmmnegativen Mutanten der Biofilmkulturen vergleichbar (s. Tabelle 11 und Tabelle 12). Hierbei ist zu berücksichtigen, daß bei den Biofilmkulturen die Ausgangskonzentration der Bakterien im Inokulum ca. 10fach höher war. Bei gleicher Ausgangskonzentration im Inokulum der Schüttelkulturen läge die Konzentration der gebundenen Zellen in Höhe der biofilmpositiven Stämme der Biofilmkulturen, wenn eine lineare Relation zwischen der Größe des Inokulums und der Zahl der gebundenen Zellen bestehen würde. Daß eine solche lineare Relation zwischen der Bakterienkonzentration im Inokulum und der Konzentration der an Polystyroloberflächen gebundenen Zellen tatsächlich besteht, wurde von Bartscht und Mack gezeigt (Bartscht und Mack, unveröffentlichte Ergebnisse).

Diese Beobachtungen zeigen, daß die biofilmmnegativen Mutanten der Biofilmkulturen verglichen mit den Schüttelkulturen eine ca. 10fach verminderte primäre Bindungsfähigkeit aufweisen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß die Zellen der Schüttelkulturen durch den Schüttelprozeß verstärkt zur Ausbildung oberflächenaktiver Substanzen angeregt werden. Diese aktiveren Zellen wären dann eher bzw. verstärkt in der Lage an Polymeroberflächen zu binden. Unterschiede zwischen an Oberflächen haftenden und planktonischen Zellen von *S. aureus* beschrieben Chuard et al. (1993 und 1997). Sie beobachteten bei geschüttelten Kulturen eine deutlich erhöhte Wirksamkeit von Antibiotika verglichen mit Zellen, die an einer Fibronectin beschichteten Polymeroberfläche gebunden waren.

Festzuhalten bleibt eine beobachtbare, insgesamt ausgeprägtere primäre Bindungsfähigkeit von Bakterien, die in Schüttelkulturen angezüchtet werden. Die Anzucht in Gewebekulturschalen scheint bei biofilmmnegativen Stämmen eine vergleichsweise reduzierte Bindungsfähigkeit hervorzurufen.

Die Mutante M17 zeigte bei Anzucht in Gewebekulturschalen verglichen mit den biofilmpositiven Stämmen einerseits eine deutlich reduzierte, andererseits im Gegensatz zu den biofilmmnegativen Mutanten eine ca. dreifach höhere primäre Bindungsfähigkeit. Da diese biofilmmnegative Mutante -wie bereits gezeigt- unter bestimmten Anzuchsbedingungen eine PIA-Produktion aufweist, lassen sich die gleichen Erklärungen für die beobachtete höhere Bindungsfähigkeit finden. Die interzelluläre Bindung könnte zu fragil sein, um bei der Suspendierung den biofilmpositiven Wildtypen entsprechende,

ausreichend große Zellcluster zu erhalten. Auf der anderen Seite wäre bei einer PIA-vermittelten primären Bindung das beeinflusste bzw. veränderte PIA in der Lage eine, verglichen mit den übrigen biofilmnegativen Mutanten, erheblich höhere Bindungsintensität hervorzurufen.

Einen strukturellen Integritätsverlust zeigte die biofilmnegative Mutante M12 unter Ultraschallbehandlung. Im Gegensatz zu dem biofilmpositiven Wildtyp 1457 nahm die Bakterienkonzentration der Mutante M12 nach Ultraschallbehandlung deutlich ab. Dadurch könnte die sehr niedrige Konzentration von M12 nach 2 minütiger Ultraschallbehandlung erklärt werden. Ansonsten zeigte M12 neben einer nach mehrtägiger Bebrütung grauen Kolonienfarbe auf Blutagar und einer reduzierten Zelldichte der Hauptkulturen bei unterschiedlichen Versuchen keine weiteren Auffälligkeiten. Die Transposoninsertion scheint eine Stabilitäts- und Wachstumsbeeinträchtigung bei M12 verursacht zu haben.

Die Mutanten M13, M22, M23 und M24 verhielten sich in allen Versuchen ihrem biofilmnegativen Typus entsprechend. Es konnte keine PIA-Produktion, keine Hämagglutination und eine den biofilmnegativen Stämmen vergleichbare primäre Bindung nachgewiesen werden.

Die biofilmpositiven Mutanten M16 und M20 zeigten einen dem Wildtyp identischen Phänotyp bis auf ihren Verlust der Mukoidbildung. Anhand dieser Ergebnisse lassen sich die Mutanten in verschiedene Klassen einteilen, die in Tabelle 20 aufgeführt sind.

<b>Tabelle 20</b>	<b>Phänotypische Klassifizierung der Transposonmutanten</b>
-------------------	---

Klassen	Bakterienstämme	Biofilmbildung <sup>1)</sup>	
		TSB-OXOID	TSB-BBL
wt <sup>2)</sup>	1457, 1457c	positiv	positiv
I	1457-M10, 1457-M11, M13, M21, M22, M23, M24	negativ	negativ
II	M12	negativ	negativ
III	M15, M19	negativ	eingeschränkt
IV	M17	negativ	positiv
V	M16, M20	positiv	positiv

Einteilung der Transposonmutanten nach phänotypischer Charakterisierung in die Klassen I bis V.

<sup>1)</sup> Messung der Biofilmbildung im Adhärenztest und Einteilung in biofilmpositive und biofilmnegative Stämme siehe unter 3.1.2.

<sup>2)</sup> wt := Wildtyp

Die Klasseneinteilung, die sich nach phänotypischen Gesichtspunkten ergibt, ist der genotypischen Einteilung nahezu identisch (s. Tabelle 19). Die Mutante M21 zählt nach genotypischer Klassifizierung zu den Klasse I Mutanten. Da sie phänotypisch von den übrigen Klasse I Mutanten abweicht, könnte sie eine eigene Klasse bilden. Die phänotypischen Besonderheiten lassen sich jedoch genotypisch nachvollziehen, so daß sie zu den Klasse I Mutanten zu rechnen ist (s. S. 61).

Das Verständnis der Funktionen und des Zusammenspiels der verschiedenen Mediatoren während der aufeinanderfolgenden Phasen der Biofilmbildung ist zur Entwicklung eines therapeutischen Konzeptes in Form einer Impfung, Herstellung anderer polymerer Materialien oder Medikamenten von zentraler Bedeutung. Die Tatsache, daß bei den in dieser Arbeit untersuchten Mutanten nicht alle einen biofilmnegativen Phänotyp aufgrund einer Insertion im *icaADBC* Genlokus ausbilden, läßt auf zusätzliche Faktoren bei der Entstehung eines Biofilms schließen. Weitere Untersuchungen werden zum Verständnis dieser Beobachtungen erforderlich sein.

