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

Typisierung genetischer Determinanten der *Staphylococcus epidermidis* Biofilmbildung auf Kunststoffoberflächen

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Medizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Holger Rohde
aus Hamburg

Hamburg 2000

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 21.11.2000

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. D. Mack

Korreferent: Prof. Dr. R. Laufs

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **1**

1 Einleitung **3**

1.1 Koagulase-negative Staphylokokken **3**
1.1.1 Klassifikation 3
1.1.2 Durch Koagulase-negative Staphylokokken hervorgerufene Erkrankungen 3
1.1.3 Pathogenese fremdkörper-assoziierter Infektionen durch *S. epidermidis* *6*
1.1.3.1 Die primäre Bindung 9
1.1.3.2 Faktoren, die an der akkumulativen Phase beteiligt sind 9
1.2 Voraussetzungen für diese Arbeit **12**
1.3 Zielsetzung der Arbeit **13**

2 Material und Methoden **14**

2.1 Material **14**
2.1.1 Geräte 14
2.1.2 Chemikalien 15
2.1.3 Medien 16
2.1.4 Enzyme 17
2.1.5 Plasmide und abgeleitete Sonden für die Southern-Hybridisierung 17
2.1.6 Oligonucleotid-Primer 19
2.1.7 Stämme 19
2.1.8 PIA-spezifisches Antiserum *22*
2.2 Methoden **22**
2.2.1 Präparation chromosomaler *S. epidermidis*-DNA 22
2.2.2 Plasmidpräparation 23
2.2.2.1 Plasmidpräparation aus Staphylokokken durch CsCl-Dichtegradienten-zentrifugation 23
2.2.2.2 pBluescript II SK-Präpration aus *E. coli* 24
2.2.3 Phenolextraktion von DNA 25
2.2.4 Agarosegelelektrophorese 26
2.2.5 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) 27
2.2.6 DNA-Restriktionsanalyse 27
2.2.7 Isolierung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente 28
2.2.8 Southern-Blot-Hybridisierung *28*
2.2.8.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit [^{32}P]dCTP nach dem Oligolabelling-Verfahren / Random-Priming 28
2.2.8.2 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter DNA auf eine feste Matrix 29
2.2.8.2.1 Alkalischer Kapillartransfer 29
2.2.8.2.2 Transfer über einen Druckgradienten im PosiBlot-Pressure Blotter 30
2.2.8.3 DNA-DNA- (Southern-) Hybridisierung 30
2.2.8.4 Entfernung von gebundenen Sonden (Membran-Stripping) 31
2.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten 32
2.2.9.1 Herstellung kompetenter *E. coli* -Zellen 32
2.2.9.2 Präparation linearisierter Vektor-DNA 32
2.2.9.3 Ligation von linearisiertem pBluescript II SK mit DNA-Fragmenten 33
2.2.9.4 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen durch $CaCl_2$- Schock 33
2.2.10 DNA-Sequenzanalyse 34
2.2.11 Adhärenztest zur semiquantitativen Bestimmung der Biofilmbildung von Bakterienstämmen an Plastikoberflächen 34
2.2.12 Semiquantitativer Koagglutinationstest zum Nachweis von PIA 35
2.2.12.1 *Staphylococcus aureus* Cowan I-Präparation 36
2.2.12.2 Herstellung des Koagglutinationsreagenz aus anti-PIA-Antikörpern und *S. aureus* Cowan I 36
2.2.12.3 Durchführung des Koagglutination 36

3 Ergebnisse **38**

3.1 Charakterisierung der Tn917-Insertionsstellen der Biofilm- und PIA-negativen Mutanten M10 und M11 ..... **38**

3.1.1 Restriktionskartierung der an die Tn917-Insertionsstellen von M10 und M11 angrenzenden Genomabschnitte 38
3.1.2 Sequenzierung der die Tn917-Insertionstelle flankierenden Genomabschnitte der Mutanten M10 und M11 43
3.2 Untersuchung möglicher Varianten des icaADBC-Genclusters und ihrer Assoziation mit der qualitativen und quantitativen Biofilm- und PIA-Expression durch klinische S. epidermidis-Isolate . 46
3.2.1 Restriktionsanalyse des *icaADBC*-Genclusters in einer Population klinischer *S. epidermidis-Isolate* *46*
3.2.1.1 Vorbemerkungen 46
3.2.1.2 *Hind*III-Restriktionsanalyse chromosomaler DNA *icaADBC*-positiver *S. epidermidis*-Stämme 47
3.2.1.3 *Eco*RI-Restriktionsanalyse chromosomaler DNA klinischer *S. epidermidis*-Isolate 51
3.2.1.4 *Msp*I-Restriktionsanalyse chromosomaler DNA *icaADBC*-positiver *S. epidermidis*-Stämme 55
3.2.1.5 *Xba*I-Restriktionsanalyse chromosomaler DNA *icaADBC*-positiver *S. epidermidis*-Stämme 55
3.2.1.6 *Xba*I x *Hind*III-Restriktionsanalyse chromosomaler DNA *icaADBC*-positiver *S. epidermidis*-Stämme 59
3.2.1.7 Kopplung polymorpher *Eco*RI- und *Hind*III-Fragmente 62
3.2.1.8 Assoziation der *Eco*RI / *Hind*III-Kopplungspaare mit den polymorphen *Msp*I-Fragmenten 62
3.2.1.9 Über den Nachweis variabler Restriktionsfragmente des *icaADBC*-Genclusters ist die Einteilung unterschiedlicher S. epidermidis-Stämme in genotypische Klassen möglich 64
3.2.2 Phänotypisierung klinischer *S.epidermidis*-Isolate anhand ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung und PIA-Expression *69*
3.2.2.1 Vorbemerkungen 69
3.2.2.2 Quantitative Biofilmbildung und PIA-Expression klinischer *S. epidermidis*-Isolate bei Kultur in TSB_{BBL} und TSB_{OXOID} 69
3.2.2.3 Änderung der quantitativen Biofilm- und PIA-Expression von *S. epidermidis*-Isolaten nach Supplementierung des TSB_{OXOID}-Mediums mit N-Acetylglucosamin (GlcNAc) 77
3.2.2.3.1 Nachweis von PIA bei durch GlcNAc-Supplementierung Biofilm-restituierten *S. epidermidis*-Stämmen. 79
3.2.3 Assoziation von *icaADBC-positivem* Genotyp und der Fähigkeit zur PIA-Expression und Biofilmbildung durch *S. epidermidis*-Stämme bei Kultur in TSB_{BBL} *81*
3.2.3.1 Assoziation von *icaADBC*-Genotypen und der differentieller Expression von Biofilm und PIA 83
3.3 Restriktionskartierung von in ihrer Fähigkeit zur Biofilm- und PIA-Expression beeinträchtigten Transposoninsertionsmutanten des S. epidermidis-Stamms 1457 87
3.3.1 Analyse der Mutanten der Klasse I - V durch Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) 87
3.3.2 Restriktionskartierung der Transposonmutanten der Klassen I - V 89

4 Diskussion 94

5 Zusammenfassung 111

6 Literaturverzeichnis 113

7 Danksagungen 130

8 Lebenslauf 131

1 Einleitung

1.1 Koagulase-negative Staphylokokken

1.1.1 Klassifikation

Staphylokokken gehören neben den Gattungen *Micrococcus, Stomatococcus* und *Planococcus* zur Familie der *Micrococcaceae*. Es handelt sich um gram-positive, fakultativ anaerobe, unbewegliche, nicht sporenbildende Bakterien, die Katalase-Aktivität exprimieren und als einzelne Zelle, in traubenartigen Haufen oder kurzen Ketten vorliegen. Zur Zeit werden anhand genetischer, physiologischer, biochemischer und morphologischer Aspekte 31 Staphylokokkenarten differenziert (Kloos, 1986; Kloos, 1997; Pfaller und Herwaldt, 1988; Rupp und Archer, 1994). Diese lassen sich durch den Nachweis der Prothrombin-aktivierenden Koagulase in Koagulase-positive und in Koagulase-negative Arten unterteilen (Sperber und Tatini, 1975). Die einzige human-pathogene, Koagulase-positive Art ist *Staphylococcus aureus*, alle anderen sind Koagulase-negativ (Kloos und Bannermann, 1994; Rupp und Archer, 1994). 14 der bekannten Koagulase-negativen Staphylokokken-Arten können als residente oder temporär residente Flora beim Menschen auf Haut, Hautanhangsdrüsen und Schleimhäuten als typische Kommensalen nachgewiesen werden (Tab. 1). Die höchste Dichte findet sich mit 10^4 - 10^6 CFU / cm^2 an den Ausführungsgängen von Schweißdrüsen, Haartalgdrüsen und den Schleimhäuten an Körperöffnungen (Nobel und Naidoo, 1986; Nobel 1997). Einige Arten weisen hierbei eine deutliche Präferenz hinsichtlich der besiedelten Körperregion auf, so findet sich *S. capitis* fast ausschließlich auf der behaarten Kopfhaut, *S. auricularis* im äußeren Gehörgang und *S. haemolyticus* sowie *S. hominis* im Bereich apokriner Schweißdrüsen. Andere Arten sind ubiquitär auf der Körperoberfläche verteilt. Unter ihnen ist *S. epidermidis* die am häufigsten gefundene. Die maximale Dichte dieser Art findet sich mit 10^4 - 10^6 CFU / cm^2 in der Axilla (Kloos und Musselwhite, 1975; Kloos, 1986; Kloos und Bannermann, 1994).

1.1.2 Durch Koagulase-negative Staphylokokken hervorgerufene Erkrankungen

Der zur Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken gehörende *S. saprophyticus* ist schon lange als typischer Erreger von Harnwegsinfektionen bei jungen Frauen bekannt (Marrie *et al*.,

Tabelle 1

Übersicht über regelhaft beim Menschen gefundene, Koagulase-negative Staphylokokken und ihre Rolle als Krankheitserreger (in Anlehnung an Rupp, 1997)

Art	Typische Infektionen
S. epidermidis	Nosokominale Bakteriämie; fremdkörper-assoziierte Infektionen [a]
S. saprophyticus	Harnwegsinfektionen
S. haemolyticus	Selten Bakteriämie, Endocarditis
S. lugdunensis	Selten Bakteriämie, Endocarditis
S. auricularis	Selten Protheseninfektionen
S. capitis	Selten Protheseninfektionen
S. cohnii	Selten Protheseninfektionen
S. hominis	Selten Protheseninfektionen
S. saccharolyticus	Selten Protheseninfektionen
S. schleiferi	Selten Protheseninfektionen
S. simulans	Selten Protheseninfektionen
S. warneri	Selten Protheseninfektionen
S. xylosus	Selten Protheseninfektionen
S. caprae	Selten Protheseninfektionen

[a] Siehe Text für Details

1982; Wallmark *et al*., 1978; Archer, 1990). Andere Koagulase-negative Staphylokokken wurden im allgemeinen als nicht humanpathogen betrachtet (Tab. 1). Erst in den letzten zwei Jahrzehnten haben epidemiologische Untersuchungen gezeigt, daß sie als herausragende nosokominale Krankheitserreger betrachtet werden müssen. In den Jahren 1980 - 1989 stieg die Zahl durch Koagulase-negative Staphylokokken induzierter, nosokomialer Bakteriämien um den Faktor 1.5 - 8.5 (Banerjee *et al*., 1991; Schaberg *et al*., 1991). Daten des US-amerikanischen Centers for Disease Control und des National Nosocominal Infection Surveillance Systems zeigen, daß sie in den Jahren 1990 - 1995 die dritthäufigste Ursache für nosokominale Infektionen überhaupt und mit 33.5% die häufigste Ursache für eine nosokominal erworbene Bakteriämie waren. Zudem konnten Koagulase-negative Staphylokokken als zweithäufigste Erreger chirurgischer Wundinfektionen gefunden werden (U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1996). Koagulase-negative Staphylokokken präsentieren sich als typische opportunistische Erreger, die erst bei einer spezifischen oder unspezifischen Immunkompromittierung wie zum Beispiel im Rahmen einer Chemotherapie, einer Knochenmarkstransplantation, eines Tumorleidens, schwerer Verbrennungen, Traumata oder eine HIV-Infektion als Ursache einer Infektion Bedeutung erlangen (Goldmann und Pier, 1993; Kotilainen, 1990). Dies zeigt auch die Tatsache, daß Koagulase-negative Staphylokokken die häufigste Ursache für eine Bakteriämie auf Kinderintensivstationen sind (Rupp und Archer, 1994). Die Infektionen mit Koagulase-negativen Staphylokokken sind besonders problematisch, da in den letzten Jahren vermehrt Stämme mit multiplen Antibiotika-Resistenzen, insbesondere gegen β-Lactam-Antibiotika, gefunden wurden (Grosserode und Wenzel, 1991; Bailey *et al*., 1990). Solche Stämme sind entweder bereits auf der Epidermis der Patienten vorhanden und werden bei unkritischem Antibiotikagebrauch selektioniert. Zum Teil werden sie aber auch durch das Krankenhauspersonal übertragen. (Vishniavsky und Archer, 1984; Maki und Stevens, 1984; Huebner *et al*., 1994). Für einzelne Stämme konnte eine jahrelange Persistenz auf Intensivstationen gezeigt werden (Huebner *et al*., 1994).

75% der klinisch signifikanten nosokomialen Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken entstehen im Zusammenhang mit eingebrachten, aus polymeren Kunststoffen gefertigten Fremdkörpern (Fidalgo *et al*., 1990; Dominguez de Villota *et al*., 1987; Kirchoff und Sheargen, 1985). Typische Beispiele sind künstliche Herzklappen, zentrale Venenkatheter, Gefäßprothesen, Liquor- (CSF-) Shunts, Gelenkprothesen, künstliche Linsen, Katheter zur chronisch ambulanten Peritonealdialyse (CAPD), Herzschrittmacher und Brustprothesen aus Silikon (Heimberger und Duma, 1989; Calderwood *et al*.; 1985; Karchmer *et al*., 1983; Rupp und

Archer, 1994; Bandyk *et al*. 1984; George *et al*., 1979; Kraus und Spector, 1983; Spanu *et al*., 1986; Renier *et al*., 1984; Inman *et al*., 1984; Brause, 1986; Weber *et al*., 1986; Heaven *et al*., 1992; Vas, 1994; Choo *et al*., 1981; Burkhardt *et al*., 1981). Die Infektionen verlaufen hierbei als „early-onset"- Infektionen mit Beginn der Krankheitssymptome Tage bis wenige Wochen nach Einbringen des Fremdkörpers bzw. einer Operation oder aber als „late-onset"-Infektionen nach einem Zeitintervall von Monaten oder Jahren. Bei ersterer soll die Besiedlung der Fremdkörper durch den Erreger während einer interventionellen Maßnahme selbst, bei letzterer entweder über eine transiente Bakteriämie oder aber z.B. *per continuitatem* über die Eintrittsstelle eines Katheters erfolgen (Kloos und Bannermann, 1994).

Fremdkörper-assoziierte Infektionen stellen ein großes klinisches Problem dar, da therapeutisch häufig nur die Entfernung des entsprechenden Fremdkörpers bleibt (Younger *et al*., 1987).

Problematisch für die Diagnose einer fremdkörper-assoziierten Infektion ist, daß 75 - 90% der isolierten Koagulase-negativen Staphylokokken als einfache Kontaminanten zu betrachten sind und daher eine Unterscheidung von klinisch signifikanten Isolaten schwierig ist (Fidalgo *et al*., 1990; Kirchoff und Sheargren, 1985; Weinstein *et al*., 1983; Ringberg *et al*., 1991; Kleemann *et al*.,1993; Herwald *et al*., 1996).

Bei den genannten fremdkörper-assoziierten Infektionen läßt sich in 74 - 92% die Spezies *S. epidermidis* isolieren, seltener kommen *S. haemolyticus*, *S. warneri* und *S. lugdunensis* vor (Kloos und Bannermann, 1994; Pulverer, 1985; Martin *et al*., 1989; Hamory und Parisi, 1985; Patrick, 1990; Jansen *et al*., 1989). Gerade *S. epidermidis* scheint nach diesen epidemiologischen Daten Eigenschaften zu besitzen, die dieser Spezies in besonderem Maße die Besiedlung von Fremdkörperoberflächen ermöglichen. Damit wird *S. epidermidis* zum wichtigsten Verursacher fremdkörper-assoziierter Infektionen. Im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses stand daher die Aufklärung von an der Oberfläche ablaufenden Interaktionen zwischen Fremdmaterial, wirtseigenen und durch *S. epidermidis* gebildeten Faktoren.

1.1.3 Pathogenese fremdkörper-assoziierter Infektionen durch *S. epidermidis*

Erstmals beobachteten Bayston und Penny 1972 einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Liquor-Shunt-Infektion und der Isolierung von *S. epidermidis* Stämmen, die *in vivo* als auch *in vitro* einen adhärenten Film auf diesen Shunts bildeten. Sie spekulierten, daß diesem Phänomen die Produktion einer mukoidartigen Substanz als wichtiger Pathogenitätsfaktor zugrunde liegen könnte. Erst später konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, daß

die Besiedlung der Oberflächen durch in eine amorphe Grundsubstanz eingebettete, mehrschichtig angeordnete Bakterien erfolgte. Die Struktur des Zellverbandes war hierbei insbesondere durch den Kontaktverlust eines Teils der Bakterienpopulation zur Fremdkörperoberfläche charakterisiert (Peters *et al*, 1981). Damit auch diese Zellen im Zellverband verbleiben, müssen Faktoren wirksam werden, die interzelluläre Adhäsion vermitteln. Diese Funktion wurde der die Zellen umgebenden Substanz zugesprochen (Christensen *et al*., 1990; Peters *et al*., 1982; Marrie und Costerton, 1984), die, da sie aus Exopolysacchariden zu bestehen schien, im weiteren als Schleim oder Glykokalix bezeichnet wurde (Christensen *et al*., 1982; Costerton *et al*., 1987; Franson *et al*., 1884; Marrie *et al*., 1984; Peters *et al*., 1981). Der Begriff Schleim wurde in der Folge auch zur Kennzeichnung des auf Fremdkörpern sichtbaren Films gebraucht (Hussain *et al*., 1993; Bayston und Rogers, 1990; Christensen *et al*., 1982; Peters *et al*., 1987). Um begriffliche Mißverständnisse zu vermeiden, sollte dieses Phänomen als Biofilm-Bildung bezeichnet werden und der Begriff Schleim ausschließlich zur Beschreibung der die Bakterien umgebenden Substanz / Glykokalix reserviert bleiben (Mack, 1999b).

Die Organisation in einem Biofilm scheint die Bakterienzellen nicht nur vor wirtseigenen Immunmechanismen zu schützen (Peters *et al*., 1982; Heinzelmann *et al*., 1997), sondern auch zu einer verminderten Antibiotikaempfindlichkeit der Erreger zu führen (Sheth *et al*., 1985; Evans und Holmes, 1987; Gristina *et al*, 1989; Farber *et al*, 1990; Widmer und Zimmerli, 1990; Chuard *et al*., 1991; Duguid *et al*., 1992; Gander, 1996). Ursächlich hierfür könnten metabolische Veränderung der Bakterienzellen wie auch eine Interferenz der Glykokalix mit der Antibiotikapenetration sein.

Christensen und Mitarbeiter etablierten einen *in vitro*-Test, mit dem Biofilmbildung durch Flüssigkultur von *S. epidermidis*-Stämmen in Kulturröhrchen qualitativ erfaßt werden konnte (Christensen *et al*., 1982). Da dieser sich jedoch hinsichtlich seiner gelieferten Ergebnisse als sehr variabel erwies (Christensen *et al*., 1885; Deighton und Balkau, 1990), entwickelte dieselbe Arbeitsgruppe einen weiteren Test, bei dem durch Kultur der zu untersuchenden Stämme in Zellkultur-Mikrotiterplatten unter statischen Bedingungen und Ermittlung der optischen Dichte des gefärbten, adhärenten Bakterienfilms eine semiquantitative Beurteilung dieses phänotypischen Charakteristikums möglich wurde (Christensen *et al*., 1985). Anhand der Festlegung von Grenzwerten lassen sich biofilm-bildende (= biofilm-positive) Stämme von nicht biofilm-bildenden (= biofilm-negativen) Stämmen differenzieren. Der *in vitro* gebildete Biofilm entsprach elektronenoptisch im wesentlichen dem *in vivo* dargestellten (Christensen *et al*., 1985; Hussain *et al*., 1992; Schmidt *et al*., 1986). Mit Hilfe der genannten Tests konnte in vielen Studien gezeigt

werden, daß bei fremdkörper-assoziierten Infektionen signifikant häufiger biofilm-positive als biofilm-negative *S. epidermidis*-Stämme gefunden werden können (Christensen *et al*., 1982; Christensen *et al*., 1985; Baddour *et al.,* 1986; Davenport *et al*., 1986; Deighton *et al*., 1990; Dunne *et al*., 1987; Ishak *et al*., 1985; Younger *et al*., 1987; Ziebuhr *et al*., 1997). Gleichzeitig fanden sich Belege dafür, daß der Nachweis eines biofilm-positiven Phänotyps mit einem schlechten Behandlungserfolg bei alleiniger antibiotischer Therapie ohne Entfernung des eingesetzten Fremdkörpers korreliert ist (Davenport *et al*., 1987, Dunne *et al*., 1987; Diaz-Mitoma *et al*., 1987; Younger *et al*., 1987). Diese Daten legen nahe, die Fähigkeit zur Ausbildung eines Biofilms als ein einen pathogenen *S. epidermidis*-Stamm vorrangig charakterisierendes und von einem nicht-pathogenen Stamm diskriminierendes Merkmal anzunehmen. Einschränkend muß gesagt werden, daß eine Reihe von Untersuchungen keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen klinisch relevanter Infektion und dem Nachweis biofilm-positiver *S. epidermidis*-Stämme erbringen konnten (Alexander und Rimland, 1987; Beard-Pegler *et al*., 1989; Needham und Stempsey, 1984). Eine Ursache für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte die problematische Erfassung eines biofilm-positiven Phänotyps sein, da der Nachweis dieses Merkmals von einer Vielzahl von exogenen Faktoren beeinflußt werden kann (Christensen *et al*., 1994). Auch technische Aspekte wie zum Beispiel die Zellfixierung (Baldassari *et al*., 1993) haben hierfür eine Bedeutung.

Zudem ist Biofilmbildung auch unter konstanten Wachstumsbedingungen ein variables Merkmal, da es einer spontanen Phasenvariation unterliegen kann (Christensen *et al*., 1990; Christensen *et al*., 1987; Deighton *et al*, 1992; Baddour 1984; Baddour *et al*, 1990; Ziebuhr *et al*., 1997; Ziebuhr *et al.*, 1999). Diese ist dadurch gekennzeichnet, daß eine Subpopulation eines biofilm-positiven Isolats in einen biofilm-negativen Phänotyp wechselt. Das führt dazu, daß verschiedene Isolate eines klinisch relevanten Stamms einmal als biofilm-positiv und ein anderes Mal als biofilm-negativ beschrieben werden (Deighton *et al*., 1992).

Fast alle *S. epidermidis*-Stämme sind in der Lage, an Polymeroberflächen zu binden, wobei es jedoch Differenzen in quantitativer Hinsicht gibt (Muller *et al*., 1993b; Espersen *et al*., 1990; Hogt *et al*., 1986; Pascual *et al*., 1986; Tojo *et al*., 1988).

Hierbei ist die Bildung eines sichtbaren Biofilms auf Polymeroberfläche durch *S. epidermidis* durch eine Zweiphasenkinetik gekennzeichnet: einer schnellen Phase (primäre Bindung), in der die Bakterien Kontakt mit der Oberfläche aufnehmen und einen einschichtigen Zellfilm etablieren, folgt eine zweite, langsamere Phase (die sogenannte akkumulative Phase), in welcher sich die Zellen in mehrschichtigen Zellclustern organisieren (Franson *et al*., 1984; Peters *et al*, 1981).

1.1.3.1 Die primäre Bindung

Die primäre Bindung wird durch spezifische wie auch unspezifische, wirtseigene und *S. epidermidis*-immanente Faktoren gefördert. Unspezifisch fördern hydrophobe Interaktionen und Van-der-Waals-Kräfte die Anlagerung (Fleer und Verhoef, 1989; Jansen *et al*., 1989). Eine hydrophobe Zelloberfläche verstärkt die Bindung von *S. epidermidis*-Stämmen an Polymeroberflächen (Ludwicka *et al*., 1984). Die Art des besiedelten Materials besitzt hierbei einen entscheidenden Einfluß (Ludwicka *et al*., 1984; Hogt *et al*., 1985).

Während die Vorbehandlung von Polymeroberflächen mit Fibronectin und Fibrinogen (Herrmann *et al*., 1988; Vaudaux *et al*., 1989, Rupp *et al*, 1999a) und die Anwesenheit aktivierter Thrombocyten (Wang *et al*., 1993) die Adhärenz fördern können, sind Serum, Plasma und Albumin in der Lage, die primäre Bindung zu inhibieren (Peters *et al*., 1987; Espersen *et al*, 1990; Pascual *et al*., 1986; Hogt *et al*., 1985; Herrmann *et al*., 1988; Vaudaux *et al*., 1989, Muller *et al*., 1991). Neben unspezifischen konnten einige spezifisch wirksame Faktoren identifiziert werden. PS/A, ein aus einer *S. epidermidis*-RP62A-Kultur isoliertes Polysaccharid, scheint in die primäre Bindung involviert zu sein (Tojo *et al*., 1988). Jedoch konnte in einer *S. epidermidis*-Population bei 50% aller Stämme, die keinen Biofilm bildeten, PS/A mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen werden (Muller *et al*., 1993b), was die Bedeutung dieses Polysaccharids für den Prozeß der Biofilmbildung einschränkt. Durch Erzeugung isogener, PS/A-negativer Transposoninsertionsmutanten des Stammes M187 konnte eine für die Synthese dieses Polysaccharids bedeutsame Genomregion kartiert werden (Muller *et al*., 1993a). Neben der Funktion im Rahmen der primären Bindung wurde PS/A auch eine Rolle in der akkumulativen Phase (s.u.) zugesprochen (Muller *et al*., 1993a, McKenny *et al*, 1998).

Weitere in der initialen Phase der Oberflächenbesiedlung spezifisch wirksame Faktoren sind die mit Hilfe eines die primäre Bindung inhibierenden, monoklonalen Antikörpers identifizierten Proteine SspI und SspII (Timmermann *et al*., 1991; Veenstra *et al*., 1996) und das kürzlich durch Transposonmutagenese gefundene, 148 kDa Autolysin AtlE von *S. epidermidis* und der hierfür codierende Genomabschnitt *atlE* (Heilmann *et al*., 1996b; Heilmann *et al*., 1997).

1.1.3.2 Faktoren, die an der akkumulativen Phase beteiligt sind

Auch für die akkumulative Phase der Biofilm-Bildung konnten mehrere spezifisch wirksame Faktoren charakterisiert werden. Schumacher-Perdreau *et al*. konnten durch Mitomycin-induzierte Mutagenese des biofilm-positiven *S. epidermidis*-Stammes RP62A die Mutante M7 erzeugen, die bei Verlust eines 140 kDa großen Proteins (accumulation associated protein, AAP) zwar noch

eine primäre Adhäsion an Polymeroberflächen zeigte, jedoch nicht mehr zur Akkumulation fähig war (Schumacher-Perdreau *et al*., 1994). Ein für das gereinigte Protein spezifisches Antiserum war in der Lage, die Akkumulation von RP62A zu inhibieren, woraus eine Beteiligung an diesem Prozeß belegt werden konnte. Da jedoch in einer Population von *S. epidermidis*-Wildtypstämmen Biofilmbildung auch bei AAP-negativen Stämmen nachgewiesen (Hussain *et al*., 1997) und in einem Rattenendocarditis-Modell keine Einschränkung der Virulenz der Mutante M7 gegenüber dem Wildtypstamm RP62A gefunden werden konnte (Perdreau-Remington *et al*., 1998), bedarf die Rolle von AAP als Biofilm und Pathogenität determinierender Faktor weiterer Untersuchung.

Auf der Suche nach einem interzelluläre Adhäsion vermittelnden Faktor lag ein Hauptaugenmerk auf der Zusammensetzung der die biofilm-positiven *S. epidermidis*-Stämme umgebenden, vermutlich aus Polysacchariden bestehenden Glykokalix. Mehrere Versuche einer Isolierung der zugrundeliegenden Substanzen scheiterten an einer Kontamination durch Mediumanteile (Drewrey *et al*., 1990; Hussain *et al*., 1991) oder die Beurteilung der Ergebnisse ist bei fehlender Kontrolle dieses Problems nur eingeschränkt möglich (Peters, 1987; Ludwicka *et al*., 1984; Arvaniti *et al*., 1994; Karamanos *et al*., 1995; Karamanos *et al*., 1997). Erst unter Verwendung eines chemisch definierten Mediums gelang es, eine Hauptkomponente der Glykokalix, bestehend aus Glucose, Glycerol, D-Alanin, N-Acetylglucosamin und Phosphat, zu charakterisieren (Hussain *et al*., 1992a, 1992b). In der biochemischen Zusammensetzung besteht eine deutliche Ähnlichkeiten mit Teichonsäure. Da biofilm-negative Stämme Teichonsäure in einer ähnlichen Menge wie biofilm-positive Stämme produzieren, erscheint es fraglich, ob diese tatsächlich eine Rolle im Prozess der Akkumulation besitzt (Hussain *et al*., 1991; Hussain *et al*, 1992).

Mack *et al*. (1992) konnten mit Hilfe eines gegen den biofilm-positiven *S. epidermidis* 1457 gebildeten, polyklonalen Kaninchenantiserums, das an mehreren biofilm-negativen Stämmen absorbiert worden war, in einer *S. epidermidis*-Population ein ausschließlich bei biofilm-positiven Stämmen vorhandenes Antigen nachweisen. Die Expression dieses auf der Bakterienoberfläche lokalisierten Antigens ließ sich parallel zum biofilm-positiven Phänotyp durch Kultur in TSB + Glucose induzieren (Mack *et al*., 1992; Mack *et al*., 1994a; Mack *et al*., 1994 b). Da durch Perjodat-Oxidation ein Verlust der Immunreaktivität erzielt werden konnte, wurde vermutet, daß das Antigen ein Polysaccharid sei (Mack *et al*., 1992). Neben dem Verlust der Immunreaktivität ließen sich Biofilm und Zellcluster von *S. epidermidis* 1457 durch Perjodat-Oxidation desintegrieren, wodurch ein Rückschluß auf die funktionelle Beteiligung des nachgewiesenen Antigens an der interzellulären Adhäsion möglich war (Mack *et al*., 1992). Durch Mutagenese mit dem *E. faecalis*-Transposon Tn*917* konnten die Mutanten M10 und M11 des biofilm-positiven *S.*

epidermidis-Stamms 13-1 isoliert werden, die bei erhaltener Fähigkeit zur primären Adhäsion vollständig biofilm-negativ waren. Die Phänotypänderung konnte durch Phagen-Transduktion eindeutig auf die Transposon-Insertion zurückgeführt werden (Mack *et al*., 1994a). Bei den Mutanten ließ sich das Polysaccharid-Antigen unter Verwendung des absorbierten Antiserums nicht nachweisen (Mack *et al*., 1994a) und somit die Bedeutung seiner Expression für die akkumulative Phase der Biofilm-Bildung darstellen. Bei dem immunreaktiven Material handelt es sich um zwei strukturell verwandte, lineare Homoglycane, bestehend aus etwa 130 β-(1,6)-gebundenen 2-Deoxy-2-Amino-D-Glucopyranosylresten, die im Falle des überwiegend vorliegenden Polysaccharids I zu 80 - 85% N-acetyliert sind. Nicht-acetylierte Anteile weisen eine positive Ladung auf. Das Polysaccharid II unterscheidet sich hiervon durch einen höheren Prozentsatz N-acetylierter D-Glucosaminyl-Reste sowie einen höheren Anteil an Phosphat und Ester-gebundenem Succinat, wodurch es einen anionischen Charakter erhält (Mack *et al*., 1996a). Das Polysaccharid erhielt die Bezeichnung interzelluläres Polysaccharid-Adhäsin (PIA). Sein Nachweis ist in qualitativer Hinsicht mit einem biofilm-positiven Phänotyp korreliert und seine Expression zeigt eine lineare Assoziation mit der gebildeten Biofilmquantität (Mack *et al*., 1996b). Neben der grundlegenden Bedeutung im Prozeß der Biofilmbildung ist PIA auch funktionell an der viele *S. epidermidis*-Stämme auszeichnenden Fähigkeit zur Haemagglutination beteiligt: Haemagglutination und Biofilmexpression sind zu 100% korrelierte Phänomene, anti-PIA-Antikörper können die Haemagglutination inhibieren und die Eigenschaften des als Träger der Eigenschaft zur Haemagglutination beschriebenen Polysaccharids decken sich mit denen von PIA in wesentlichen Punkten (Rupp und Archer, 1992; Rupp *et al*., 1995; Mack *et al*., 1999a; Fey *et al*., 1999).

Heilmann *et al*. erzeugten die biofilm-negativen Mutanten mut2 und mut2a des *S. epidermidis* O-47, die große phänotypische Übereinstimmung mit den Mutanten M10 und M11 aufwiesen. Transformation dieser Mutanten mit dem Plasmid pCN27, welches ein chromosomales Fragment von *S. epidermidis* RP62A umfaßt, führte zu einer Komplementierung des biofilm-negativen Phänotyps (Heilmann *et al*., 1996a; Heilmann *et al*., 1996b). Der biofilm-negative *S. carnosus* TM300 bildete nach Transformation mit diesem Plasmid sichtbare Zellcluster und mit Hilfe des oben beschriebenen Antiserums konnte eine PIA-Synthese durch diesen Stamm nachgewiesen werden (Heilmann *et al*., 1996a; Gerke *et al*, 1998). Die Sequenzanalyse des klonierten, 5081bp umfassenden Fragments erbrachte den Nachweis von vier in einer operonartigen Struktur organisierten Genen mit übereinstimmender Transcriptionsrichtung, die als intercellular adhesion-(*ica*-) *ABCD*-Gene bezeichnet wurden (Heilmann *et al*., 1996a; Gerke *et al*, 1998). Anhand von

in vitro erhobenen und epidemiologischer Daten konnte die Bedeutung des *icaADBC*-Genclusters und seiner Transcription mit konsekutiver PIA-Synthese für die Biofilm-Bildung belegt werden (Ziebuhr *et al*., 1997; Gerke *et al*., 1998). Bei biofilm-negativen Phasenvarianten biofilm-positiver *S. epidermidis*-Stämmen war keine *icaADBC*-spezifische mRNA gefunden worden. Bei diesen Stämmen konnte weder eine Deletion des Genlocus noch andere strukturellen Änderungen von *icaADBC* gefunden werden. Diese Ergebnisse wurden als indirekte Hinweise auf die Existenz von Expressions-kontrollierenden Faktoren von *icaADBC* gewertet (Ziebuhr *et al*., 1997). Kürzlich konnte als ein Mechanismus der Biofilm-Phasenvariation die temporäre Insertion von IS*256* im *ica*-Genlocus dargestellt werden (Ziebuhr *et al*., 1999)

In zwei Tiermodellen konnte unter Verwendung des biofilm-positiven, PIA-exprimierenden *S. epidermidis* 1457 sowie der isogenen, Biofilm- sowie PIA-negativen Tn*917*-Mutante 1457-M10 (s.u.) die Bedeutung von PIA als Virulenzfaktor sowie *icaADBC* als Virulenz determinierende Gene identifiziert werden. In einem Maus-Modell fremdkörper-assoziierter Infektionen induzierte der Wildtypstamm siginifikant häufiger die Entstehung subcutaner Abzesse, konnte seltener durch die wirtseigene Abwehr eradiziert werden und haftete stärker an den implantierten Kathetern als die biofilm- und PIA-negative Mutante (Rupp *et al*., 1999a). Ferner konnte in einem Rattenmodell gezeigt werden, daß 1457 signifikant häufiger zur Entstehung i.v.-Katheter assoziierter Infektion führt als die korrespondierende, isogene Mutante 1457-M10 (Rupp *et al*., 1999b).

1.2 Voraussetzungen für diese Arbeit

Mack *et al*. war es gelungen, durch Transposoninsertionsmutagenese die Biofilm-, Haemagglutination- und PIA-negativen Mutanten M10 und M11 des zuvor stark Biofilm- und PIA-positiven sowie haemagglutinierenden Stamms 13-1 zu erzeugen. Zur Einschleusung des Transposons in die Zielzellen wurde das temperatursensitive Plasmid pTV1ts verwandt, welches neben einer *cat*-codierten Chloramphenicolresistenz auch Tn*917* umfaßt (Youngman *et al*., 1983; Villafane *et al*., 1987). Durch Phagen-Transduktion konnte die konsekutive Phänotypänderung auf die Insertion des Transposons in das Wirtsgenom eindeutig zurückgeführt werden (Mack *et al*., 1994a; Nedelmann *et al*., 1998). Bei Tn*917* handelt es sich um 5.3 kb großes, komplexes Transposon aus *E. faecalis*, welches exzentrisch eine Erythromycin-Resistenz-Kassette (*erm*) trägt. Durch die Kennzeichnung dieses Gens und Angabe seiner Transcriptionsrichtung ist eine Aussage über die relative Orientierung des Transposons im Wirtsgenom möglich (Shaw und Clewell, 1985).

Es konnten die das Transposon umfassenden *Eco*RI-Fragmente von M10 und M11, biofilm-negativen Tn*917*-Insertionsmutanten des starken Biofilmbildners 9142 in pT181mcs ligiert und in *S. carnosus* TM300 kloniert werden. Dabei stellte sich heraus, daß die zu diesen Mutanten führenden Transposoninsertionsorte auf unterschiedlich großen *Eco*RI-Fragmenten (M10: 2.2 kb; M11: 0.8 kb), jedoch einem identischen *Hind*III-Fragment von 13.0 kb Größe gelegen sind, woraus geschlossen wurde, daß die inaktivierten Genen in enger räumlicher Umgebung geclustert sind oder es sich sogar um ein identisches Gen handeln könnte (Mack *et al*., 1999a). Im weiteren Verlauf konnten durch Transduktion der zur Phänotypänderung von M10 und M11 führenden Transposoninsertion in die unabhängigen, Biofilm- und PIA-positiven Stämme 1457 und 8400 zwei weitere isogene Stammpaare mit identischen Transposoninsertionsorten erzeugt werden (Nedelmann M., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein effizientes Transposonmutagenese-System etabliert, mit dessen Hilfe weitere Tn*917*-Insertionsmutanten M12, M13, M15, M16, M17, M19 und M24 erzeugt wurden. Diese Mutanten wurden anhand ihrer jeweils veränderten Fähigkeit zur Biofilmbildung, PIA-Synthese und Ausbildung mukoider Kolonien auf Purpleagar in die Mutantenklassen I - V eingeteilt (Tab. 7).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Durch die Transposon-Insertionen waren Genorte von *S. epidermidis* 9142 und 1457, die für die Bildung eines Biofilms auf Polymeroberflächen sowie die Synthese von PIA von Bedeutung sind und hierüber auch Einfluß auf die Fähigkeit zur Haemagglutination haben, inaktiviert und hierbei gleichzeitig genetisch markiert worden. Unter Rückgriff auf die geleistete Vorarbeit können die Ziele dieser Arbeit wie folgt formuliert werden:

1.) Weitergehende Restriktionskartierung der zu den Mutanten M10 und M11 führenden, durch Tn*917* markierten Genomabschnitte, sowie Sequenzanalyse der in pT181mcs klonierten, Tn*917* umfassenden, chromosomalen *EcoRI*-Fragmente dieser Mutanten.

2.) Epidemiologische Untersuchung zum Vorkommen der bei M10 und M11 inaktivierten Genorte in einer Population klinischer *S. epidermidis*-Isolate unter Berücksichtigung ihrer Fähigkeit zur PIA-Expression und Biofilmbildung.

3.) Weitergehende Charakterisierung der durch Inaktivierung zu den Mutantengruppen I - V führenden Transposoninsertionsorte durch Restriktionskartierung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2

Übersicht über verwendete Geräte

Laborgerät	**Hersteller**
Kühlzentrifuge Cryofuge 6-6 Kühlzentrifuge Megafuge 1.0 R Brutschrank 5050E	Heraeus-Christ, Osterode
Kühlzentrifuge J2-21 Rotor JA-10 Spectrophotometer 34	Beckmann, München
Eppendorfzentrifuge 5415 Eppendorfphotometer 1101M Eppendorfschüttler	Eppendorf, Hamburg
Thermoinkubator5320	Fa. Nettler-Hinz, Hamburg
Tischzentrifuge Rotana / S	Fa. Hettich, Tuttlingen
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co., New Brunswick
Schüttelinkubator Lab-Shaker	B. Braun, Melsungen
Inkubator F / 30	Dr. Gruß KG, Neuß am Rhein
Schüttelwasserbad GFL1083	AD Krauth, Hamburg
Waage PC4400	Mettler Waagen GMBH, Gießen
Feinwaage 2432	Leitz, Wetzlar
Spectrophotometer ELISA Processor II	Behring, Marburg
Sofortbildkamea MP4 Sofortbildfilme 665 / 667	Polaroid Corporation, Cambridge
UV-Transilluminator	Ultra-Violett Products Inc., San Gabriel
Gleichspannungsgerät 67510	Camag
UV-Leuchte 30W	NIS
Digital-pH-Meter 646	Knick, Berlin
Gelkammern	Kreutz Laborgeräte, Hamburg
Zellkulturplatten, Nunclon Delta mit Abdeckung	Nunc, Roskilde
Röntgenfilme X-Omat AR	Agfa
Zeta Probe Nylon Blottingmembranen	Bio-Rad, Richmond
Filterpapier Whatmann 3MM	Balstone, England
Refraktometer	Zeiss, Wetzlar
Saran-Folie	Dow-Chemical, USA
Sterilfilter 0.2µm Porengröße	Sartorius, Göttingen

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 3

Übersicht über verwendete Chemikalien

Chemikalie	**Hersteller**
D(+)-Glucose D(+)-Galaktose N-Acetylglucosamin Saccharose 37%iges Formaldehyd 96%ige Essigsäure Methanol NaN_3 NaCl K_2HPO_4 *$3H_2O$ Triton X-100 Chloroform Ethanol abs 87%iges Glycerin NaH_2PO_4 Na_2HPO_4 $CaCl_2$ Natriumacetat NaOH Borsäure Bromphenolblau 25%ige HCl Natriumcitrat X-Gal	Merck, Darmstadt
SeaKem-Agarose	FMC Bioproduct, Rockland
Phenol	Fa. Roth, Karlsruhe
EDTA IPTG N, N´-Dimethylformamid	Sigma, St. Louis
Ficoll Ampicillin Trihydroxyaminomethane (Tris) Polyethylenglycol (PEG) 6000 Glycin Erythromycin Tetracyclin Ethidiumbromid Natriumdodecylsulfat (SDS) D(+)-Glucosamin	Serva, Heidelberg
One-Phor-all-Plus-Puffer DNA-Labelling-Kit-Ready-to-go Sephadex G-50 ϕλ-DNA, *Hin*dIII-gespalten	Fa. Pharmacia, LKB-Biotechnology, USA
Isoamylalkohol ϕλ-DNA (*Hind*III-digest)	Boehringer, Mannheim
Xylen Cyanol FF	Fluka
Chloramphenicol	Bayer, Leverkrusen
[^{32}P]dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig

2.1.3 Medien

Angegeben ist die Zusammensetzung für die Flüssigmedien, wobei die jeweiligen Bestandteile in VE-Wasser gelöst und anschließend autoklaviert wurden. Zur Anfertigung von Agarplatten wurde zusätzlich 1.5% Bacto-Agar (Fa. Difco, Detroit / USA) zugegeben, der Ansatz autoklaviert und die Platten bei einer Temperatur von 60°C gegossen.
Wo angezeigt, wurden Antibiotika zur Selektion den flüssigen und festen Nährmedien bei Erreichen einer Temperatur von etwa 60°C aus einer Stammlösung (10 mg / ml) in entsprechender Verdünnung zugesetzt. Wenn gewünscht, wurden sterilfiltrierte Kohlenhydratzusätze nach dem Autoklavieren zugegeben.

TSB (Tryptic Soy Broth)
Beckton Dickinson (TSB_{BBL}), Cockeysville, Ma. (USA): 30 g TSB ad 1000 ml H_2O
Oxoid (TSB_{OXOID}), Basingstoke (England): 30 g TSB ad 1000 ml H_2O

PY- (Peptone-Yeast-) Brühe: 10 g Peptone (Difco, Detroit / USA), 5 g Yeast Extract (Difco, Detroit / USA), 5 g NaCl, 1 g Glucose, ad 1000 ml H_2O, mit 1 M NaOH auf pH 7.5 eingestellt

LB- (Luria-Bertani-) Brühe: 10 g Tryptone (Difco, Detroit / USA), 5 g Yeast Extract (Fa. Difco, Detroit / USA), 10 g NaCl, ad 1000 ml H_2O.

Einfriermedium: 1.5 g Peptone (Difco, Detroit / USA), ad 100 ml H_2O sowie 60 ml Glycerin wurden getrennt autoklaviert und im Anschluß daran zusammengeführt.

X-Gal / IPTG-Agar: Lösungen: X-Gal-Lösung (40 mg / ml X-Gal in Dimethylformamid), IPTG-Lösung (2 g IPTG / 10 ml H_2O); 40 µl der X-Gal-Lösung und 4 µl der IPTG-Lösung wurden auf die mit dem gewünschten Antibiotikum versehenen LB-Agarplatten gegeben und mit einem sterilen Glasstab auf der Oberfläche verteilt und für ca. 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um das Dimethylformamid zum Verdunsten zu bringen.

2.1.4 Enzyme

Tabelle 4

Übersicht über verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Lysostaphin	Sigma
RNAse (DNAse frei) Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) T4-DNA-Ligase	Fa. Boehringer, Mannheim
*Eco*RI *Hin*dIII *Xba*I *Bgl*II *Sal*I *Sph*I *Ava*I	Pharmacia, LKB Biotechnology, USA

2.1.5 Plasmide und abgeleitete Sonden für die Southern-Hybridisierung

Tabelle 5

Übersicht über verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenzmarker	Funktion	Bezug
pBluescript II SK	Ampicillin (100 µg / ml)	Klonierungsvektor in *E. coli*	Stratagene, La Jolla
pT181mcs	Tetracyclin (10µg / ml)	Klonierungsvektor in Staphylokokken	Mack, *et al.*, 1999a
pTV1ts	Erythromycin (10 µg / ml) Chloramphenicol (10 µg / ml)		Mack, *et al.*, 1994a
pM10*Eco*RI	Tetracyclin (10µg / ml)	umfaßt in M10 getroffenes *Eco*RI-Fragment	Mack, *et al.*, 1999a
pM11*Eco*RI	Tetracyclin (10µg / ml)	umfaßt in M11 getroffenes *Eco*RI-Fragment	Mack, *et al.*, 1999a
pCN27	Chloramphenicol (10 µg / ml)	umfaßt *icaADBC*	Heilmann *et al.*, 1996a
pHRFE10	Ampicillin (100 µg / ml)	umfaßt in M10 getroffenes *Eco*RI-Fragment	diese Arbeit
pHRFE11	Ampicillin (100 µg / ml)	umfaßt in M11 getroffenes *Eco*RI-Fragment	diese Arbeit

Tabelle 6

Übersicht über verwendete Sonden

Sonde	**Erstellt aus Plasmid**	**Spezifität**
Ec10	pM10*Eco*RI	*icaADB*, distales *Eco*RI-Fragment; Tn*917*
Ec11	pM11*Eco*RI	*icaA*, proximales *Eco*RI-Fragment; Tn*917*
Tn*917*/3´	pTV1ts	Tn*917*, 3´-gelegenes Ende
Tn*917*/5´	pTV1ts	Tn*917*, 5´-gelegenes Ende (*erm*)
$F_{XH}27$ [a]	pCN27	*icaADBC*
$F_{SX}27$ [a]	pCN27	*icaADBC, geh*SE1
$F_{EAS}10$ [a]	pM10*Eco*RI	*icaADB* (bp 931 - bp 2235), keine Tn*917*-Anteile
$F_{EA}11$ [a]	pM11*Eco*RI	*icaA* (5´-gelegenes *Eco*RI-Fragment), keine Tn*917*-Anteile

[a] Tiefgestellt die Initialien der zur Präparation der jeweiligen Sonde herangezogenen Restriktionsendonucleasen: A, *Ava*I; E, *Eco*RI; S, *Sal*I; H, *Hin*dIII; X, *Xba*I

Die verschiedenen Sonden wurden aus den in Tab. 5 genannten Plasmiden zum Einsatz in der Southern-Hybridisierung erzeugt (Tab. 6, Abb. 5). Hierzu erfolgte ein Restriktionsspaltung des jeweiligen Plasmids unter Einsatz geeigneter Restriktionsendonucleasen und die Präparation des gewünschten Fragments nach elektrophoretischer Auftrennung über das Gene-Clean-Verfahren.

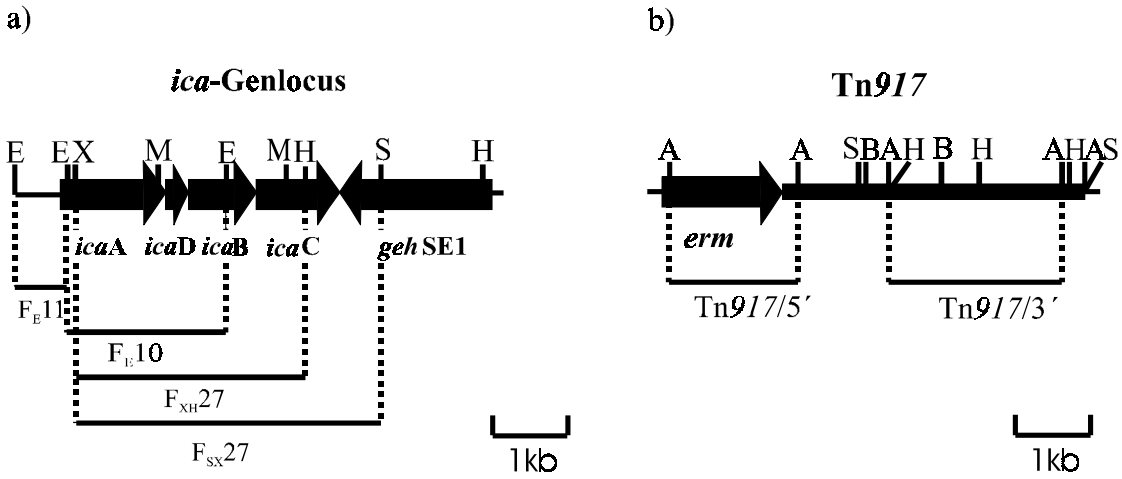

Abbildung 1:a) Gezeigt ist eine schematische Darstellung des *ica*-Genlocus und den aus ihm erzeugten Sonden zur Southern-Hybridisierung. Die Sonden $F_{SX}27$ und $F_{XH}27$ wurden hierbei aus Sequenzabschnitten von *S. epidermidis* RP62A erzeugt, die Sonden Ec10 und Ec11 basieren auf solchen aus *S. epidermidis* 9142. Für sie ist die Darstellung insofern ungenau, als die verwendeten Sonden zusätzlich Teile von Tn*917* umfaßten. **b)** Darstellung von Tn*917* und den aus ihm abgleiteten Sonden *Tn917/3´* uns *Tn917/5´* . Mit ihnen ist eine selektive Detektion des 5´-der 3´-Endes möglich (*Tn917/5´* resp. *Tn917/3´*).

A, *Ava*I; B, *Bgl*II, E, *Eco*RI , H, *Hin*dIII; M, *Msp*I, S,*Sal*I; Sp, *Sph*I; *erm* = Erythromycin-Resistenz

2.1.6 Oligonucleotid-Primer

Von F. Götz, Tübingen, wurden die Sequenzen der folgenden, jeweils für ein Ende von Tn*917* spezifischen Primer vorgeschlagen.

5L: 5´-CTC ACA ATA GAG AGA TGT CAC CG-3´ (*erm*)

3R: 5´-GGC CTT GAA ACA TTG GTT TAG TGG G-3´.

2.1.7 Stämme

Einen Überblick über die eingesetzten Stämme gibt die Tabelle 7. Ferner wurden 61 *S. epidermidis*-Stämme untersucht, die in der Zeit von 1988 bis 1990 die im Rahmen der Routinediagnostik des Institus für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie aus Blutkulturen, von zentralen Venenkathetern und Wundabstrichen isoliert wurden (Mack *et al.*, 1996b).

Tabelle 7

Übersicht über die *S. epidermidis*-Wildtypstämme und die aus ihnen abgeleiteten Transposoninsertionsmutanten

Stamm	**Charakteristikum**	**Bezug**
9142	stark biofilm-positiv, haemagglutinations-positiv	Mack *et al.*, 1994a
M10	biofilm-negativ, PIA-negativ, haemagglutinations-negativ	
M11	biofilm-negativ, PIA-negativ, haemagglutinations-negativ	
1457	stark biofilm-positiv, haemagglutinations-positiv	Mack *et al.*, 1992; Mack *et al.*, 1999a
1457-M10 [a]	biofilm-negativ, PIA-negativ, haemagglutinations-negativ	
M13 [a]	biofilm-negativ, PIA-negativ, weiße Koloniemorphologie, mukoid-negativ	Nedelmann, 1999; Mack *et al.*, 2000
M21 [a]	biofilm-negativ, PIA-negativ, weiße Koloniemorphologie, mukoid-negativ	Nedelmann, 1999; Mack *et al.*, 2000
M22 [a]	biofilm-negativ, PIA-negativ, weiße Koloniemorphologie, mukoid-negativ	Nedelmann, 1999; Mack *et al.*, 2000
M23 [a]	biofilm-negativ, PIA-negativ, weiße Koloniemorphologie, mukoid-negativ	Nedelmann, 1999; Mack *et al.*, 2000
M24 [a]	biofilm-negativ, PIA-negativ, weiße Koloniemorphologie, mukoid-negativ	Nedelmann, 1999; Mack *et al.*, 2000
M12 [b]	biofilm-negativ, PIA-negativ, graue Koloniemorphologie, mukoid-negativ	Nedelmann, 1999; Mack *et al.*, 2000
M15, M19 [c]	schwach biofilm-positiv, niedriger PIA-Titer, graue Koloniemorphologie	Nedelmann, 1999; Mack *et al.*, 2000
M17 [d]	schwach biofilm-positiv, niedriger PIA-Titer, weiße Koloniemorphologie	Nedelmann, 1999; Mack *et al.*, 2000
M16, M20 [e]	mukoid-negativ, biofilm-positiv, PIA-Titer und Koloniemorphologie wie 1457	Nedelmann, 1999; Kiel *et al*, 2000

[a] Angehöriger der Mutantenklasse I; [b] Angehöriger der Mutantenklasse II; [c] Angehörige der Mutantenklasse III; [d] Angehöriger der Mutantenklasse IV; [e]Angehörige der Mutantenklasse V

Tabelle 8

Übersicht über weitere verwendete Stämme

Stamm	**Herkunft / Referenz**	**Eigenschaften**
Staphylococcus epidermidis		
8400	Mack *et al*., 1992	biofilm-positiv
5179	Mack *et al*., 1992	Biofilm-negativ
RP62A (ATCC 35984)	G. Peters, Münster	biofilm-positiv
KH11	G. Peters, Münster	biofilm-negativ
O-47	F. Götz, Tübingen	stark biofilm-positiv
SE5	M. Rupp, Omaha	stark biofilm-positiv
RP12	G. Peters, Münster	biofilm-positiv
M187	G. Pier, Boston	biofilm-positiv, PS/A-positiv
Staphylococcus carnosus		
TM300 (pCN27)	F. Götz, Tübingen	enthält pCN27
TM300 (pM10*Eco*RI)	Mack *et al*., 1999a	enthält pM10*Eco*RI
TM300 (pM11*Eco*RI)	Mack *et al*., 1999a	enthält pM11*Eco*RI
TM300 (pTV1ts)	Mack *et al*., 1994a	enthält pTV1ts
Staphylococcus hominis		
SP2 (ATCC 35981)	G. Peters, Münster	biofilm-negativ
RP14 (ATCC 35982)	G. Peters, Münster	biofilm-negativ, PS/A-positiv
Staphylococcus aureus		
Cowan I	J. Heesemann, München	Protein A
Escherichia coli		
DH5α	Stratagene, La Jolla	*supE*44 Δ*lac*U169 (ϕ80*lacZ*ΔM15) *hsd*R17 *rec*A *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *rel*A1
MC1061	J. A. Gutierrez, Gainesville	*hsd*R *mcr*B *ara*D139 Δ(*ara*ABC-*leu*) 7679 Δ*lac*X74 *gal*U *gal*K *rps*L *thi*; Expression von *erm*

Die Dauerlagerung der Stämme erfolgte in 1 ml Einfriermedium bei -80°C. Um rasch verfügbar zu sein, wurden sie auf PY-Agarplatten, gegebenenfalls unter Zusatz entsprechender Antibiotika zur Selektion, mittels einer ausgeglühten Platinöse ausplattiert, bei 37°C für 12 - 24 h angezüchtet und bei 4°C gelagert. Alle 4 Wochen erfolgte eine Subkultivierung auf frischen Agarplatten, allerdings höchstens viermal. Dann wurden frische Kulturen aufgetaut.

2.1.8 PIA-spezifisches Antiserum

Zum Einsatz kam ein polyklonales anti-PIA-Kaninchenantiserum (Mack *et al*., 1992). Dieses war durch Immunisierung eines Kaninchens mit dem biofilm-positiven *S. epidermidis* 1457 und Absorption an biofilm-negativen Stämmen erzeugt worden.

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation chromosomaler *S. epidermidis*-DNA

Lösungen:

1. Natrium-Dodecylsulfat (SDS) 7 %
2. 3 M Natriumacetat pH 7.0
3. Chloroform / Isoamylalkohol 24 : 1
4. TE- (Tris-EDTA-) Puffer (pH 7.4): 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA

Als Vorkultur wurden 10 ml PY-Brühe + 1% Glycin mit einer Kolonie des entsprechenden Stamms steril beimpft. Die Anzucht erfolgte als Schüttelkultur über Nacht bei 37°C und 120 Upm. Bei Tn*917*-Mutanten wurde zusätzlich eine Selektion auf die Tn*917*-codierte Erythromycin-Resistenz mit Erythromycin (10 µg/ml) durchgeführt. 4 ml der Vorkultur wurden steril in 400 ml PY-Brühe + 1% Glycin (ggf. + Erythromcin 10 µg/ml) überführt und weiter bei 37°C, 120 Upm für 20-24 h inkubiert. Die Bakterienernte erfolgte durch Zentrifugation für 15 min bei 6000 Upm im Sorvall GS-3 Rotor. Der Überstand wurde dekantiert, das Bakterien-Pellet für ca. 5 min auf Eis gekühlt, sodann in 3 ml NaCl-Puffer aufgenommen und mit 75 U Lysostaphin bei 37°C im Wasserbad für 6 – 9 h lysiert. Die hierbei freigesetzte RNA wurde durch Zusatz von 2.5 µl RNAse abgebaut. Nach Zugabe von 3 ml 7 % SDS uns kräftigem Mischen auf dem Vortex wurde der Ansatz für 30 min auf Eis stehengelassen. Nach Zugabe von 7 ml des Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches, erneutem Mischen und weiterem Ruhenlassen bei Raumtemperatur für etwa 2 h konnten durch Zentrifugation für 30 min bei 3000 Upm zwei Phasen getrennt werden, wobei sich die zu isolierende DNA in der wässrigen Oberphase befand. Diese wurde vorsichtig abpipettiert, in ein Glas-Reagenzglas überführt und 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat-

Lösung sowie 2 Volumen 96% Ethanol hinzugegeben. Hierauf konnte die an der Interphase der entstehenden zwei Phasen präzipitierende DNA mit einer hakenförmig gebogenen Pasteurpipette aufgewickelt, an der Luft getrocknet und in 500 µl TE-Puffer gelöst werden. Fakultativ schloß sich hieran eine Phenol-Extraktion und Fällung mit Ethanol an (s.u.). Die gereinigte DNA wurde in 500 µl TE-Puffer gelöst. Nach Abschätzung der gelösten DNA-Menge durch Gelelektrophorese wurde die Präparation bei 4°C gelagert.

2.2.2 Plasmidpräparation

2.2.2.1 Plasmidpräparation aus Staphylokokken durch CsCl-Dichtegradienten-zentrifugation

Lösungen:

1. 50 % PEG 6000
2. Ethidiumbromid-Lösung 1 mg/ml
3. Lysis-Puffer (pH 8.0): 50 mM Tris, 300 mM EDTA, 0.2% Brij 50, 0.2% Triton X-100, mit 1 M NaOH auf pH 8.0 eingestellt
4. NaCl-Puffer (pH 7.0): 2.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 50 mM EDTA
5. STE- (Saline-Tris-EDTA-) Puffer: 0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA

20 ml PY-Brühe wurden mit einer Kolonie des Plasmidwirts steril inokuliert und bei 30°C (*S. carnosus* TM300 [pTV1ts]) beziehungsweise 37°C (alle anderen Stämme) bei 120 Upm für 12h unter geeigneter Selektion des Plasmid-codierten Resistenzmarkers (Tab. 5) angezüchtet. Als Hauptkultur wurden 8 ml der Vorkultur zu 800 ml PY-Brühe gegeben. Die Anzucht erfolgte unter Beibehaltung der Selektionsbedingungen bei 30°C resp. 37°C (s.o) über 24 h bei 120 Upm. Die durch 15 min Zentrifugation bei 6000 Upm (Rotor GS 3) geernteten Bakterien wurden durch Resuspension der Pellets in 50 ml PBS-Puffer gewaschen, erneut 15 min bei 6000 Upm zentrifugiert, das resultierende Pellet in 40 ml NaCl-Puffer aufgenommen und in einen Erlenmeyerkolben überführt. In diesem erfolgte die Lyse der Bakterien durch Zugabe von 150 U Lysostaphin und Inkubation bei 37°C im Wasserbad unter ständigem Schwenken bis zur beginnenden Lyse der Zellen (empirisch

nach etwa 20-25 min). In diesem Stadium wird die Plasmid-DNA, nicht aber chromosomale DNA freigesetzt. Die Lyse wurde durch Zugabe von 40 ml eisgekühltem Lysis-Puffer und anschließende Lagerung auf Eis für 1.5 h vervollständigt. Es folgte die Zentrifugation des Lysats bei 4°C, 8000 Upm über 30 min und hierauf das vorsichtige Abnehmen des Überstandes. Dieser wurde dann mit 20 ml 50% PEG6000 zusammengeführt und über Nacht (ca. 12 h) bei 4°C gelagert. Es schloß sich eine 20 minütige Zentrifugation der Ansätze bei 4°C und 8000 Upm an. Das Pellet wurde in 6 ml STE-Puffer aufgenommen. Hierzu kam 1 ml Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml). Anschließend wurden 8.5 g CsCl hierin gelöst, die Lösung 1 h in Dunkelheit stehengelassen und anschließend 30 min bei 20°C, 3000 Upm zur weiteren Entfernung von Proteinpräzipitaten zentrifugiert. Der Refraktionsindex wurde mit Hilfe eines Refraktometers durch weitere TES-Puffer-Zugabe auf 1.3867 eingestellt. Es schloß sich eine Ultrazentifugation an, wozu Beckmann-Zentrifugenröhrchen mit der Lösung unter genauer Abgleichung des Gewichts und Auffüllung des verbleibenden Volumens mit Bayol beladen und schließlich zugeschweißt wurden. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 39.000 Upm, 20°C über eine Zeit von 45 h im Rotor Ti 50 (Beckmann, München). Unter UV-Licht-Kontrolle konnte dann die Plasmid-Bande über Punktion des Röhrchens mit einer Kanüle in einem Eppendorf-Hütchen gesammelt werden.

Nach viermaliger Extraktion des Ethidiumbromids durch Isoamylalkohol folgte die Entfernung des CsCl durch Dialyse der Präparationen im Servapor-Dialyseschlauch gegen 2 x 3 l TE-Puffer über 48 h bei 4°C (der Wechsel des Puffers erfolgte nach 24 h). Die Gelelektrophorese zeigte die Ausbeute der Präparation. Durch Restriktionsanalyse wurde geprüft, ob das gewünschte Plasmid isoliert worden war. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei 4°C.

2.2.2.2 pBluescript II SK-Präpration aus *E. coli* (Birnboim, 1983)

Lösungen:

1. Glucose-Lösung: 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8
2. Alkaline / SDS-Lösung: 0.2 M NaOH, 1% SDS
3. Kaliumacetat-Lösung: 60 ml 5 M K-acetat, 11.5 ml Eisessig, 28.5 ml H_2O
4. STE- (Saline-Tris-EDTA-) Puffer: 0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA

Die Kultur des Plasmid-Wirts erfolgte unter Selektion auf den jeweiligen, Plasmid-codierten Resistenzmarkers in 2 ml LB-Brühe über Nacht bei 37°C, 120 Upm. 1.5 ml der Kultur wurden in ein Eppendorf-Hütchen überführt, 30 s bei 14000 Upm zentrifugiert, das Pellet nach Verwerfen des Überstands zur Entfernung von Restriktionsendonuclease-inhibierenden Substanzen in 0.5 ml STE-Lösung resuspendiert, welche nach erneuter Zentrifugation bei 14.000 Upm für 30 s durch Dekantieren entfernt wurde. Um die Zellen zu lysieren, wurden das Pellet durch vehementes Vortexen in 100 µl der eisgekühlten Glucose-Lösung aufgenommen, hierzu 200 µl der auf Eis gekühlten Alkaline / SDS-Lösung gegeben, die Flüssigkeiten durch mehrmaliges Invertieren der Reaktionsgefäße gemischt und dann für 5 min auf Eis gestellt. Daraufhin wurden 150 µl der Kaliumacetat-Lösung zugefügt, die Ansätze durch Vortexen gemischt und wiederum für 5 min auf Eis gelagert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C, 14.000 Upm konnten nun die groben Zelltrümmer abgetrennt und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden, wo Proteine durch Zusatz von 400 µl Phenol / Chloroform 1:1 und anschließender Zentrifugation über 2 min bei 14000 Upm mit Abnahme der wässrigen, DNA-haltigen Oberphase extrahiert wurden. Die Reinigung vervollständigte die Präzipitation der Plasmid-DNA mit 800 µl 95% Ethanol, Zentrifugation über 5 min, 14000 Upm bei 4°C, vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes und die Trocknung der DNA bei Raumtemperatur. Nach Lösung der DNA in 50 µl TE-Puffer folgte die Inkubation der Präparation mit 2 µl RNAse für 10 min bei 37°C und die Lagerung bei 4°C. Die Ausbeute der Präparation konnte durch Gelelektrophorese, das Vorliegen des richtigen Plasmids durch Restriktionsanalyse ermittelt werden.

2.2.3 Phenolextraktion von DNA (Kirby, 1957)

Lösungen: 3 M Kaliumacetat, pH 8

Zur weiteren Aufreinigung wurde zu den DNA-Präparationen 1 Volumen Phenol und 1 Volumen Chloroform : Isoamylalkohol 24 : 1 gegeben, durch Vortexen gemischt und anschließend das Phenol durch Zentrifugation für 30 s und Abnehmen der wässrigen Oberphase wieder entfernt. Hieran schloß sich nach Zusatz von 3M Kaliumacetat entsprechend einem zehntel des Volumens der Oberphase und von 96% Ethanol

entsprechend dem 2.5-fachen Volumen der Oberphase die Fällung der DNA bei -80°C über 5 h an. Das nach Zentrifugation über 10 min bei 14.000 Upm und 4°C entstehende Pellet wurde mit 800 µl 80% Ethanol gewaschen, welcher sodann nach 2 min Zentrifugation mit 14.000 Upm bei 4°C entfernt wurde. Nach Trocknen des Pellets an der Luft bei Raumtemperatur wurde das DNA-Pellet in 50 µl TE-Puffer gelöst. Die DNA-Konzentration wurde gelelektrophoretisch geprüft und die Präparation bei 4°C gelagert.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989)

Lösungen:

1. Ethidiumbromid 0.5 µg/ml
2. 5 x TBE- (Tris-Borat-EDTA-) Puffer: 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM Na_2EDTA, pH 8.0
3. Proben-Puffer: 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylen Cyanol FF, 15% Ficoll
4. ϕλ-DNA, *Hin*dIII-gespalten

Zur Anwendung kamen SeaKem-Agarosegele mit einer Konzentration von 0.5% (DNA-Fragmente 2-30 kb), 0.7% (DNA-Fragmente 0.7-20 kb) und 1% (DNA-Fragmente 0.5-10 kb). Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in 0.5 x TBE-Puffer durch kochen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlung auf 60°C in eine Horizontalgelkammer (wahlweise Mini-Gel: Laufstrecke 7.5 cm oder Maxi-Gel: Laufstrecke 17 cm) unter Vermeidung von Luftblasen gegossen. Die Geltaschen (Mini-Gel: #8; Maxi-Gel: #14) wurden durch in das noch flüssige Gel gehängte Kämme vorgegeben. Hierbei war es möglich, das Maxi-Gel mit 2 parallelen Reihen von Probentaschen auszustatten und somit simultan 28 Proben bei einer Laufstrecke von 8.5 cm zu bearbeiten. Nach Aushärten der Agarose wurde das Gel in die Elektrophorese-Kammer überführt und diese mit 0.5 x TBE-Puffer soweit aufgefüllt, daß das Gel gerade von Flüssigkeit bedeckt war. 22 µl (Maxi-Gel) bzw. 18 µl (Mini-Gel) der Probe wurden mit 2 µl Pronben-Puffer versetzt und sodann das Gel beladen. Stets wurde in einem oder beiden äußeren Spuren 2 µg ϕλ-DNA (*Hin*dIII-digest) als Größenstandard mitgführt. Die Auftrennung erfolgte in einem Gleichstromfeld bei einer Spannung von 50-70 V über 4-6 h (Mini-Gel) oder 30-40 V über Nacht (Maxi-Gel). Die Laufstrecke wurde durch die blaugefärbte Bande des Proben-Puffers beurteilt.

Nach Färben des Gels mit 1 µg/ml Ethidiumbromid auf einer Laborwippe für ca. 30 min konnte die aufgetrennt DNA auf dem UV-Transilluminator betrachtet und durch Anfertigung eines Polaroidbildes das Ergebnis dokumentiert werden. Alternativ wurde die Agarose bei Erreichen von 60°C mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, wodurch die DNA bereits während der Elektrophorese gefärbt wurde und somit der Färbungsschritt nach Beendigung des Laufs entfiel.

2.2.5 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeldgelelektrophoresen wurden von Dr. med. H.-A.Elsner am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie unter Verwendung eines CHEF-DR II Systems (Fa. Bio-Rad, München) und Anwendung eines Standardprotokolls (Schwarzkopf *et al*, 1993) durchgeführt.

2.2.6 DNA-Restriktionsanalyse

Lösungen:

1. One-for-all-Puffer: 10 mM Tris-Acetat, pH 7.5, 100 mM Mg-Acetat, 500 mM Kaliumacetat
2. TE- (Tris-EDTA-) Puffer (pH 7.4): 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA

Je nach gelelektrophoretisch bestimmter, relativer DNA-Konzentration in der Präparation der zu untersuchenden DNA wurden 4 -15 µl davon in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit One-for-all-Puffer in einer vom Hersteller angegebenen Konzentration (abhängig von genutzter Restriktionsendonuclease) und TE-Puffer zusammengebracht und anschließend 5 U der gewünschten Restriktionsendonuclease hinzugefügt, so daß das Endvolumen 18 µl (Mini-Gel) oder 22 µl (Maxi-Gel) betrug. Nach gründlichem Mischen auf dem Vortex erfolgte die Inkubation der Ansätze bei 37°C im Heizblock für 3 - 10 h, die im Anschluß, sofern keine sofortige Weiterverarbeitung geplant war, bei 4°C gelagert wurden.

2.2.7 Isolierung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente (GeneClean II - Kit, Bio 101 Inc., La Jolla, USA)

Lösungen: wie durch Hersteller geliefert

Nach Spaltung der DNA mit Restriktionsendonucleasen und Auftrennung in einem Mini-Gel wurde die dem Fragment entsprechende Bande unter UV-Licht-Kontrolle mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten, der resultierende Agarosewürfel in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und sein Volumen durch Wiegen bestimmt (1 mg Agarose ≈ 1ml H_20). NaI-Lösung entsprechend dem 4.5-fachen Volumen des Agarosewürfels und TBE-Modifier wurde entsprechend dem 0.5-fachen Volumen des Agarosewürfels hinzugefügt und die Agarose in diesen Lösungen im Wasserbad bei 50°C vollständig geschmolzen. Nach Zugabe von 5 µl Glasmilch, kräftigem Mischen und 5 min Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation für 15 s bei 14.000 Upm. Die Flüssigkeit wurde dekantiert und die Glaspartikel mit der daran gebundenen DNA in eiskalter NEW-Lösung resuspendiert. Die Glasspartikel wurde dreimal mit NEW-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt und vollständiger Entfernung der NEW-Lösung konnten die Glaspartikel in 15 µl TE-Puffer gelöst werden. Die an sie gebundene DNA ließ sich durch Inkubation für 10 min bei 50°C im Wasserbad von ihnen lösen, woraufhin die Glaspartikel durch Zentrifugation (14000 Upm, 30 s) mit anschließender Abnahme des die DNA enthaltenden Überstandes abgetrennt wurden. Die Ausbeute der Präparation wurde dann durch eine Gelelektrophorese geprüft und die DNA-Fragmente bei -20°C gelagert.

2.2.8 Southern-Blot-Hybridisierung (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989)

2.2.8.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit [^{32}P]dCTP nach dem Oligolabelling-Verfahren / Random-Priming (Ready-to-go DNA-Labelling-Kit)

Lösungen:

1. TE- (Tris-EDTA-) Puffer (pH 7.4): 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA
2. Hybridisierungslösung : 1 mM EDTA, 0.16 M NaH_2PO_4, 0.34 M Na_2HPO_4 (pH 7.2), 7% SDS
3. Waschlösung 1: 1 mM EDTA, 12.6 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2) 27.4 mM Na_2HPO_4, 5% SDS

4. Waschlösung 2: 1 mM EDTA, 12.6 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2), 27.4 mM Na_2HPO_4, 1% SDS

Je nach DNA-Konzentration wurden 2 - 2.5 µl der Fragment-Präparation (ca. 2 ng) beziehungsweise 1 µg ϕλ-DNA (*Hind*III-digest) ad 45µl mit TE-Puffer aufgefüllt. Die DNA wurde für für 15 min bei 95°C im Heizblock denaturiert, 2 min auf Eis abgekühlt und quantitativ in das vom Hersteller gelieferte Reaktionsgefäß überführt. Die darin befindlichen Kristalle wurden gelöst. Nach Zugabe von 5 µl [^{32}P]dCTP (entsprechend 50 µCi) erfolgte der Markierungs-Vorgang bei 37°C über 30 min. Nicht eingebaute [^{32}P]dCTP-Nucleotide wurden dann über eine Sephadex G-50-Säule durch Zentrifugation (3 min, 5000 Upm) entfernt. Das resultierende Eluat enthielt die markierte Sonde, wobei die Aktivität im Szintillationszähler geprüft wurde. Die Sonden konnten bei -20°C gelagert werden.