In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Hämagglutinationsfähigkeit der Wildtypstämme und ihrer Transposonmutanten untersucht. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Biofilmbildung und der Fähigkeit von *S. epidermidis* zur Hämagglutination sowie eine Abgrenzung des Hämagglutinins zu bereits beschriebenen möglichen Mediatoren der Biofilmbildung wurden von Rupp und seinen Mitarbeitern beschrieben (Rupp et al., 1992; Rupp et al., 1995). Bei ihren Untersuchungen stellten sie neben der Korrelation von Biofilmbildung und Hämagglutination einen kompletten Verlust der Hämagglutinationsfähigkeit nach Behandlung der Bakterien mit Glukosidasen und Perjodatoxidation fest. Eine Unabhängigkeit der Hämagglutination von der Hydrophobizität der Bakterien sowie eine Verstärkung der Hämagglutination durch Zusatz von Glucose zum Nährmedium konnten ebenfalls beobachtet werden (Rupp et al., 1995). Nach Untersuchungen von Mack und Mitarbeitern (1992) konnte ebenfalls eine Abhängigkeit der PIA- bzw. Biofilmproduktion von der im Nährmedium enthaltenen Glucose und ein kompletter Verlust der Biofilmbildung nach Perjodatoxidation beobachtet werden. Auch das Molekulargewicht von  $>30$  kDa stimmte bei dem vermeintlichen Hämagglutinin und PIA überein (Rupp et al., 1995; Mack et al., 1992). Eine tatsächliche Beziehung des beschriebenen Hämagglutinins und des von Mack et al. isolierten PIAs konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden.

Alle biofilmpositiven Stämme außer der zuvor diskutierten Mutanten M17 zeigten eine deutliche Hämagglutination von Schaferythrozyten mit reziproken Titern zwischen 64 und 512 (reziproker Titer: M17 16, 1457 128). Die isogenen Mutanten der biofilmbildenden Wildtypen, die ihre Fähigkeit zur Produktion von PIA und Biofilmbildung komplett verloren haben, waren nicht mehr in der Lage, die ihnen zugesetzten Erythrozyten zu agglutinieren. Transposonmutanten mit geringer Biofilm- und PIA-Bildung wiesen ebenfalls einen niedrigen Hämagglutinationstiter auf (reziproker Titer: 1457 128 M15 16, M19 16, M21 2). Ein Zusammenhang zwischen PIA und der Hämagglutination läßt sich aus diesen Ergebnissen vermuten.

Nur die eingesetzten Antikörper aus Kaninchenantisera gegen PIA und den biofilmpositiven *S. epidermidis* Stamm 1457 inhibierten die Hämagglutination der fünf biofilmpositiven, PIA-produzierenden *S. epidermidis* Stämme 1457, 9142, 8400, RP62A und SE-5. Eine Blockierung des PIA durch spezifische Anti-PIA Antikörper scheint die Ursache für dieses Phänomen zu sein. Die Anti-5179 IgG-Fraktion enthält keine Anti-PIA Antikörper, jedoch einen hohen Anti-Staphylokokken-Antikörper Titer (Mack et al.,

1999). Sie rief keine Hemmung der Hämagglutination biofilmpositiver Bakterien hervor, so daß eine rein sterische Behinderung der Hämagglutination durch Antikörper ausgeschlossen ist.

Wenn demnach PIA eine Rolle für die Hämagglutination spielt bzw. als Hämagglutinin fungieren könnte, läge die Vermutung nahe, isoliertes PIA wäre in der Lage biofilmbegleitender Stämmen zur Hämagglutination zu verhelfen bzw. durch direkten Kontakt Erythrozyten ohne Anwesenheit von Bakterien zu agglutinieren. Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden. Im Gegenteil wird die bakterienvermittelte Hämagglutination durch isoliertes PIA um 6 Verdünnungsstufen gehemmt. Bei einer zugesetzten PIA-Menge von ca. 9 µg/Näpfchen ist die PIA-Konzentration der PIA-Hämagglutinationshemmtests, verglichen mit der von den biofilmpositiven Bakterien produzierten PIA-Menge, ca. um den Faktor 10 bis 100 höher. Diese deutlich höhere Konzentration an freiem, zugesetztem PIA könnte eine vermehrte Anheftung der freien PIA-Moleküle an die Erythrozyten bewirken und damit eine Interaktion der Erythrozytenoberfläche mit dem zellgebundenen PIA anwesender Bakterien blockieren.

Ein ähnliches Phänomen konnte bereits von Rupp und Mitarbeitern (1995) beobachtet werden. Sie entdeckten eine Inhibition der Hämagglutination von 7 *S. epidermidis* Stämmen durch eine konzentrationsabhängige Zugabe von  $\beta$ -Laktose und in geringerem Maße auch ihrer beiden Monosaccharide Glucose und Galaktose. Da PIA aus durchschnittlich 130  $\beta(1,6)$ -verknüpften 2-Desoxy-2-amino-D-glucopyranosyl-Einheiten besteht und somit ein Polysaccharid ist, wäre analog zu der inhibierenden Wirkung der  $\beta$ -Laktose eine Konkurrenz des freien PIA mit dem zellassozierten PIA um eine mögliche Hämagglutinin-Bindungsstelle auf der Erythrozytenoberfläche wahrscheinlich.

Verschiedene Gründe für die mangelnde Fähigkeit von PIA eine Hämagglutination biofilmbegleitender Bakterien hervorzurufen sind zu diskutieren. Da bei den isogenen Mutanten größtenteils nur eine Verminderung des Hexosamingehaltes und nicht in gleichem Maße an Proteinen bestand (Mack et al., 1994), wäre bei reduzierter PIA-Bildung eine uneingeschränkte Produktion eines potentiellen Membranverankerungsproteins anzunehmen. In diesem Fall wäre eine wiederauftretende Hämagglutination mittels zugesetztem PIA denkbar. Wenn man jedoch von einer kovalenten Bindung zwischen PIA und dem Verankerungsprotein ausgeht, wäre bei nachträglicher Zugabe von PIA ohne enzymatischen Katalysator keine Wiedervereinigung möglich.

Es kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, daß sekundäre Veränderungen der Bakterienoberfläche bei biofilmbildenden Mutanten eingetreten sind, und somit zugegebenes PIA nicht mehr an den Zellen binden kann (Mack et al., 1992).