2.2.8.2 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter DNA auf eine feste Matrix (Zeta-Probe Blotting-Membran)

2.2.8.2.1 Alkalischer Kapillartransfer (Smith und Summers, 1980; Southern, 1975)

Lösungen:

1. 0.25 M HCl
2. 0.4 M NaOH
3. 20x SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0.3 M Na_3Citrat, pH 7.0

Nach elektrophoretischer Auftrennung der zu analysierenden DNA-Fragmente in einem Maxi-Gel, Färben mit Ethidiumbromid und der Anfertigung eine Polaroidphotodokuments wurde das Gel für 15 min in 500 ml 0.25 M HCl auf einer Laborwippe inkubiert, um die DNA zu depuriniern. Nach Spülen des Gels mit frischem Wasser wurde dieses gedreht, so daß die ebene Unterfläche nach oben zeigte, und auf 12 x 16 cm zurechtgeschnitten. Auf den Rand zweier flacher Schalen, die mit der als Transferpuffer dienenden 0.4 M NaOH gefüllt waren, wurde eine Glassplatte entsprechend der Ausmaße des Gels gelegt. Auf dieser wurden vier Lagen von mit 0.4 M NaOH getränkten Filterpapier so plaziert, daß die überstehenden Enden ausreichend in den mit NaOH gefüllten Schalen eintauchten.

Eingeschlossene Luftblasen konnten durch Austreichen mit einer Glaspipette entfernt werden. Auf diese Filterpapiere wurde das Gel gelegt und wiederum alle Luftblasen sorgfältig entfernt. Die mit Wasser angefeuchtete und auf die Ausmaße des Gels exakt zugeschnittene Zeta-Probe-Blotting-Membran wurde auf das Gel unter Vermeidung von Luftblasen aufgelegt. Die freien Ränder des Gels konnten durch Saran-Folie abgeschlossen werden. Der Kapillarfluß über die Membran wurde durch zwei weitere Filterpapiere sowie eine Schicht Papierhandtücher gewährleistet. Eine Glasplatte sowie eine mit 60 ml Wasser gefülltes 100 ml Gefäß wurden zur Beschwerung aufgelegt. Die durchschnittliche Transferdauer betrug 24 h. Im Anschluß erfolgte eine kurze Spülung der Membran in 2 x SSC. Nach Trocknung der Membranen bei Raumtemperatur wurden diese zwischen zwei Filterpapieren bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.8.2.2 Transfer über einen Druckgradienten im PosiBlot-Pressure Blotter (Angaben der Fa. Stratagene, La Jolla, Ca. / USA)

Lösungen:

1. 0.25 M HCl
2. 0.5 M NaOH
3. 20 x SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0.3 M Na_3Citrat, pH 7.0

Nach Depurinieren der DNA in 0.25 M HCl wie oben beschrieben und Denaturierung durch Inkubation des Gels in 0.5 M NaOH für 30 min wurde das zurechtgeschnittene Gel auf die in den Blotter gelegte, angefeuchtete Zeta-Probe-Membran gelegt und hierauf ein mit 0.5 M NaOH getränkter Schwamm plaziert. Nach Schließen des Druckgehäuses erfolgte der Transfer der DNA bei einem Druck von 75 mm Hg über einen Zeitraum von etwa 1 h. Nach Abschluß des Transfers wurde die Membran in 2 x SSC gewaschen und bei Raumtemperatur zwischen zwei Filterpapieren getrocknet und gelagert.

2.2.8.3 DNA-DNA- (Southern-) Hybridisierung (Angaben der Fa. Bio-Rad, Richmond, USA)

Zunächst wurden die [^{32}P]dCTP -markierten Sonden auf einem Heizblock bei 95°C für 30 min denaturiert und anschließend auf Eis kurz abgekühlt. Zeitgleich erfolgte die Prähybridisierung

der Membranen in etwa 30 ml Hybridisierungslösung bei 62°C im Wasserbad für 10 min. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte in etwa 50 ml Hybridisierungslösung und Zugabe der denaturierten Sonden unter stringenten Bedingungen bei 62°C für 24 h im Wasserbad unter leichtem Schwenken. Danach wurde die Hybridisierungslösung quantitativ in 50 ml Falcon-Röhrchens abgegossen und bei -20°C gelagert. Die Membranen wurden zur Entfernung ungebundener Sonden zweimal 25 min in jeweils frischer Waschlösung 1 und zweimal 25 min in Waschlösung 2 bei 62°C unter leichtem Schwenken gespült. Daraufhin wurden die Membranen in feuchtem Zustand in Folie eingeschweißt und in mit Verstärkerfolie beschichteten Filmkassetten bei -80°C gegenüber einem Röntgenfilm (X-Omat AR, Fa. Kodak) exponiert. Autoradiographien wurden nach verschiedenen Belichtungszeitpunkten angefertigt. Bei jeder Hybridisierung wurde radioaktiv markierte ϕλ-DNA *Hind*III-digest parallel eingesetzt, da zuvor eine Hybridisierung zwischen dieser Sonde und chromosomaler *S. epidermidis*-DNA ausgeschlossen werden konnte.

Die gelagerten Sonden konnten, solange die Radioaktivität noch nicht abgeklungen war, erneut genutzt werden. Hierzu wurde die gefrorene Hybridisierungslösung mit den darin enthaltenen Sonden zunächst bei Raumtemperatur langsam aufgetaut, die Sonden dann im Wasserbad bei 90°C für 30 min denaturiert und auf Eis kurz abgekühlt, ohne daß es dabei zu einem Ausfallen des SDS kam. Das weitere Procedere entsprach dem oben geschilderten.

2.2.8.4 Entfernung von gebundenen Sonden (Membran-Stripping)

Lösungen: Stripping-Lösung: 0.1 x SSC, 0.5 % SDS

Um Membranen mit verschiedenen Sonden zu hybridisieren, konnten gebundene Sonden durch zweimaliges Waschen der Membran in jeweils 80 ml frischer Strippinglösung bei 95°C im Wasserbad entfernt werden. Hierzu durften die Membranen vorher nach Hybridisierung nicht getrocknet worden sein. Der Erfolg wurde durch Anfertigung einer Autoradiographie überprüft. Gestrippte Membranen wurden in Folie eingeschweißt bei -20°C gelagert.

2.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.9.1 Herstellung kompetenter *E. coli* -Zellen (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989)

Lösungen:

1. 0.1 M $CaCl_2$
2. 50% Glycerol
3. 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4

100 ml LB-Brühe wurden mit einer Kolonie *E. coli* DH5α beziehungsweise *E. coli* MC1061 beimpft und bei 37°C, 120 Upm inkubiert, bis die OD_{578} 0.25 - 0.4 betrug (nach etwa 3 h). Anschließend wurden je 50 ml der Kultur in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4000 Upm, 4°C) geerntet, in 10 ml eiskalte 0.1 M $CaCl_2$ aufgenommen und für 45 min auf Eis stehengelassen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4000 Upm, 4°C) wurden die Zellen in 2 ml eiskalte 0.1 M $CaCl_2$-Lösung aufgenommen. Dazu wurden 1 ml 50% Glycerol und 150 µl 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4) gegeben und dieser Ansatz erneut für 10 min auf Eis stehengelassen. Die kompetenten Zelle wurden in 100 µl-Aliquots nach Schockgefrierung auf Trockeneis bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.9.2 Präparation linearisierter Vektor-DNA (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989)

Lösungen : Dephophorylisierungs-Puffer (Boehringer, Mannheim)

Zirkuläre Vektor-DNA wurde über Mini-Präp aus *E. coli* DH5α (pBluescript II SK) gewonnen. Vektor-DNA wurde mit Restriktionsendonucleasen entprechend der Klonierungsstrategie gespalten. Hierdurch entstand durch Trennung der ringförmigen DNA im Bereich des Polylinkers ein lineares DNA-Fragment, das beidseits durch zu den Enden des zu klonierenden DNA-Fragments komplementäre, kohäsive Enden ausgezeichnet ist. Die linearisierte DNA wurde zur Kontrolle der vollständigen Spaltung und der Entfernung der Restriktionsendonuclease in einem Mini-Gel aufgetrennt, durch das Gene-Clean-Verfahren isoliert und in 15 µl H_2O aufgenommen. Hierauf folgte die Inkubation mit 10 U Calf Intestinal Alkaline Phosphorylase (CIAP) unter Verwendung des Dephosphorylierungs-

Puffers in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration für 30 min bei 37°C zur Entfernung der 5´-Phosphatgruppen der Vektor-DNA. Diese Maßnahme steigert die Effizienz der Ligation von Vektor und Insert, da die Rezirkulation des Vektors ohne Insert erschwert ist. Die so gewonnene lineare, dephosphorylierte Vektor-DNA wurde erneut durch das GeneClean-Verfahren gereinigt, in 15 µl H_2O aufgenommen und bei 4°C gelagert. Die DNA-Konzentration ließ sich durch Agarosegelelektrophorese kontrollieren.

2.2.9.3 Ligation von linearisiertem pBluescript II SK mit DNA-Fragmenten (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989)

Lösungen: Ligations-Puffer (Boehringer, Mannheim)

Die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden durch Restriktions-Spaltung, elektrophoretische Auftrennung und Isolierung durch das GeneClean-Verfahren gewonnen. Die Konzentration konnte durch Agarosegelelektrophorese abgeschätzt werden. Für die Ligationsreaktion wurden dephosphorylierte Vektor-DNA und Fragment-DNA in einem ungefähren Konzentrationsverhältnis von 1:1, 2:1 und 3:1 angesetzt, wobei zuvor die Vektor-Präparation zur Trennung von spontan reassoziierten kohäsiven Enden für 5 min bei 45°C erhitzt worden war. Nach Zusammenführen von Vektor und zu klonierendem Fragment wurde das Gemisch auf Eis für 5 min abgekühlt. Dazu wurde der ATP-haltige Ligationspuffer in der vom Hersteller angegebenen Konzentration sowie 10 U T4-Ligase gegeben. Die Ligationsansätze wurden für 12 h bei 14°C inkubiert. Als Kontrollen wurden parallel mitgeführt 1.) Dephosphorylierter Vektor + Ligase, 2.) nicht-dephosphorylierter Vektor + Ligase und 3.) Insert + Ligase.

2.2.9.4 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen durch $CaCl_2$- Schock (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989)

Kompetente Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Transformation der Zellen erfolgte durch Zugabe von 0.1 µl, 1 µl oder 2 µl der Ligationsansätze und 1 µl der oben beschriebenen Kontrollen zu jeweils einem 100 µl Aliquot kompetenter Zellen. Zur Kontrolle wurde eine Transformation mit 1 µl nicht-linearisierter Vektor-DNA durchgeführt. Nach gründlichem Mischen wurden die Ansätze für exakt 75 s im Heizblock bei 42°C inkubiert, dann sofort für 10

min auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 450 µl LB-Brühe je Ansatz bei 37°C für 1 h stehengelassen. Als Kontrolle wurde ein Aliquot nicht-transformierter kompetenter Zellen mitgeführt. Anschließend wurden 10 µl, 20 µl, 75 µl und 100 µl der Transformationsansätze auf Selektivmedien ausplattiert. Bei Klonierungen in *E. coli* DH5α wurden X-gal / IPTG-Platten zum blue-white screening, versetzt mit 100 µg / ml Ampicillin zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen, verwendet. 50 µl nicht-transformierte Zellen wurden sowohl auf X-gal / IPTG-Platten als auch auf LB-Platten ohne Antibiotikum ausplattiert.

Bei Klonierungen in *E. coli* MC1061 wurden LB-Platten, versetzt mit 50 µg / ml Ampicillin zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen verwendet. Gleichzeitig wurde mit 300 µg / ml Erythromycin auf das *Tn917*-codierte *ermA* selektioniert, wodurch ein ausschließliches Wachstum Vektor und Insert enthaltender Klone ermöglicht wurde. Als Kontrolle wurde eine LB-Platte + 50 µg / ml Ampicllin mit dem Transformationsansatz *E. coli* MC1061 x pBluescript II SK (nicht-linearisiert) sowie eine LB-Platte ohne Antibiotikum mit den nicht-transformierten Zellen beimpft. Bei beiden Ansätzen erfolgte die Kultur bei 37°C für 24-72 h.

Zellen mit dem bei einer Transformation mit dem Vektor + Insert zu erwartenden Phänotyp (*E. coli* DH5α: Amp^R und weiße Kolonien; *E. coli* MC1061: Amp^R und Erm^R) wurden unter entsprechender Selektion subkultiviert, das Plasmid isoliert und das Insert durch Restriktionsanalyse kontrolliert.

2.2.10 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalys wurde von Prof. Dr. H. H. Feucht unter Verwendung des Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing-Kits (USB, Cleveland, USA) durchgeführt.

2.2.11 Adhärenztest zur semiquantitativen Bestimmung der Biofilmbildung von Bakterienstämmen an Plastikoberflächen (Christensen *et al.*, 1985; Mack *et al.*, 1992)

Lösungen:

1. Gentiana-Violett
2. Bouin´s Fixierlösung: 0.5 g Picrinsäure, 37.5 ml H_2O, 12.5 ml 37%iges Formaldehyd, 2.5 ml 96%ige Essigsäure
3. PBS- (phosphat buffered saline-) Puffer: 8.5 g NaCl, 0.3 g KH_2PO_4, 0.75 g Na_2PO_4, ad 1 l H_2O

Jeweils eine Kolonie des zu untersuchenden Stamms wurde in 2 ml Medium suspendiert und bei 37°C, 120 Upm über Nacht angezüchtet. Diese Kultur wurde dann 1:100 verdünnt und aus diesem Verdünnungsansatz jeweils 4 Wells einer 96-Well-Zellkultur-Platte (Nunclon Delta, Fa. Nunc) mit 200 µl beschickt. Um eine differentielle Biofilmbildung zu untersuchen, wurde als Medium für Vor- und Hauptkultur wurde entweder ausschließlich TSB_{BBL} oder TSB_{OXOID} verwendet. Wurden die Medien mit Kohlenhydraten supplementiert, so erfolgten Vor- und Hauptkultur ebenfalls ausschließlich in diesen Medien. Nach Kultur von 20 h unter statischen Bedingungen bei 37°C wurde das Medium verworfen und die Wells 3 mal mit 200 µl PBS vorsichtig gewaschen. Daran schloß sich die Fixierung der am Boden haftenden Zellen durch Inkubation mit 150 µl Bouin´s Fixierlösung für 15 min an. Nach erneutem Waschen mit 200 µl PBS je Well erfolgte die Färbung der fixierten Zellen mit 150 µl Gentiana-Violett über 5 min. Überschüssiges Gentiana-Violett konnte durch sachtes Spülen unter fließendem Leitungswasser entfernt werden. Die Platten wurden über Nacht an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und die optische Dichte (OD) der gefärbten Zellen mit einem Photometer (ELISA Processor II, Fa. Behring) bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt. Pro untersuchtem Stamm wurden dreimal vier Einzelwerte zu ihrem Mittelwert zusammengefaßt. Stämme mit einer $OD_{570} < 0.1$ wurden als biofilm-negativ betrachtet, Stämme mit einer $OD_{570} > 0.1 < 0.5$ als schwache, die mit einer $OD_{570} > 0.5 < 1.0$ als mäßige und solche mit einer $OD_{570} > 1.0$ als starke Biofilmbildner. Unter Anwendung folgender Kriterien wurde die quantitative differentielle Biofilm-Expression eines Stammes unter verschiedenen Kulturbedingungen beschrieben (Referenzwert = OD_{570} in TSB_{BBL}): $OD_{570} > 120\%$ = stärkere Biofilmbildung; $OD_{570} \pm 20\%$ = unveränderte Biofilmbildung; $OD_{570} < 80\%$ = schwächere Biofilmbildung; $OD_{570} < 0.1$ = Wechsel in biofilm-negativen Phänotyp. Als Positivkontrolle wurde *S. epidermidis* 1457 mitgeführt, als Negativkontrolle die biofilm-negative Mutante 1457-M10.

2.2.12 Semiquantitativer Koagglutinationstest zum Nachweis von PIA (Mack *et al.*, 1992)

Lösungen:

1. 0.05% (wt / vol) NaN_3 in PBS

2.2.12.1 *Staphylococcus aureus* Cowan I-Präparation

Zellen einer Übernachtkultur in 800 ml TSB_{BBL} wurden durch 10 min Zentrifugation bei 6000 Upm geerntet und zweimal in 100 ml in PBS + 0.05% NaN_3 gewaschen. Das Gewicht der Bakterien wird bestimmt und die Zellen werden in einer Konzentration von 10 % (wt / vol) in PBS + 0.05% NaN_3 + 1.5% (vol / vol) Formaldehyd aufgenommen und über 120 min unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur fixiert. Nach Ernte der Zellen durch Zentrifugation (10 min, 6000 Upm) wurden diese in PBS + 0.05% NaN_3 aufgenommen. Nach Inkubation für 5 min bei 80°C im Wasserbad unter ständigem Schwenken und anschließender Abkühlung auf Eis für einige Minuten wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS + 0.05% NaN_3 gewaschen und final nach Bestimmung des Gewichts der Zellen in einer Konzentration von 10 % (wt / vol) in PBS + 0.05% NaN_3 aufgenommen. In 1.5 ml Aliquots verteilt wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

2.2.12.2 Herstellung des Koagglutinationsreagenz aus anti-PIA-Antikörpern und *S. aureus* Cowan I

Lösungen: PBS-Puffer + 0.05% (wt/vol) NaN_3

Ziel war es, die anti-PIA-Antikörper Protein A-vermittelt über ihr Fc-Fragment an der Oberfläche von *S. aureus* Cowan I zu fixieren. Die aufgetaute Cowan-I-Präparation wurde dreimal in 1 ml PBS + 0.05% NaN_3 gewaschen und das resultierende Pellet in 1 ml PBS + 0.05% NaN_3 aufgenommen. Hierzu wurden 100 µl des polyklonalen anti-PIA-Antiserums gegeben und mit der Bakteriensuspension gründlich gemischt. Anschließend wurde der Ansatz bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Die Zellen wurden hiernach durch Zentrifugation (14000 Upm, 1 min) geerntet, zweimal mit 1 ml PBS + 0.05% NaN_3 gewaschen, durch Zentrifugation (14000 Upm, 1 min) geerntet, in 1 ml PBS + 0.05% NaN_3 aufgenommen und diese Bakteriensuspension in 9 ml PBS + 0.05% NaN_3 überführt. Das fertige Koagglutinationsreagenz wurde bei 4°C gelagert.

2.2.12.3 Durchführung des Koagglutination

Eine Kolonie des zu untersuchende Stammes in 2 ml Medium über Nacht bei 37°C, 120 Upm angezüchtet. Die Vorkultur wurde 1 : 100 in 2 ml Medium verdünnt und bei 37°C, 120 Upm über 24 h inkubiert. Zur Darstellung einer differentiellen Expression von PIA unter verschiedenen

physiologischen Wachstumsbedingungen wurde als Medium für Vor- und Hauptkultur entweder ausschließlich TSB_{BBL} oder TSB_{OXOID} verwendet. Wurden die Medien mit Kohlenhydraten supplementiert, so erfolgten Vor- und Hauptkultur ebenfalls ausschließlich in diesen Medien. Der Hauptkultur wurde 5 µl entnommen und mit 15 µl des Koagglutinationsreagenz auf einem Glasobjektträger zusammengebracht. Die Zellen wurden homogen mit dem Koagglutinationsreagenz vermischt. Nach 2 min, in denen die Suspensionen durch kreisende Bewegung weiter vermischt wurden, konnte das Koagglutinationsergebnis unter hellem Licht gegen einen dunklen Hintergrund abgelesen werden. Bei Koagglutination (Ausfällung sichtbarer Agglutinate) wurde von einer relevanten PIA-Synthese des untersuchten Stamms ausgegangen und er als PIA-positiv bezeichnet, fehlte eine Koagglutination, so wurde dies als Zeichen einer fehlenden PIA-Synthese gewertet und der Stamm als PIA-negativ klassifiziert. Als Kontrollen wurden stets mitgeführt *S. epidermidis* 1457 (Positivkontrolle), 1457-M10, PBS + 0.05% (wt / vol) NaN_3 und das jeweilige, sterile Medium (Negativkontrollen). Um eine semiquantitative Aussage über die PIA-Produktion eines Stamms machen zu können, wurde die Hauptkultur im jeweiligen Medium 1:10 und 1:20 verdünnt und hieran eine Koagglutination in der oben beschriebenen Weise angeschlossen. Kam es bei einem Stamm auch bei einer höheren Verdünnung zu einer Koagglutination, bei einem anderen Stamm nicht, so wurde die synthetisierte PIA-Menge des ersten Stamms als größer gegenüber der des zweiten Stamms betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Tn*917*-Insertionsstellen der Biofilm- und PIA-negativen Mutanten M10 und M11

Ziel war es, die zu den Mutanten M10 und M11 führenden Tn*917*-Insertionsstellen, an welcher offensichtlich für die Expression eines biofilm- und PIA-positiven Phänotyps entscheidende Genorte gelegen sind, zum einen durch Bestimmung der die Genorte determinierenden Restriktionsstellen, zum anderen durch Sequenzierung genauer zu charakterisieren.

3.1.1 Restriktionskartierung der an die Tn*917*-Insertionsstellen von M10 und M11 angrenzenden Genomabschnitte

Zur Restriktionskartierung der die Tn*917*-Insertionsstellen von M10 und M11 umgebenden Genomabschnitte erfolgte die Spaltung chromosomaler DNA dieser Mutanten mit den Restriktionsendonucleasen *Eco*RI, *Hind*III, *Xba*I und *Bgl*II und anschließender Analyse in der Southern-Hybridisierung. Als Referenz wurde parallel chromosomale DNA des Stamms 9142 untersucht.

Die Hybridisierung *Hind*III-gespaltener, chromosomaler DNA von 9142 mit den Sonden Ec10 und Ec11 ergab jeweils ein Signal, das einem Fragment von 13 kb entspricht. Bei Hybridisierung *Hind*III-gespaltener, chromosomaler DNA der Mutanten M10 und M11 mit diesen Sonden war dieses Fragment nicht mehr nachweisbar (Abb. 2a, b). Die zu den Mutanten M10 und M11 führenden Tn*917*-Insertionen liegen auf einem identischen 13 kb *Hind*III-Fragment. Die zu M10 und M11 führenden Transposoninsertionen sind ebenfalls auf einem identischen, 28 kb *Bgl*II-Fragment gelegen: bei beiden Mutanten ist bei Hybridisierung sowohl mit Ec10 als auch Ec11 dieses Fragment von *S. epidermidis* 9142 nicht mehr nachweisbar (Abb. 2 a, b).

Im Gegensatz dazu fand sich nach *Xba*I-Spaltung bei Hybridisierung mit der Sonde Ec10 ein 7.6 kb großes Fragment, das sich auch bei der Mutante M11, nicht jedoch M10 darstellte (Abb. 2a). Bei Hybridisierung mit der Sonde Ec11 wurde ein 4.3 kb großes Fragment von *S. epidermidis* 9142 detektiert, welches bei M10, nicht aber M11 vorhanden war (Abb. 2b). Die zu M10 und M11 führenden Transposoninsertionen sind demnach auf unterschiedlichen, 7.6 kb beziehungsweise 4.3 kb großen *Xba*I-Fragmenten lokalisiert.

Die zu M10 und M11 führenden Transposoninsertionen konnten zwei unterschiedlichen *Eco*RI-Fragmenten zugeordenet werden. Während die zur Mutante M10 führende Transposoninsertion auf einem 2.2 kb großen Fragment gelegen ist (Verlust der 2.2 kb Bande bei Hybridisierung mit

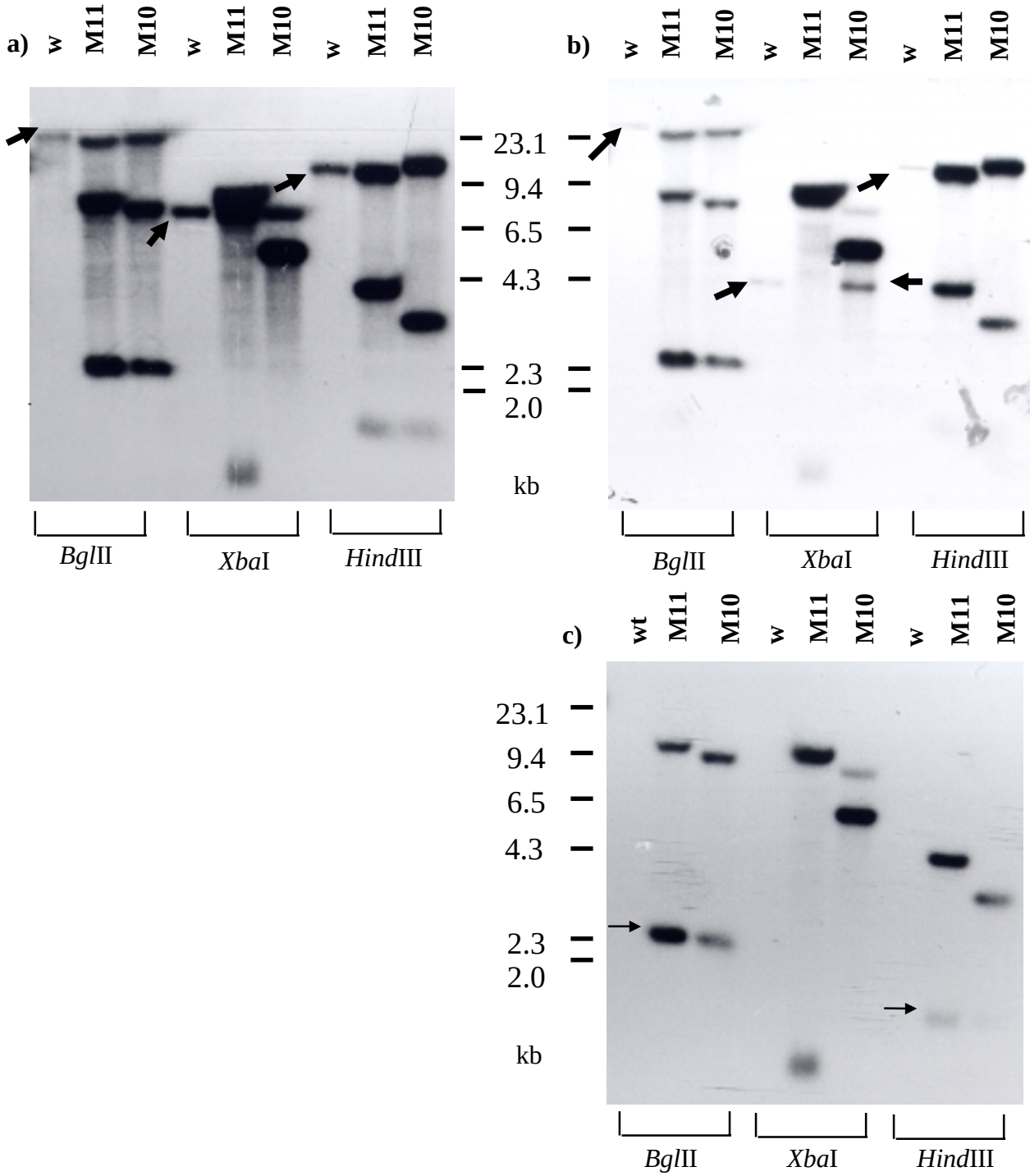

Abbildung 2: Gezeigt werden die Autoradiographien *Bgl*II-, *Xba*I- und *Hind*III-gespaltener, chromosomaler DNA von *S. epidermidis* 9142, M10 und M11.
a) Hybridisierung mit der [^{32}P]dCTP markierten Sonde Ec10. Die bei M10 und M11 nach *Bgl*II- bzw. *Hind*III-Spaltungnachweisbaren, drei Banden repräsentieren zwei chromosomale sowie ein Transposon-internes Fragment. dicker Pfeil: wt-Fragment
b) Hybridisierung mit der [^{32}P]dCTP markierten Sonde Ec11.
c) Hybridisierung mit der [^{32}P]dCTP markierten Sonde Tn*917*/3`. Bei *Bgl*II und *Hind*III Darstellung eines 2.3 kb resp. 1.4 kb großen, Transposon–internen Fragments (kleiner Pfeil). Daneben Hybridisieren spezifisch die an das 3´-Ende des Transposons angrenzenden Genomabschnitte von *S. epidermidis* 9142 (dicke Pfeile). Bei *Xba*I Darstellung der 3´und 5´ gelegenen Fragmente (selektive Darstellung mit Tn*917*/5´)

Ec10, Abb. 3a), so ist die zu M11 führende Insertion auf einem 0.8 kb großen Fragment lokalisiert (nachweisbare Bande des wt bei Hybridisierung mit Ec10, Abb. 3a).

*Hind*III, *Xba*I und *Bgl*II weisen auch Transposon-interne Schnittstellen auf. Hierdurch kommt es bei den Mutanten zu einer Trennung der getroffenen Fragmente. Aus der selektiven Darstellung dieser Fragmente mit Tn*917*/3´respektive Tn*917*/5´ und Abzug der Transposonanteile ergibt sich die relative Lage der Transposoninsertionen auf den jeweils getroffenen Fragmenten und deren relative Orientierung, darstellbar durch Angabe der Transcriptionsrichtung von *erm* (Abb. 2c, 3 b). So war die Erstellung einer Restriktionskarte möglich (Abb. 4). Es zeigte sich, daß M10 und M11 zwar auf identischen *Hind*III- und *Bgl*II-Fragmenten gelegen sind, hierbei jedoch an distinkten Positionen. So wird die zur Mutante M10 führende Tn*917*-Insertion an der *erm*-codierenden Seite von einem 10.1 kb und am 3´-Ende von einem 1.8 kb großen *Hin*dIII-Fragment begrenzt wird. Bei der Mutante M11 grenzt 5´ an das Transposon ein 9.4 kb und 3´ ein 2.6 kb großes *Hin*dIII-Fragment an (Abb. 2c).

Sowohl bei der Untersuchung von M10 als auch M11 ergibt die Addition der Fragmentgrößen der Transposon-flankierenden Genomabschnitte bei Restriktion mit *Hind*III, *Bgl*II und *Xba*I einen Betrag, der nur unwesentlich von der im Wildtypstamm ermittelte Größe des korrespondierenden Fragments abweicht (Tab. 9). Das gleiche gilt für die Größen der *Eco*RI-Fragmente. Somit kann es als wahrscheinlich gelten, daß durch die Tn*917*-Insertionen keine weiteren wesentlichen Alterationen des Genoms, z. B. durch Deletion, im durch das Transposon getroffenen Genomabschnitt induziert wurden. Die Phänotypänderungen von 9142 lassen sich daher direkt auf die Insertion des Transposon zurückführen. Somit werden PIA-Synthese und Biofilmbildung offenbar über Genorte gesteurt, die auf einem 13 kb *Hind*III-Fragment geclustert sind, jedoch auf getrennten *Eco*RI-Fragmenten liegen. Diese Konstellation schließt nicht aus, daß mehrere Gene die inaktivierten Funktionen steuern.

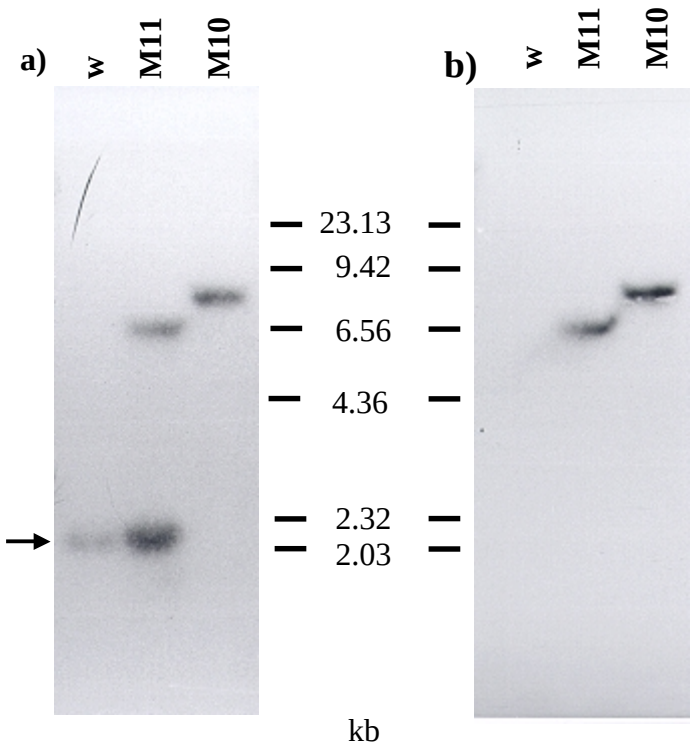

Abbildung 3: Gezeigt werden Autoradiographien *Eco*RI-gespaltener, chromosomaler DNA von *S. epidermidis* 9142, M10 und M11.
a) Hybridisierung mit der [^{32}P]dCTP markierten Sonde Ec10. Bei *S. epidermidis* 9142 Darstellung eines 2.2 kb großen Fragments, welches auch bei M11, nicht jedoch M10 hybridisiert (Pfeil). Die zu den Mutanten M10 und M11 liegen auf unterschiedlichen *Eco*RI-Fragmenten.
b) Hybridisierung mit der [^{32}P]dCTP markierten Sonde Tn*917*/3´. Selektive Darstellung der vom Transposon getroffenen *Eco*RI-Fragmente. Bei M11 ergibt sich rechnerisch nach Abzug des Transposons (5.6 kb), daß bei dieser Mutante ein 0.8 kb großes Fragment getroffen sein muß.

Tabelle 9

Restriktionsanalyse von 9142, M10 und M11: Fragmentgrößen nach Hybridisierung mit Ec10, Ec11, Tn*917*/3´und Tn*917*/5´

Restriktions-endonuclease	**Fragmentgrößen (kb)**		
	9142	**M10**	**M11**
*Eco*RI	2.2, 0.8	2.2 (+, -)	0.8 (+, -)
*Hind*III	13.0	10.1 (-), 1.8 (+)	9.4 (-), 2.6 (+)
*Xba*I	7.6, 4.3	6.6 (+), 0.9 (+ / -)	4.3 (- / +), 0.1 (+)
*Bgl*II	28	21 (-), 5.2 (+)	20 (-), 5.8 (+)

Die Fragmentgrößen sind angegeben nach Abzug der Transposonanteile

(+): Fragment hybridisiert mit Tn*917/3´*; (-): Fragment hybridisiert mit Tn*917/5´* (*erm*)

3.1.2 Sequenzierung der die Tn*917*-Insertionstelle flankierenden Genomabschnitte der Mutanten M10 und M11

Die Restriktionskartierung (Abb. 4) hatte gezeigt, daß die durch Transposoninsertion inaktivierten Genorte in M10 und M11 zwar auf einem identischen 13kb *Hind*III-Fragment, jedoch differenten *Eco*RI- und *Xba*I-Fragmenten gelegen sind. Somit war nicht ausgeschlossen, daß unterschiedliche Gene die Biofilmbildung von *S. epidermidis* beeinflussen. Daher sollten die Transposon-flankierenden Genomabschnitte sequenziert werden. Hierzu wurden zunächst die in pT181mcs klonierten, die jeweilige Transposoninsertion tragenden *Eco*RI-Fragmente in pBluescript II SK subkloniert, um eine einfachere DNA-Isolirung für die Sequenzierung zu ermöglichen. Hierzu erfolgte die Präparation der Konstrukte pM10*Eco*RI und pM11*Eco*RI aus *S. carnosus* und nach *Eco*RI-Spaltung die Isolierung der klonierten Fragmente durch das Gene-Clean-Verfahren. Diese Fragmente wurden in pBluescript II SK ligiert und kompetente *E. coli* transformiert. Für den das *Eco*RI-Fragment der Mutante M11 beinhaltende Ligationsansatz wurde *E. coli* DH5α als Wirt genutzt. Zur Transformation mit dem das *Eco*RI-Fragment der Mutante M10 enthaltenden Ligationsansatz wurde *E. coli* MC1061, der zur Expression der Tn*917* codierten Erythromycin-Resistenz *erm* befähigt ist (Guiterrez *et al*., 1996), herangezogen, da dieses Fragment sich aus nicht bekannten Gründen als ein Letalfaktor für *E. coli* DH5α darstellte. Die Übereinstimmung von kloniertem Insert und dem Ausgangsfragment wurde durch Restriktionsanalyse mit *Eco*RI und *Ava*I geprüft. Die rekombinaten Plasmid-Konstrukte erhielten den Namen $pHRF_E10$ (*Eco*RI-Fragment M10) und $pHRF_E11$ (*Eco*RI-Fragment M11).

Unter Verwendung dieser rekombinanten Plasmide wurde die Sequenzierung der das Transposon am 5´- und 3´-flankierenden Genomabschnitte des Stamms 9142 durchgeführt. Als Primer wurden zum 5´- und 3´-Ende des Transposons Tn*917* komplementäre Oligonucleotide genutzt (Kap. 2.1.7), die so gewählt waren, daß im Rahmen der Sequenzierung auch die 5´- und 3´-gelegenen Sequenzen des Transposons (inkl. der inverted repeats) bestimmt werden konnten. Hierdurch konnte durch Vergleich mit der publizierten DNA-Sequenz dieses Transposons der genaue Beginn des Genoms von 9142 festgelegt und auch eine Aussage über die relative Orientierung des inserierten Transposons (darstellbar durch Angabe der relativen Lage des *erm*-Gens; Abb. 1b) im Genom gemacht werden.

Die Sequenzanalyse durch Homologievergleiche mit publizierten Sequenzen ergab für die 5´ und 3´ an die Transposoninsertionsorte angrenzenden Sequenzen von $pHRF_E10$ und $pHRF_E11$ eine 99% Übereinstimmung mit Abschnitten der Sequenz U43366, die der Sequenz des *icaADBC*-Genclusters von *S. epidermidis* RP62A entspricht. Beide Tn*917*-Insertionen sind im IcaA-

codierenden Abschnitt gelegen, die Transcriptionsrichtung von *erm* stimmt bei beiden Mutanten mit der von *icaADBC* überein (Abb. 4).