Des Weiteren könnte die zur Gewinnung des PIA durchgeführte Ultraschallbehandlung eine Strukturveränderung des PIA hervorgerufen haben. Daraufhin könnte PIA noch als kompetitiver Inhibitor an die Erythrozytenoberfläche binden, jedoch keine Verbindung mit der Bakterienzelle herstellen.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der alleinigen Verwendung der Peak I-Fraktion des PIA für die Hämagglutinationsversuche. Bei der Gewinnung des PIA mit der Q-Sepharose Säule entsteht eine Hauptfraktion Peak I und eine kleinere Fraktion Peak II. Das PIA aus Peak I enthält durchschnittlich 15% deacetylierte Glucosaminreste und ist positiv geladen (Mack et al., 1996b). Das PIA aus Peak II enthält weniger deacetylierte Glucosaminreste. Stattdessen verleiht der Gehalt an Phosphat und Succinat dem PIA aus Peak II eine leicht negative Ladung. Die Erythrozytenoberfläche ist aufgrund ihrer durch N-Acetyl-Neuraminsäuren modifizierten Oligosaccharide von Glykoproteinen eher negativ geladen. Wenn sich das PIA aus Peak I mit seiner positiven Ladung der eher negativ geladenen Erythrozytenoberfläche anlagert, könnte das PIA aus Peak II das fehlende Verbindungsglied zur Bakterienwand darstellen und somit nur ein gemeinsamer Einsatz beider Fraktionen ein funktionstüchtiges Hämagglutinin hervorbringen.

Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse stützen die These einer hämagglutinierenden Eigenschaft des PIA. Fey et al. (1999) untersuchten 39 *S. epidermidis* Stämme, unter denen sich 1457 mit seinen isogenen Mutanten 1457-M10, O-47 mit seinen isogenen Mutanten mut1 und mut2, *S. carnosus* TM300 und andere Stämme befanden. Sie fanden eine starke Korrelation ( $P < .001$ ) zwischen Hämagglutination und Biofilmbildung sowie dem Nachweis einer 357-Basenpaare zählenden Sequenz innerhalb des Genlokus *icaA*. Diese Sequenz konnte mittels PCR nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte der das Plasmid pCN27 mit darauf lokalisiertem *ica* Gen enthaltene *S. carnosus* TM300 nur einen Biofilm auf Glas bei erhaltener Hämagglutination ausbilden. Das für die PIA-Synthese kodierende Plasmid verhalf dem normalerweise hämagglutinationsnegativen TM300 zur Hämagglutination.

Falls ein zusätzliches Protein für die Hämagglutination eine entscheidende Rolle spielen sollte, dann müßte dieses Protein sowohl bei *S. carnosus* als auch bei *S. epidermidis* Stämmen zu finden sein. Es scheint ziemlich unwahrscheinlich, daß ein anderes Polysaccharid als PIA für die Hämagglutination verantwortlich ist, da das *icaADBC*

Operon nur für eine Glykosyltransferase kodiert und keine zusätzlichen Gene für ein mögliches Protein einer Zuckersynthese existieren, das ein von PIA vollkommen verschiedenes Polysaccharid erzeugen könnte (Gerke et al., 1998; Heilmann et al., 1996).

Die Pathogenität der PIA/Hämagglutinin-positiven Bakterien unterstrichen kürzlich von Rupp et al. veröffentlichte Ergebnisse von Infektions-Tiermodellen (Rupp et al., 1999a; Rupp et al., 1999b). Dabei verursachte der PIA-hämagglutinationspositive Stamm 1457 bei Mäusen, deren subkutan-implantierte Venenkatheter mit den beiden Stämmen kontaminiert wurden, deutlich häufiger subkutane Abscesse ( $P < 0.01$ ) als seine biofilm- und hämagglutinationsnegative isogene Mutante 1457-M10. In einem zweiten Tiermodell zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem PIA-hämagglutinationspositiven Stamm 1457 und Zentralvenenkatheterinfektionen mit Bakteriämie sowie metastatischer Absiedlung ( $P < 0.03$ ) verglichen mit seiner isogenen Mutante 1457-M10.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird deutlich, daß PIA das Hämagglutinin oder zumindest ein wesentlicher funktioneller Bestandteil des Hämagglutinins ist.

## 5 Zusammenfassung

*S. epidermidis* ist der am häufigsten isolierte Erreger fremdkörperassoziierter Infektionen. Seine Pathogenität wird auf die Fähigkeit zur Adhäsion an Polymeroberflächen und der Ausbildung eines Biofilms zurückgeführt. Das für die Biofilmbildung entscheidende interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion wurde in früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe isoliert. Dies geschah mit Hilfe isogener biofilmm negativer Transposonmutanten klinisch relevanter Wildtypen, bei denen das Transposon in das mittlerweile sequenzierte *icaADBC* Gencluster inserierte. Hierbei wurden weitere 9 biofilmm negative und 2 biofilmpositive Transposonmutanten isoliert, wobei sich bei 6 Mutanten die Transposoninsertionsstellen von dem *icaADBC* Gencluster unterschieden.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Mutanten zur weiteren Phänotypisierung mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Es zeigte sich, daß durch eine singuläre Transposoninsertion verschiedene phänotypische Veränderungen hervorgerufen werden konnten. So waren neben dem Verlust der Biofilmbildung auch eine Änderung der Kolonienfarbe, des mukoiden Wachstums auf Purple Agar, der Hämagglutinationsfähigkeit, der PIA- und Zellclusterbildung sowie der primären Bindungsfähigkeit zu beobachten. Anhand der erhaltenen Ergebnisse ließ sich eine phänotypische Einteilung der Transposonmutanten in 5 Klassen vornehmen (s. Tabelle 20), die sich mit der genotypischen Klassifizierung deckte (s. Tabelle 19).

Ein Einfluß der Anzuchtbedingungen zeigte sich bei allen Versuchen. So ließ sich z. B. bei der in TSB-OXOID angezüchteten biofilmm negativen Mutante M17 unter Anzucht in TSB der Firma BBL ein biofilmpositiver Phänotyp induzieren. Neben dem Nährmedium ist weiterhin die Art der Bakterienanzucht entscheidend. Bei den Versuchen zur primären Bindungsfähigkeit konnte eine um das zehn bis fünfzigfach reduzierte primäre Bindung bei als Biofilmkulturen gewachsenen biofilmm negativen Mutanten gegenüber den biofilmm negativen Mutanten der Schüttelkulturen festgestellt werden.

Zur Klärung eines funktionellen Zusammenhanges von PIA und einem postulierten Hämagglutinin wurden Hämagglutinationstests mit verschiedenen IgG-Fraktionen und gereinigtem PIA durchgeführt. Spezifische Antikörper gegen einen biofilmpositiven Stamm bzw. gegen gereinigtes PIA inhibierten die Hämagglutination. Antikörper eines Präimmunserums bzw. Antikörper gegen einen biofilmm negativen Stamm konnten keine signifikante Hämagglutinationshemmung hervorrufen. Gereinigtes PIA inhibierte ebenfalls die Hämagglutination. Dieses läßt sich darauf zurückführen, daß freies PIA mit dem

zellgebundenen PIA um die Bindungsstellen auf der Erythrozytenoberfläche konkurriert. Aus den Ergebnissen wird deutlich, daß PIA das Hämagglutinin oder zumindest ein wesentlicher Bestandteil ist.