Die exakte Lokalisation der zur Mutante M10 führenden Tn*917*-Insertion befindet sich an Position von bp931 in *icaA*, wobei sie stromaufwärts und stromabwärts von den charakteristischen, im Rahmen des Insertionsprozesses entstehenden, 5 bp Duplikationen des Wirtsgenoms begrenzt ist (Abb. 4).

Die Sequenzanalyse der 5´ und 3´ an das Transposon angrenzenden DNA-Abschnitte von $pHRF_E11$ konnte die Insertionsstelle, von 5 bp Duplikationen des Wirtsgenoms flankiert, an bp 87 bestimmen. Die charakteristische *Xba*I-Schnittstelle des *icaADBC*-Genclusters bei bp 213 konnte stromabwärts der Insertionsstelle gefunden werden (Abb. 4). Somit bestätigte die Sequenzierung die Restriktionskartierung, bei der die zu M10 und M11 führenden Tn*917*-Insertionen unterschiedlichen *Xba*I-Fragmenten zugewiesen wurden. Im Vergleich mit der Nucleotidfolge des aus dem *S. epidermidis*-Stamm RP62A klonierten *ica*-Genlocus ergab sich, daß 9142 stromabwärts der *Xba*I-Schnittstelle, d.h. auch 3´ der Tn*917*-Insertionsstelle von M11, eine weitere *Eco*RI-Schnittstelle besitzt. Die zur Mutante M10 führende Transposoninsertion kann einem 2.2 kb großen *Eco*RI-Fragment zugeordnet werden (Tab. 9). Daher ist offenbar die weiter distal, bei *S. epidermidis* RP62A bei bp 2235 gelegene *Eco*RI-Schnittstelle, auch bei *S. epidermidis* 9142 vorhanden. Die zusätzliche *Eco*RI-Schnittstelle kann erklären, warum die Tn*917*-Insertionen bei Lage auf dem gleichen *Hind*III-Fragment verschiedenen *Eco*RI-Fragmenten zugewiesen werden konnten.

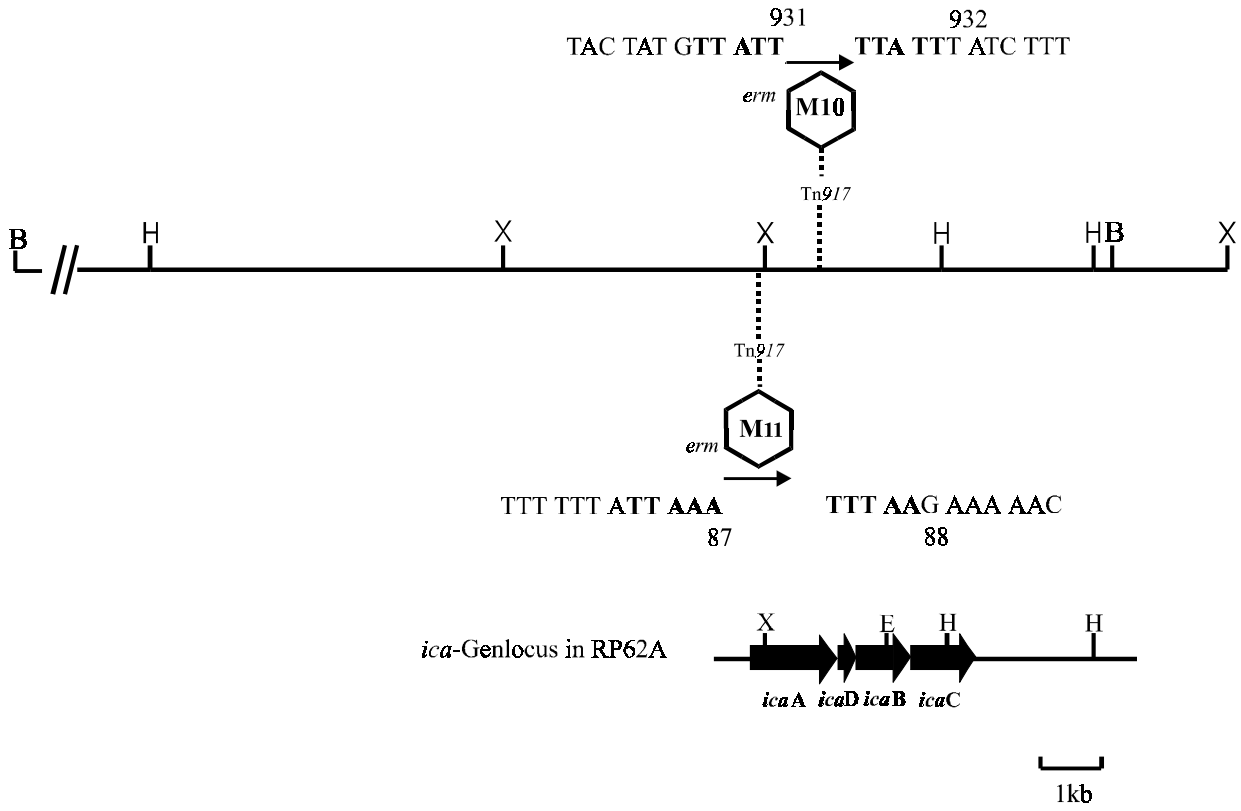

Abbildung 4: Restriktionskartierung der biofilm-negativen Mutanten M10 und M11. Die die Transpons an der Insertionsstelle flankierenden Sequenzen des *icaADBC*-Genclusters sind unter Angabe des Nucleotids (gerechnet vom Startcodon von *icaA*) wie auch die im Rahmen des Interpositionsvorgangs entstandenen Duplikationen des Wirtsgenoms (fett) dargestellt.

A, *Ava*I; B, *Bgl*II,; H, *Hind*III; M, *Msp*I; *erm* = Erythromycin-Resistenz, Pfeile zeigen die Transcriptionsrichtung von *erm*

3.2 Untersuchung möglicher Varianten des *icaADBC*-Genclusters und ihrer Assoziation mit der qualitativen und quantitativen Biofilm- und PIA-Expression durch klinische *S. epidermidis*-Isolate

Die unter 3.1 dargestellten Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung eines intakten *icaADBC*-Genclusters für die Ausbildung eines biofilm- und PIA-positiven Phänotyps. Bisher nicht beschrieben wurden Unterschiede dieses Genortes bezüglich der *Eco*RI-Restriktion. Dies deutet auf eine genetische Variabilität dieses Genortes hin. Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Verteilung des *icaADBC*-Genclusters und die im Rahmen der Tn*917*-Insertionskartierung aufgefallene Variabilität hinsichtlich der *Eco*RI-Restriktionsstellen des *ica*-Genlocus in einer Population klinischer *S. epidermidis*-Stämme zu evaluieren sowie nach weiteren polymorphen Endonucleaseschnittstellen zu suchen. Die Möglichkeit einer genotypische Charakterisierung von *S. epidermidis*-Wildtypstämmen anhand einer möglichen Restriktionsvariabilität des *icaADBC*-Genclusters sollte geprüft werden. Auch interssierte die Frage, ob sich eine genetische Variabilität auch in der Fähigkeit eines einzelnen Stammes zur Biofilm- und PIA-Expression niederschlagen würde und somit genetische Marker eines bestimmten Phänotyps beschrieben werden können.

3.2.1 Restriktionsanalyse des *icaADBC*-Genclusters in einer Population klinischer *S. epidermidis*-Isolate

3.2.1.1 Vorbemerkungen

Untersucht wurden die unter 2.1.8 beschriebenen, 61 klinischen *S. epidermidis*-Isolate. Als Referenz dienten die *S. epidermidis*-Stämme 1457, 9142, 8400, 5179, SE5, RP62A, O-47, M187, RP12, so wie auch die *S. hominis* RP14 und SP2, die hinsichtlich ihrer Fähigkeit, einen Biofilm auszubilden, näher charakterisierten sind (Tab. 8).

Nach Präparation chromosomaler DNA der oben genannten Stämme erfolgte die Spaltung mit den Restriktionsendonucleasen *Eco*RI, *Hind*III, *Xba*I und *Msp*I. Diese Restriktionsendonucleasen weisen alle mindestens eine *icaADBC*-interne Schnittstelle auf. So konnte einerseits die relative Lage von Schnittstellen außerhalb der IcaADBC-codierenden Sequenz bestimmt werden. Andererseits war es möglich, sich in Änderungen der Restriktionsstellen niederschlagende Sequenzvariabilität innerhalb von *icaADBC* zu erfassen. In der Southern-Hybridisierung kamen $F_{SX}27$, $F_{EAS}10$, $F_{EA}11$ als Sonden zum Einsatz, die nicht nur den Nachweis *icaADBC*-homologer

Sequenzen, sondern auch eine Aussage über die relative Anordnung von Fragmenten ermöglichten (Tab. 5, Abb. 1a).

3.2.1.2 *Hind*III-Restriktionsanalyse chromosomaler DNA *icaADBC*-positiver *S. epidermidis*-Isolate

Unter den 70 analysierten *S. epidermidis*-Stämmen fand sich in 57 Fällen (80.7%) in der Hybridisierung mit den *ica*-spezifischen Sonden $F_{EAS}10$, $F_{EA}11$ und $F_{SX}27$ Bandensignale. Diese Stämme sind somit *icaADBC*-positiv.

Bei den *icaADBC*-positiven klinischen Isolaten *S. epidermidis*-Isolaten wie auch den Referenzstämmen waren jedoch unterschiedliche Fragmentmuster nachweisbar. Bei Hybridisierung mit der Sonde $F_{SX}27$ ließ sich bei allen Stämmen ein 2.5 kb großes *Hind*III-Fragment ermitteln (Abb. 5 a). Daneben kamen in der Stammpopulation vorherrschend Fragmente von 13.0 kb (in 47 Fällen entsprechend 82.46%) oder 8.7 kb (in 7 Fällen entsprechend einer Frequenz von 12.28%) Größe zur Darstellung (Tab. 10, Seite 61).

Unter Verwendung der Sonde $F_{EA}11$, die selektiv und hochspezifisch 5´-gelegene, *icaA*-homologe Sequenzen detektiert, traten nur die alternativen, 13 kb bzw. 8.7 kb großen Fragmente in Erscheinung. Dadurch ist die relative Orientierung der *Hind*III-Fragmente zueinander und die Lage der differenten Schnittstellen festgelegt (Abb. 5 b, Abb.12). Die unterschiedlichen *Hind*III-Schnittstellen, die diesem Phänomen zugrunde liegen, müssen bei Konstanz der bei bp 3086 lokalisierten, *icaC*-internen *Hind*III-Schnittstelle 9.9 kb beziehungsweise 5.6 kb vor dem Start von *icaA* gelegen sein. Offenbar ist der *ica*-Genlocus durch einen *Hind*III-Restriktionsfragmentpolymorphismus (RFLP) gekennzeichnet, da größendifferente Fragmente in einer Frequenz von über 5 % gefunden werden können (Lewin, 1997).

Neben den polymorphen Fragmenten fanden sich solche mit einer Frequenz von weniger als 5 %, die somit als sporadische Fragmente zu betrachten sind (Lewin, 1997).

Bei BK10333 und BK7486 ließ sich bei Hybridisierung mit der Sonde $F_{EAS}10$ jeweils ein 13.5 kb großes Fragment ermitteln, daß diese Stämme von allen anderen untersuchten abgrenzbar machte (Abb. 6 c). Da bei Verwendung der Sonde $F_{SX}27$ die bezüglich ihrer Lage im *icaADBC*-Gencluster weiter distal gelegenen, 2.5 kb großen Fragmente auch bei diesen Stämmen vorlagen, muß die von den anderen Stämmen abweichende *Hind*III-Schnittstelle stromaufwärts der *ica*-Genregion gelegen sein.

Der Stamm 5179 weist bezüglich seiner *Hind*III-Restriktion ein einzigartiges Verhalten auf. Bei Hybridisierung mit der Sonde $F_{SX}27$ unter stringenten Bedingungen kamen drei Banden zur

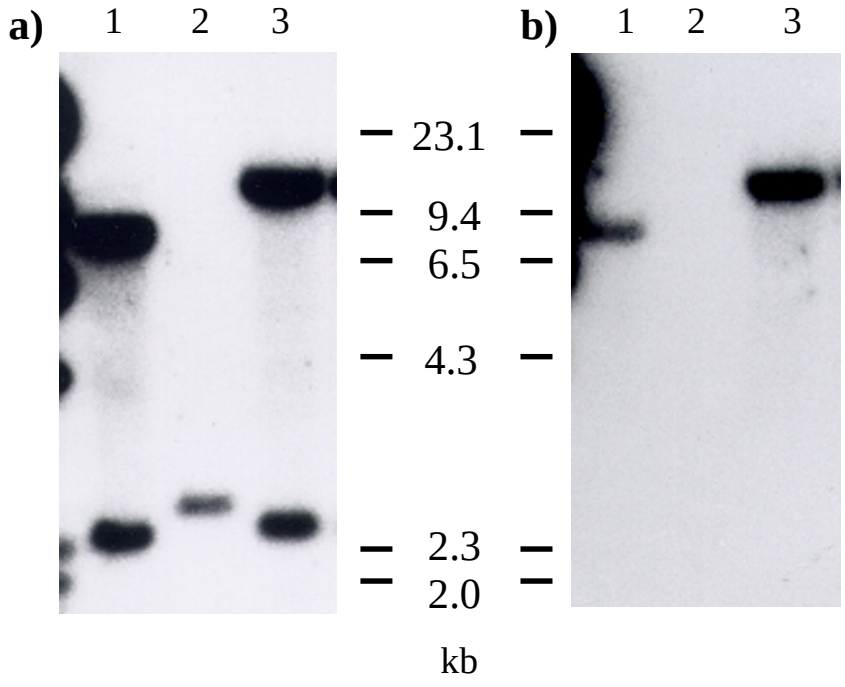

Abbildung 5:

a) *Hind*III-Spaltung und elektrophoretische Auftrennung chromosomaler DNA von 1457 (Spur 1), BK8125 (Spur 2) und 9142 (Spur 3). Gezeigt wird die Autoradiographie einer Southern-Hybridisierung mit der [^{32}P]dCTP-markierten Sonde F_{SX}27. Bei 1457 und 9142 lassen sich jeweils kleineren Fragmente von einer Größe von 2.5 kb detektieren, daneben kommt bei 1457 ein 8.7 kb und bei 9142 ein 13.0 kb großes Fragment zur Darstellung. Der *icaADBC*-Gencluster weist eine *Hind*III-Restriktionsvariabilität auf. In Spur 2 findet sich ein Fragment mit einer Größe von 2.7kb. Längenstandard ϕλ-DNA / *Hind*III-gespalten.

b) Hybridisierung des unter a) gezeigten Blots mit der [^{32}P]dCTP-markierten Sonde F_{EA}11. Während bei 1457 und 9142 das jeweils größere Fragment darstellbar ist und sich hieraus die Lage der variablen *Hind*III-Schnittstelle ableiten läßt, findet sich bei BK8125 kein Signal mehr, woraus geschlossen werden kann, daß dieser Stamm *icaADBC*-negativ ist. Längenstandard ϕλ-DNA / *Hind*III-gespalten**.**

Darstellung, wobei das durch sie dargestellte, kleinste Fragment 2.5 kb groß ist, die beiden größeren Banden 3 kb bzw. 5.8 kb große Fragmente repräsentieren (Abb. 6 a). Da die beiden letzteren Fragmente in der Summe 8.8 kb groß sind, ist es wahrscheinlich, daß hier eine zusätzliche, das 8.7 kb große Fragmente trennende Schnittstelle vorliegt. Da bei Hybridisierung mit der Sonde $F_{EA}11$ nur das 5.8 kb große Fragment detektierbar war (Abb. 6 b), läßt sich eine Aussage über die Lage der zusätzlichen *Hind*III-Schnittstelle machen: sie kann sich in Hinblick auf die Lokalisation des zur Sequenz der Sonde $F_{EA}11$ komplementären *ica*-Gencluster-Abschnitts nur 3000 bp stromaufwärts der *icaADBC*-internen *Hind*III-Schnittstelle, also im IcaA-codierenden Abschnitt 5´der dort gelegenen *Xba*I-Schnittstelle, befinden. Eine Übersicht über die gefundenen Fragmente und ihre Frequenz gibt die Tabelle 10 auf Seite 59.

Bei einem Teil der *ica*-negativen *S. epidermidis*-Stämme (5 von 13 entsprechend 38.4 %), bei denen unter Verwendung der Sonden $F_{EAS}10$ und $F_{EA}11$ bei Spaltung mit *Hind*III keine Hybridisierungssignale nachweisbar waren, konnte bei Einsatz der Sonde $F_{SX}27$ ein solches dargestellt und mit 2.7 kb vermessen werden (Abb.5 a). Bei diesen Stämmen ist demnach das durch die *icaC*-interne *Hind*III-Schnittstelle bei Nucleotid 3086 distal begrenzte *Hind*III-Fragment, auf welchem fast der gesamte *ica*-Genlocus lokalisiert ist, nicht vorhanden. Es ist daher wahrscheinlich, daß es sich bei den dargestellten Fragmenten um solche handelt, die zu Abschnitten der Sonde $F_{SX}27$ außerhalb des *icaADBC*-Genclusters komplementär sind. Da diese Sonde Genomabschnitte von RP62A distal des 3´-Endes der *ica*-Gene umfaßte und dort bei der Sequenzanalyse des pCN27-Klons Sequenzen der *S. epidermidis*-Lipase (*geh*SE1) gefunden wurden, umfassen die entsprechenden Stämme vermutlich Sequenzen dieses Gens. Stämme, bei denen auch mit $F_{SX}27$ keine Signale nachweisbar waren, besitzen weder den *ica*-Genort noch *geh*SE1.

Bei den *S. hominis*-Stämmen RP14 und SP2 ließ sich weder bei Verwendung der Sonde $F_{SX}27$ noch der Sonde $F_{EAS}10$ oder $F_{EA}11$ ein Signal detektieren. Diese Stämme besitzen keine *icaADBC*-homologen Sequenzabschnitte. Anteile von *geh*SE1finden sich bei ihnen nicht.

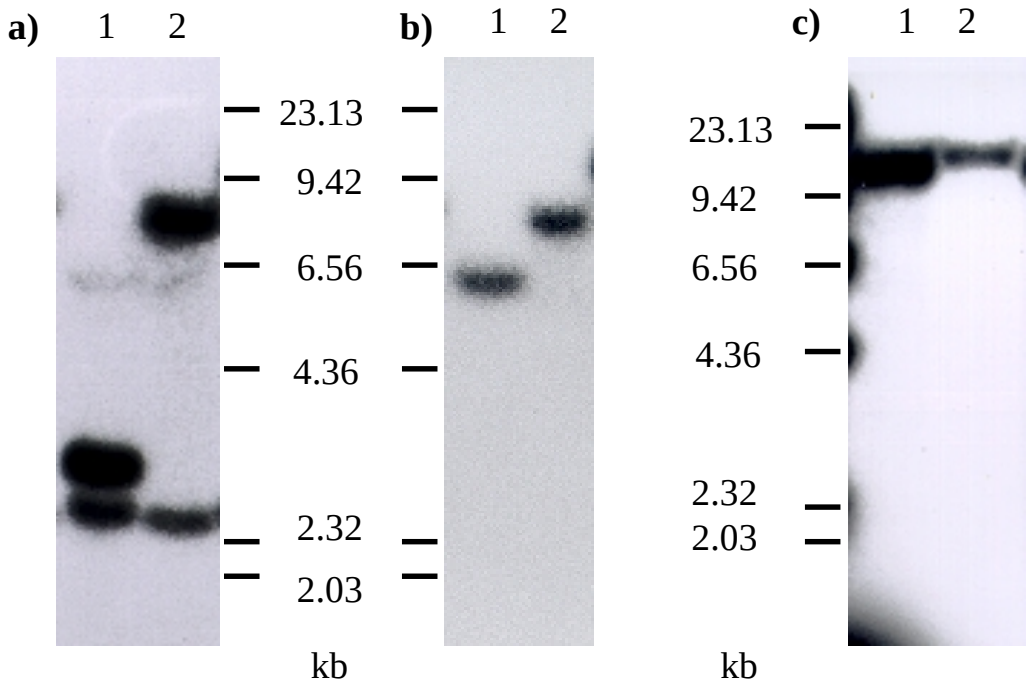

Abbildung 6:

a) *Hind*III-Spaltung und elektrophoretische Auftrennung chromosomaler DNA von 5179 (Spur 1) und 1457 (Spur 2). Hybridisierung mit der Sonde $F_{SX}27$ unter stringenten Bedingungen. Bei 5179 kommen drei Banden zur Darstellung, wobei das durch sie dargestellte, kleinste Fragment 2.5 kb groß ist, die beiden größeren Banden 3 kb bzw. 5.8 kb große Fragmente repräsentieren. Längenstandard ϕλ-DNA / *Hind*III-gespaltener.

b) Hybridisierung des unter a) beschriebenen Blots mit der Sonde $F_{EA}11$. Hier kommt beim Stamm 5179 in der Spur 3 nur das 5.8 kb große Fragment zur Darstellung. Die Ursache für die stärkere Intensität der 5.8 kb Bande im Vergleich zu Abb. 6 a ist die Tatsache, daß die Sonde $F_{SX}27$ und das genannte Fragment nur über die kurze Strecke bis zur *Xba*I-Schnuittstelle hybridisieren, während $F_{EA}11$ größere Abschnitte erkennt. Längenstandard ϕλ-DNA / *Hind*III-gespaltener.

c) *Hind*III-Spaltung chromosomaler DNA der Stämme 9142 (Spur 1) und BK10333 (Spur 2). Autoradiographie des Blots nach Hybridisierung mit der [^{32}P]dCTP-markierten Sonde $F_{EAS}10$. BK10333 ist bei Darstellung eines 13.5 kb großen *Hind*III-Fragments ein weiteres Bespiel für Stämme, die in ihren Restriktionsstellen des *icaADBC* -Genclusters von den anderen untersuchten Stämmen (als Beispiel hier 9142). Längenstandard ϕλ-DNA / *Hind*III-gespaltener.

3.2.1.3 *Eco*RI-Restriktionsanalyse chromosomaler DNA klinischer *S. epidermidis*-Isolate

Das Vorliegen einer abweichend zur Sequenz von RP62A zusätzlichen *Eco*RI-Schnittstelle in *icaA* mit einem konsekutiv differenten *Eco*RI-Restriktionfragmentmuster, wie es bei *S. epidermidis* 9142 gefunden worden war, ließ sich auch in einer größeren Gruppe von *S. epidermidis*-Stämme dokumentieren (Abb. 7 a und b).

In allen Fällen, bei denen vom Vorliegen des *icaADBC*-Genclusters ausgegangen wurde, ließ sich ein 6.3 kb großes Fragment nachweisen. Bei diesem muß es sich aufgrund der Tatsache, daß es bei Hybridisierung mit der Sonde $F_{SX}27$, nicht jedoch mit der Sonde $F_{EAS}10$ darstellbar war, um das im *icaADBC*-Gencluster weiter 3´-gelegene *Eco*RI-Fragment handeln. Weitere, somit 5´-gelegenen Fragmente konnten bei Hybridisierung mit den Sonden $F_{SX}27$ und $F_{EAS}10$ mit 2.2 kb oder 3.0 kb vermessen werden. In diesem Abschnitt bestehen also innerhalb der Stammpopulation eine unterschiedliche Anordnung der *Eco*RI-Schnittstellen. Das 2.2 kb große Fragment fand sich in 49 Fällen (85.95%), das 3.0 kb große Fragment in 7 Fällen (entsprechend einer Frequenz von 12.28%). Die Häufigkeit dieser Fragmente erfüllt das Kriterium, um sie als polymorphe Fragmente zu bezeichnen.

Um Abschnitte weiter proximal darzustellen, erfolgte die Hybridisierung mit der Sonde $F_{EA}11$ (Abb. 7 b). Hierbei konnte in allen Fällen, bei denen zuvor ein 2.2 kb großes Fragment darstellbar gewesen war, ein 0.8 kb großes Fragment nachgewiesen werden, während in den anderen Fällen weiterhin ausschließlich das 3.0 kb große Fragment detektiert wurde. Die Mehrzahl der untersuchten Stämme (85.95 %) wies also im mit den genannten Sonden untersuchten, proximalen Bereich des *ica*-Genlocus eine zusätzliche *Eco*RI-Schnittstelle auf. Da das 0.8 kb große Fragment nur bei Verwendung der Sonde $F_{EA}11$ zur Darstellung kam, läßt sich eine Aussage über die relative Lage der beiden Fragment zueinander machen. Aufgrund der der Sonde zugrundeliegenden Sequenz muß das 0.8 kb große Fragment in allen untersuchten Fällen 5´ proximal vor dem 2.2 kb großen Fragment gelegen sein. Hieraus ergibt sich, daß die zusätzliche *Eco*RI-Schnittstelle im IcaA-codierenden Abschnitt des *ica*-Genlocus gelegen ist. Die relative Anordnung der Fragmente ist unter den diese Schnittstelle aufweisenden Stämmen identisch. Die so dargestellte *Eco*RI-Schnittstelle entspricht mit großer Wahrscheinlichkeit der bei *S. epidermidis* 9142 durch Sequenzierung nachgewiesenen (Abb. 12, Seite 65).

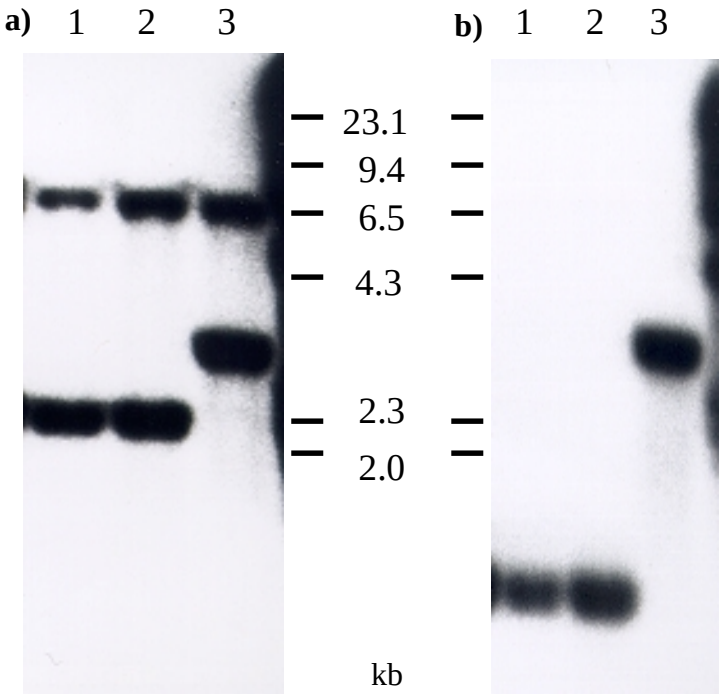

Abbildung 7:

a) *Eco*RI-gespaltene, chromosomaler DNA von 3 *S. epidermidis*-Stämmen (Spur 1, BK10730; Spur 2, 9142; Spur 3, 1457). Autoradiographie einer Southern-Hybridiesierung bei Verwendung der [^{32}P]dCTP-markiertenSonde F_{SX}27. Das Genom der gezeigten Stämme umfaßt *icaADBC*-homologe Sequenzen. Neben einem gemeinsamen 6.3kb großen Fragment findet sich bei 1457 ein 3.0 kb großes Fragment, bei 9142 und BK10730 jedoch ein 2.2 kb großes.
Längenstandard ϕλ-DNA / *Hind*III-gespaltener.

b) Hybridisierung des unter a) gezeigten Blots mit der [^{32}P]dCTP-markierten Sonde F_{EA}11. Bei 1457 kommt erneut nur eine Bande entsprechend dem 3.0 kb großen Fragment zur Darstellung, bei 9142 und BK10730 Banden entsprechend einem 0.8kb großen Fragment. Dies zeigt, daß diese Stämme im Gegensatz zu 1457 im *ica*-Genclusters eine weitere *Eco*RI-Schnittstelle aufweisen, so daß Fragmente von 2.2 kb und 0.8 kb vorliegen. Längenstandard ϕλ-DNA / *Hind*III-gespalten.

Die Variabilität der *Eco*RI-Restriktion ließ sich auch unter den *icaADBC*-positiven, unabhängigen Kontrollstämmen finden (Tab. 13, Seite 68).

Neben den oben beschriebenen, vorherrschenden *Eco*RI-Restriktionsmustern fand sich im Falle von 5179 ein atypisches *Eco*RI-Fragment. Dies muß aufgrund seiner Frequenz von 1.75% als sporadische Varianten der *Eco*RI-Restriktion angesehen werden. Bei Hybridisierung mit der Sonde $F_{SX}27$ ließ sich im Vergleich zu den oben beschriebenen Bandenmustern ebenfalls das 3´-gelegen, 6.3 kb große Fragment finden (Abb. 8). Das weiter 5´-gelegene Fragment ist jedoch 3.9 kb groß. Die der Schnittstellenvariabilität zugrundeliegende Sequenzänderung liegt wahrscheinlich vor den codierenden Abschnitten des *ica*-Genlocus (siehe hierzu auch Kap. 3.2.1.3.5).

Der Stamm 5179 ist Beleg für das Vorkommen von Varianten des *icaADBC*-Genclusters. Eine Übersicht über die gefundenen *Eco*RI-Fragmente und ihre Frequenz in der untersuchten Population gibt die Tabelle 10 auf Seite 59.

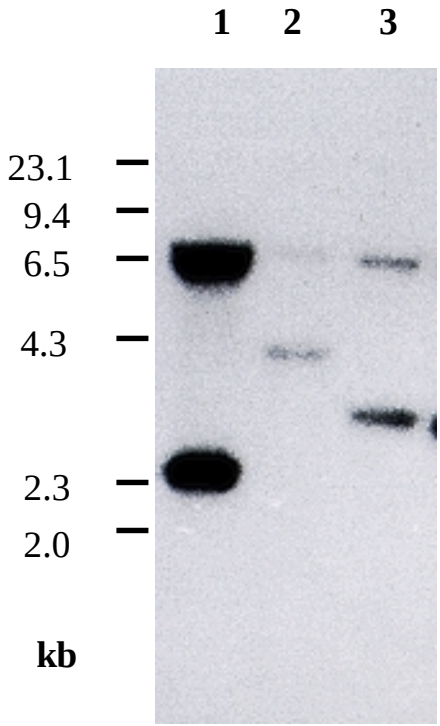

Abbildung 8:

Blot des *Eco*RI-gespaltenen und elektrophoretisch aufgetrennten Genoms des Stamms 5179 (Spur 2) im Vergleich zu den Stämmen 9142 (Spur 1) und 1457 (Spur 3). Autoradiographie nach Hybridisierung mit der Sonde $F_{SX}27$. Neben dem auch bei 9142 und 1457 gefundenen 6.3 kb großen Fragment Darstellung eines 3.9 kb großen Fragments, daß diesen Stamm von allen anderen untersuchten unterscheidet. Längenstandard ϕλ-DNA / *Hind*III-gespalten.

3.2.1.4 *Msp*I-Restriktionsanalyse chromosomaler DNA *icaADBC*-positiver *S. epidermidis*-Isolate

Aus der Sequenzanalyse des den *icaADBC*-Gencluster umfassenden Plasmids pCN27 ist bekannt, daß dieser Genlocus zwei interne *Msp*I-Schnittstellen an den Nucleotiden 1285 und 3061 besitzt. Bei allen untersuchten Stämmen konnte das resultierende, etwa 1.8 kb große, interne Fragment mit der Sonde $F_{SX}27$ gefunden werden (Abb. 9a). Dies ist ein Beleg dafür, daß die beiden *icaADBC*-internen *Msp*I-Schnittstellen unter diesen Stämmen konserviert sind. Ebenso war in allen Fällen ein 4.16 kb großes Fragment detektierbar. Ein Differenz der Bandenmuster bestand darin, daß in 40 Fällen (70.17%) bei Hybridisierung mit der Sonde $F_{SX}27$ ein 4.95 kb großes Fragment nachweisbar war, in 17 Fällen (29.82%) ein 4.27 kb großes (Abb. 8a, Tab. 10). Da bei Hybridisierung mit der Sonde $F_{EA}11$ ausschließlich das 4.16 kb große Fragment in Erscheinung trat (Abb. 9b), muß das Fragment variabler Größe im Anschluß an das interne, 1.8 kb große Fragment lokalisiert sein. Bei Konstanz der stromaufwärts des *icaADBC*-Genclusters gelegenen *Msp*I-Schnittstelle finden sich stromabwärts variable *Msp*I-Schnittstellen, nämlich 4.95 kb oder 4.27 kb jenseits der letzten internen *Msp*I-Schnittstelle bei Nucleotid 1776. Sie liegen demnach 3.35 kb beziehungsweise 2.67 kb 3´ außerhalb von *icaC*.
Der Stamm 5179, der in der *Eco*RI- und *Hind*III-Restriktion ein einzigartiges Bandenmuster aufgewiesen hatte, war mit einem 3´-gelegenen *Msp*I-Fragment von 4.95 kb größenkonform mit einem Teil der anderen Stämme.

3.2.1.5 *Xba*I-Restriktionsanalyse chromosomaler DNA *icaADBC*-positiver *S. epidermidis*-Isolate

Der *ica*-Genlocus besitzt eine *Xba*I-Schnittstelle bei Nucleotid 213. Aus den Kartierungsuntersuchungen der Tn*917*-Insertionsmutanten M10 und M11 hatte sich ergeben, daß diese Schnittstelle das Ende eines folglich proximal gelegenen, 4.3 kb großen Fragments und den Beginn eines, somit distal gelegenen, 7.6 kb großen Fragments darstellt. Dieses Fragmentmuster fand sich mit Ausnahmen von *S. epidermidis* 5179 auch bei Hybridisierung chromosomaler DNA der analysierten Stämme mit der Sonde $F_{SX}27$ (Darstellung des 3´-gelegenen, 7.6 kb großen Fragments; Abb. 10a) und der Sonde $F_{EA}11$ (Darstellung des 5´-gelegenen, 4.3 kb großen Fragments; Abb. 10b). Es lagen demnach unter den geprüften Stämmen mit einer Ausnahmen (s.u.) keine variablen *Xba*I-Schnittstellen vor, sie präsentierten sich als hoch konserviert. Die relative Lage der Fragmente zueinander ist konstant (Abb. 12).

5179 weist ein distal gelegenes, mit den Sonden $F_{EAS}10$ und $F_{SX}27$ darstellbares, 7.9 kb großes *Xba*I-Fragment auf, verfügt also über eine um 300 bp weiter stromabwärts lokalisierte *Xba*I-Schnittstelle als die übrigen Stämme.

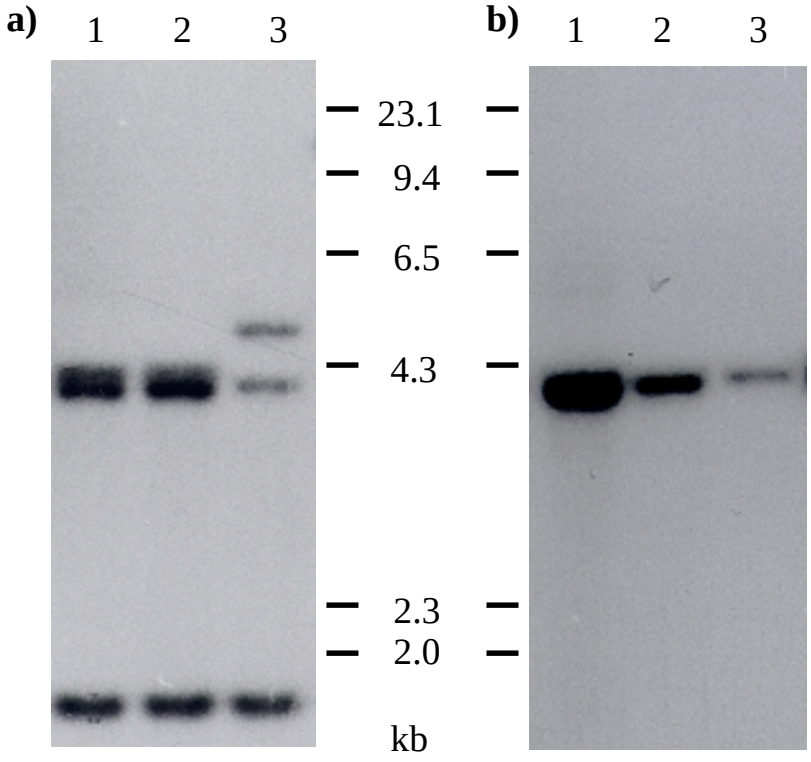

Abbildung 9:

a) Gezeigt wird ein Blot *Msp*I-gespaltener, elektrophoretisch aufgetrennter chromosomaler DNA der Stämme 9142 (Spur 1), 8400 (Spur 2) und 1457 (Spur 3) nach Hybridisierung mit der [^{32}P]dCTP-markierten Sonde F_{SX}27. In allen Spuren kommen drei Banden zur Darstellung, wobei die kleineren, 1.8 kb und 4.16 kb großen Fragmenten entsprechenden, in allen Fällen konstant detektierbar sind. Das größte nachweisbare Fragment läßt sich in Spur 3 mit 4.95 kb vermessen, in den Spuren 1 und 2 mit 4.27 kb.

Längenstandard ϕλ-DNA / *Hind*III-gespalten.

b) Hybridisierung des unter 5a gezeigten Blots mit der [^{32}P]dCTP-markierten Sonde F_{EA}11. Das in den Spuren 1-3 nachweisbare, 4.16 kb große Fragment muß aufgrund der Sequenz der eingesetzten Sonde am 3´-Ende des *icaADBC*-Genclusters gelegen sein.

Längenstandard ϕλ-DNA / *Hind*III-gespalten.