Weitere Untersuchungen der geno- und phänotypischen Eigenschaften der Mutanten der Klassen I-V sind zur Entwicklung neuer Möglichkeiten in der Diagnostik, Prävention und Therapie fremdkörperassoziierter Infektionen erforderlich.

## 6 Literaturverzeichnis

- Anderson, J. D., A. M. Clarke, M. E. Anderson, J. L. Isaac-Renton, and M. G. McLoughlin. 1981. Urinary tract infections due to *Staphylococcus saprophyticus* biotype 3. *Can. Med. Assoc. J.* 124: 415-418.
- Archer, G. L. 1994. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 38: 2231-2237.
- Archer, G. L., G. J. Vazquez, and J. L. Johnson. 1980. Antibiotic prophylaxis of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* 142: 725-731.
- Arvaniti, A., N. K. Karamanos, G. Dimitracopoulos, and E. D. Anastassiou. 1994. Isolation and characterization of a novel 20 kDa sulfated polysaccharide from the extracellular slime layer of *Staphylococcus epidermidis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 432-438.
- Baddour, L. M., T. N. Phillips, and A. L. Bisno. 1986. Coagulase-negative staphylococcal endocarditis: occurrence in patients with mitral valve prolaps. *Arch. Intern. Med.* 146: 119-121.
- Baird-Parker, A. C. 1965. The classification of staphylococci and micrococci from world wide sources. *J. Gen. Microbiol.* 38: 363-387.
- Baldassarri, L., G. Donelli, A. Gelosia, M. C. Voglino, A. W. Simpson, and G. D. Christensen. 1996. Purification and Characterization of the Staphylococcal Slime-Associated Antigen and Its Occurence among *Staphylococcus epidermidis* Clinical Isolates. *Infect. Immun.* 64: 3410-3415.
- Baldassarri, L., G. Donelli, A. Gelosia, A. W. Simpson, and G. D. Christensen. 1997. Expression of Slime Interferes with In Vitro Detection of Host Protein Receptors of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 65: 1522-1526.
- Bancsi, M. J. L. F., M. H. A. M. Veltrop, R. M. Bertina, and J. Thompson. 1998. Role of Monocytes and Bacteria in *Staphylococcus epidermidis* Endocarditis. *Infect. Immun.* 66: 448-450
- Bandyk, D. F., G. A. Berni, B. L. Thiele, and J. B. Towne. 1984. Aortofemoral graft infection due to *Staphylococcus epidermidis*. *Arch. Surg.* 119: 102-108.
- Baumgart, S., S. E. Hall, J. M. Campos, and R. A. Polin. 1983. Sepsis with coagulase-negative staphylococci in critically ill newborns. *Am. J. Dis. Child.* 137: 461-463.

- Bayston, R., and S. R. Penny. 1972. Excessive production of mucoid substances in *Staphylococcus* SIIA: a possible factor in colonisation of Holter shunts. *Dev. Med. Child. Neurol.* 14(Suppl. 27): 25-28.
- Bayston, R., and J. Rogers. 1990. Production of extra-cellular slime by *Staphylococcus epidermidis* during stationary phase of growth: its association with adherence to implantable devices. *J. Clin. Pathol.* 43: 866-870.
- Beaman, M., L. Solaro, D. Adu, and J. Michael. 1987. Peritonitis caused by slime-producing coagulase-negative staphylococci in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Lancet* i: 42.
- Bor, D. H., R. M. Rose, J. F. Modlin, R. Weintraub, and G. H. Friedland. 1983. Mediastinitis after cardiovascular surgery. *Rev. Infect. Dis.* 5: 885-897.
- Brandt, L., and B. Swahn. 1960. Subacute bacterial endocarditis due to coagulase-negative *Staphylococcus albus*. *Acta Med. Scand.* 166: 125-132.
- Brause, B. D. 1986. Infections associated with prosthetic joints. *Clin. Rheum. Dis.* 12: 523-535.
- Calderwood, S. B., M. A. Baker, P. A. Carroll, J. L. Michel, R. D. Arbeit, and F. M. Ausubel. 1996. Use of Cleaved Amplified Polymorphic Sequences To Distinguish Strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2860-2865.
- Caputo, G. M., G. L. Archer, S. B. Caulderwood, M. J. DiNubile, and A. W. Karchmer. 1987. Native valve endocarditis due to coagulase-negative staphylococci. *Am. J. Med.* 83: 619-625.
- Cheung, A. L., K. Eberhardt, and J. H. Heinrichs. 1997. Regulation of Protein A Synthesis by the *sar* and *agr* Loci of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 65: 2243-2249.
- Choo, M. H., D. R. Holmes, B. J. Gersch, J. D. Maloney, J. Meredith, J. R. Pluth, and J. Trusty. 1981. Permanent pacemaker infections: characterization and management. *Am J. Cardiol.* 48: 559-564.
- Christensen, G. D., L. P. Barker, T. P. Mawhinney, L. M. Baddour, and W. A. Simpson. 1990. Identification of an Antigenic Marker of Slime Production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 58: 2906-2911.
- Christensen, G. D., L. M. Baddour, and W. A. Simpson. 1987. Phenotypic Variation of *Staphylococcus epidermidis* Slime Production In Vitro and In Vivo. *Infect. Immun.* 55: 2870-2877.
- Christensen, G. D., W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton, and E. H. Beachey. 1985. Adherence of Coagulase-Negative

- Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *J. Clin. Microbiol.* 22: 996-1006.
- Christensen, G. D., W. A. Simpson, A. L. Bisno, and E. H. Beachey. 1982. Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. *Infect. Immun.* 37: 318-326.
- Chuard, C., P. Vaudaux, F. A., Waldvogel, and D. P. Lew. 1993. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* growing on fibronectin-coated surfaces to bactericidal antibiotics. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 37: 625-632.
- Chuard, C., P. Vaudaux, F. A., R. A. Proctor, and D. P. Lew. 1997. Decreased susceptibility to antibiotic killing of a stable small colony variant of *Staphylococcus aureus* in fluid phase and on fibronectin-coated surfaces. *J. Antimicrob. Chemother.* 39: 603-608.
- Clarke, A. M. 1979. Prophylactic antibiotics for total hip arthroplasty: the significance of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 5: 493-502.
- Colleen, S., B. Hovelius, Å. Wieslander, and P.-A. Mårdh. 1979. Surface properties of *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus epidermidis* as studied by adherence tests and two-polymer, aqueous phase systems. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B* 87: 321-328.
- Costerton, J. W., K.-J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 435-464.
- Dan, M., G. J. R. Marien, and G. Goldsand. 1984. Endocarditis caused by *Staphylococcus warneri* on a normal aortic valve following vasectomy. *Can. Med. Assoc. J.* 131: 211-213.
- Davenport, D. S., R. M. Massanari, M. A. Pfaller, M J. Bale, S. A. Streed, and W. J. Hierholzer, Jr. 1986. Usefulness of a Test for Slime Production as a Marker for Clinically Significant Infections with Coagulase-Negative Staphylococci. *J. Infect. Dis.* 153: 332-339.
- Deighton, M. A., and R. Borland. 1993. Regulation of Slime Production in *Staphylococcus epidermidis* by Iron Limitation. *Infect. Immun.* 61: 4473-4479.
- Deighton, M. A., and B. Balkau. 1990. Adherence Measured by Microtiter Assay as a Virulence Marker for *Staphylococcus epidermidis* Infections. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2442-2447.