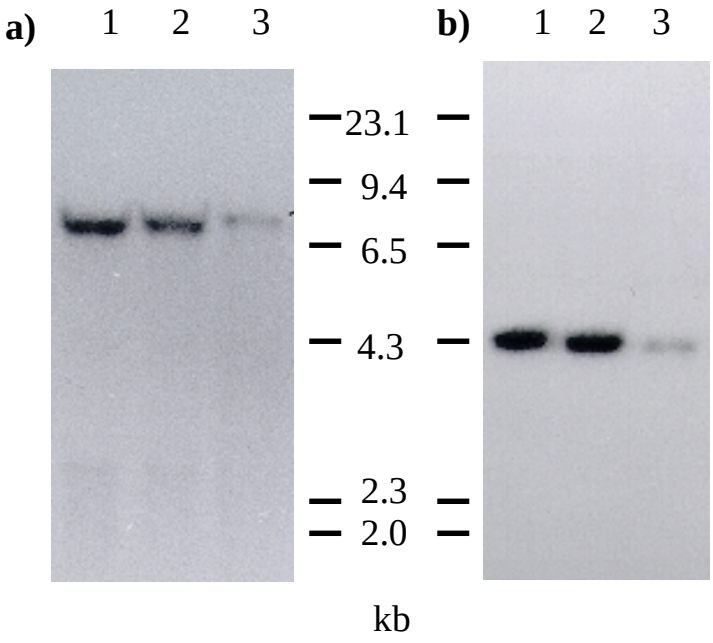

Abbildung 10:

a) Hybridisierung eines Blots *Xba*I-gespaltener, elektrophoretisch aufgetrennter chromosomaler DNA der Stämme 1457 (Spur 1), 9142 (Spur 2) und 8400 (Spur 3) mit der [^{32}P]dCTP-markierten Sonde F_{EAS}10. In allen Spuren läßt sich konstant eine Bande nachweisen, die einem Fragment von 7.6 kb entspricht. Das distal gelegene *Xba*I-Fragment ist hochkonserviert. Längenstandard ϕλ-DNA / *Hind*III-gespalten.

b) Hybridisierung desselben Blots mit der Sonde F_{EA}11. In diesem Falle läßt sich in den Spuren 1-3 konstant eine Bande von 4.3 kb Größe detektieren. Unter Berücksichtigung der unter a) gezeigten Ergebnisse läßt sich sagen, daß die *icaADBC*-interne *Xba*I-Schnittstelle keinem Polymorphismus unterliegt. Längenstandard ϕλ-DNA / *Hind*III-gespalten.

3.2.1.6 *Xba*I x *Hind*III-Restriktionsanalyse chromosomaler DNA *icaADBC*-positiver *S. epidermidis*-Isolate

Durch die Untersuchung *Xba*I x *Hind*III-gespaltener DNA der *S. epidermidis*-Stämme sollte ermittelt werden, ob der Abschnitt des *ica*-Genlocus, der durch diese Schnittstellen flankiert wird, durch Insertionen, Deletionen oder Rekombinationsereignisse eventuellen Alterationen unterzogen wurde. In allen Fällen konnte bei Hybridisierung mit der Sonde $F_{EAS}10$, die aufgrund der ihr zugrunde liegenden Sequenz *ica*-Abschnitte stromabwärts der internen *Xba*I-Schnittstelle, jedoch keine Sequenzabschnitte außerhalb des *icaADBC*-Genclusters darstellt, Fragmente von 2.9 kb Größe vermessen werden (Abb. 11). In diesem Bereich des *ica*-Genlocus finden sich unter den analysierten Stämmen keine größeren strukturellen Unterschiede. Wichtig ist hierbei zu vermerken, daß diese Kontinuität auch unter Stämmen bestand, die sich hinsichtlich des proximal gelegenen *Hind*III-Fragments unterschieden (BK7486, BK10333, nicht gezeigt). Die variable *Hind*III-Schnittstelle muß sich auch aus diesem Grunde vor dem Beginn des *ica*-Genlocus befinden.

Auch der Stamm BK5179 wies ein 2.9 kb großes *Xba*I x *Hind*III-Fragment auf. Selbst hier war also der zentrale Abschnitt des *ica*-Genlocus größenkonform mit dem der anderen untersuchten Stämme. Die zusätzliche *Hind*III-Schnittstelle (Abb. 13) muß auch aufgrund der Größe des *Xba*I x *Hind*III -Fragments 5´ der *icaA*-internen *Xba*I-Schnittstelle lokalisiert sein.

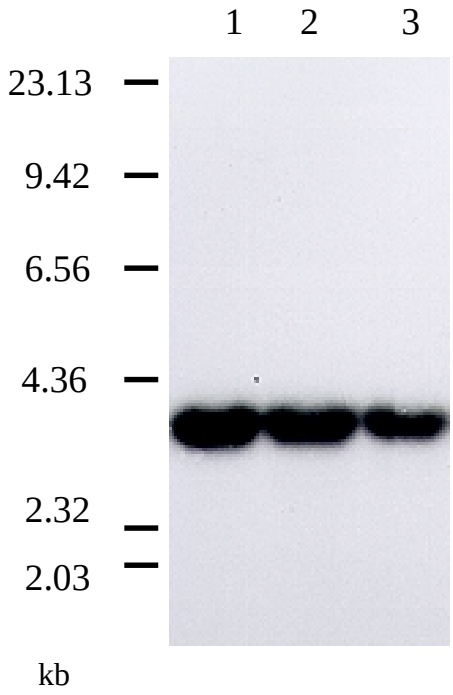

Abbildung 11:

Gezeigt wird die Hybridisierung von *Xba*I x *Hind*III-gespaltener, elektrophoretisch aufgetrennter DNA der Stämme 1457 (Spur 1), 9142 (Spur 2) und 8400 (Spur 3) mit der [^{32}P]dCTP-markierten Sonde F_{EAS}10. Die in Spur 1-3 erkennbaren Banden entsprechen Fragmenten von 2.9 kb Größe.

Längenstandard ϕλ-DNA / *Hind*III-gespalten.

Tabelle 10

Übersicht über die innerhalb der untersuchten Population von *S. epidermidis*-Stämmen nachweisbaren, distinkten Fragmente des *icaADBC*-Genclusters und ihre Frequenz

Restriktionsendonuclease	**Variable Fragmente**	**Anzahl** [a]
***Eco*RI**	2.2 kb / 0.8 kb	n = 49 (85.95%)
	3.0 kb	n = 7 (12.28%)
	3.9 kb	n = 1 (1.75%)
***Hind*III**	13.0 kb	n = 47 (82.46%)
	8.7 kb	n = 7 (12.28%)
	13.5 kb	n = 2 (3.51%)
	5.8 kb / 3.0 kb	n = 1 (1.75%)
***Msp*I**	4.95 kb	n = 40 (70.18%)
	4.27 kb	n = 17 (29.82%)
***Xba*I**	7.6 kb	n =56 (98.25%)
	7.9 kb	n = 1 (1.75%)

[a] In Klammern Angabe der Frequenz des jeweiligen Fragments bezogen auf alle *icaADBC*-positiven Stämme (n = 57)

3.2.1.7 Kopplung polymorpher *Eco*RI- und *Hind*III-Fragmente

Aus Tabelle 11 a geht hervor, daß die *Eco*RI-RFLP-Variante 2.2 kb/0.8 kb in 95.91 % der untersuchten Stämme in Verbindung mit der *Hind*III-RFLP-Variante 13.0 kb auftrat. Die *Eco*RI-RFLP-Variante 3.0 kb stellte sich in allen untersuchten Fällen als koinzident mit der *Hind*III-RFLP-Variante 8.7 kb dar. Die genannten assoziierten Fragmentgrößen können daher als gekoppelt angesehen und als Kopplungspaar beschrieben werden. Lediglich in zwei Fällen (BK7486, BK10333; Tab. 12, Seite 66) fehlte die Kopplung der *Eco*RI-RFLP-Variante 2.2 kb/0.8 kb mit dem 13.0 kb großen *Hind*III-Fragment (entsprechend einer Häufigkeit von 4.09%). In beiden Fällen handelte es sich um das Auftreten des 2.2 kb/0.8 kb-*Eco*RI-RFLP gemeinsam mit einer sporadischen Variante der *Hind*III-Schnittstelle (Fragment 13.5 kb, Frequenz 3.5%). In allen Fällen konnte bei Vorliegen des 13.0 kb-*Hind*III-RFLP´s eine Assoziation mit dem 2.2 kb/0.8 kb-*Eco*RI-RFLP nachgewiesen werden. Das 8.7 kb großen *Hind*III-Fragment war in keinem Fall mit der 2.2 kb/0.8 kb-*Eco*RI-Variante assoziiert (Tab. 11a).

3.2.1.8 Assoziation der *Eco*RI / *Hind*III-Kopplungspaare mit den polymorphen *Msp*I-Fragmenten

Sowohl bei Stämmen, die die *Eco*RI 2.2 kb/0.8 kb - *Hind*III 13.0 kb-Kopplungsgruppe aufweisen, als auch bei Stämmen, die die *Eco*RI 3.0kb / *Hind*III 8.7 kb- Kopplungsgruppe aufweisen, fand sich sowohl das 4.95 kb große als auch das 4.27 kb große *Msp*I-Fragment. Eine strenge Assoziation zwischen den beiden Kopplungsgruppen und den polymorphen *Msp*I-Fragmenten besteht somit nicht (Tab. 11 b).

In der *Eco*RI 2.2 kb/0.8 kb - *Hind*III 13.0 kb-Kopplungsgruppe überwog das Auftreten des 4.95 kb großen (68.09%) gegenüber dem 4.27 kb großen *Msp*I-Fragment (31.01%).

In der *Eco*RI 3.0 kb - *Hind*III 8.7 kb-Kopplungsgruppe trat im Vergleich zur Gesamtpopulation das 4.95 kb große *Msp*I-Fragment mit einer Frequenz von 85.71% häufiger, das 4.27 kb große *Msp*I-Fragment mit einer Frequenz von 14.28% seltener auf. Jedoch ist bei der kleinen Fallzahl keine signifikante Tendenz eines präferentiellen Assoziation des größeren *Msp*I-Fragments mit dieser RFLP-Kopplungsgruppe zu postulieren.

Tabelle 11

Assoziation polymorpher *Eco*RI –, *Hind*III- und *Msp*I-Fragmente

a)

	***Hind*III**		
***Eco*RI**	13.0 kb (n = 47)	8.7 kb (n = 7)	Sporadisches Fragment (n = 2)
2.2 kb/ 0.8 kb (n = 49)	47 (95.91%)	0	2 (4.09%)
3.0 kb (n = 7)	0	7 (100%)	0

b)

	***Msp*I**	
***Eco*RI-*Hind*III**	4. 95 kb	4.27 kb
2.2 kb/0.8 kb - 13.0 kb (n = 47)	32 (68.09%)	15 (31.01%)
3.0 kb - 8.7 kb (n = 7)	6 (85.71%)	1 (14.28%)

3.2.1.9 Über den Nachweis variabler Restriktionsfragmente des *icaADBC*-Genclusters ist die Einteilung unterschiedlicher *S. epidermidis*-Stämme in genotypische Klassen möglich

In der großen Mehrzahl der untersuchten klinischen *S. epidermidis*-Stämme (54 von 57 Fälle, entsprechend 94.74%) war bei Restriktionsanalyse chromosomaler DNA durch *Eco*RI, *Hind*III und *Msp*I bei jedem der genannten Enzyme eines von zwei möglichen, polymorphen Fragmenten des *icaADBC*-Gencluster nachweisbar (Tab. 10). Es erschien daher sinnvoll, eine sich an den vorherrschenden Restriktionsmustern dieses Genlocus orientierende, genotypische Einteilung der untersuchten Stämme vorzunehmen. Die Einteilung der einzelnen Stämme in diese Ordnung gibt die Tab. 13 auf Seite 68 wieder, ein Überblick ist in Tab. 12 auf Seite 66 gezeigt. Als Merkmal erster Ordnung wurde der Restriktionspolymorphismus von *Eco*RI und *Hind*III gewählt, da die Frequenz der hierbei darstellbaren Fragmente zur größten Polarisierung innerhalb der untersuchten Stamm-Population führt: die Fragmentkombination *Eco*RI 2.2 kb/0.8 kb und *Hind*III 13.0 kb trat in 47 Fällen in Erscheinung (82.46%). Der Nachweis dieser Fragmentkombination wurde als Kriterium zur Zuordnung der entsprechenden Stämme zur genotypischen Klasse 1 gewählt. Demgegenüber wurde die Fragmentkombination *Eco*RI 3.0kb - *Hind*III 8.7kb in nur 7 Fällen gefunden (entsprechend 12.28%), sie wurde als Kriterium zur Subsummierung der jeweiligen Stämme in die genotypischen Klasse 2 gewertet. Das Verhältnis der Frequenz der Klasse 1 zur Klasse 2 beträgt 6.71: 1.

Als Zusatzkriterium mußte das oben beschriebene, gekoppelte Auftreten der *Eco*RI- und *Hind*III -Fragmente gelten. Eine hiervon abweichende Kombination entweder mit dem die andere Klasse determinierenden *Eco*RI- oder *Hind*III -Fragment oder aber einem in der Größe von den zur Einteilung herangezogenen Fragmenten differentes Fragment schloß die Zuweisung in die Klasse 1 oder -2 aus. Die hiervon betroffenen Stämme bilden die genotypische Klasse 3, in die demnach alle Stämme, die sporadische Fragmentlängen in der *Eco*RI- und *Hind*III-*icaADBC*-Restriktion aufweisen, eingegliedert wurden. Drei (5.26%) der untersuchten Stämme wiesen einen solchen Genotyp auf (Tab. 12). Hierbei lag in zwei Fällen die Kombination der *Eco*RI 2.2 kb/0.8 kb-Restriktionsvariante mit einem 13.5kb großen, in seiner Frequenz einem variablen Auftreten entsprechenden *Hind*III-Fragment vor (BK10333, BK7486, Tab. 13), in einem fanden sich sowohl von der die Klasse 1 als auch die Klasse 2 determinierenden *Eco*RI- als auch der *Hind*III-Restriktion abweichende Schnittstellen (5179).

Die Frequenz der beiden polymorphen *Msp*I Restriktionsfragmente führte nicht zu einer so starken Polarisierung wie der *Eco*RI- und *Hind*III-RFLP: die Frequenz des 4.95 kb großen Fragments

beträgt 70.18%, die des 4.27 kb großen 29.82%, ihr Verhältnis beträgt also 2.35 : 1. Daher wurde ihr Nachweis zur Subtypisierung innerhalb der Genotypen 1 und 2 herangezogen. Der Nachweis des 4.95kb großen Fragments wird durch den Zusatz „a“, der des 4.27 kb großen durch den Zusatz „b“ angezeigt. Wurde ein von den beiden genannten abweichendes Fragment gefunden, so hatte dies die Zuordnung zur Klasse 3 zur Folge. Da die Klasse 3 hinsichtlich ihrer Restiktionseigenschaften außerordentlich heterogen ist, wurde der Zusatz „a“ bzw. „b“ auf sie nicht angewendet.

Die *Xba*I-Restriktion stellte sich unter den untersuchten Stämmen der genotypischen Klassen 1 und 2 als hochkonserviert dar (Tab. 10). Dies ist daher ein charakteristisches Kennzeichen dieser Klassen, eine Abweichung hiervon ein Ausschlußkriterium für die Zuordnung in diese. Es ergab sich dann konsekutiv die Einteilung in die Klasse 3. Da jedoch unter allen getesteten Stämmen in nur einem Fall (5179) variante *Xba*I-Restriktionsfragmente auftraten und dieser Stamm schon aufgrund seiner differenten *Eco*RI- und *Hind*III- Restriktionsstruktur in die Klasse 3 eingegliedert wurden, kam diesem Kriterium in keinem Fall eine determinierende Funktion zu.

Die genotypische Klasse 1a umfaßt innerhalb der untersuchten Gruppe von Stämmen 32, die Klasse 1b 14, die Klasse 2a sechs und die Klasse 3 vier Mitglieder, die Klasse 2b wird durch nur ein Mitglied repräsentiert (Tab. 12 und 13). Die genotypische Klasse 1a dominiert demnach in der Population der untersuchten, *icaADBC*-positiven Isolate mit einer Frequenz von 56.14%, gefolgt von der Klasse 1b mit 26.32%, der Klasse 2a mit 10.53% und der Klasse 3 mit 5.26%. Die Klasse 2b weist lediglich eine Frequenz von 1.75% auf.

Tabelle 12

Genotypische Klassifikation anhand des *Eco*RI-, *Hind*III- und *Msp*I-RFLP

***Eco*RI- *Hind*III-RFLP n = 57[b]**	***Msp*I-RFLP n = 57**	
	a (4.95 kb) n = 40 (70.18%) [a]	**b** (4.27 kb) n = 17 (29.82%) [a]
Klasse 1 (*Eco*RI 2.2 / 0.8 kb, *Hind*III 13.0kb, *Xba*I 4.3/7.6kb) n = 47 (82.46%) [d]	32 (56.14%) [c]	15 (26.32%) [c]
Klasse 2 (*Eco*RI 3.0kb, *Hind*III 8.7kb, *Xba*I 4.3/7.6kb) n = 7 (12.28%) [d]	6 (10.52%) [c]	1 (1.75%) [c]
Klasse 3 (*Eco*RI + *Hind*III + *Xba*I ≠ Klasse 1 / Klasse 2) n = 3 (5.26%)	3 [e]	

[a] Prozentzahl = Frequenz des Fragments bezogen auf die Zahl aller Stämme der jeweiligen Klasse; [b] Die gezeigten *Eco*RI- und *Hind*III-Fragmente werden als gekoppelt betrachtet; [c] Prozentzahl = Frequenz der Fragmentkombination bezogen auf die gesamte Stammzahl; [d] Prozentzahl = Frequenz der Kopplungsgruppe bezogen auf die 57 *ica*ADBC-positiven Stämme; [e] hier 2 Stämme mit 4.95kb, ein Stamm mit 4.27kb *Msp*I-Fragment vertreten, wg. genereller Heterogenität der Klasse 3 keine Kennzeichnung.

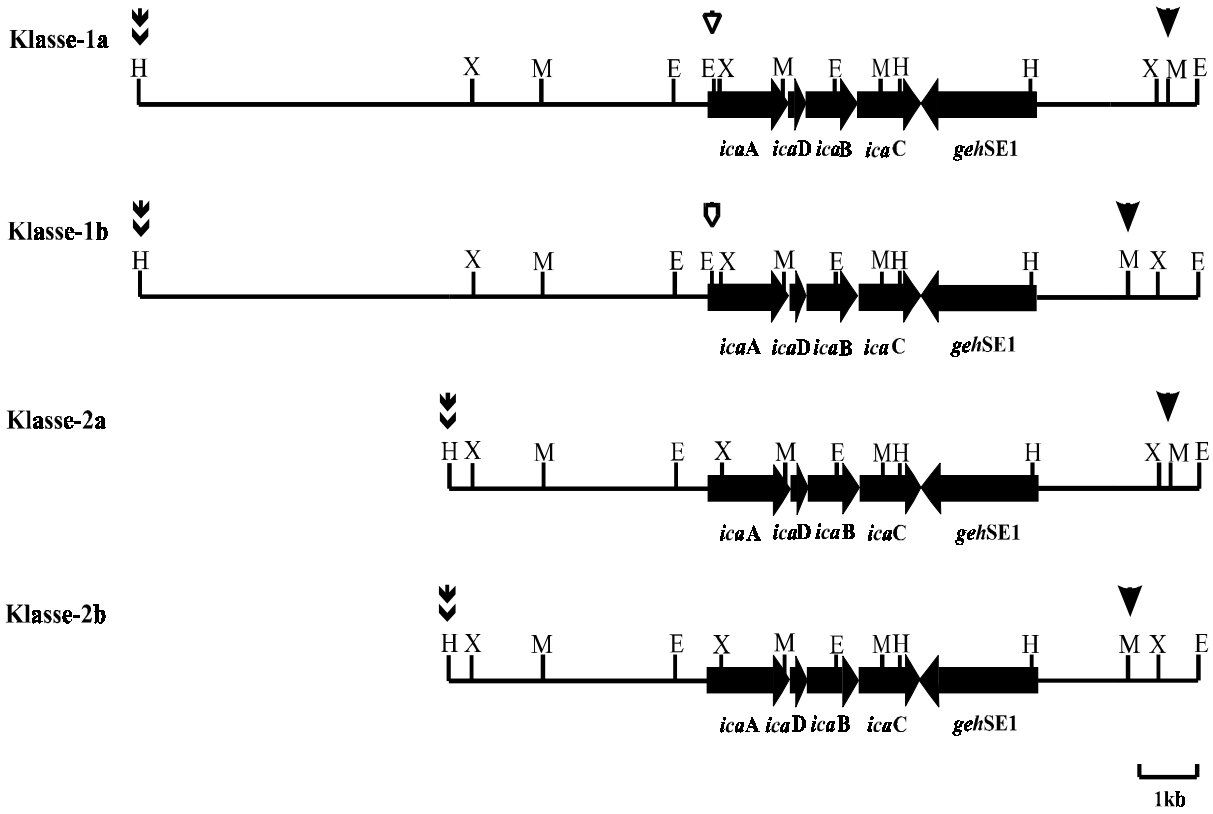

Abbildung 12:

RFLP des *icaADBC*-Genclusters. Die variablen Schnittstellen sind mit einem Doppelpfeil (*Hind*III) oder einem einfachen, schwarzen Pfeil (*Msp*I) gekennzeichnet. Sie sind außerhalb des *ica*-Genlocus lokalisiert. Lediglich die den *Eco*RI-RFLP determinierende Schnittstelle liegt innerhalb der IcaA-codierenden Sequenz (transparenter Pfeil).

E, *Eco*RI , H, *Hind*III; M, *Msp*I; X, *Xba*I

Tabelle 13: Tabellarische Übersicht der *icaADBC* –positiven und *icaADBC*-negativen Stämme sowie ihre Einteilung in die genotypischen Klassen

Klasse 1 *Eco*RI 0.8kb/2.2kb, *Hind*III 13.0kb, *Xba*I 4.3kb/7.6kb								**Klasse 2** *Eco*RI 3.0kb, *Hind*III 8.7kb, *Xba*I 4.3kb/7.6kb		**Klasse 3** *Eco*RI-, *Hind*III-, *Msp*I- und / oder *Xba*I-Restriktion ≠ Klasse 1 und / oder Klasse 2			
Starke Biofilmbildung[a]		Mäßige Biofilmbildung[b]		Schwache Biofilmbildung[c]		Keine Biofilmbildung[d]		Starke Biofilmbildung[a]		Mäßige Biofilmbildung[b]		Keine Biofilmbildung[c]	
	OD_{570}		OD_{570}		OD_{570}		OD_{570}		OD_{570}		OD_{570}		OD_{570}
9142	2.3	RP12	0.955	BK7873	0.47	BK 7501	0.055	1457	2.5	BK7486	0.84	BK10333	0.07
BK 10730	2.3	BK11808	0.95	ZK1603	0.41	BK8669	0.04	M187	2.39			BK5179	0.05
BK 9209	2.3	ZK122	0.93	ZK1891	0.39	BK 472	0.017	BK 7874	2.26				
BK10590	2.2	BK8679	0.84	ZK1535	0.29	ZK 560	0.012	BK 8188	2.2				
ZK1815	2.17	ZK1443	0.83	BK10993	0.26	BK 7873	0.008	BK 11063	2.01				
ZK 1516	2.1	BK10094	0.73	BK942	0.25			RP62A	2.0				
BK 11935	2.1	BK 9909	0.625	ZK4417	0.19			BK 1166	1.1				
O-47	2.1	BK7415	0.55	BK 429	0.172			8400	1.9				
BK 10248	2.1	ZK1540	0.52	BK1222	0.154								
ZK1217	1.85												
SE 5	1.8												
BK521	1.74												
BK10160	1.58												
BK 10008	1.38												
ZK178	1.3												
ZK 1057	1.26												
ZK685	1.23												
VA13449	1.187												
VA12368	1.15												
VA4386	1.15												
BK941	1.04												
BK939	1.04												
BK10691	1.025												
ZK1334	1.025												

a (oben): *icaADBC*-positive Stämme

b (unten) : *icaADBC*-negative Stämme

Mäßige Biofilmbildung[b]			Keine Biofilmbildung[d]		
	OD_{570}	*Hind*III[f]		OD_{570}	*Hind*III[f]
BK10331	0.77	kein Signal	BK9225	0.05	2.7kb
			BK 9602	0,043	2,7 kb
			KH 11	0,04	kein Signal
			BK12541	0,04	kein Signal
			BK11529	0,032	kein Signal
			ZK1414	0,031	2,7 kb
			BK 10256	0,024	kein Signal
			BK 3102	0,021	kein Signal
			BK 8125	0,017	2,7 kb
			BK 10369	0,015	2,7 kb
			BK 9896	0,015	≈10kb
			BK 8102	0,023	2,7 kb
			SP2[e]	0.09	kein Signal
			RP14[e]	0.06	kein Signal

[a]: OD_{570} >1.0, [b]: OD_{570} < 1.0 >0.5, [c]: OD_{570}< 0.5 >0.1
[d]: OD_{570}<0.1, [e]: *S. hominis*-Stämme, [f] Hybridisierung mit $F_{SX}27$ nach *Hind*III-Spaltung

graue Felder = *Msp*I-Fragmente 4.16 kb, 1.8 kb und 4.95 kb (b)
transparente Felder = *Msp*I 4.16kb, 1.8kb und 4.27 kb (b)

3.2.2 Phänotypisierung klinischer *S.epidermidis*-Isolate anhand ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung und PIA-Expression

3.2.2.1 Vorbemerkungen

Untersucht wurden die unter Kap. 3.2.1.1 genannten Stämme. Zur Bestimmung der quantitativen Biofilmbildung der verschiedenen *S. epidermidis*-Stämme wurde der Biofilm-Test genutzt. Die PIA-Expression wurde im semiquantitativen Koagglutinations-Test gemessen. Die Kultur der Stämme erfolgte in Trypticase soy broth (TSB). Zur Darstellung einer differentiellen Expression von Biofilm und PIA bei Änderung der Kulturbedingungen wurden Biofilm-Test und PIA-Agglutination nach Kultur in TSB der Firma BBL Microbiology Systems (TSB_{BBL}) und der Firma OXOID (TSB_{OXOID}) durchgeführt. Die weitere Darstellung einer differentiellen Expression von PIA und biofilm-positivem Phänotyp gelang durch Supplementierung des TSB_{OXOID}-Mediums mit N-Acetylglucosamin (GlucNAc) in einer Konzentration von 0.5%.

3.2.2.2 Quantitative Biofilmbildung und PIA-Expression klinischer *S. epidermidis*-Isolate bei Kultur in TSB_{BBL} und TSB_{OXOID}

Das phänotypische Merkmal Biofilmbildung ist in der untersuchten Gruppe von *S. epidermidis*-Stämmen außerordentlich heterogen (Tab. 14). Bei Kultur in TSB_{BBL} fanden sich unter den 70 getesteten *S. epidermidis*-Isolaten im Biofilm-Test 51 biofilm-positive Stämme (72.85%), 19 Stämme waren in diesem Test biofilm-negativ (27.14%). Unter den biofilm-positiven Stämmen waren 31 Stämme, die die Kriterien einer starken Biofilmbildung erfüllten (60.78%), daneben 11 mäßige (21.57%) und 9 schwache (17.65%) Biofilmbildner. Die beiden *S. hominis* RP14 und SP2 waren biofilm-negativ.

Bei qualitativer Betrachtung sind die Fähigkeit zur Biofilmbildung und PIA-Detektion bei Kultur in TSB_{BBL} positiv miteinander korreliert (Tab. 15). In der Analyse der PIA-Expression mit Hilfe des Koagglutinations-Tests ergab sich, daß bei 50 der 51 biofilm-positiven Stämme PIA exprimiert wird (98.04%). Die Kultur des schwach biofilm-positiven Stamms BK1222 zeigte keine Reaktivität mit dem Antiserum. In der Gruppe der bei Kultur in TSB_{BBL} biofilm-negativen Stämme konnte PIA in keinem Fall detektiert werden (Tab. 15). Auch bei SP2 und RP14 war dies nicht möglich.

Tabelle 14

Biofilmbildung durch *S. epidermidis*-Stämme im Abhängigkeit vom gewählten Medium (n = 70)

Medium	**Biofilm (OD_{570})**			
	Positiv [a]			Negativ [b]
	Stark [c]	mäßig [c]	schwach [c]	
TSB_{BBL}	31 (44.29%)[d]	11 (15.71%)[d]	9 (12.86%)[d]	19 (27.14%)[e]
TSB_{OXOID}	11 (15.71%)[d]	8 (11.43%)[d]	15 (21.43%)[d]	36 (51.43%)[e]

[a] OD_{570} ermittellt im Biofilm-Test > 0.1
[b] OD_{570} ermittellt im Biofilm-Test < 0.1
[c] stark = OD_{570} > 1.0, mäßig = OD_{570} < 1.0 > 0.5, schwach = OD_{570} < 0.5 > 0.1
[d] Prozentangabe bezieht sich auf die Zahl aller im jeweiligen Medium biofilm-positiven
[e] Prozentangabe bezieht sich auf die Zahl aller im jeweiligen Medium getesteten Stämme

Tabelle 15

Assoziation von Biofilmbildung und PIA-Expression

PIA-Expression[b]	**Biofilm (OD_{570}) [a]**			
	Positiv (OD_{570} > 0.1)		Negativ (OD_{570} < 0.1)	
	TSB_{BBL} n = 51	TSB_{OXOID} n = 34	TSB_{BBL} n = 19	TSB_{OXOID} n = 36
Positiv	50 (98.04%)	33 (97.05%)	0	1 (2.78%)
Negativ	1 (1.96%)	1 (2.94%)	19 (100%)	35 (97.22%)

[a] Ermittelt mit Hilfe des Biofilm-Tests
[b] Ermittelt im Koagglutinations-Test

Für die Assoziation von Biofilmbildung und PIA-Nachweis fand sich neben dem qualitativen Aspekt auch eine quantitative Verbindung (Abb. 13). In der Gruppe der starken Biofilmbildner zeigten 21 der 31 Mitglieder (67.74%) auch bei einer Verdünnung der Kultur von 1:20 und 30 (96.77%) bei einer Verdünnung der Kultur von 1:10 ein positives Ergebnis in der Koagglutination, in unverdünnter Form stellte sich allen Fällen ein positives Koagglutinationsergebnis dar. In gesonderter Form muß der Stamm BK939 herausgestellt werden. Diese Stamm erwies sich im Biofilm-Test als stark biofilm-positiv (Tab. 13).

Entsprechend der schwächeren Biofilmexpression konnte bei den 11 Mitglieder der Gruppe mäßigen Biofilmbildner bei einer Kultur-Verdünnung von 1:20 in keinem Fall ein positives Ergebnis, bei einer Verdünnung der Kultur von 1:10 in 10 Fällen ein positives Ergebnis nachgewiesen werden (90.91%). In unverdünnter Form kam es in allen Fällen zu einem positiven Koagglutinationsergebnis (Abb. 13).

Die Kultur der 9 schwachen Biofilmbildner führte bei Inkubation mit dem Koagglutinationsreagenz in unverdünnter Form in acht Fällen (88.89%) zu einer Koagglutination. Lediglich der Stamm BK1222 war Koagglutinations-negativ. In der Kultur-Verdünnung von 1:10 trat nur noch bei 4 Stämmen eine Koagglutination in Erscheinung (44.4%), in einer Verdünnung von 1:20 in keinem Fall.

Die Ergebnisse zeigen, daß in der untersuchten *S. epidermidis*-Population Biofilmbildung ein heterogenes, auf der differentiellen Expression von PIA basierendes Phänomen ist.

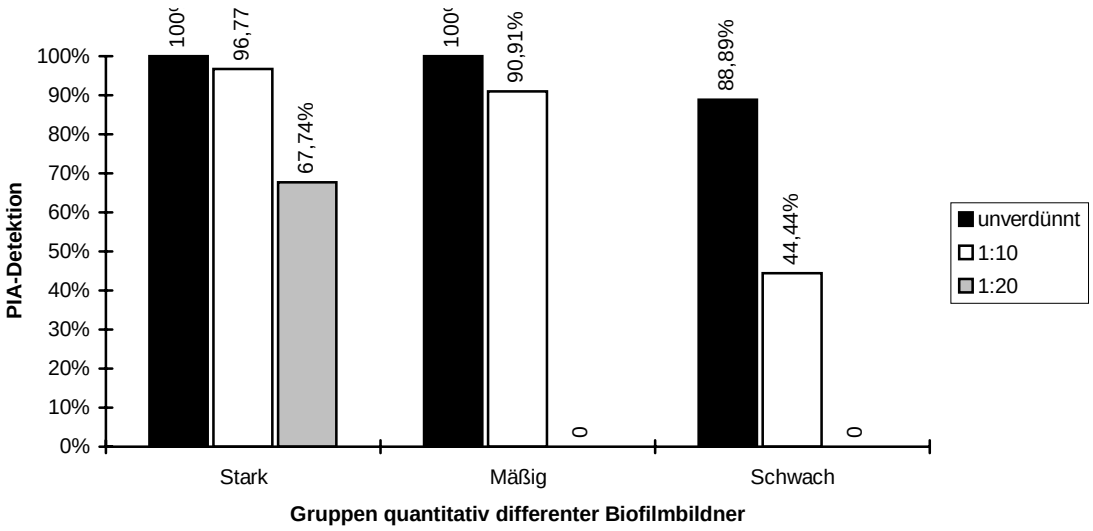

Abbildung 13: Gezeigt wird die quantitative Assoziation von Biofilm- und PIA-Expression in der untersuchten Stamm-Population bei Kultur in TSB_{BBL}. Je stärker die im Biofilm-Test anhand der OD_{570} bewerteten Biofilmbildung ist, desto häufiger kann auch bei einer Verdünnung der Zellsuspension von 1:10 bw. 1:20 bei Inkubation mit dem PIA-spezifischen Antiserum eine Koagglutination erzielt werden.

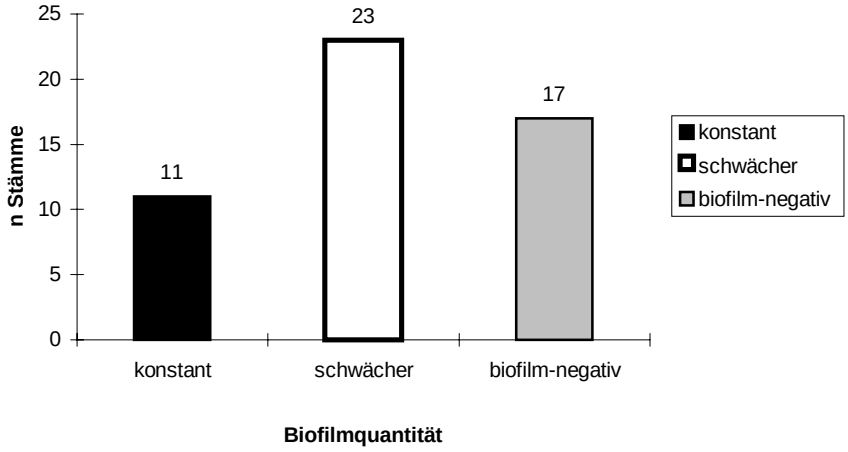

Abbildung 14: Gezeigt wird die Beeinflußbarkeit der Biofilmexpression von *S. epidermidis*-Stämmen durch Kultur in TSB_{OXOID}. Nur 11 der 51 in TSB_{BBL} biofilm-positiven Stämme behalten ihre in TSB_{BBL} exprimierte Biofilmmenge bei. 40 Stämme verändern ihren Biofilm-Phänotyp: 23 bilden einen schwächeren Biofilm, 17 werden vollständig biofilm-negativ**.**

Die Biofilmbildung klinischer *S. epidermidis*-Isolate auf Polymeroberflächen wird bei Kultur in TSB_{OXOID} abgeschwächt. In der untersuchten Stammpopulation ließ sich ein allgemein Biofilm-depressiver Effekt dokumentieren (Tab. 14, Abb.15). Im Biofilm-Test fanden sich bei Verwendung dieses Mediums nur noch 34 biofilm-positive Stämme (48.57%), 36 (51.43%) waren biofilm-negativ. Im Vergleich zu den Untersuchungen mit TSB_{BBL} war es somit zu einer Zunahme der biofilm-negativen Stämme gekommen (51.43 % vs. 27.14 %). Der prozentuale Anteil der starken Biofilmbildner nahm ab (15.71 % in TSB_{OXOID} gegenüber 44.29% in TSB_{BBL}), der der schwachen Biofilmbildner war größer (21.43% in TSB_{OXOID} gegenüber 12.86% in TSB_{BBL}). Der Anteil der mäßigen Biofilmbildner war mit 11.43% in TSB_{OXOID} gegenüber 15.71% in TSB_{BBL} relativ konstant geblieben (Tab. 14).

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist offenbar ein variables phänotypisches Charakteristikum. Dies geht aus dem Vergleich der Biofilmmengen, die ein einzelner Stamm in TSB_{BBL} im Vergleich mit TSB_{OXOID} zu produzieren in der Lage war, hervor (Abb. 14). 23 (67.65%) der 51 in TSB_{BBL} biofilm-positiven Stämme bildeten bei Kultur in TSB_{OXOID} einen schwächeren Biofilm. 17 Stämme (33.33%) waren in TSB_{OXOID} biofilm-negativ. 40 der 51 vormals biofilm-positiven Stämme veränderten also ihren Phänotyp deutlich (78.43%). Nur 11 Stämme zeigten keine Änderung dieses Merkmals (21.57%). Die in TSB_{BBL} biofilm-negativen Stämme blieben auch bei Kultur in TSB_{OXOID} biofilm-negativ.