- Diaz-Mitoma, F., G. K. M. Harding, D. J. Hoban, R. S. Roberts, and D. E. Low. 1987. Clinical Significance of a Test for Slime Production in Ventriculoperitoneal Shunt Infections Caused by Coagulase-Negative Staphylococci. *J. Infect. Dis.* 156: 555-560.
- Dobbins, J. J., D. Seligson, and M. J. Raff. 1988. Bacterial Colonization of Orthopedic Devices in the Absence of Clinical Infection. *J. Infect. Dis.* 158: 203-205.
- Drewry, D. T., L. Galbraith, B. J. Wilkinson, and S. G. Wilkinson. 1990. Staphylococcal Slime: a Cautionary Tale. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1292-1296.
- Driebe, W. T. Jr., S. Mandelbaum, R. K. Forster, L. K. Schwartz, and W. W. Culbertson. 1986. Pseudophakic endophthalmitis, diagnosis and management. *Ophthalmology* 93: 442-448.
- Espersen, F., B. J. Wilkinson, B. Gahrn-Hansen, V. T. Rosdahl, and I. Clemmensen. 1990. Attachment of staphylococci to silicone catheters in vitro. *APMIS* 98: 471-478.
- Etienne, J., Y. Brun, N. el Solh, V. Delorme, C. Mouren, M. Bes, and J. Fleurette. 1988. Characterization of Clinically Significant Isolates of *Staphylococcus epidermidis* from Patients with Endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 26: 613-617.
- Farrell, A. M., T. J. Foster, and K. T. Holland. 1993. Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. *J. General Microbiol.* 139: 267-277.
- Fleer, A., J. Verhoef, and A. P. Hernandez. 1986. Coagulase-negative staphylococci as nosocomial pathogens in neonates: role of host defense, artificial devices, and bacterial hydrophobicity. *Am. J. Med.* 80(Suppl. 6B): 161-165.
- Fleurette, J., Y. Brun, M. Bès, M. Coulet, and F. Forey. 1987. Infections caused by coagulase-negative staphylococci other than *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*, p. 195-208. In G. Pulverer, P. G. Qui, and G. Peters (ed.), *Pathogenicity and clinical significance of coagulase-negative staphylococci*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Franson, T. R., N. K. Sheth, H. D. Rose, and P. G. Sohnle. 1984. Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters. *J. Clin. Microbiol.* 20: 500-505.
- Gallagher, D. J. A., J. Z. Montgomerie, and J. D. K. North. 1965. Acute infections of the urinary tract and the urethral syndrome in general practice. *Br. Med. J.* 1: 622.
- George, R., L. Leibrock, and M. Epstein. 1979. Long term analysis of cerebrospinal fluid shunt infections: a 25-year experience. *J. Neurosurg.* 51: 804-811.

- Gerke, C., A. Kraft, R. Süßmuth, O. Schweitzer, and F. Götz. 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* 272: 18586-18593.
- Gill, V. J., S. T. Selepak, and E. C. Williams. 1983. Species identification and antibiotic susceptibilities of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 18: 1314-1319.
- Gray, E. D., G. Peters, M. Versteegen, and W. E. Regelman. 1984. Effect of Extracellular Slime Substance from *Staphylococcus epidermidis* on the Human Cellular Immune Response. *Lancet* i: 365-367.
- Gristina, A. G., J. Dobbins, B. Giammara, J. C. Lewis, and W. C. de Vries. 1988. Biomaterial-centered sepsis and the total artificial heart: microbial adhesion vs tissue integration. *JAMA* 259: 870-874.
- Gruer, L. D., R. Bartlett, and G. A. J. Ayliffe. 1984. Species identification and antimicrobial sensitivity of coagulase-negative staphylococci from CAPD peritonitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 13: 577-583.
- Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters, F. Götz. 1997. Evidence for autolysin-mediated attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* 24: 1013-1024.
- Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gehrke, N. Vanittanakom, D. Mack, and F. Götz. 1996a. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20: 1083-1091.
- Heilmann, C., C. Gehrke, F. Perdreau-Remington, and F. Götz. 1996b. Characterization of Tn917 Insertion Mutants of *Staphylococcus epidermidis* Affected in Biofilm Formation. *Infect. Immun.* 64: 277-282.
- Herrmann, M., P. E. Vaudaux, D. Pittet, R. Auckenthaler, P. D. Lew, F. Schumacher-Perdreau, G. Peters, and F. A. Waldvogel. 1988. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J. Infect. Dis.* 158: 693-701.
- Hogt, A. H., J. Dankert, C. E. Hulstaert, and J. Feijen. 1986. Cell surface characteristics of coagulase-negative staphylococci and their adherence to fluorinated poly(ethylenepropylene). *Infect. Immun.* 51: 294-301.

- Hogt, A. H., J. Dankert, and J. Feijen. 1985. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2485-2491.
- Holt, R. J. 1971. The colonization of ventriculoatrial shunts by coagulase-negative staphylococci, p. 81-87. *In* Finland, W. Marget, and K. Bartmann (ed.), *Bacterial infections: changes in their causative agents; trends and possible basis*. Springer-Verlag, New York.
- Hübner, J., G. B. Pier, J. N. Maslow, E. Muller, H. Shiro, M. Parent, A. Kropec, R. D. Arbeit, and D. A. Goldmann. 1994. Endemic nosocomial transmission of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in a neonatal intensive care unit over 10 years. *J. Infect. Dis.* 169: 526-531.
- Hussain, M., M. Herrmann, C. von Eiff, F. Perdreau-Remington, and G. Peters. 1997. A 140-Kilodalton Extracellular Protein Is Essential for the Accumulation of *Staphylococcus epidermidis* Strains on Surfaces. *Infect. Immun.* 65: 519-524.
- Hussain, M., M. H. Wilcox, and P. J. White. 1993. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol. Rev.* 102: 191-208.
- Hussain, M., J. G. M. Hastings, and P. J. White. 1992a. Comparison of cell-wall teichoic acid with high-molecular-weight extracellular slime material from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* 37: 368-375.
- Hussain, M., M. H. Wilcox, P. J. White, M. K. Faulkner, and R. C. Spencer. 1992b. Importance of medium and atmosphere type to both slime production and adherence by coagulase-negative staphylococci. *J. Hosp. Infect.* 20: 173-184.
- Hussain, M., J. G. M. Hastings, and P. J. White. 1991. Isolation and composition of the extracellular slime made by coagulase negative staphylococci in a chemically defined medium. *J. Infect. Dis.* 163: 534-541.
- Ishak, M. A., D. H. M. Gröschel, G. L. Mandell, and R. P. Wenzel. 1985. Association of Slime with Pathogenicity of Coagulase-Negative Staphylococci Causing Nosocomial Septicemia. *J. Clin. Microbiol.* 22: 1025-1029.
- Jansen, B., and G. Peters. 1993. Foreign body associated infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 32(Suppl. A): 69-75.
- Jansen, B., F. Schumacher-Perdreau, G. Peters, and G. Pulverer. 1989. New aspects in the pathogenesis and prevention of polymer-associated foreign-body infections caused by coagulase-negative staphylococci. *J. Invest. Surg.* 2: 361-380.