Die Beeinflussung der Biofilmexpression in TSB_{OXOID} erfolgt unabhängig von der bei Kultur in TSB_{BBL} gebildeten Biofilmmenge (Tab. 16). Keine Gruppe der nach ihrer quantitativen Biofilmexpression in TSB_{BBL} eingeteilten *S. epidermidis*-Stämme bildete bei Kultur in TSB_{OXOID} bevorzugt einen schwächeren Biofilm aus oder wurden biofilm-negativ. Der prozentuale Anteil der in TSB_{BBL} stark, mäßig oder schwach biofilm-positiven Stämme, der in TSB_{OXOID} keine Veränderungen der Biofilm-Quantität zeigte, einen schwächeren Biofilm bildete oder biofilm-negativ wurde, ist annährend gleich (Tab. 16). Unter den gewählten Kulturbedingungen stellt die Biofilmbildung bei einem Teil der Stämme ein konstitutiv exprimiertes Merkmal, bei einem anderen Teil ein fakultativ exprimiertes Merkmal dar.

Aus den in Tab. 15 gezeigten Daten geht hervor, daß auch bei Kultur der *S. epidermidis*-Stämme in TSB_{OXOID} ein biofilm-positiver Phänotyp mit der Expression von PIA qualitativ assoziiert ist. Ebenso kam in diesem Medium die quantitative Assoziation von Biofilmbildung und PIA-Expression zur Darstellung (Abb. 15). Auffällig war im Vergleich zu den in TSB_{BBL} ermittelten Daten, daß in der Gruppe der starken Biofilmbildner bei einer Verdünnung der Bakterien-

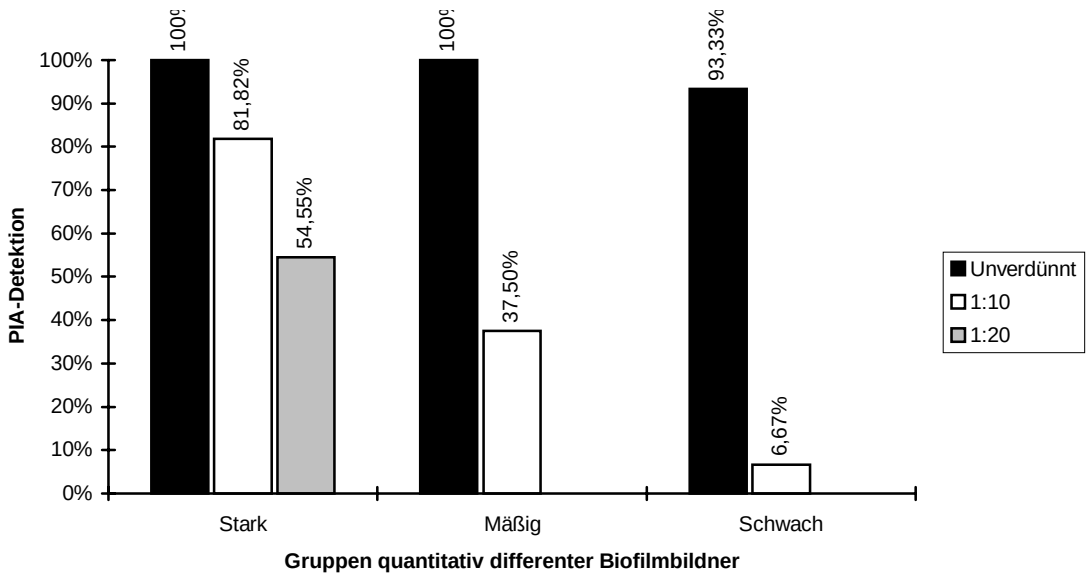

Abbildung 15: Gezeigt wird die positive Assoziation von Biofilm- und PIA-Expression bei Kultur der *S. epidermidis*-Stämme in TSB_{OXOID}. Auch hier war eine starke Biofilmbildung (OD_{570} >1.0) mit einer Koagglutination mit dem PIA-spezifischen Serum bis zu einer höheren Verdünnung möglich als bei mäßiger (OD_{570} <1.0>0.5) und schwacher (OD_{570} <0.5>0.1) Biofilmexpression. In den Gruppen der starken und mäßigen Biofilmbildner kam es bei Verdünnung der Zellsuspension im bei prozentual weniger Stämmen zu einer Koagglutination als bei Kultur in TSB_{BBL} (siehe hierzu auch Abb. 13).

Tabelle 16

Änderung der quantitativen Biofilmbildung in TSB_{OXOID} in Abhängigkeit vom Phänotyp bei Kultur in TSB_{BBL} (in TSB_{BBL} biofilm-positive *S. epidermidis* Stämme n = 51)

Quantitative Biofilm-bildung in TSB_{BBL} [a]	Biofilmbildung in TSB_{OXOID} im Vergleich zur Kultur in TSB_{BBL}: Anzahl der den jeweiligen Änderungsmodus aufweisenden Stämme [b]		
	unverändert [c]	schwächer [c]	Wechsel in biofilm-negativen Phänotyp [c]
Stark (n=31)	8 (25.81%)	13 (41.94%)	10 (32.26%)
Mäßig (n=11)	2 (18.18%)	6 (54.55%)	3 (27.27%)
Schwach (n=9)	1 (11.11%)	4 (44.44%)	4 (44.44%)

[a] Einteilung der *S. epidermidis*-Stämme anhand der quantitativen Biofilm-Expression ermittelt als OD_{570}; in Klammern Anzahl der Mitglieder in der jeweiligen Gruppe.

[b] In Klammern Angabe des prozentualen Werts bezogen auf die Gesamtzahl der entsprechenden Gruppe.

[c] OD_{570} in TSB_{OXOID} ± 20% des Wertes in TSB_{BBL} = unveränderte Biofilmbildung; OD_{570} in TSB_{OXOID} < 80% des Wertes in TSB_{BBL} = schwächere Biofilmbildung; OD_{570} in TSB_{OXOID} < 0.1, bei Kultur in TSB_{BBL} > 0.1 = Wechsel in biofilm-negativen Phänotyp

Suspension von 1:10 und 1:20 sowie in der Gruppe der mäßigen und schwachen Biofilmbildner bei einer Verdünnung von 1:10 bei einer prozentual kleineren Zahl von Stämmen eine Koagglutination erzielt werden konnte (Abb. 13 und 16).

Die Ursache hierfür könnte sein, daß es bei Kultur in TSB_{OXOID} bei einigen Stämme zu einer deutlichen Verringerung der Biofilmquantität kam, ohne das hieraus eine Neueinstufung in eine andere phänotypische Klasse der quantitativen Biofilmbildung resultierte. Ein Beispiel hierfür ist *S. epidermidis* 1457, welcher sowohl nach Kultur in TSB_{BBL} (OD_{570} 2.5) als auch bei Kultur in TSB_{OXOID} (OD_{570} 1.4) als stark biofilm-positiv eingestuft wurde. Dennoch kam es im Koagglutinations-Test nur noch zu einer Koagglutination bis zu einer Verdünnung von 1 : 10. Dies ist Hinweis auf einen direkten Zusammenhang zwischen verminderter Biofilmbildung und PIA-Synthese.

Tatsächlich wurden Änderungen der Biofilmmenge bei Kultur in TSB_{OXOID} parallel in einer gleichsinnigen Veränderung der exprimierten PIA-Menge reflektiert (Tab. 17). Bei 19 von 22 Stämmen (86.36%), die in TSB_{OXOID} einen schwächeren Biofilm bildeten, war im Koagglutinations-Test eine Koagglutination nur bis zu einer geringeren Verdünnungstufe als nach Kultur in TSB_{BBL} zu erzielen. Bei 16 der 17 Stämme (94.12%), die in TSB_{OXOID} keinen meßbaren Biofilm mehr ausbildeten, konnte keine Koagglutination mehr dargestellt werden. Sie wurden daher als PIA-negativ betrachtet. Lediglich der Stamm M187 machte hiervon eine Ausnahme. Er war trotz des Wechsels in einen biofilm-negativen Phänotyp bei Kultur in TSB_{OXOID} Koagglutinations-positiv, jedoch nur bis zu einer geringeren Verdünnung als bei analogem Experiment nach Kultur in TSB_{BBL}. Bei den 11 Stämmen, die keine Veränderung der Biofilmexpression zeigten, war eine Koagglutination in 8 Fällen (72.73%) bis zu der bei Kultur in TSB_{BBL} erreichten Verdünnungsstufe möglich.

Offenbar sind die beschriebenen Änderungen der quantitativen Biofilmbildung bei Änderung der Kulturbedingungen entscheident auf eine schwächere PIA-Expression zurückzuführen.

Daraus folgt, daß die PIA-Expression einer durch äußere Faktoren beeinflußbaren Regulation unterworfen ist, die zwischen den verschiedenen Stämmen variiert. Somit ist es einigen Stämmen möglich, auch dann noch PIA zu synthetisieren und einen Biofilm auszubilden, wenn dies für andere Stämme nicht mehr möglich ist.

Tabelle 17

Assoziation der Änderung von Biofilmmenge und PIA-Quantität bei Kultur in TSB_{OXOID} im Vergleich zur Kultur in TSB_{BBL} (*S. epidermidis* dort biofilm- und PIA-positiv; n = 50) [a]

PIA-Quant. in TSB_{OXOID} [b] im Vergl. zu TSB_{BBL}	**Biofilmmenge bei Kultur in TSB_{OXOID} im Vergleich zur Kultur in TSB_{BBL}**		
	Gleich [c] (n = 11)	Schwächer [c] (n = 22)	biofilm-negativ [c] (n = 17)
konstant [d]	8 (72.73%)	3 (13.04%)	0
geringer [d]	3 (27.27%)	19 (82.61%)	1 (5.88%)
größer [d]	0	0	-
nicht nachweisbar [d]	0	0	16 (94.12%)

[a] Nicht eingeschlossen der biofilm-positive, PIA-negative Stamm BK1222; Biofilm im Biofilm-Test als OD_{570} ermittelt.

[b] Ermittelt durch Koagglutination mit PIA-spezifischem Serum

[c] Gleich: OD_{570} wie in TSB_{BBL} +/- 20%; schwächer: OD_{570} < 80% des Werts als bei Kultur in TSB_{BBL}; negativ: OD_{570} < 0.1

[d] konstant: Koagglutination bis zur bei Kultur in TSB_{BBL} erreichten Verdünnungsstufe; schwächer: Koagglutination nur bis zu einer geringern Verdünnungsstufe als bei Kultur in TSB_{BBL}; nicht nachweisbar: keine Koagglutination; stärker: Koagglutination bis zu einer höheren Verdünnungsstufe als in TSB_{BBL}

3.2.2.3 **Änderung der quantitativen Biofilm- und PIA-Expression von *S. epidermidis*-Isolaten nach Supplementierung des TSB_{OXOID}-Mediums mit N-Acetylglucosamin (GlcNAc)**

Aus Kap. 3.2.2.2 geht hervor, daß Kulturbedingungen einen ausgeprägten Einfluß auf die Biofilmbildung und die PIA-Synthese haben können. Es wurde daher untersucht, ob die Supplementierung des TSB_{OXOID}-Mediums mit GlcNAc (einem wesentlichen Bestandteil von PIA) Auswirkungen auf die Biofilmbildung haben würde. Hierzu erfolgte die Durchführung des quantitativen Biofilm-Tests unter Verwendung von TSB_{OXOID} supplementiert mit 0.5% (wt / vol) GlcNAc.

Bei 35 Stämmen führte die Supplementierung des TSB_{OXOID}-Mediums mit 0.5% GlcNAc zu einer Änderung der Biofilmquantität. 16 Stämme waren unbeeinflußbar durch diese Maßnahme. Alle 19 in TSB_{BBL} wie auch TSB_{OXOID} biofilm-negativen Stämme blieben auch nach Supplementierung des Mediums biofilm-negativ. Bei 13 Stämmen konnte ein biofilm-induzierender, bei 18 Stämmen ein biofilm-verstärkender und bei 4 Stämme ein biofilm-abschwächender (einfache Abschwächung oder Übergang in einen biofilm-negativen Phänotyp) Effekt beobachtet werden (Tab. 18).

Ein verstärkender Effekt durch Supplementierung des Mediums mit 0.5% GlcNAc konnte auch in TSB_{BBL} beobachtet werden. Eine Induktion der Biofilmbildung von Stämmen, die in diesem Medium biofilm-negativ waren, gelang nicht (Daten nicht gezeigt).

Die Verstärkung der Biofilmexpression erfolgte sowohl bei Stämmen, die in TSB_{OXOID} einen quantitativ vergleichbaren Biofilm bildeten wie in TSB_{BBL}, als auch bei solchen, deren Biofilmquantität abgeschwächt worden war (Tab. 24 a, b, Seite 87). Die Zunahme der Biofilmquantität bei Stämmen, die in TSB_{OXOID} einen schwächeren Biofilm als in TSB_{BBL} bildeten, erfolgte in Form einer einfachen Verstärkung, eines Erreichens der OD_{570} wie bei Kultur in TSB_{BBL} oder aber der Bildung eines quantitativ über das Maß in TSB_{BBL} hinausgehenden Biofilms (Tab. 19, Tab. 24 b). Eine Verstärkung war unabhängig davon, ob es sich in TSB_{BBL} um einen stark, mäßig oder aber schwach biofilm-positiven Stamm handelte (Tab. 24 b).

Neben dem allgemein promovierenden Effekt des GlcNAc auf die Biofilmbildung konnte bei 13 der 17 (76.47 %) durch Kultur in TSB_{OXOID} in einen biofilm-negativen Phänotyp überführten Stämme durch GlcNAc-Supplementierung der biofilm-positive Phänotyp restituiert werden (Tab. 18). 8 Stämme (61.54%) erreichten hierbei nicht den bei Kultur in TSB_{BBL} erzielten, photometrischen Absorptionswert im Biofilm-Test. Dies war nur bei 4 Stämmen (30.77%) der Fall (Tab. 19). In nur einem Fall (7.69%) kam es zu einer Zunahmen des Biofilms über das bei

Tabelle 18

Einfluß von GlcNAc auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* Stämmen mit veränderter Biofilmquantität in TSB_{OXOID}

Änderungsmodus	**Anzahl der Stämme (n = 40)**
Induktion [a]	13 (32.5%)
Verstärkung [a]	18 (45%)
Abschwächung [a]	4 (10%)
keine Änderung [b]	5 (12.5%)

[a] Induktion = Wechsel in biofilm-positiven Phänotyp; Verstärkung = OD_{570} nach Supplementierung 20% größer als in nicht-supplemntiertem Medium; Abschwächung = OD_{570} < 80% des Wertes in TSB_{OXOID} oder Übergang in biofilm-negativen Phänotyp

[b] keine Änderung = OD_{570} in TSB_{OXOID} +/- 20% des Wertes in TSB_{BBL}

Tabelle 19

Biofilmexpression in GlcNAc-supplementiertem TSB_{OXOID} im Vergleich zu TSB_{BBL} (*S. epidermidis* Stämme, deren Biofilmbildung verstärkt wird oder die biofilm-positiv werden; n = 31)

Änderungsmodus nach GlcNAc-Suppl.	**Biofilmquantität nach Supplementierung [a] im Bezug auf den Wert in TSB_{BBL}**		
	kleiner [c]	gleich [c]	größer [c]
Induktion [b] (n = 13)	8 (61.54%)	4 (30.77%)	1 (7.69%)
Verstärkung [b] (n = 18)	3 (16.67%),	5 (27.78%)	10 (55.56%)

[a] TSB_{OXOID} + 0.5% GlcNAc

[b] Induktion = Wechsel in biofilm-positiven Phänotyp; Verstärkung = OD_{570} nach Supplementierung 20% größer als in nicht-supplementiertem Medium

[c] kleiner = Wert nach Supplementierung < 80% des Wertes in TSB_{BBL}; gleich = Wert nach Supplementierung + / - 20% des Wertes in TSB_{BBL} ; größer = Wert nach Supplementierung > 120 % des Wertes in TSB_{BBL}

Kultur in TSB_{BBL} gemessene Maß hinaus. Die verbleibenden 4 Stämme (Tab. 24 e) änderten ihren biofilm-negativen Phänotyp nicht. Hierunter befanden sich auch 2 bei Kultur in TSB_{BBL} starke Biofilmbildner.

3.2.2.3.1 Nachweis von PIA bei durch GlcNAc-Supplementierung Biofilm-restituierten *S. epidermidis*-Stämmen

Unter Abschnitt 3.2.2.2 wurde dargestellt, daß unter den bei Kultur in TSB_{OXOID} biofilm-negativen Stämme kein PIA mittels des PIA-spezifischen Serum nachgewiesen werden konnte. Wurden diese Stämme in TSB_{OXOID} + 0.5% GlcNAc angezüchtet, so ließ sich bei allen Stämmen, deren biofilm-positiver Phänotyp hierdurch restituiert worden war, auch PIA durch Koagglutination wieder nachweisen. Die Expression von PIA läßt sich demnach durch GlcNAc-Supplementierung induzieren (Tab. 20). Ein stärkerer Biofilm war hierbei mit einer Koagglutination auch bei stärkerer Verdünnung verbunden (Daten nicht gezeigt). Die hier und unter Kap. 3.2.2.3 dargestellten Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis auf eine Abhängigkeit der Biofilmbildung von der PIA-Synthese. PIA-Synthese und Biofilmbildung müssen als durch äußere Faktoren beeinflußbare, fakultativ exprimierte phänotypische Charakteristika betrachtet werden.

Tabelle 20

Biofilmbildung und PIA-Expression nach Supplementierung von TSB_{OXOID} mit 0.5 % GlcNAc

Biofilm-Phänotyp [a]	**PIA-Nachweis** [b]	
	positiv	negativ
biofilm-positiv (n = 13) [c]	13 (100 %)	0
biofilm-negativ (n = 4) [d]	0	4 (100 %)

[a] Ermittlung im Biofilm-Test nach Supplementierung mit 0.5% GlcNAc

[b] Darstellung durch Koagglutination mit PIA-spezifischem Antiserum (Koagglutinations-Test); [c] $OD_{570} > 0.1$; [d] $OD_{570} < 0.1$

3.2.3 Assoziation von *icaADBC*-positivem Genotyp und der Fähigkeit zur PIA-Expression und Biofilmbildung durch *S. epidermidis*-Stämme bei Kultur in TSB_{BBL}

Die unter Kap. 3.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß der *ica*-Genlocus ein Enzymsystem codiert, welches essentiell an der PIA-Synthese beteiligt ist. Die Ergebnisse unter 3.2 machen deutlich, daß PIA maßgeblich an der Biofilmbildung durch *S. epidermidis* beteiligt ist und beide Merkmale einer differentiellen Expression unterliegen. Im folgenden sollte untersucht werden, in welcher Verbindung ein *icaADBC*-positiver Genotyp mit PIA-Synthese und Biofilmbildung in einer Population klinischer *S. epidermidis*-Isolate steht.

Unter den untersuchten 70 *S. epidermidis*-Stämmen waren bei Kultur in TSB_{BBL} 51 biofilm-positiv, 98.04% hiervon produzierten PIA in nachweisbarer Menge (Kap. 3.2.2.2). Bei 50 dieser 51 Stämme (98.04%) war bei Hybridisierung mit *icaADBC*-spezifischen Sonden der *ica*-Genlocus zweifelsfrei nachweisbar (Tab. 21). Im Fall des schwach biofilm-positiven Stamms BK10331 wurde mit keiner der eingesetzten Sonden ein Signal gefunden und dieser Stamm daher als *icaADBC*-negativ betrachtet. Der schwach biofilm-positive Stamm BK1222, der im Koagglutinations-Test keine Reaktivität aufwies, war *icaADBC*-positiv. Mit wenigen Ausnahmen ist demnach bei Nachweis eines PIA- und biofilm-positiven Phänotyps *in vitro* der Rückschluß auf einen *icaADBC*-positiven Genotyp möglich. Die determinierende Funktion des *ica*-Genlocus bezüglich eines PIA- und biofilm-positiven Phänotyps wird dadurch unterstrichen, daß 12 der 13 *icaADBC*-negativen Stämme (92.31%) bei Kultur in TSB_{BBL} auch biofilm- und PIA-negativ waren.

In der Gruppe der 19 PIA- und biofilm-negativen Stämme ließ sich in 7 Fällen (36.84%) der *ica*-Genlocus durch Hybridisierung nachweisen. Die weiteren 12 biofilm-negativen *S. epidermidis*-Stämme waren auch *icaADBC*-negativ (Tab. 21). Dasselbe gilt für die biofilm-negativen *S. hominis* RP14 und SP2. Insgesamt waren 12.28% der 57 *icaADBC*-positiven Stämme biofilm-negativ. Die Assoziation von biofilm-positivem Phänotyp ließ sich auch bei Betrachtung der TSB_{OXOID} erhobenen Daten finden (Tab. 21): 33 der 34 biofilm-positiven *S. epidermidis* waren auch *icaADBC*-positiv. Im Vergleich zu TSB_{BBL} ist der Anteil der biofilm-negativen, jedoch *icaADBC*-positiven Stämme deutlich größer (Tab. 21).

Ein bei Kultur der Stämme in TSB_{BBL} oder TSB_{OXOID} *in vitro* PIA- und biofilm-negativer Phänotyp läßt damit nicht den Rückschluß auf ein Fehlen des *ica*-Genlocus zu. Die IcaADBC-codierenden Gene konnten bei den gewählten Wachstumsbedingungen zwar als hinreichende Bedingung zur Biofilm- und PIA-Expression gefunden werden, ihr Nachweis war jedoch nicht definitiv hinweisend auf eine sichere Darstellbarkeit dieser Merkmale *in vitro*.

Tabelle 21

Assoziation von biofilm-positivem Phänotyp bei *S. epidermidis* und Nachweis des *icaADBC*-Genclusters

***icaADBC*-Nachweis**[b]	**Biofilm**[a]			
	Positiv (OD_{570} >0.1)		Negativ (OD_{570} < 0.1)	
	TSB_{BBL} n = 51	TSB_{OXOID} n = 34	TSB_{BBL} n = 19	TSB_{OXOID} n = 36
Positiv	50 (98.04%)	33 (97.05%)	7 (36.84%)	24 (66.67%)
Negativ	1 (1.96%)	1 (2.94%)	12 (63.16%)	12 (33.33%)

[a] Ermittelt mit Hilfe des Biofilm-Tests

[b] Darstellung durch Southern-Hybridisierung mit den Sonden $F_{SX}27$, $F_{EAS}10$ und $F_{EA}11$.

3.2.3.1 Assoziation von *icaADBC*-Genotypen und der differentieller Expression von Biofilm und PIA

PIA-Expression und Biofilmbildung unterliegen offenbar einer differentiellen Expression, so daß *icaADBC*-positive Stämme *in vitro* biofilm-negativ sein können. Es stellte sich die Frage, ob ein bestimmter *icaADBC*-Genotyp als Marker eines definierten Phänotyps gelten kann.

Entsprechend ihrer häufigen Frequenz dominieren Stämme des Klasse 1 Genotyps in den verschiedenen phänotypischen Gruppen sowohl bei Kultur in TSB_{BBL} wie auch TSB_{OXOID} (Tab. 22). Hierbei fanden sich Stämme der Klasse 1a und -1b sowohl in der Gruppe der starken, der mäßigen und der schwachen Biofilmbildner (Tab. 22). Das zahlenmäßige Verhältnis der Klassen 1a und 1b zueinander war sowohl bei Kultur in TSB_{BBL} wie auch TSB_{OXOID} in den Gruppen stark und schwach biofilm-positiven Stämme etwa gleich (stark 1.5 : 1, schwach 3.5 : 1), so daß keine Gesetzmäßigkeit in ihrem Nachweis darstellbar war. In der Gruppe der mäßig biofilm-positiven Stämme war bei Kultur in TSB_{BBL} das Verhältnis von Klasse 1a zu Klasse 1b ausgeglichen (1.5 : 1). Bei Kultur in TSB_{OXOID} überwog die Klasse 1b (Verhältnis Klasse 1b : Klasse 1a = 2.5 : 1). In der Gruppe der biofilm-negativen Stämme überwog der Klasse 1a Genotyp über den Klasse 1b Genotyp (5 : 0).

Alle 7 Mitglieder Klasse 2 Genotyps bilden im Biofilm-Test einen starken Biofilm. Da ihr Anteil an allen biofilm-positiven Stämmen 17.07 % beträgt, sie aber 22.58 % aller stark biofilm-positiven Stämme stellen, scheinen sie präferentiell eher einen starken Biofilm zu exprimieren.

Ein Stamm des Klasse 3-Genotyps (BK7486) war biofilm-positiv. Zwei Stämme des Klasse 3-Genotyps präsentierten sich als biofilm-negativ.

Zusammengenommen exprimieren die Stämme des Klasse 2 Genotyps in beiden Medien tendentiell eher einen starken Biofilm, Stämme des Klasse 3-Genotyps sind häufiger biofilm-negativ. In TSB_{OXOID} bilden die Stämme der Klasse 1b häufiger als die Klasse 1a einen mäßig starken Biofilm. Insgesamt jedoch zeigen die Ergebnisse, daß beim Vorliegen eines bestimmten *icaADBC*-Genotyps kein sicherer qualitativer wie auch quantiativer Rückschluß auf Biofilmbildung und die PIA-Expression *in vitro* möglich ist.

Bei Kultur in TSB_{OXOID} bildeten als Ausdruck einer differentiellen PIA-Expression nur noch 34 der 70 getesteten Stämme einen Biofilm. Es sollte untersucht werden, ob differentielle PIA-Expression und Biofilmbildung mit dem Nachweis eines bestimmten *icaADBC*-Genotyps verbunden ist.

Unter den 34 in TSB_{OXOID} biofilm-positiven Stämmen konnte in 33 Fällen (97.06%) das charakteristische Bandenmuster des *icaADBC*-Genclusters nachgewiesen werden (Tab. 21). Dies war auch bei 24 der 36 (66.67%) der in TSB_{OXOID} biofilm-negativ Stämme möglich (Tab. 21).

Die *S. epidermidis*-Stämme zeigten in Abhängigkeit von ihrem Genotyp in unterschiedlicher Weise eine Empfindlichkeit der quantitativen Biofilmexpression bei Kultur in $TSB_{OXOID,}$ (Tab. 23, Tab. 24 a-d, Seite 87), wodurch es zu einer Verschiebung der relativen Häufigkeit der einzelnen Genotypen in den Gruppen von Stämmen unterschiedlicher Biofilmbildung kam (Tab. 22). Eine Änderung der quantitativen Biofilmexpression trat vor allem in der genotypischen Klasse 1 auf (35 von 42 Stämmen [83.33%]), wobei die Subgruppen 1a (24 von 27) und b (11 von 15) gleichermaßen betroffen waren (88.89% resp. 73.33%). In den Klassen-1a und 1b kam es zu einer einfachen Abnahme der Biofilmquantität (1a in 13 / 27 Fällen entspr. 48.15%; 1b in 6 / 15 Fällen entsprechend 40%) wie auch zu einem Wechsel in einen biofilm-negativen Phänotyp (1a in 11 / 27 Fällen entsprechend 40.74%; 1b in 5 Fällen entsprechend 33.33%). Der Biofilm-abschwächende Effekt des TSB_{OXOID} wirkt demnach in der Klasse 1 unabhängig von der genotypischen Subklasse.

Die Stämme der Klasse 2 zeigten keine so deutliche negative Beeinflussbarkeit der Biofilmbildung durch die Änderung der Kulturbedingungen wie die Stämme des Klasse 1 Genotyps (Tab. 23): 4 der 7 Stämme (57.14%) behielten ihren in TSB_{BBL} erreichten Wert im Biofilm-Test bei. 2 Stämme exprimierten einen schwächeren Biofilm (28.57%), ein Stamm (M187) wurde biofilm-negativ (14.29%).

Zusammengefaßt scheint der Klasse 2 Genotyp unabhängig vom gewählten Medium konstanter biofilm-positiv *in vitro* zu sein, während die Stämme des Klasse 1-Genotyps eher ein Kontinuum von starker bis zu völlig fehlender PIA- und Biofilm-Expression darstellten. Da die Stämme mit Klasse 2 Genotyp nur in geringer Zahl gefunden wurden, ist die Signifikanz dieser Beobachtung nicht gesichert.

Tabelle 22

Verteilung der distinkten *icaADBC*-Genotypen in der Population von *S. epidermidis*-Isolaten

	Biofilmbildung [a]							
Genotyp[c]	Stark [b]		Mäßig [b]		Schwach [b]		negativ [b]	
	TSB_{BBL} n = 31	TSB_{OXOID} n = 11	TSB_{BBL} n = 10	TSB_{OXOID} n = 7	TSB_{BBL} n = 9	TSB_{OXOID} n = 15	TSB_{BBL} n = 7	TSB_{OXOID} n = 24
Klasse 1 a	14 (45.16%)	3 (54.55%)	6 (60%)	2 (28.57%)	7 (77.78%)	11 (73.33%)	5 (71.43%)	16 (66.67%)
b	10 (32.26%)	2 (18.18%)	3 (30%)	5 (71.43%)	2 (22.22%)	2 (13.33%)	0	5 (20.83%)
Klasse 2 a	6 (19.35%)	5 (45.45%)	0	0	0	0	0	1 (4.17%)
b	1 (3.23%)	1 (9.09%)	0	0	0	0	0	0
Klasse 3	0	0	1 (10%)	0	0	2 (13.33%)	2 (28.57%)	2 (8.33%)

[a] Ermittelt im Biofilm-Test

[b] Einteilung anhand der OD_{570} im Biofilm-Test

[c] Einteilung anhand der Restriktionsvariabilität des *icaADBC*-Genclusters für *Eco*RI, *Hind*III, *Msp*I und *Xba*I.

Tabelle 23

Assoziation von *ica*-Genotyp und Änderung der Biofilmquantität bei Kultur in TSB_{OXOID}

Genotyp	**Modus der Biofilmänderung bei Kultur in TSB_{OXOID}**		
	biofilm-negativ [a]	schwächer [a]	keine Änderung [a]
Klasse 1 (n = 42)	16 (38.09%)	19 (45.23%)	7 (16.66%)
Klasse 2 a (n = 7)	1 (14.28%)	2 (28.57%)	4 (57.14%)

[a] Prozentangaben beziehen sich auf Zahl der Mitglieder der jeweiligen Klasse

Tabelle 24

Übersicht über *icaADBC*-positive *S. epidermidis*-Stämme und ihr Biofilmbildung bei Kultur in TSB_{BBL}, TSB_{OXOID} und TSB_{OXOID} + 0.5 % GlcNAc

a) Stämme, deren OD_{570} bei Kultur in TSB_{OXOID} > 80% des Werts in TSB_{BBL} ist.

		Biofilm in		
Stamm	**Genotyp**	TSB_{BBL}	TSB_{OXOID}	TSB_{OXOID} + 0.5%GlcNAc
BK8188	2a	2,4	2,4	2,4
BK7874	2a	2,26	2,3	1,4
RP62A	2a	2,0	2,5	2,5
8400	2b	1,9	1,4	2,4
O-47	2a	2,1	1,9	2,0
SE5	1a	1,8	1,8	2,5
BK10160	1b	1,58	2,5	2,29
VA13449	1b	1,19	1,58	2,25
RP12	1a	0,6	0,43	1,4
BK7415	1b	0,55	0,85	2,5
BK7378	1b	0,47	0,73	2,5
BK7501	1a	0,06	0,02	0,04
BK10333	3	0,07	0,01	0,01
BK 5179	3	0,05	0,04	0,01
BK8669	1a	0,04	0,03	0,01
BK 472	1a	0,02	0,02	0,02
ZK560	1a	0,01	0,01	0,03
BK7873	1a	0,01	0,02	0,01

b) Stämme, deren OD_{570} bei Kultur in TSB_{OXOID} abnimmt; bei Suppl. mit 0.5% GlcNAc mind. Verdopplung oder aber > 80% des Werts als bei Kultur in TSB_{BBL}

		Biofilm in		
Stamm	**Genotyp**	TSB_{BBL}	TSB_{OXOID}	TSB_{OXOID} + 0.5%GlcNAc
1457	2a	2,5	1,4	2,2
BK 10730	1b	2,3	0,67	1,44
9142	1b	2,3	0,88	2,5
BK10590	1b	2,2	0,66	2,01
BK11935	1a	2,1	0,58	1,96
BK 10248	1a	2,1	1,37	2,5
VA 4386	1a	1,15	0,27	0,82
BK 941	1b	1,04	0,11	0,77
BK11808	1a	0,95	0,18	1,21
ZK 1540	1b	0,52	0,11	1,25
ZK 1891	1a	0,39	0,1	0,5
BK1535	1a	0,29	0,15	0,69

c) Stämme, deren OD_{570} bei Kultur in TSB_{OXOID} abnimmt; bei Suppl. mit 0.5% GlcNAc nicht verstärkt (keine Verdopplung der OD_{570} oder OD_{570} < 80% Werts bei Kultur in TSB_{BBL} erreicht)

		Biofilm in		
Stamm	**Genotyp**	TSB_{BBL}	TSB_{OXOID}	TSB_{OXOID} + 0.5%GlcNAc
BK11063	2a	2,01	1,39	1,25
BK521	1a	1,74	0,1	0,1
BK 10008	1a	1,38	0,54	0,78
ZK 178	1a	1,3	0,18	0,47
BK939	1b	1,04	0,32	0,25
BK7486	3	0,84	0,1	0,05
BK8679	1a	0,84	0,35	0,22
BK1222	1a	0,15	0,10	0,1
BK9909	1a	0,63	0,15	0,06
BK942	1a	0,25	0,13	0,02

d) Stämme, die bei Kultur in TSB_{OXOID} biofilm-negativ werden; bei Suppl. mit 0.5% GlcNAc Induktion der Biofilmexpression

		Biofilm in		
Stamm	**Genotyp**	TSB_{BBL}	TSB_{OXOID}	TSB_{OXOID} + 0.5%GlcNAc
M187	2a	2,39	0,05	1,03
ZK 1815	1a	2,17	0,06	0,17
ZK1516	1a	2,1	0,08	0,46
ZK1217	1a	1,85	0,06	0,23
BK1057	1a	1,26	0,08	1,03
ZK685	1a	1,23	0,03	0,27
VA12368	1b	1,15	0,06	0,1
ZK1334	1a	1,03	0,05	0,95
ZK 122	1a	0,93	0,02	0,5
ZK1443	1b	0,83	0,07	0,2
BK10094	1a	0,73	0,05	0,6
BK10993	1a	0,26	0,06	0,31
ZK4417	1b	0,19	0,06	0,79

e) Stämme, die bei Kultur in TSB_{OXOID} Biofilm-negativ werden und bei Suppl. mit 0.5% GlcNAc Biofilm-negativ bleiben

		Biofilm in		
Stamm	**Genotyp**	TSB_{BBL}	TSB_{OXOID}	TSB_{OXOID} + 0.5%GlcNAc
BK 9209	1b	2,3	0,01	0,07
BK10691	1b	1,03	0,07	0,07
ZK1603	1a	0,41	0,05	0,04
BK429	1a	0,17	0,07	0,05

3.3 Restriktionskartierung von in ihrer Fähigkeit zur Biofilm- und PIA-Expression beeinträchtigten Transposoninsertionsmutanten des *S. epidermidis*-Stamms 1457

Die unter 3.2.2 dargestellten Ergebnisse machen deutlich, daß die Expression eines PIA- und biofilm-positiven Phänotyps durch eine *icaADBC*-codiertes Enzymsystem in einer Population klinischer *S. epidermidis*-Isolate ein heterogenes, in Abhängigkeit von äußeren Faktoren differentiell exprimiertes Merkmal ist. Diese differentielle Expression scheint unabhängig von einem, auf im wesentlichen außerhalb der IcaADBC-codierenden Sequenz determinierten, RFLP zu sein. Die Vermutung, daß andere Genorte direkten oder indirekten Einfluß auf PIA- und Biofilm- Expression haben, liegt daher nahe. Mack *et al*. (2000) konnten durch Transposonmutagenese mit Tn*917* verschiedene, in ihrer Fähigkeit zur Biofilm- und PIA-Synthese beeinträchtigten Mutanten des stark PIA- und biofilm-positiven Wildtypstamms 1457 isolieren, die sich durch ihre phänotypischen Charakteristika in die Klassen I -V einteilen lassen (Tab. 7). Ziel der weiteren Untersuchung war es, durch Kartierung der durch die Tn*917*-Insertion markierten Genorte für PIA-Expression und Biofilmbildung bedeutsame Genorte zu charakterisieren und von *icaADBC* abzugrenzen.

3.3.1 Analyse der Mutanten der Klasse I - V durch Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Analyse der Transposon-Insertionsorte durch PFGE und Hybridisierung (Abb. 16b) mit *Tn917/3´* zeigte, daß die zu den Mutanten M13 und M22 (Klasse I) führenden Tn*917*-Insertionen auf einem identischen 60 kb *Sma*I-Fragment gelegen sind. Die zu den weiteren Mutanten führenden Tn*917*-Insertionen sind bei M12 (Klasse II) auf einem 40 kb, bei M15 und M19 (Klasse III) auf einem 97 kb sowie bei M17 (Klasse IV) auf einem 40 kb großen Fragment gelegen. Die Insertion auf unterschiedlichen *Sma*I-Fragmenten zeigte sich auch auf dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel (Abb. 16a): bei den Mutanten M12 und M17 erfolgten die Tn*917*-Insertionen auf 40kb *Sma*I-Fragmenten, die bei den Mutanten der Klassen I und II nicht getrennt werden, wodurch in diesem Bereich eine in der Intensität etwas hervorgehobene Bande erscheint. Bei M12 kommt es zu einer verringerten Mobilität dieser Doppelbande, während bei M17 zwei distinkte Banden auftreten. Dies ist hinweisend darauf, daß die die jeweiligen Transposon-Insertionen auf unterschiedlichen *Sma*I-Fragmenten gelegen sind.

Die Ergebnisse der PFGE zeigen, daß in den Mutanten durch Inaktivierung distinkter Genloci eine Abnahme der Biofilmquantität, der Wechsel in einen vollständig biofilm-negativen Phänotyp (Klassen I - IV) oder der Übergang in einen mucoid-negativen Phänotyp (Klasse V) induziert wird.

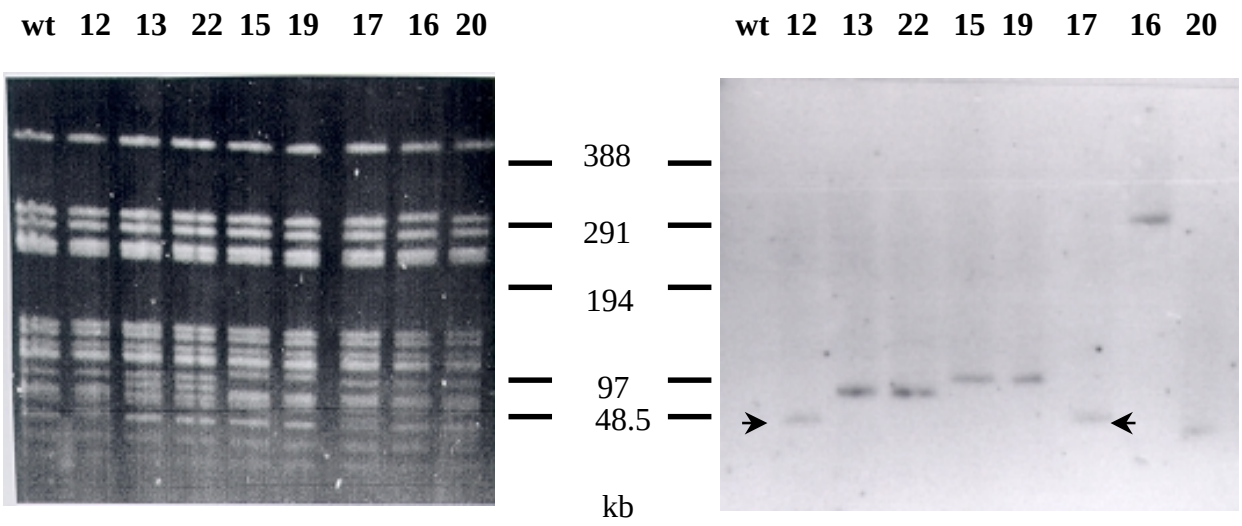

Abbildung 16:

PFGE-Analyse *Sma*I-geschnittener DNA des biofilm-positiven *S. epidermidis* 1457 sowie der Transposonmutanten M12 (Klasse II), M13 und M21 (Klasse I), M15 und M19 (Klasse III), M17 (Klasse IV) und M16 und M20 (Klasse V).**a)** Ethidiumbromid gefärbtes Gel; **b)** Autoradiographie nach Southern-Hybridisierung mit der Tn*917*-spezifischen, [^{32}P]dCTP-markierten Sonde Tn*917/3´*.

Dünne Pfeile: 40 kb Fragment M12 / M17

3.3.2 Restriktionskartierung der Transposonmutanten der Klassen I - V

Hybridisierung *Eco*RI-gespaltener DNA der Mutanten Klasse I mit $F_{XH}27$ (Abb. 17a) ergab, daß bei diesen Stämmen die Transposoninsertionen im *ica*-Genlocus erfolgt waren, entweder auf dem proximalen, 3.0 kb großen *Eco*RI-Fragment (M13, M24), oder auf dem distalen, 6.3 kb großen *Eco*RI-Fragment (M21 - M23). Durch Hybridisierung mit Tn*917/3´* (Abb. 17b) konnte gezeigt werden, daß bei allen Mutanten dieser Klasse eine singuläre Transposoninsertion zur Phänotypänderung geführt hatte. Durch die Spaltung mit *Xba*I-, *Hin*dIII- und *Bgl*II konnte die Lokalisation der einzelnen Transposoninsertionen im *ica*-Genlocus genauer bestimmt werden: Während die Insertionen bei den Mutanten M13 und M24 in *icaA* lokalisiert sind, liegen sie bei M22 und M23 vermutlich in *icaC* (Abb. 19a). Die zur Mutante M21 führende Transposoninsertion liegt vermutlich am äußersten 3´-Ende von *icaC*. Durch Restriktionskartierung kann nicht sicher ausgeschlossen werden, daß die Tn*917*-Insertion distal hiervon außerhalb des *ica*-Genlocus gelegen ist. Die relative Transcriptionsrichtung von *erm* nach Insertion entsprach der des *ica*-Genlocus (M13, M21 - M23) oder war in der entgegengesetzten Richtung orientiert (M24). Die errechneten Fragmentgrößen nach *Eco*RI- , *Hind*III- und *Xba*I-Spaltung (Tab. 25) ergaben bei allen Mutanten der Klasse I nach Abzug des Transposons Werte, die annährend denen der Wildtyp-Fragmente entsprachen. Daher könne ausgedehntere Deletionen als mögliche Folge des Insertionsprozesses als ausgeschlossen gelten.

Bei den Mutanten der Klasse II - V waren die beiden *icaADBC*-umfassenden *Eco*RI-Fragmente unverändert nachweisbar (Abb. 17a). Die zu diesen Mutanten führenden Transposoninsertionen müssen damit außerhalb dieses Genorts liegen. Auch bei ihnen hatte eine einzelne Tn*917*-Insertion die Phänotypänderung induziert (Abb. 17b).

Die exakte Kartierung der Transposoninsertionsorte bei den Mutanten M15 und M19 zeigte, daß in beiden Fällen eine Insertion in engster Nachbarschaft erfolgt war. Ansonsten ließen sich keine Übereinstimmungen in der Restriktionskartierung zwischen den einzelnen Mutanten finden, sie sind demnach unabhängig voneinander (Tab. 26, Abb. 17, Abb. 19). Dies gilt auch für die Mutanten M12 und M17, bei denen eine genetische Trennung nach den Ergebnissen der PFGE nicht endgültig sicher möglich war.

Zusammenfassend läßt sich daher feststellen, daß weitere, vom *ica*-Genlocus unabhängige Genorte PIA-Expression und Biofilmbildung beeinflussen (Klasse II, Klasse III, Klasse IV). Zudem können die Merkmale Biofilm- und Mukoidbildung genetisch voneinander getrennt werden (Klasse V).

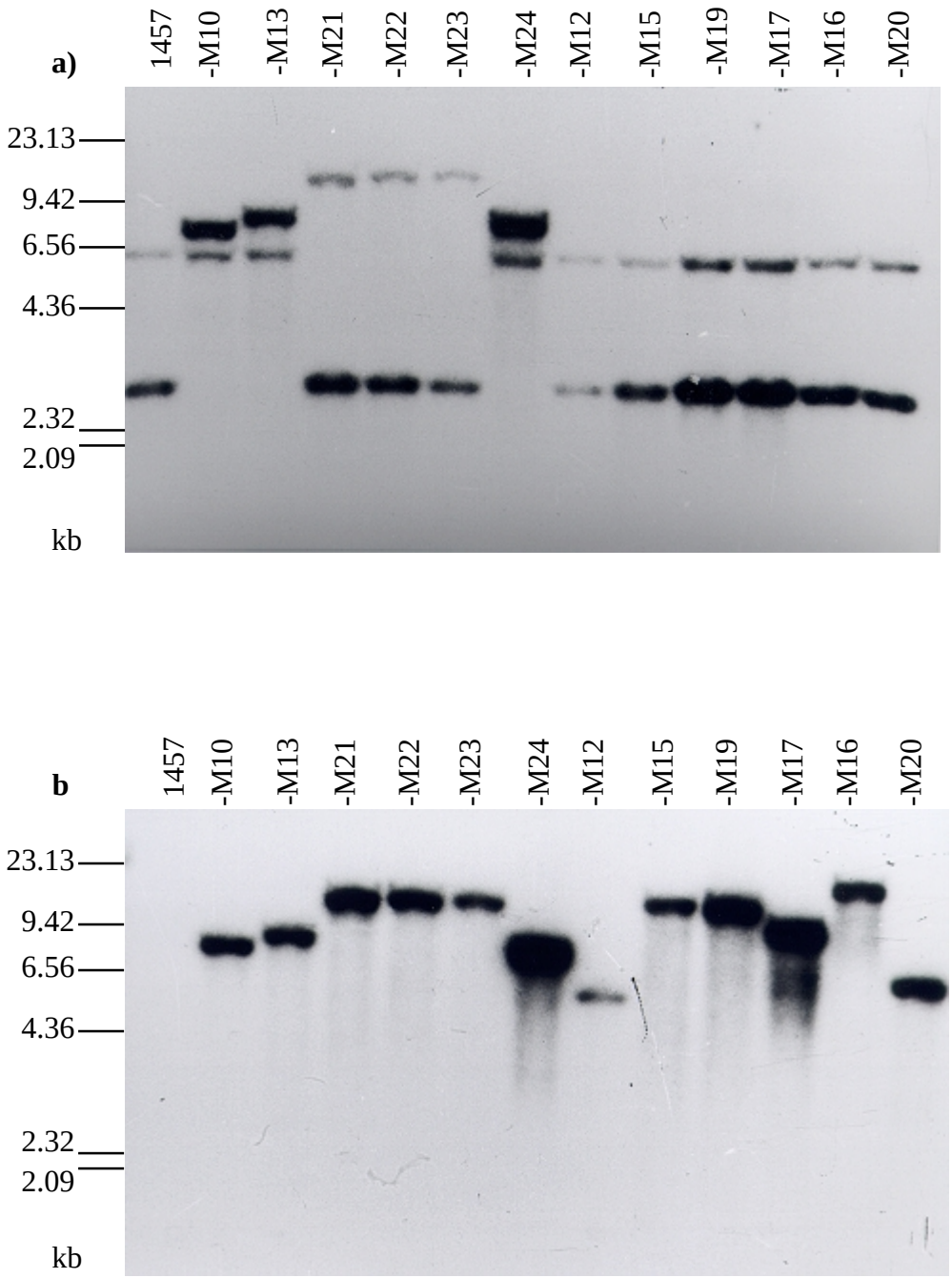

Abbildung 17: Unter **a)** die Hybridisierung eines Blots chromosomaler DNA des Stamms 1457 sowie der aus ihm abgeleiteten Tn*917*-Insertionsmutanten mit der [^{32}P]dCTP-markierten Sonde $F_{XH}27$, unter **b)** derselbe Blot mit der Sonde *Tn917/5´*. Die zu den Mutanten der Klasse 1 führenden Transposon-Insertionen sind im Bereich des *ica*-Genlocus lokalisiert (Verlust des 3kb resp. 6.3kb großen wt-Fragments in A). Diese Fragmente sind bei den weiteren Mutanten unverändert nachweisbar (Abb. A), das Transposon hat bei ihnen an einem von *icaADBC* distinkten Ort inseriert (Abb. B).

Tabelle 25

Restriktionsanalyse chromosomaler DNA der Stämme der Mutantenklasse I

Stamm	**Fragmentgrößen nach Endonucleaserestriktion (kb)**			
	*Eco*RI	*Hind*III	*Xba*I	*Bgl*II
1457 [+]	3.0, 6.3	8.7	4.3, 7.6	ca. 20
M13	2.8 [*] [§]	5.7 [*] 8.5 2.8 [§]	4.2 [*] 4.3 0.1 [§]	15.4 [*] 20 4.6 [§]
M21	6.4 [*] [§]	0.4 [*] 2.1 1.9 [§]	3.4 [*] 7.5 4.1 [§]	18.4 [*] 20 1.6 [§]
M22	6.4 [*] [§]	8.5 [*] 8.8 0.3 [§]	2.6 [*] 7.5 4.9 [§]	17.9 [*] 20 2.1 [§]
M23	6.4 [*] [§]	8.7 [*] 8.8 0.1 [§]	2.9 [*] 7.5 4.6 [§]	18.1 [*] 20 1.9 [§]
M24	2.9 [*] [§]	4.9 [§] 7.3 2.4 [*]	7.5 [*] 7.5 0.1 [§]	15.4 [§] 20 4.6 [*]

Gezeigt sind die Restriktionsfragmentgrößen der Mutanten der Klasse I abzüglich der Transposonanteile. Die nach Abzug der Transposonanteile errechneten Größen der getroffenen Fragmente stimmt mit der zu erwartenden Größe von 1457 annährend überein (in Spalte 3-5 = Summe der beiden entstandenen Einzelfragmente).

[*] Fragment grenzt an das 5´-Ende des Transposons (dargestellt mit Tn*917/5´*)

[§] Fragment grenzt an das 3´-Ende des Transposons (dargestellt mit Tn*917/3´*)

[+] Fragmente von 1457 dargestellt mit *Ec*10, *Ec*11 und $F_{XH}27$

Tabelle 26

Restriktionsanalyse chromosomaler DNA der Stämme der Mutantenklassen II - V

Restriktions-endonuclease	**Fragmentgrößen nach Restriktionsanalyse (kb)**							
	1457 [+]	Klasse II M12	Klasse III M15	Klasse III M19	Klasse IV M17	Klasse V M16	Klasse V M20	
*Eco*RI	3.0, 6.3	0.1[§] 0.4 0.3[*]	8.0[§] 8.9 0.9[*]	8.0[§] 8.9 0.9[*]	3.8[§] 4.2 0.4[*]	13.8[§] 14.4 0.6[*]	1.2[§ *]	
*Hin*dIII	8.7, 2.5	1.0[§] 1.72 0.72[*]	1.2[§] 1.8 0.6[*]	1.2[§] 1.8 0.6[*]	0.3[§] 3.3 3.0[*]	0.3[§] 1.8 1.5[*]	0.3[§] 11.1 10.8[*]	
*Xba*I	4.3, 7.6	0.15[§] 6.95 6.8[*]	7.7[§] 13.6 5.9[*]	7.1[§] 13.5 6.4[*]	1.5[§] 5.5 4.0[*]	2.0[§] 3.1 1.1[*]	1.1[§] 2.2 1.1[*]	
*Bgl*II	20	22.3[§] 25.4 3.1[*]	15.4[§] 24.57 9.3[*]	15.4[§] 24.57 9.3[*]	6.1[§] 9.8 3.7[*]	7.96[§] 23.8 15.8[*]	1.2[§] 10.9 9.7[*]	

Die Fragmentgrößen der Mutanten sind angegeben nach Abzug der Transposonnteile. Zum Vergleich dargestellt sind die den *ica*-Genlocus umfassenden Fragment von 1457, die bei den Mutanten alle in unveränderter Größe mit den Sonden *Ec*10, *Ec*11 und $F_{XH}27$ nachweisbar waren.

[§] Darstellung mit der Sonde Tn*917/3´*

[*] Darstellung mit der Sonde Tn*917/5´*

[+] Darstellung mit den Sonden *Ec*10, *Ec*11 und $F_{XH}27$

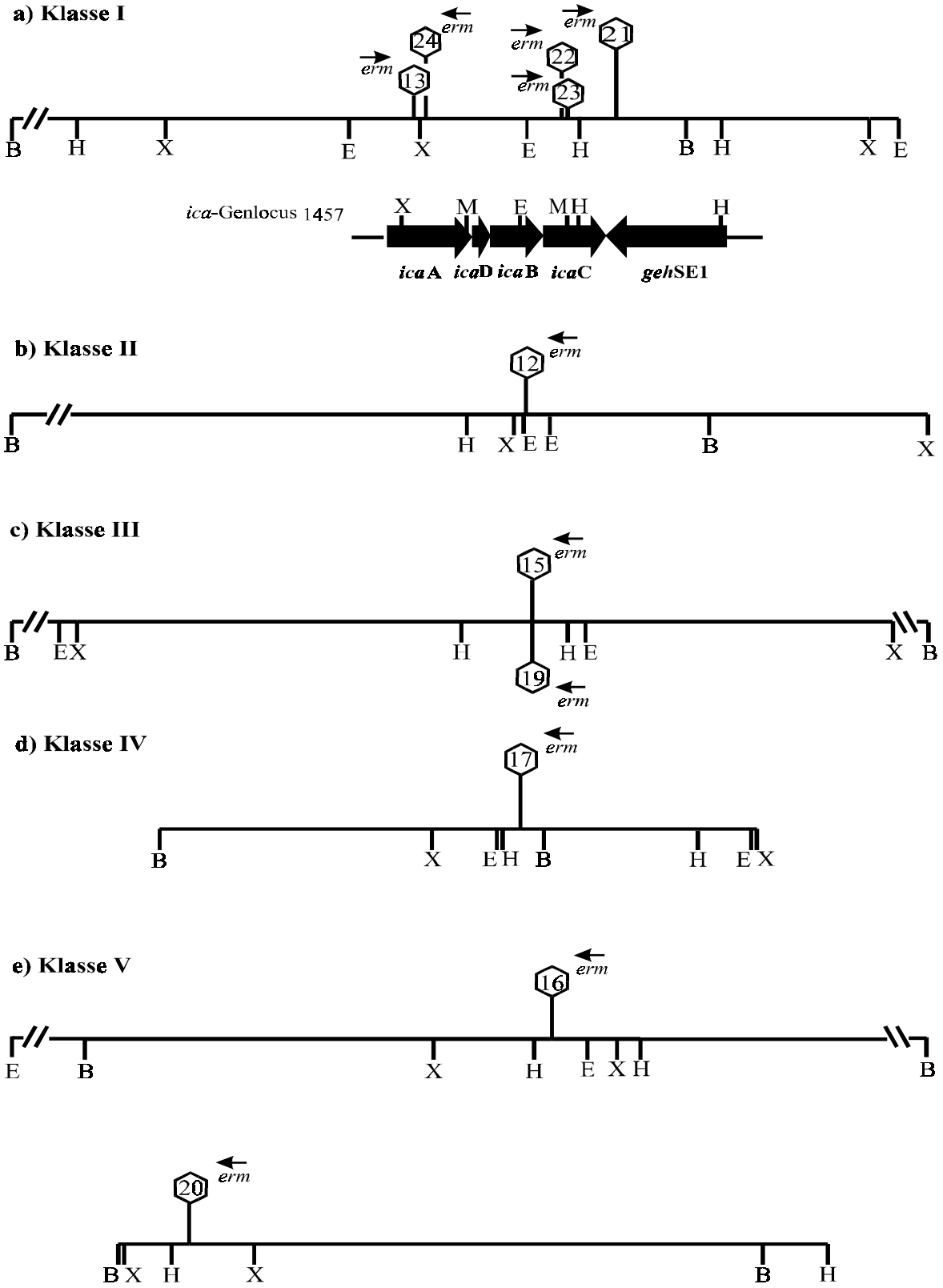

Abbildung 18: Gezeigt werden die Restriktionskartierungen der Mutantenklassen I - V. Die zu den phänotypischen Änderungen führenden *Tn917*-Insertionen liegen in von *icaADBC* distinkten Bereichen des Genoms von 1457. Die Mutanten M15 und M19 sind in engster Nachbarschaft, w enn nicht sogar identischen Orten gelegen.

A, *Ava*I; B, *Bgl*II, E, *Eco*RI , H, *Hind*III; M, *Msp*I; *erm* = Erythromycin-Resistenz, Pfeile zeigen die Transcriptionsrichtung von *erm*

4 Diskussion

Staphylococcus epidermidis ist in den letzten Jahren als herausragender Verursacher nosokomialer Infektionen, insbesondere im Zusammenhang mit in den Körper eingebrachten Fremdkörpern, erkannt worden. Dieses selektive pathogene Potential beruht auf der Fähigkeit von *S. epidermidis*, auf Oberflächen polymerer Kunststoffe und anderer Materialien einen Biofilm auszubilden. Dieses Organisationsprinzip ist insbesondere dadurch gekennzeichnet, daß im Anschluß an eine initiale Adhärenzphase, in welcher die Bakterien in Kontakt mit der zu besiedelnden Oberfläche treten, die Akkumulation in einen mehrschichtigen Zellverband erfolgt. In diesem werden die Zellen, die in keinem direkten Kontakt zur Oberfläche stehen, durch interzelluläre Adhäsion gehalten. Die interzelluläre Adhäsion wird entscheidend über das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin (PIA) realisiert (Mack, 1999b).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die bei den biofilm-negativen Tn*917*-Mutanten M10 und M11 inaktiverten Abschnitte des Bakterienchromosoms durch Restriktionskartierung und Sequenzierung näher charakterisiert. Die jeweiligen Tn*917*-Insertionsorte ließen sich durch Southern-Hybridisierung auf einem identischen, 13 kb großen *Hind*III-Fragment, jedoch differenten, 2.2 kb resp. 0.8 kb großen *Eco*RI-Fragmenten und 7.6 kb resp. 4.3 kb großen *Xba*I-Fragmenten lokalisieren (Abb. 4). Da die Inaktivierung der hier beschriebenen Genorte zu einem biofilm-negativen Phänotyp führt und die Mutanten nicht mehr zur Expression von PIA in der Lage sind, ist es wahrscheinlich, daß die hier kartierten Bereiche des Chromosoms von *S. epidermidis* 9142 eine grundlegende Funktion bei der Expression dieser phänotypischen Merkmale einnehmen. Tatsächlich fand sich in der Analyse der Transposon-flankierenden Sequenzen bei beiden Mutanten eine fast vollständige Übereinstimmung mit Sequenzabschnitten des *icaA*-Gens. Die Inaktivierung dieses Locus ist somit für die phänotypische Veränderung verantwortlich. Die genaue Position der zur Mutante M10 führenden Tn*917*-Insertion konnte bei Nucleotid 931 und die der Mutante M11 bei Nucleotid 87 in der IcaA-codierenden Sequenz des *ica*-Genlocus bestimmt werden (Abb. 4).

Der 3.4 kb umfassende *ica*-Genlocus wird durch vier als Operon organisierte Gene *A, D, B* und *C* mit übereinstimmender Transcriptionsrichtung gebildet. Der Start von *icaD* überlappt um 37 bp mit dem 3´-Ende von *icaA* und sein Stoppcodon ist 4 bp distal des *icaB*-Startcodons gelegen. Das Startcodon von *icaC* liegt 14 bp vor dem 3´-Ende von *icaB*. Distal des 3´-Endes von *icaC* ist eine rho-unabhängige Terminationssequenz lokalisiert. Die Organisation des Genclusters legt eine gekoppelte Transcription der einzelnen Gene nahe (Heilmann *et al*, 1996b; Gerke *et al*, 1998). *IcaA* codiert für ein etwa 412 Aminosäurereste großes Transmembranprotein, das Homologie mit

der N-Acetyltransferase von *Rhizobium meliloti* besitzt, *icaB* für ein etwa 289 Aminosäurereste umfassendes, vermutlich sezerniertes Protein und *icaC* für ein hydrophobes, integrales Membranprotein. Durch Frame-shift-Mutagenese von *icaA*, *icaB* und *icaC* konnte gezeigt werden, daß jedes dieser drei Gene essentiell für die PIA-Synthese notwendig ist (Heilmann *et al*., 1996a). Die Funktion der auf dem *icaADBC*-Gencluster codierten Proteine und ihr Beitrag zur PIA-Synthese konnte durch die Expression von *icaA* alleine, *icaA* gemeinsam mit *icaD* sowie *icaA* gekoppelt mit *icaD* und *icaC* in *S. carnosus* gezeigt werden. Hierbei war bei Expression von *icaA* nur eine schwache N-Acetyltransferase-Aktivität meßbar. Bei Expression von *icaAD* kam es zur Synthese von N-Acetylglucosamin-Oligomeren, bestehend aus etwa 20 Resten, die ausnahmslos acetyliert waren. Erst die Koexpression von *icaADC* induzierte die Bildung von *S. carnosus*-Zellaggregaten und eines mit dem PIA-spezifischen Antiserum reaktiven Produkts. Von diesem ist noch nicht bekannt, ob es sich hierbei tatsächlich um PIA in der oben beschriebenen Form oder einen auch schon immunoreaktiven Vorläuferstufen handelt. Die Rolle von *icaB* bleibt nach den vorliegenden Ergebnissen ungeklärt (Gerke *et al*., 1998).

Im Rahmen der Restriktionskartierungsuntersuchungen der Transposoninsertionsmutanten des Stamms 1457, die phänoypisch der Klasse I zugeordnet worden waren (Tab.7), konnte gefunden werden, daß die zu den Mutanten M13 und M22 - M24 führenden Transposoninsertionen ebenfalls im *icaADBC*-Gencluster lokalisiert sind. Bei Mutante M13 liegt sie im IcaA-codierenden, bei den Mutanten M22 - M24 im IcaC-codierenden Abschnitt (Abb.19 a). Wie schon durch Frame-shift-Mutagenese gezeigt (Heilmann *et al*., 1996a), führt die Inaktivierung von *icaA* oder *icaC* bei *S. epidermidis* 1457 zu einem PIA- und biofilm-negativen Phänotyp.

Es läßt sich bei den Transposon-induzierten Mutanten nicht sicher sagen, ob die Änderung des Phänotyps tatsächlich ausschließlich auf der Inaktivierung von *icaA* beziehungsweise *icaC* beruht, oder ob auch die Transcription der anderen Gene gestört wird. Es muß bedacht werden, daß alle vier Gene vermutlich über eine Transcriptionsinitiierung am Promoter vor *icaA* und Termination an der rho-unabhängigen Sequenz distal von *icaC* co-exprimiert werden (Heilmann *et al*.,1996a). Die meisten Insertionselemente blockieren die Transcription der distal der Insertionsstelle gelegenen Sequenzen via rho-abhängige oder rho-unabhängige Terminationsmechanismen (Galas und Chandler, 1989). Unter Umständen blockiert daher eine Transposon-Insertion die *ica*-Expression komplett (Insertion in *icaA* / M13) oder zumindest die der jenseits der Insertionstelle gelegenen Abschnitte (Insertion in *icaC* / M22 - M24). Ziebuhr konnte jedoch zeigen, daß die Transcription des *ica*-Genlocus durch Insertion von IS*256* in *icaA* nicht gestört und bei biofilm-negativen Stämmen mRNA, die mit *icaADBC*-spezifischen Sonden reagiert, synthetisiert wird

(Ziebuhr *et al*., 1999). Die Ursache des Funktionsverlustes muß bei den betroffenen Stämmen in einer Störung der Translation oder sogar einem strukturell veränderten Protein begründet sein.
Unabhängig vom zum funktionellen Defizit führenden Mechanismus zeigen die Mutanten mit einer singulären, definierten Mutation jedoch die Bedeutung des *ica*-Genlocus für die PIA-Expression und geben einen direkten Hinweis auf die entscheidende Rolle dieses Moleküls in der akkumulativen Phase der Biofilm-Bildung *in vitro*. Die primäre Bindung bleibt hierbei unbeeinflußt.
In zwei Tiermodellen konnte durch Vergleich von *S. epidermidis* 1457 und der biofilm-negativen Mutante 1457-M10 erstmals direkte Evidenz für die Bedeutung der Fähigkeit zur Biofilmbildung als wichtigem Pathogenitätsfaktor sowie die Rolle von PIA und des *ica*-Genlocus als dieses phänotypische Charakteristikum determinierendem Genort *in vivo* dargestellt werden. Hierbei zeigte sich in einem Mausmodell, in welchem den Tieren subcutan Plastikkatheter implantiert worden waren, daß der Wildtypstamm 1457 signifikant häufiger zur Bildung subcutaner Abzesse führte, signifikant seltener durch die wirtseigene Abwehr eradiziert werden konnte und stärker am Fremdkörper adhärierte (Rupp *et al*., 1999a). Des weiteren konnte gezeigt werden, daß in einem Modell für Infektionen im Zusammenhang mit zentralvenös lokalisierten Kathetern in der Ratte 1457 signifikant häufiger Katheter-assoziierte Infektionen auslösen konnte als die Mutante 1457-M10. Die Biofilmbildung auf dem Boden von *icaADBC*-vermittelter PIA-Synthese kann somit als ein wichtiger Virulenzfaktor von *S. epidermidis* gelten.
Interessant ist die Mutante M21, die sich insbesondere durch eine schwach erhaltene Fähigkeit zur PIA- und Biofilm-Expression sowie Haemagglutination in einer niedrigen Titerstufe auszeichnet (Mack *et al*., 2000). Sie kann daher mit den Mutanten mut2 und mut2a verglichen werden (Heilmann *et al*., 1996b). Mut2 und mut2a konnten in *S. epidermidis* O-47 durch Transposonmutagenese mit Tn*917* erzeugt werden. Mut2 zeichnet sich phänotypisch bei in Hinblick auf den Ursprungsstamm unveränderter Fähigkeit zur primäre Bindung und einer unveränderten Zelloberflächen-Hydrophobizität durch einen Verlust der Fähigkeit zur interzellulären Adhäsion sowie fehlende PIA-Synthese aus. Mut2a zeigt im Gegensatz zu mut2 keinen vollständigen Verlust der PIA-Expression, sie ist bei diesem Stamm nur signifikant gegenüber der von O-47 reduziert. (Heilmann *et al*., 1996b; Heilmann *et al*., 1998). Restriktionskartierungen und Sequenzierung der das Transposon von mut2 flankierenden Abschnitte des Genoms von O-47 ergaben, daß die zur Mutante mut2 führende Tn*917*-Insertion 48 bp stromaufwärts des Starts von *icaA* gelegen ist. Die Tn*917*-Insertion der Mutante mut2a wurde ca. 1 kb stromaufwärts des Starts von *icaA* lokalisiert (Heilmann *et al*.,1996b; Heilmann *et*

al., 1998). Während bei mut2 eine Zerstörung der Promotorstruktur des *icaADBC*-Genclusters (-35-Region, UP-Elemente) als Ursache der aufgehobenen PIA-Synthesefähigkeit und Biofilmexpression möglich erscheint, eine mittelbare Beeinflussung von *icaADBC* aber nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, ist eine direkte Wirkung der Transposon-Insertion bei mut2a ausgesprochen unwahrscheinlich. Zwei Mechanismen könnten im genannten Phänotyp von mut2a resultieren. Einerseits wäre es möglich, daß im Sinne eines polaren Effekts durch die Insertionen Änderungen der DNA-Topologie in größerem Umfang hervorgerufen werden, resultierend in veränderten Zugänglichkeit des *icaADBC*-Promotors für den Initiationskomplex. Dies kann negativen Einfluß auf die Transcription dieser Region haben (Sheehan *et al*., 1992). Auf der anderen Seite wäre es möglich, daß die vor dem *ica*-Genlocus gelegenen Genomabschnitte regulativ auf die Transcription von *icaADBC* wirksam werden. 165 bp vor dem Startcodon des *ica*-Genlocus ist *icaR* lokalisiert (Ziebuhr *et al*., 1999). *IcaR* umfaßt einen offenen Leserahmen von 557 bp. Da diesem Element *icaADBC*-regulative Aufgaben zugesprochen werden, ist der genannte Phänotyp von mut2a auch über eine Inaktivierung dieses Gens erklärbar.

Anhand der durch Restriktionskartierung erhobenen Daten ist die zu M21 führende Transposon-Insertion entweder am äußersten 3´-Ende von *icaC* oder aber knapp distal des 3´-Endes des *ica*-Genlocus gelegen. Bei Lokalisation der Transposoninsertion distal des 3´-Endes von *icaC* ist es möglich, daß auch die Expression der hinter dem *ica*-Genlocus codierten Genprodukte einen Einfluß auf die Transcription von *icaADBC* oder die Aktivität der hier codierten Enzymsysteme hat.

Distal von *icaC* ist bei RP62A das in einer im Vergleich zum *icaADBC*-Gencluster umgekehrten Transcriptionsrichtung orientierte *geh*SE1-Gen lokalisiert, welches für die *S. epidermidis*-Lipase codiert (Götz *et al*., 1998; Simons *et al*., 1998; Heilmann *et al*, 1996a) und einen hohen Homologiegrad zu *gehC* von *S. epidermidis* 9 aufweist (Farrell *et al*, 1993). g*ehC* umfaßt einen offenen Leserahmen von 2064 bp, so daß die zur Mutante M21 führende Transposon-Insertion innerhalb dieses Locus möglich ist. Einerseits könnte es sich bei *gehSE1* um ein *trans* auf die Expression von *icaADBC* wirksam werdendes Element handeln. Andererseits konnte der Pro-Region von GeHSE1 (das als Prä-Pro-Enzym exprimiert wird) Chaperone-Wirkung zugesprochen werden, die sich nicht nur auf dieses Protein bezieht (Götz *et al*., 1998). Eine Beeinflussung des PIA-Metabolismus wäre durch eine nicht korrekte Faltung der *icaADBC*-codierten Proteine denkbar.

Kürzlich konnte durch Sequenzanalyse der die Transposoninsertion flankierenden Genomabschnitte die exakte Position des Transposons bei bp 1001 in *icaC* festgelegt werden

(Mack *et al*., 2000). Diese distale Lokalisation in *icaC* impliziert, daß auch die hier codierten, distalen Abschnitte Bedeutung für die Funktionalität von IcaC haben, so daß eine Abnahme der Biofilmquantität trotz korrekter Transcription von *icaADB* so wie weiter Bereiche von *icaC* resultiert.

Die Mutanten M10 und M11 sowie M13 und M22 - M24 stellen in Abgrenzung zu mut2 und mut2a die einzigen bislang beschriebenen Tn*917*-Insertionsmutanten dar, bei denen der Verlust der Fähigkeit zur PIA- und Biofilm-Expression durch Transposon-Insertionen innerhalb der codierenden Sequenz des für die PIA-Synthese verantwortlichen *ica*-Genlocus zurückzuführen ist. Sie geben daher nicht nur weitere Hinweise auf die Funktion der dort codierten Proteine, sie sind aufgrund der Tatsache, daß sie sich gegenüber ihren Ausgangsstämmen 9142 und 1457 in genau einer, definierten Mutation unterscheiden, gut geeignet, die Rolle und Wertigkeit der inaktivierten Gene und ihrer Produkte (d.h. auch PIA) in der Pathogenese fremdkörperassoziierter Infektionen durch *S. epidermidis* zu untersuchen.

Hierzu gehört auch die Fähigkeit von *S. epidermidis*-Stämmen zur Haemagglutination, welche ein gängiges Merkmal auch bei anderen Staphylokokkenarten wie *S. saprophyticus* und *S. aureus* ist (Gatermann *et al*., 1988; Lindahl *et al*., 1989). Insbesondere das Haemagglutinin von *S. saprophyticus*, welches dem Autolysin Aas entspricht, ist in diesem Zusammenhang interessant, da es offenbar eine Rolle im Prozeß der Besiedelung von Nieren spielt und als Virulenzfaktor zu betrachten ist (Gatermann *et al*., 1988; Gatermann *et al*., 1992; Hell *et al*., 1998; Beuth *et al*., 1988). Auch *S. epidermidis*-Stämme sind in der Lage, Erythrocyten zu agglutinieren. Es konnte eine Assoziation zwischen der Fähigkeit zur Haemagglutination und der Möglichkeit zur Besiedlung von Plastikoberflächen und Ausbildung eines Biofilms festgestellt werden (Rupp und Archer, 1992). Erste Untersuchungen ergaben, daß die Haemagglutination-vermittelnde Funktion von einem Polysaccharid vermittelt wird. Hierbei können Erythrocyten verschiedener Spezies gebunden werden (Rupp und Archer, 1992). Zwischen der Biofilm-Menge, dem Haemagglutinationstiter und der PIA-Menge, die verschiedene *S. epidermidis* Stämme bilden, besteht eine positive Assoziation. Hieraus wurde gefolgert, daß es sich bei der Biofilmbildung und Haemagglutination um eng verknüpfte Phänomene handelt (Rupp *et al*., 1995). Es konnten eine wichtige funktionelle Verbindung zwischen PIA, Biofilmquantität und der Haemagglutinationsfähigkeit einzelner *S. epidermidis*-Stämme nachgewiesen werden (Mack *et al*., 199a): die Haemagglutination durch *S. epidermidis* 9142, 1457, 8400, SE 5 und RP62A konnte durch PIA-spezifische Antikörper inhibiert werden. PIA selbst war in gereinigter Form in der Lage, die Haemagglutination kompetitiv zu inhibieren. Die Mutanten M10 und M11 waren im

Gegensatz zum Ursprungsstamm haemagglutinations-negativ (Mack *et al*., 1999a). Da bei diesen Mutanten der *ica*-Genlocus inaktiviert ist, resultierend in einem PIA-negativen Phänotyp, erscheint es wahrscheinlich, daß PIA zumindest eine wichtige Funktion im Rahmen der Haemagglutination einnimmt oder sogar selbst das Haemagglutinin repräsentiert. Der *icaADBC*-Gencluster stellt daher den wesentlichen genetischen Hintergrund auch eines haemagglutinations-positiven Phänotyps dar.
In einer epidemiologischen Untersuchung konnte Fey *et al*. eine signifikante Verbindung zwischen hohem Haemagglutinationstiter und starker Biofilmproduktion nachweisen, während Stämme mit einem niedrigeren Haemagglutinationstiter signifikant geringere Mengen Biofilm produzierten. (Fey *et al*., 1999). In dieser Studie konnte in einer Population von *S. epidermidis*-Stämmen eine fast hundertprozentige Korrelation zwischen dem Nachweis eines haemagglutinations-positiven Phänotyp und PCR-Detektion von *icaA*-homologen Sequenzen nachgewiesen werden. Nur bei einem Stamm fand man in dieser Untersuchung keine *icaA*-homologen Sequenzen, dafür aber solche homolog zu *icaB* (Fey *et al*., 1999). Desweiteren war *S. carnosus* TM 300, der selbst haemagglutinations-negativ ist, nach Transformation mit pCN27 nicht nur PIA- und biofilm-, sondern auch Haemagglutinations-positiv. Dies stellt ein weiteres Indiz für eine funktionelle Verbindung von PIA und Haemagglutination und die Relevanz des *ica*-Genlocus dar (Fey *et al*., 1999). Es darf zu diesem Zeitpunkt aber nicht unberücksichtigt bleiben, daß auch weitere, *S. carnosus* TM300 wie auch *S. epidermidis* immanente Moleküle an der Haemagglutination beteiligt sein und diese in Kooperation mit PIA vermitteln könnten.