- Jarvis, W. R., and W. J. Martone. 1992. Predominant pathogens in hospital infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 29(Suppl. A): 19-24.
- John, J. F., P. K. Gramling, and N. M. O'Dell. 1978. Species identification of coagulase-negative staphylococci from urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 8: 435-437.
- Johnsen, G. M., D. A. Lee, W. E. Regelman, E. D. Gray, G. Peters, and P. G. Quie. 1986. Interference with Granulocyte Function by *Staphylococcus epidermidis* Slime. *Infect. Immun.* 54: 13-20.
- Jones, D., R. H. Deibel, and C. F. Niven. 1963. Identity of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 85: 62-67.
- Kloos, W. E.. 1997. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In K. B. Crossley, and G. L. Archer: *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York: 117-140.
- Kloos, W. E. 1986. Ecology of human skin, p. 37-50. *In* P.-A. Mårdh and K. H. Schleifer (ed.), *Coagulase-negative staphylococci*. Almquist and Wiksell International, Stockholm.
- Kloos, W. E., and T. L. Bannerman. 1994. Update on Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 117-140.
- Kloos, W. E., and M. S. Musselwhite. 1975. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl. Microbiol.* 30: 381-395.
- Kloos, W. E., and K. H. Schleifer. 1983. *Staphylococcus auricularis* sp. nov.: an inhabitant of the human external ear. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 9-14.
- Kojima, Y., M. Tojo, D. A. Goldmann, T. D. Tosteson, and G. B. Pier. 1990. Antibody to capsular polysaccharide/adhesin protects rabbits against catheter-related bacteremia due to coagulase-negative staphylococci. *J. Infect. Dis.* 162: 435-441.
- Kotilainen, P. 1990. Association of Coagulase-Negative Staphylococcal Slime Production and Adherence with the Development and Outcome of Adult Septicemias. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2779- 2785.
- Kraus, E. S., and D. A. Spector. 1983. Characteristics and sequelae of peritonitis in diabetics and nondiabetics receiving chronic intermittent peritoneal dialysis. *Medicine (Baltimore)* 62: 52-57.
- Kristinsson, K. G., R. C. Spencer, and C. B. Brown. 1986. Clinical importance of production of slime by coagulase-negative staphylococci in chronic ambulatory peritoneal dialysis. *J. Clin. Pathol.* 39: 117.

- Leighton, P. M., and J. A. Little. 1986. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from urinary tract infections. *Am. J. Clin. Pathol.* 85: 92-95.
- Lowy, F. D., and S. M. Hammer. 1983. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Ann. Intern. Med.* 99: 834-839.
- Ludwicka, A., G. Uhlenbruck, G. Peters, P. N. Seng, E. D. Gray, J. Jaljaszewicz, and G. Pulverer. 1984a. Investigation on extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig A* 258: 256-267.
- Ludwicka, A., B. Jansen, T. Wadström, L. Switalski, G. Peters, and G. Pulverer. 1984b. Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. *Zentralbl. Bakteriologie Mikrobiol. Hyg.* 256: 479-489.
- Mabeck, C. E. 1969. Significance of coagulase-negative staphylococcal bacteriuria. *Lancet* *ii*: 1150-1152.
- Mack, D., N. Siemssen and R. Laufs. 1992. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect. Immun.* 60: 2048-2057.
- Mack, D., M. Nedelmann, A. Krokotsch, A. Schwarzkopf, J. Heesemann, and R. Laufs. 1994. Characterization of Transposon Mutants of Biofilm-Producing *Staphylococcus epidermidis* Impaired in the Accumulative Phase of Biofilm Production: Genetic Identification of a Hexosamine-Containing Polysaccharide Intercellular Adhesin. *Infect. Immun.* 62: 3244-3253.
- Mack, D., M. Header, N. Siemssen, and R. Laufs. 1996a. Association of Biofilm Production of Coagulase-Negative Staphylococci with Expression of a Specific Polysaccharide Intercellular Adhesin. *J. Infect. Dis.* 174: 881-4.
- Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, and R. Laufs. 1996b. The Intercellular Adhesin Involved in Biofilm Accumulation of *Staphylococcus epidermidis* Is a Linear  $\beta$ -1,6-Linked Glucosaminoglycan: Purification and Structural Analysis. *J. of Bacteriol.* 178: 175-183.
- Mack, D., J. Riedewald, H. Rohde, T. Magnus, H. Feucht, H-A. Elsner, R. Laufs, and M. E. Rupp. 1999. Essential Functional Role of the Polysaccharide Intercellular Adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in Hemagglutination. *Infect. Immun.* 67: 1004-1008.
- Mack, D., H. Rohde, S. Dobinsky, J. Riedewald, M. Nedelmann, J. K.-M. Knobloch, H.-A. Elsner, and H. H. Feucht. 2000. Identification of Three Essential Regulatory Gene

- Loci Governing Expression of *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin and Biofilm Formation. *Infect. Immun.* 68: 3799-3807.
- Males, B. M., W. R. Bartholomew, and D. Amsterdam. 1985. *Staphylococcus simulans* septicemia in a patient with chronic osteomyelitis and pyarthrosis. *J. Clin. Microbiol.* 21: 255-257.
- Martin, M. A., M. A. Pfaller, and R. P. Wenzel. 1989. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Ann. Intern. Med.* 110: 9-16.
- Marrie, T. J., and J. W. Costerton. 1984. Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *J. Clin. Microbiol.* 19: 687-693.
- Marrie, T. J., C. Kwan, M. A. Noble, A. West, and L. Duffield. 1982. *Staphylococcus saprophyticus* as a cause of urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 16: 427-431.
- McKenney, D., D. G. Allison. 1995. Effects of growth rate and nutrient limitation on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*. *J. Bacteriol.* 177(14):4140-3.
- McKenney, D., D. G. Allison. 1997. Influence of growth rate and nutrient limitation on susceptibility of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and tobramycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 40(3):415-7.
- Morris, I. M., P. C. Mattingly, and B. E. Gostelow. 1986. Coagulase-negative *Staphylococcus* as a cause of joint infection. *Br. J. Rheum.* 25: 414-415.
- Muller, E., J. Hübner, N. Gutierrez, S. Takeda, D. A. Goldmann, and G. B. Pier. 1993a. Isolation and Characterization of Transposon Mutants of *Staphylococcus epidermidis* Deficient in Capsular Polysaccharide/Adhesin and Slime. *Infect. Immun.* 61: 551-558.
- Muller, E., S. Takeda, H. Shiro, D. Goldmann, and G. B. Pier. 1993b. Occurrence of Capsular Polysaccharide/Adhesin among clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J. Infect. Dis.* 168: 1211-1218.
- Nedelmann, M. 1999. Genetische Untersuchungen zur Entstehung von adhärenenten Biofilmen von *Staphylococcus epidermidis* auf Kunststoffoberflächen. Dissertation. Fachbereich Medizin. Universität Hamburg.
- Nilsson, M., L. Frykberg, J. I. Flock, L. Pei, M. Lindberg, and B. Guss. 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 66: 2666-2673.

- Noble, W. C. 1997. Staphylococcal carriage and skin and soft tissue infection. In K. B. Crossley, and G. L. Archer: The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York: 401-412.
- Nord, C. E., S. Holta-Oie, Å. Ljungh, and T. Waldström. 1976. Characterization of coagulase-negative staphylococcal species from human infections, p. 105-111. *In*. J. Jeljaszewicz (ed.), Staphylococcus and staphylococcal diseases. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Paley, D., C. F. Moseley, P. Armstrong, and C. G. Prober. 1986. Primary osteomyelitis caused by coagulase negative staphylococci. *J. Pediatr. Orthop.* 6: 622-626.
- Pascual, A., A. Fler, N. A. C. Westerdaal, and J. Verhoef. 1986. Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to teflon catheters in vitro. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5: 518-522.
- Patrick, C. C., M. R. Plaunt, S. V. Hetherington, and S. M. May. 1992. Role of the *Staphylococcus epidermidis* Slime Layer in Experimental Tunnel Tract Infections. *Infect. Immun.* 60: 1363-1367.
- Pereira, A. T. 1962. Coagulase-negative strains of *Staphylococcus* possessing antigen 51 as agents of urinary tract infection. *J. Clin. Pathol.* 15: 252-259.
- Peschel, A. and F. Götz. 1996. Analysis of the *Staphylococcus epidermidis* Genes *epiF*, *-E*, and *-G* Involved in Epidermin Immunity. *J. of Bacteriol.* 178: 531-536.
- Peters, G., F. Schumacher-Perdreau, B. Jansen, M. Bey, and G. Pulverer. 1987. Biology of *S. epidermidis* extracellular slime. *Zbl. Bakt. Suppl.* 16: 15-31.
- Peters, G., F. Saborowski, R. Locci, and G. Pulverer. 1984. Investigations on staphylococcal infection of intravenous endocardial pacemaker-electrodes. *Am. Heart. J.* 108: 359-364.
- Peters, G., R. Locci, and G. Pulverer. 1982. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J. Infect. Dis.* 146: 279-482.
- Peters, G., R. Locci, and G. Pulverer. 1981. Microbial colonization of prosthetic devices: II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 173: 293-299.
- Peters, G., und G. Pulverer. 1994. Die Familie der *Micrococcaceae*. p. 350-360. In H. Brandis, W. Köhler, H. J. Eggers und G. Pulverer (Hrsg.): Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie. 7. Aufl. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- Ponce de Leon, S., S. H. Guenther, and R. P. Wenzel. 1986. Microbiologic studies of coagulase-negative staphylococci isolated from patients with nosocomial bacteremias. *J. Hosp. Infect.* 7: 121-129.
- Ponce de Leon, S., and R. P. Wenzel. 1984. Hospital-acquired bloodstream infections with *Staphylococcus epidermidis*. *Am. J. Med.* 77: 639-644.
- Pulverer, G. 1985. On the pathogenicity of coagulase-negative staphylococci, p. 1-9. *In* J. Jeljaszewicz (ed.), *The staphylococci: proceedings of V International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal infections*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Pulverer, G., and J. Pillich. 1971. Pathogenic significance of coagulase-negative staphylococci, p. 91-96. *In* M. Finland, W. Marget, and K. Bartmann (ed.), *Bacterial infections: changes in their causative agents; trends and possible basis*. Springer-Verlag, New York.
- Pulverer, G., and R. Halswick. 1967. Coagulase-negative Staphylokokken (*Staphylococcus albus*) als Krankheitserreger. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 92: 1141-1145.
- Raad, I., A. Alrahwani, and K. Rolston. 1998. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin. Infect. Dis.* 26: 1182-1187.
- Richardson, J. V., R. B. Karp, J. W. Kirklin, and W. E. Dismukes. 1978. Treatment of infective endocarditis: a 10-year comparative analysis. *Circulation* 58: 589-597.
- Righter, J. 1987. Septicemia due to coagulase-negative *Staphylococcus* in a community hospital. *Can. Med. Assoc. J.* 137: 121-125.
- Rohde, H. 2000. Typisierung genetischer Determinanten der *Staphylococcus epidermidis* Biofilmbildung auf Kunststoffoberflächen. Dissertation. Fachbereich Medizin. Universität Hamburg.
- Rubin, J., W. A. Rogers, H. M. Taylor, E. D. Everett, B. F. Prowant, L. V. Fruto, and K. D. Nolph. 1980. Peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann. Intern. Med.* 92: 7-13.
- Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, K. Bartscht, and D. Mack. 1999b. Characterization of the Importance of Polysaccharide Intercellular Adhesin/Hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the Pathogenesis of Biomaterial-Based Infection in a Mouse Foreign Body Infection Model. *Infect. Immun.* 67: 2627-2632.
- Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, and D. Mack. 1999a. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin/Hemagglutinin

- in the Pathogenesis of Intravascular Catheter-Associated Infection in a Rat Model. *Infect. Immun.* 67: 2656-2659.
- Rupp, M. E., N. Sloat, H.-G. W. Meyer, J. Han, and S. Gatermann. 1995. Characterization of the Hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* 172:1509-18.
- Rupp, M. E., and G. L. Archer. 1994. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin. Infect. Dis.* 19: 231-245.
- Rupp, M. E., and G. L. Archer. 1992. Hemagglutination and Adherence to Plastic by *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 60: 4322-4327.
- Schaberg, D. R., D. H. Culver, and R. P. Gaynes. 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am. J. Med.* 91(Suppl. A): 72-75.
- Schleifer, K. H. 1986a. *Micrococcaceae*. p. 999-1002. In P. H. A. Sneath (ed.): *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Schleifer, K. H. 1986b. *Micrococcaceae*. p. 1003. In P. H. A. Sneath (ed.): *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Schnitzler, N., R. Meilicke, G. Conrads, D. Frank, and G. Haase. 1998. *Staphylococcus lugdunensis*: Report of a Case of Peritonitis and an Easy-To-Perform Screening Strategy. *J. Clin. Microbiol.* 36: 812-813.
- Schumacher-Perdreau, F., C. Heilmann, G. Peters, F. Götz, and G. Pulverer. 1994. Comparative analysis of a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain and its adhesion-positive, accumulation-negative mutant M7. *FEMS Microbiol. Letters* 117: 71-78.
- Schumacher-Perdreau, F., H. Roterig, and G. Pulverer. 1983. Cell Wall Analysis and Taxonomy of Staphylococci. *Zbl. Bakt. Hyg.* A 256: 25-36.
- Shiro, H., G. Meluleni, A. Groll, E. Muller, T. D. Tosteson, D. A. Goldmann, and G. B. Pier. 1995. The pathogenic role of *Staphylococcus epidermidis* capsular polysaccharide/adhesin in a low-inoculum rabbit model of prosthetic valve endocarditis. *Circulation* 92: 2715-2722.
- Shiro, H., E. Muller, N. Gutierrez, S. Boisot, M. Grout, T. D. Tosteson, D.A. Goldmann, and G. B. Pier. 1994. Transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in elaboration of capsular polysaccharide/adhesin and slime are avirulent in a rabbit model of endocarditis. *J. Infect. Dis.* 169: 1042-1049.
- Skoutelis, A. T., R. L. Murphy, K. B. MacDonell, J. H. VonRoenn, C. D. Sterkel, and J. P. Phair. 1990. Indwelling central venous catheter infections in patients with acquired immune deficiency syndrome. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 3: 335-342.

- Smith, I. M., P. D. Beals, K. R. Kingsbury, and N. F. Hasenclever. 1958. Observations on *Staphylococcus albus* septicemia in mice and men. *Arch. Intern. Med.* 102: 375-388.
- Stillman, R. I., R. P. Wenzel, and L. G. Donovitz. 1987. Emergence of coagulase-negative staphylococci as major nosocomial bloodstream pathogens. *Infect. Control.* 8: 108-112.
- Takeda, S., G. B. Pier, Y. Kojima, M. Tojo, E. Muller, T. Tosteson, and D. A. Goldmann. 1991. Protection against endocarditis due to *Staphylococcus epidermidis* by immunization with capsular polysaccharide/adhesin. *Circulation* 84: 2539-2546.
- Timmerman, C. P., A. Fler, J. M. Besnier, L. de Graaf, F. Cremers, and J. Verhoef. 1991. Characterization of a Proteinaceous Adhesin of *Staphylococcus epidermidis* Which Mediates Attachment to Polystyrene. *Infect. Immun.* 59: 4187-4192.
- Tojo, M., N. Yamashita, D. A. Goldmann, and G. B. Pier. 1988. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* 157: 713-730.
- Veenstra, G. J. C., F. F. M. Cremers, H. van Dijk and A. Fler. 1996. Ultrastructural Organization and Regulation of a Biomaterial Adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J. of Bacteriol.* 178: 537-541.
- Wallmark, G. I., I. Anemark, and B. Telander. 1978. *Staphylococcus saprophyticus*: a frequent cause of urinary tract infections among female outpatients. *J. Infect. Dis.* 138: 791-797.
- West, T. E., J. Walshe, C. P. Krol, and D. Amsterdam. 1986. Staphylococcal Peritonitis in Patients on Continuous Peritoneal Dialysis. *J. Clin. Bacteriol.* 23: 809-812.
- Wilson, T. S., and R. D. Stuart. 1965. *Staphylococcus albus* in wound infection and in septicemia. *Can. Med. Assoc. J.* 93: 8-16.
- Younger, J. J., G. D. Christensen, D. L. Bartley, J. C. H. Simmons, and F. F. Barrett. 1987. Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Cerebrospinal Fluid Shunts: Importance of Slime Production, Species Identification, and Shunt Removal to Clinical Outcome. *J. Infect. Dis.* 156: 548-554.
- Zaidi, A. K., L. J. Harrell, J. R. Rost, and L. B. Reller. 1996. Assessment of Similarity among Coagulase-Negative Staphylococci from Sequential Blood Cultures of Neonates and Children by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Infect. Dis.* 174: 1010- 1014.

Ziebuhr, W., C. Heilmann, F. Götz, P. Meyer, K. Wilms, E. Straube, and J. Hacker. 1997. Detection of the Intercellular Adhesion Gene Cluster (*ica*) and Phase Variation in *Staphylococcus epidermidis* Blood Culture Strains and Mucosal Isolates. *Infect. Immun.* 65: 890-896.

## **7 Danksagung**

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. D. Mack für seine hervorragende Betreuung sowie der Überlassung des Themas. Seine intensive Unterstützung sowohl in schwierigen als auch in sehr produktiven Phasen habe ich als sehr motivierend und hilfreich empfunden.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. R. Laufs für die Bereitstellung der Gerätschaften, des Arbeitsplatzes sowie der Unterstützung meiner Arbeit ohne die eine Durchführung nicht möglich gewesen wäre.

Für die Anfertigung der Photographien und Abzüge danke ich Frau Schlüter.

Dem ganzen übrigen Institutspersonal danke ich für die mir überall entgegengebrachte Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft.

Zuletzt danke ich meinen Mitdoktoranden, vor allem Holger Rhode, für die einmalige Zeit und freundschaftliche Zusammenarbeit. Das Teilen von Freud und Frustration bei den vielen Versuchen wird mir sehr lebhaft in Erinnerung bleiben.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Joachim Riedewald
Geburtsdatum/Ort	05.01.1971 in Hamburg
Nationalität	deutsch

### Schulbildung

1977-1983	Grundschule Moorflagen in Hamburg
1983-1990	Gymnasium Hartsprung in Hamburg mit Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

### Zivildienst

1991-1992	Arbeiter Samariter Bund in Hamburg im Rahmen der Behindertenbeförderung
-----------	---

### Hochschulbildung

1992-1999	Studium der Medizin an der Universitätsklinik Eppendorf, Hamburg
1995	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
1997	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
1999	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Berufsausbildung

1987-1991	Ausbildung zum Chemisch Technischen Assistenten am Gymnasium Altona parallel zur Schulausbildung im Rahmen einer vom Senat Hamburg eingerichteten Doppelqualifikation
1999-2001	Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Medizinisch-Psychosomatischen Klinik Bad Bramstedt
4/2001-	Assistenzarzt in der Medizinisch-Psychosomatischen Klinik Bad Bramstedt

### Wissenschaftliche Arbeit

1995-1997	Experimentelle Arbeit an der Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mack am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Hamburg.
-----------	---

## **Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen oder Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Joachim Riedewald