Die Variabilität der Restriktionsfragmente des *ica*-Genclusters, wie sie zwischen RP62A und 9142 für die *Eco*RI- und *Hin*dIII-Restriktion gefunden wurde, ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. In einer Population von 70 *S. epidermidis*-Stämmen wurde nach diesen so wie weiteren variablen Restriktionsschnittstellen gesucht. Gefunden wurde, daß differente Restriktionsfragmente des *icaADBC*-Genclusters bei Untersuchung mit den Restriktionsendonucleasen *Eco*RI, *Hin*dIII, *Xba*I und *Msp*I mit einer Frequenz von mehr als 5% nachweisbar waren, d.h., daß man bei ihnen von einem Restriktionsfragmentpolymorphismus (RFLP) sprechen kann (Tab. 10; Lewin, 1997). Solche polymorphen Fragmente ließen sich in 92.98% der untersuchten, *icaADBC*-positiven Fälle nachweisen. Stämme mit unterschiedlichen Restriktionsfragmenten unterschieden sich in mindestens einer Schnittstelle für das jeweils untersuchte Restriktionsenzym. Neben den polymorphen Fragmenten kam es bei Untersuchung chromosomaler DNA zum Auftreten von sporadischen Fragmentgrößen, d.h. sie waren in weniger

als 5% der Fälle nachweisbar. Auffällig war, daß unter den polymorphen Fragmenten bei Spaltung mit *Eco*RI und *Hin*dIII bei Nachweis des 3.0 kb großen *Eco*RI-Fragments stets das 8.7 kb große *Hin*dIII-Fragment nachweisbar war, bei Detektion des 13.0 kb großen *Hin*dIII-Fragments stets die 2.2 kb / 0.8 kb großen *Eco*RI-Fragmente. Nur in zwei Fällen kam es zum Auftreten der 2.2 kb / 0.8 kb großen *Eco*RI-Fragmente mit einer sporadischen *Hin*dIII-Fragmentvariante. Die in diesen Fragmentmustern resultierenden Schnittstellen wurden daher als gekoppelt betrachtet. Für die polymorphen *Msp*-Fragmente ließ sich keine Kopplung beschreiben (Tab. 11). Aus dem Nachweis der (gekoppelten) Restriktionsfragmente wurde eine genotypische Einteilung der untersuchten *S. epidermidis*-Stämme abgeleitet (Abb. 12).

Die in den polymorphen Fragmenten resultierenden, variablen Schnittstellen konnten, außer der *Eco*RI-Schnittstelle, die in *icaA* gelegen ist, weit außerhalb 5´ vor (*Hin*dIII) oder 3´ nach (*Msp*I) dem *ica*-Genlocus lokalisiert werden. Die variablen *Hin*dIII-Schnittstellen sind somit noch vor dem bei mut2a inaktivierten Bereich, also auch außerhalb von *icaR*, gelegen. Die polymorphen *Msp*I-Schnittstellen liegen kurz vor *gehSE1* (Abb.12). Bei Konstanz der polymorphen Fragmente erscheint eine häufige Alteration der IcaADBC-codierenden Gene durch strukturelle Änderungen, z.B. in Form von Insertionen oder Deletionen, als sehr unwahrscheinlich. Dies wird auch durch die Größenkonstanz des bei Doppelspaltung mit *Hin*dIII und *Xba*I entstehenden, 2.9 kb großen, weite Anteile von *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* umfassenden Fragments deutlich.

Auch definitiv von den in Hamburg isolierten Isolaten unabhängige *S. epidermidis*-Referenzstämme wie RP62A, O-47, SE5, M187 und RP12 ließen sich den genotypischen Klassen 1 und 2 zuordnen. Daher ist es unwahrscheinlich, daß es zum Nachweis weniger Genotypen nur aufgrund der Untersuchung genetisch eng verwandter Stämme gekommen ist. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die Sequenz des *ica*-Genclusters in der untersuchten Stammpopulation als konserviert gelten kann: es ließ sich keine wesentliche, durch Änderung der Restriktionsstellen der verwendeten Restriktionsenzyme manifestierende Sequenzvaribilität finden.

Die Tatsache, daß die polymorphen Schnittstellen außerhalb der *icaADBC*-codierenden Sequenz gelegen sind, könnte, unter evolutionären Gesichtspunkten betrachtet, Hinweis darauf sein, daß dieser Genort zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Rahmen eines horizontalen Gentransfers in die Spezies *S. epidermidis* gelangt ist. Bei anderen Arten konnte die Übertragung Virulenz-vermittelnder Sequenzen, sog. Pathogenitätsinseln, gezeigt werden (Hacker *et al*., 1997). Als Ursprung des *icaADBC*-Genclusters käme z. B. *S. aureus* in Betracht. Kürzlich konnte dieser Genort auch in dieser Spezies nachgewiesen werden (McKenney *et al*., 1999; Crampton *et al*., 1999).

Von den sporadische Fragmentgrößen umfassenden Stämmen war insbesondere 5179 interessant. Die Restriktionsfragmentmuster von 5179 unterrschieden sich für *Eco*RI, *Hin*dIII und *Xba*I von allen anderen Stämmen. Die zugrunde liegenden Schnittstellen waren für *Eco*RI 1.7 kb vor und für *Xba*I 7.7 kb nach der IcaADBC-codierenden Sequenz gelegen, die zusätzliche *Hin*dIII-Schnittstelle muß nach den Ergebnissen der Hybridisierungsversuche 3000 bp stromaufwärts der *icaC*-internen *Hin*dIII-Schnittstelle und damit in *icaA* gelegen sein. In der *Msp*I-Restriktion fanden sich keine Differenzen zu den vorherrschenden Restriktionsmustern.

Die Rolle des *icaADBC*-Genclusters als entscheidender genetischer Hintergrund der PIA-Synthese und Biofilmbildung sollte durch die Untersuchung der Assoziation von *icaADBC*-positiven Genotyp und Fähigkeit zur PIA- und Biofilmexpression genauer untersucht werden. Hierzu erfolgte nach der oben beschriebenen Genotypisierung von 70 *S. epidermidis*-Stämmen die phänotypische Charakterisierung dieser Population. Bei Ermittlung der Fähigkeit zur Biofilmexpression in TSB_{BBL} stellt sich dieses Merkmal als heterogen dar. Die Stämme ließen sich qualitativ in biofilm-positive und biofilm-negative klassifizieren. Unter den biofilm-positiven wiederum fanden sich stark, mäßig und schwach biofilm-bildende Stämme.

Dieses heterogene Erscheinungsbild wurde auch in der PIA-Synthese widergespiegelt. Durch Koagglutination mit einem polyklonalen anti-PIA-Antiserum konnte eine deutliche Assoziation von PIA-Expression und biofilm-positivem Phänotyp sowie zwischen gebildeter PIA-Menge und der Biofilmmenge in semiquantitativer Form dargestellt werden. Hierdurch werden bisherige Ergebnisse (Mack *et al*., 1996b) bestätigt.

Bei synoptischer Betrachtung fand sich, daß ein Biofilm- und PIA-positiver Phänotyp in 96.08% der untersuchten Fälle mit dem *icaADBC*-Gencluster assoziiert ist. Bei einem biofilm-positiven Stamm war der *ica*-Genlocus nicht darstellbar. Somit ist in der Mehrzahl der Fälle ein Rückschluß auf das Vorliegen der IcaADBC-codierenden Gene bei einem biofilm-positiven Phänotyp möglich, ein *in vitro* dokumentierbarer Biofilm ist demnach ein phänotypischer Marker eines *icaADBC*-positiven Genotyps. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint der *ica*-Genlocus die *conditio sine qua non* eines biofilm-positiven Phänotyps zu sein. Gemeinsam mit der Tatsache, daß nur ein *icaADBC*-negativer Stamm einen (schwachen) Biofilm bilden konnte, liefern diese Ergebnisse auch epidemiologische Hinweise für die Bedeutung des *ica*-Genlocus als wichtigem Strukturgen für PIA-Synthese und Biofilmbildung.

Ziebuhr und Mitarbeiter konnten hinsichtlich der Verteilung des *icaADBC*-Genclusters unter biofilm-positiven Stämmen hierzu vergleichbare Ergebnisse finden (Ziebuhr *et al*., 1997). In einer Population von 49 *in vitro* biofilm-positiven Stämmen konnte der *ica*-Genlocus in 93% der Fälle

unter Verwendung einer aus pCN27 generierten, *icaADBC*-spezifischen Sonde durch Southern-Hybridisierung dargestellt werden, woraus auf die fundamentale Bedeutung der korrespondierenden Genprodukte für PIA-Synthese und Biofilmbildung geschlossen wurde. Da der Gencluster und ein biofilm-positiver Phänotyp häufiger unter Blutkultur- als unter Scheimhaut-Isolaten gefunden werden konnte, wurde die Hypothese aufgestellt, daß es sich hierbei um wichtige Virulenzgene beziehungsweise bei PIA um einen wichtigen Virulenzfaktor handeln könnte (Ziebuhr *et al*., 1997). In der genannten Arbeit konnte unter den getesteten 39 *in vitro* biofilm-negativen *S. epidermidis*-Stämmen in keinem Fall der *ica*-Genlocus nachgewiesen werden. Dies steht im Kontrast zu den in der hier vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnissen, da bei den 19 *in vitro* in TSB_{BBL} biofilm-negativen Stämmen in 7 Fällen (36.84%) der *ica*-Genlocus nachgewiesen werden konnte. Hieraus ergibt sich, daß die IcaADBC-codierenden Gene unter den gewählten Wachtumsbedingungen hinreichende Bedingung für PIA-Synthese und Biofilmbildung sind. Ein Rückschluß von einem biofilm-negativen Phänotyp auf einen *icaADBC*-negativen Genotyp jedoch nicht zulässig. Der *icaADBC*-Gencluster ist mithin kein genetischer Marker eines *in vitro* biofilm-positiven Phänotyps ist.

In der Restriktionsanalyse fand sich nur bei 2 der 7 biofilm-negativen, *icaADBC*-positiven Fälle (28.57%) ein gegenüber dem auch bei biofilm-positiven Stämmen detektierbares, abweichendes Fragmentmuster dieser Gene. Aus diesem Grund scheint eine Inaktivierung von *icaADBC* als Ursache für die fehlende PIA- und Biofilm-Expression durch größere strukturelle Veränderungen wie z.B. Insertionen oder Deletionen zumindest beim Großteil dieser Gruppe biofilm-negativer *S. epidermidis*-Stämme unwahrscheinlich. Dies wird dadurch unterstrichen, daß das sporadische Fragmentmuster eines biofilm-negativen Stamms (BK10333) auch bei einem weiteren Stamm (BK7486) gefunden wurde, dieser Stamm jedoch biofilm-positiv war und PIA exprimierte.

Es stellte sich die Frage, ob eine der anhand des *icaADBC* -RFLP´s etablierten, genotypischen Klassen bevorzugt einen biofilm-negativen Phänotyp zeigt. Insgesamt betrachtet fand sich hierfür kein Hinweis, weder bei Kultur in TSB_{BBL} noch in TSB_{OXOID} (Tab. 19). Die Betrachtung der *icaADBC*-Genotypen ist daher nicht zur Vorhersage eines biofilm-positiven oder -negativen Phänotyps unter den getesten Bedingungen geeignet.

Der Nachweis eines biofilm-negativen Phänotyps bei vorhandenem *ica*-Genlocus ist konsistent mit der von Fey berichteten Beobachtung, daß bei 3 von 22 untersuchten, *in vitro* biofilm- und haemagglutinations-negativen Stämmen durch PCR ein 357 bp umfassendes Fragment von *icaA* nachgewiesen werden konnte. Die Organisation des *icaADBC*-Genclusters wurde jedoch nicht

weiter untersucht, so daß größere Alterationen der Gene als Ursache dieses Phänotyps in bei diesen Stämmen nicht ausgeschlossen werden können (Fey *et al*., 1999).

Interessant war die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen Nachweis einer bestimmten RFLP-Variante (also eines definierten Genotyps) des *ica*-Genlocus und der vom entsprechenden Stamm *in vitro* gebildeten PIA- und Biofilm-Menge gibt. Wie oben diskutiert, war ein Rückschluß auf PIA- und Biofilm-Expression unter qualitativen Gesichtspunkten nicht möglich. Ebenso konnte keine Assoziation einer Genotyp-Klasse mit einer bestimmten Biofilm- und PIA- quantität gefunden werden. Zwar schienen die 7 Stämme der genotypischen Klasse 2 tendenziell eher mehr PIA und damit auch mehr Biofilm zu bilden, eine signifikante Verbindung ist bei der kleinen Zahl der Genotyp 2 Isolate aber nicht zu postulieren.

Interessant war der Stamm BK939. Dieser konnte in TSB_{BBL} als stark biofilm-positiv klassifiziert werden. Die genotypische Analyse führte zur Einteilung in die Klasse 1b. Diskrepant zu den Befunden bei anderen Stämme war das Ergebnis im Koagglutinations-Test. Hier fand sich nur bei Einsatz der unverdünnten Bakteriensuspension ein positives Ergebnis. Somit besteht bei diesem Stamm offenbar keine enge Korrelation zwischen starker Biofilmbildung und PIA-Synthese. Ursache für diesen Befund könnte sein, daß zwar PIA synthetisiert, jedoch sekundär chemisch modifizert wird. Dies könnte eine Änderung der immunologischen Reaktivität im Koagglutinations-Test erklären. Andererseits ist es möglich, daß der Biofilm dieses Stammes auf alternativen, PIA unabhängigen Mechanismen beruht. So wäre ein biofilm-positiver Phänotyp auch unabhängig von PIA erklärbar. Welche dieser beiden Hypothesen zutrifft, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

In der weiteren phänotypischen Untersuchung stellten sich PIA- und Biofilm-Expression unter den 70 *S. epidermidis*-Stämme nicht nur als qualitativ und quantitativ heterogene Merkmale dar, sie sind auch bezogen auf den einzelnen Stamm als ein *in vitro* variables, inkonstantes Charakteristikum zu betrachten.

Durch Kultur der Stämme in TSB_{OXOID} konnte eine Verringerung der Biofilmquantität erzielt werden. Dies äußerte sich nicht nur in einer Abnahme der durch einen Stamm gebildeten Biofilmmenge, einige in TSB_{BBL} biofilm-positive Stämme waren in TSB_{OXOID} sogar biofilm-negativ. Beide Phänomene ließen sich unabhängig von der Quantität des in TSB_{BBL} gebildeten Biofilms dokumentieren (Tab. 15). Da auch in TSB_{BBL} stark biofilm-positive Stämme biofilm-negativ wurden, kann geschlossen werden, daß die Biofilmmenge nicht um einen festen Betrag gemindert wurde, da in diesem Falle bevorzugt solche Stämme in TSB_{OXOID} biofilm-negativ geworden wären, die schon in TSB_{BBL} nur schwach biofilm-positiv waren.

Die Beeinflußbarkeit der Biofilm-Bildung durch exogene Faktoren ist von anderen Autoren beschrieben worden. Sowohl die Wahl des Mediums (Christensen *et al*., 1982; Deighton und Balkau, 1990; Hussain *et al*., 1991; Hussain *et al*., 1992; Mack *et al*., 1992), als auch die Anwesenheit oder Konzentration bestimmter Kohlenhydrate (Mack *et al*., 1992; Christensen *et al*., 1982; Deighton und Balkau, 1990; Hussain *et al*., 1991), von Eisen (Deighton und Borland, 1993), der CO_2-Gehalt (Deneyer *et al*., 1990; Hussain *et al*., 1992) und die Kultur unter aeroben oder anaeroben Bedingungen (Barker *et al*., 1992) hat qualitative und quantitative Auswirkungen auf den Ausprägungsgrad des Biofilms. Mack zeigte, daß die Substitution von Glucose-freiem TSB mit Glucose parallel zu einer Induktion der Biofilm- wie auch PIA-Expression durch biofilmbildende *S. epidermidis*-Stämme führt (Mack *et al*., 1992).

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Änderungen der Biofilmexpression in einer gleichsinnigen Änderung der PIA-Expression reflektiert. Abschwächung der Biofilmexpression beziehungsweise Wechsel in einen biofilm-negativen Phänotyp sind daher mit großer Wahrscheinlichkeit auf Änderungen der gebildeten PIA-Menge rückführbar.

Die Analyse der Zusammensetzung der beiden verwendeten Medien erbrachte bezüglich der Konzentration von ionisiertem Calcium, Magnesium, Eisen und verschiedenen Aminosäuren keine signifikanten Differenzen (Angaben der Firmen OXOID und Becton Dickinson). Dennoch liegen offensichtlich äußere Faktoren vor, die bei einem Teil der untersuchten Stämme Biofilmbildung und PIA-Expression zu fakultativ exprimierten Merkmalen werden lassen, andere Stämme von diesen jedoch unabhängig sind und Biofilm wie auch PIA konstitutiv exprimieren. Die PIA-Expression und Biofilmbildung scheint daher einer durch äußere Faktoren beeinflußbaren, differentiellen Regulation unterworfen zu sein, die zwischen den verschiedenen Stämmen variiert. Es ist somit einigen Stämmen möglich, auch dann noch PIA zu synthetisieren und einen Biofilm auszubilden, wenn dies für andere Stämme nicht mehr möglich ist. Dies wird durch die Möglichkeit hervorgehoben, PIA-Synthese und Biofilmbildung durch Supplementierung von TSB_{OXOID} mit GlcNAc zu augmentieren, respektive zu induzieren: Insgesamt konnte bei 31 der 51 in TSB_{BBL} biofilm-positiven Stämme hierbei ein verstärkender Effekt beobachtet werden. 52.17% der in TSB_{OXOID} einen im Vergleich zu TSB_{BBL} schwächeren Biofilm exprimierenden Stämme zeigten eine positive Beeinflussbarkeit dieses Merkmals durch GlcNAc-Supplementierung des TSB_{OXOID}-Mediums. Bei 76.47% der in TSB_{OXOID} biofilm-negativen Stämme konnte durch diese Maßnahme der biofilm-positive Phänotyp wieder restituiert werden. Sowohl die stärkere Biofilmexpression wie auch die Biofilminduktion waren von einer sich in der Koagglutination darstellenden Verstärkung der PIA-Synthese begleitet (Tab. 17).

Von den hier beschriebenen, gezielten Veränderungen der Biofilmbildung und der PIA-Synthese müssen spontane Änderungen des Phänotyps abgegrenzt werden. Koloniemorphologie, Adhärenz, Schleimbildung, Biofilmbildung und Antibiotikaresistenz sind Merkmale, die einer Spontanphasenvariation unterworfen sind (Christensen *et al*., 1990; Christensen *et al*., 1987; Deighton *et al*, 1992a; Deighton *et al*., 1992b; Baddour *et al*, 1990; Baselga *et al*., 1993; Mempel *et al*., 1994; Proctor *et al*., 1995; Ziebuhr *et al*., 1997). Hierbei kommt es bei konstanten Wachstumsbedingungen zu einer Änderung eines oder mehrerer der oben genannten Merkmale, so daß Subpopulationen eines Stammes hierin differieren. Die Fähigkeit, das jeweilige Merkmal zu exprimieren, ist dabei nicht verloren. Ziebuhr konnte zeigen, daß biofilm-negative Spontanphasenvarianten eines biofilm-positiven Stamms nach neunfacher Passage in TSB wieder zur Biofilmbildung in der Lage waren. Dabei war der *icaADBC*-Gencluster beim Ursprungsstamm wie auch der biofilm-negativen Variante nachweisbar (Ziebuhr *et al*., 1997). Als ein genetischer Mechanismus Spontanphasenvariation der Biofilmbildung konnte bei *S. epidermidis* RP62A in 30% der Fälle eine reversible Insertionsinaktivierung des *ica*-Genlocus durch bewegliche genetische Elemente gefunden werden (Ziebuhr *et al*., 1999). Hierbei führt die Insertion des Insertionselements IS*256* im *icaADBC*-Gencluster zu einem Verlust der Möglichkeit zur Biofilmbildung, ohne jedoch die Transcription dieses Genlocus zu verhindern (s.o.). Als Ort einer präferentiellen Insertion konnte *icaC* bestimmt werden, wobei die Lokalisation der Insertionen bei den untersuchten Spontanphasenvarianten wiederum an bestimmten Nucleotiden geclustert waren. Die Restitution des biofilm-positiven Phänotyps war mit einem Verlust von IS*256* verbunden, wobei auch die im Rahmen des Integrationsprozesses generierten, am 5´- und am 3´-Ende jeweils 4 bp umfassenden Duplikationen herausgeschnitten worden waren.

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen, phänotypischenVeränderungen handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um Phasenvariationen, da durch Änderung der Wachstumsbedingungen PIA-Expression und Biofilm-Bildung durch Wahl des Mediums beziehungsweise die Zugabe von Kohlenhydraten gezielt gesteuert, d.h. an- und abgeschaltet werden konnten. In der hier untersuchten *S. epidermidis*- Population konnten bei Änderung der Wachstumsbedingungen ein Spektrum quantitativer Änderungen der Biofilmbildung, von der einfachen Abschwächung bis hin zum vollständigen Verlust dieses Merkmals, gefunden werden. Die Tatsache, daß die Ergebnisse der Hybridisierungsuntersuchungen keine auf Veränderungen der IcaADBC-codierenden Sequenz beruhenden Größenunterschiede im Fragmentmuster zeigten, scheint das Vorliegen von auf Insertionsinaktivierung durch bewegliche genetische Elemente beruhenden Spontanphasenvarianten auszuschließen. Diese hätten sich in einer Änderung der Größe von

Restriktionsfragmenten zeigen müssen, entweder durch die Einfügung von neuen, im Insertionselement gelegenen Restriktionsendonuclease-Schnittstellen, oder aber durch Größenänderung eines regulären Fragments des *ica*-Genlocus durch die Insertion selbst. Diese Aussage läßt sich in der untersuchten Population für weite Bereiche vor dem Start von *icaA* sowie hinter dem Ende von *icaC* machen.

Die Abnahme der Biofilm-Quantität einiger *S. epidermidis*-Stämme bei Kultur in TSB_{OXOID} beruht auf einer verminderten PIA-Synthese (s.o.). Diese phänotypische Variabilität unter verschiedenen physiologischen Wachstumsbedingungen ist weitestgehend unabhängig von der jeweils vorliegenden RFLP-Variante des *ica*-Genlocus. Lediglich die Stämme des Klasse 2a-Genotyps wiesen weniger ausgeprägte Empfindlichkeit der Biofilmexpression gegenüber Änderungen der Kulturbedingungen auf (Tab. 23). Die genotypische Klassifikation anhand des *icaADBC* -RFLPs läßt keine Rückschlüsse auf die Variabilität der PIA-Synthese zu. Auch fanden sich zwischen den einzelnen Angehörigen der unterschiedlichen Genotyp-Klassen keine Differenzen bezüglich einer Abhängigkeit der PIA-Bildung von GlcNAc (Tab. 20). Es konnten Stämme beobachtet werden, die, obwohl ihr Genom eine auch bei unter allen Kulturbedingungen stark biofilm-bildenden Stämmen detektierbare RFLP-Variante des *icaADBC*-Genclusters aufwies, stets biofilm-negativ blieben (z.B. BK8669 mit Genotyp Klasse 1a). Die funktionelle Bedeutung des *icaADBC*-RFLP für PIA-Synthese und Biofilmbildung bleibt somit unklar. Allerdings machen die Untersuchungen deutlich, daß in einer größeren Stamm-Population Änderungen der quantitativen Biofilmbildung unabhängig von größeren, durch Restriktionskartierung detektierbaren Alterationen von *icaADBC* erfolgen.

Eine Ursache für eine differentielle PIA-Synthese bei strukturell intaktem *ica*-Genlocus kann eine herabgesetzte oder sogar aufgehobene Transcription des *icaADBC*-Genclusters sein. Bei einigen biofilm-negativen *S. epidermidis*-Phasenvarianten war, im Gegensatz zu biofilm-positiven Stämmen, im Northern-Blot keine *icaADBC*-komplementäre mRNA gefunden worden (Ziebuhr *et al*., 1997). Die Variabilität der PIA-Quantität unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kann hypothetisch auch durch andere Mechanismen als die Änderung der Transcriptionsfrequenz des *icaADBC*-Genclusters erklärt werden, beispielsweise auf Ebene der Translation (Limitierung der benötigten Aminosäuren) oder durch Änderung der Aktivität der *icaADBC*-codierten Enzyme. Auch wären strukturelle Veränderungen von PIA möglich, z.B. durch Zunahme der N-Acetylierung durch Abnahme der Aktivität einer bislang nicht bekannten Deacetylase (Mack *et al*., 1996; Gerke *et al*., 1998), woraus funktionelle Einbußen mit konsekutiver Abnahme der interzellulären Adhäsion resultieren könnten. Da PIA und Biofilmbildung auf der genetischen

Basis des *ica*-Genlocus als entscheidende Virulenzfaktoren von *S. epidermidis* gelten müssen (Ziebuhr *et al*. 1997; Rupp *et al*., 1999a; Rupp *et al*. 1999b), ist es jedoch wahrscheinlicher, daß ihre Expression in Analogie zur Kontrolle solcher Faktoren bei anderen pathogenen Bakterienarten kontrolliert werden, d. h. daß weitere Genorte neben *icaADBC* Einfluß nehmen können. Hierdurch wären Unterschiede der quantitativen Biofilmbildung zwischen verschiedenen Stämmen wie auch der Einfluß von äußeren Faktoren bei konserviertem *ica*-Genlocus erklärbar.

Dieses Phänomen ist für andere pathogene Bakterienarten beschrieben. Formen einer äußeren Beeinflussung sind z.B. Temperaturänderung, Änderungen der Ionenkonzentration, Osmolarität oder der Eisenkonzentration (Gross, 1993). Änderungen dieser Parameter steuern über wenige Transcriptionsfaktoren, sogenannte globale Regulatoren, die Expression verschiedener Virulenzfaktoren. In diesen Fällen liegt im allgemeinen ein Zweikomponenten-Regulator-System vor, welches aus membranständigem Sensorprotein mit Proteinkinaseaktivität sowie dem eigentlichen, vom Sensorprotein aktivierten / inaktivierten Transcriptionsfaktor zusammengesetzt ist (Finlay und Falkow, 1989).Weitere gängige Motive der Kontrolle von Virulenzfaktoren auf Transkriptionsebene sind alternative Sigmafaktoren, die bei gram-negativen Bakterien (Finlay und Falkow, 1997), aber auch in Form des alternativen Sigmafaktors σ^B bei *S. aureus* beschrieben worden sind (Hecker und Engelmann, 2000; Kullik *et al*., 1997; Wu *et al*., 1996).

Die Tatsache, daß bei einigen Stämmen wie *S. epidermidis* RP62A im Rahmen einer Phasenvariation mit dem Wechsel vom biofilm-positiven in einen biofilm-negativen Phänotyp auch der Verlust der β-Lactam-Resistenz (Christensen *et al*., 1990) wie auch einer fehlenden *mecA*-Transkription (Mempel *et al*., 1994) verbunden ist, führte zur Annahme der Existenz eines übergeordneten, verschiedene Aspekte der pathogenitätsfördernden Eigenschaften von *S. epidermidis*-Stämmen kontrollierenden Systems, wie es auch für *S. aureus* beschrieben ist (Christensen *et al*., 1994). Dort ist die Regulation von Virulenzgenen abhängig von zwei globalen Regulatorsystemen *agr* und *sar* (Bayer *et al*., 1996; Kornblum *et al*, 1990). Der *agr*- (*a*ccessory *g*ene *r*egulation-) Locus umfaßt fünf Gene, die die Synthese von extrazellulären und zellwandständigen Proteinen steuern (Arvidson *et al.*, 1990; Kornblum *et al*., 1990; Cheung *et al*., 1992; Wolz *et al*., 1996). Es lassen sich zwei verschiedene Transcripte des *agr*-Locus unterscheiden (RNAII und RNAIII), deren Synthese von zwei Promotoren P2 und P3 initiiert wird (Janzon *et al*., 1990; Morfeldt *et al*, 1995; Novick *et al*., 1993). RNAII codiert für vier Proteine, AgrA, AgrC, AgrB und AgrD. AgrA und AgrC repräsentieren hierbei ein Zweikomponenten-Regulator-Signal-Transduktions-System, während AgrD als Autoinduktor die Synthese von RNAIII steuert (Ji *et al*., 1995; Ji *et al*., 1997). RNAIII selbst ist das Effektormolekül, welches die

Expression von sezernierten Proteinen (z. B. α-Haemolysin) positiv und die von zellwandständigen Proteinen (z. B. Protein A oder die Fibronectin-bindenden Proteine FnbA und FnbB) negativ kontrolliert (Janzon und Arvidson, 1990, Novick *et al*., 1993; Saravia-Otten *et al*., 1997)

Die Expression des *agr*-Locus wird wiederum durch Produkte des *sar*-Locus kontrolliert. *Sar* steuert zusätzlich abhängig von der Wachstumsphase die Expression verschiedener Proteine unabhängig von *agr* (Bayer *et al*., 1996; Cheung *et al*., 1994; Heinrichs *et al*., 1996).

Bei *S. epidermidis* konnten Sequenzen gefunden werden, die die Existenz eines analogen Systems auch in dieser Spezies nahelegen. Es scheinen jedoch vor allem hinsichtlich der Expressionskontrolle Unterschiede zu *S. aureus* vorzuliegen (Fluckiger *et al*., 1998; Tegmark *et al*., 1998; Otto *et al.*, 1998; Van Wamel *et al*., 1998).

Verschiedene klinische Beobachtungen zeigen, daß im Rahmen einer fremdkörper-assoziierten Infektion mit biofilm-positiven *S. epidermidis*-Stämmen biofilm-negative Varianten im peripheren Blut der Patienten erscheinen (Baddour und Christensen, 1987; Christensen *et al*., 1987; Baddour *et al*., 1990; Deighton *et al*., 1992; Baselga *et al*., 1993). Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, daß es einigen Bakterien im zeitlichen Verlauf gelingt, sich durch Einstellung der Synthese von Faktoren, die ihren Verbleib im Biofilm sichern, aus dem auf der Oberfläche eines Fremdkörpers lokalisierten Zellverband zu lösen und später einen geeigneten Ort unter Wiederaufnahme der Biofilmsynthese zu besiedeln. Ein möglicher, hieran beteiligter Mechanismus könnte auch die Inaktivierung des *ica*-Genlocus durch IS*256* sein (Ziebuhr *et al*., 1999). Jedoch sind weitere Möglichkeiten eines Wechsels in einen biofilm-negativen Phänotyp denkbar, so könnte auch der *agr*-Locus via AgrD-vermitteltes Quorum-Sensing eine Rolle spielen.

Die Ergebnisse der Restriktionskartierung der Transposoninsertionsmutanten des Stamms 1457 liefern erstmals genetische Hinweise dafür, daß von *icaADBC* unabhängige Genorte Einfluß auf die Expression eines biofilm-positiven Phänotyps nehmen (Abb. 19). Sowohl die Resultate der Pulsfeldgelelektrophorese wie auch der Restriktionskartierung der die Transposoninsertionsstelle flankierenden Genomabschnitte der verschiedenen Mutanten von 1457 zeigen, daß der *ica*-Genlocus in den Mutantenklassen II-IV als unbeschädigt gelten kann. Die durch die Tn*917*-Insertion induzierten, quantitativen Änderungen der Biofilmbildung sind somit von ihm unabhängig. Es lassen sich unterschiedliche Grade der quantitativen Änderung der PIA-Expression und Biofilmbildung unterscheiden (Mack *et al*. 2000): neben einem vollständigem Verlust dieses phänotypischen Merkmals (M12) konnte eine verminderte Biofilmbildung (M15

und M19) sowie ein verminderter Biofilm bei Kultur in TSB_{BBL} verbunden mit einem vollständigem Verlust dieser Eigenschaft in TSB_{OXOID} (M17) erzielt werden. Die Änderung der Biofilmquantität trat nicht als isoliertes Phänomen auf. In allen genannten Mutantenklassen wurden parallel durch die Transposoninsertion weitere phänotypische Merkmale beeinflusst, wie z.B. die Koloniefarbe und die Fähigkeit zu mukoidem Wachstum auf Purple-Agar (Tab. 7). Infolgedessen kann bei ihnen von einem pleiotropen Effekt der Transposoninsertion gesprochen werden. Ein solches Phänomen könnte durch die Störung verschiedener Prozesse erklärt werden: Verlust von Transcriptionsfaktoren (mit konsekutiver Einstellung der Expression verschiedener Genorte), Transportern (z. B. mit der Folge einer Limitierung von PIA-Vorläufersubstanzen) und Synthesegene für Vorläufersubstanzen von PIA (mit Substratmangel der *icaADBC*-codierten Enzymsysteme) sind mögliche Beispiele. Bei den Mutantenklassen II – IV ist die Transcription von *icaADBC* aufgehoben, woraus eine Beeinflussung der PIA-Expression auf Ebene der Transcriptionskontrolle dieser Gene angenommen werden kann (Mack *et al*., 2000). Gestützt wird diese Vermutung durch Experimente, bei denen durch Transduktion das Plasmid pTX*icaADBC* in die Mutanten der Klasse II – IV transferiert worden war. Dieses Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß *icaADBC* unter der Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors steht (Gehrke *et al*., 1998). Die pTX*icaADBC* enthaltenden Mutanten der Klasse II – IV waren nach Induktion mit 0.4 % Xylose wieder zur Biofilmbildung in der Lage (Mack *et al*., 2000). PIA-Synthese und die Fähigkeit zur Biofilmbildung scheinen daher in ein komplexes, regulativ wirkendes System integriert zu sein.

In diesem Kontext ist auch die biofilm-negative Mutante M187sn3 zu betrachten (Muller *et al*., 1993). Diese Mutante wurde durch Transposonmutagenese des biofilm-, PS/A- und PIA-positiven *S. epidermidis*-Stamms M187 erzeugt und ist insbesondere durch einen Verlust der PS/A-Expression gekennzeichnet, er stellt sich allerdings auch als PIA-negativ dar (Rohde und Mack, unveröffentlichte Daten; McKenney *et al*., 1998). Zusätzlich ließ sich ein verminderte primäre Bindung dokumentieren (Muller *et al*., 1993). Die zu der Phänotypänderung führende Transposoninsertion konnte auf einem ca. 5 kb großen *Eco*RI-Fragment des Mutterstammes lokalisiert werden (Muller *et al*., 1993). Der *icaADBC*-Gencluster ist unverändert nachweisbar (genotypische Klasse 2a). Unabhängig von der Frage, in welchem Zusammenhang PS/A und PIA stehen, zeigt diese Mutante doch, daß neben den hier charakterisierten Genorten weitere Genorte Einfluß auf die PIA-Synthese nehmen können.

Das die in dieser Arbeit durch Restriktionskartierung charakterisierten Genorte auch in Wildtypstämmen eine Bedeutung haben können, wird bei Betrachtung der Mutante M17 deutlich.

Wie oben beschrieben, zeichnet sich diese Mutante durch einen im Vergleich zum Mutterstamm 1457 bei Kultur in TSB_{BBL} abgeschwächten Biofilm sowie den vollständigen Verlust dieses Merkmals bei Kultur in TSB_{OXOID} aus. Insofern bietet dieser Stamm eine phänotypische Parallele zu einer Vielzahl von *S. epidermidis*-Isolaten, die ebenfalls bei Kultur in TSB_{BBL} biofilm-positiv sind, jedoch durch Kultur in einen biofilm-negativen Phänotyp überführt werden können (Tab. 21 d und e). Diese Parallele setzt sich weiter fort, da auch M17 bei Supplementierung des TSB_{OXOID}-Mediums mit 0.5% GlcNAc in einen biofilm-positiven Phänotyp zurückgeführt werden kann (Mack und Rohde, unveröffentlichte Daten), so wie dies auch bei einigen hier untersuchten Wildtypstämmen der Fall ist (Tab. 21 d). Die Austattung mit einem variablen Satz an für die Bildung eines Biofilms relevanten Genorten könnte daher von entscheidender Bedeutung für die Beantwortung der Frage sein, warum voneinander unabhängige *S. epidermidis*-Stämme bei relativer Konstanz des *icaADBC*-Genclusters eine differentielle Expression von PIA in Abhängigkeit von exogenen Faktoren zeigen.

Der Nachweis nur des *ica*-Genlocus ließ keinen Rückschluß auf die spätere *in vitro*-Biofilmbildung zu. Somit war eine Abschätzung der pathogenen Potenz des einzelnen Stammes durch diese Untersuchung nicht möglich. Dies ist unter Hinblick auf die möglichen weiteren einflußnehmenden Genorte hinreichend erklärbar. Eventuell könnte über die Detektion dieser Gene eine Ausage über die Fähigkeit eines Stammes, unter bestimmten Umständen einen Biofilm zu bilden, möglich sein. Dies würde der Etablierung eines genetischen Pathogenitätsprofils gleichkommen.

Die Analyse der weiteren an der PIA-Expression und Biofilmbildung beteiligten Gene, ihrer Expressionskontrolle sowie der Funktion der durch sie codierten Proteine wird in der Zukunft zu einem tieferen Verständnis der Biofilmbildung auf Fremdkörperoberflächen durch *S. epidermidis* führen. Hieraus können sich neue Optionen für die Diagnose, Therapie und Prophylaxe dieser Infektionsform ergeben.

5 Zusammenfassung

S. epidermidis ist in den letzten Jahren als herausragender Erreger nosokomialer Infektionen erkannt worden. Infektionen treten hierbei typischerweise im Zusammenhang mit in den Körper eingebrachtem, polymerem Kunststoffmaterial auf. Ursache für dieses selektive pathogene Potential ist die Fähigkeit von *S. epidermidis*, auf Oberflächen polymerer Kunststoffe einen sogenannten Biofilm zu bilden. Essentiell an der Entstehung dieser Biofilme beteiligt ist das von einem *icaADBC*-codierten Enzymsystem synthetisierte interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin (PIA).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch Restriktionskartierung und Sequenzierung *icaA* als Ort der zu den biofilm-negativen Transposonmutanten M10 und M11 führenden Tn*917*-Insertionen ermittelt werden. Hierdurch ist der biofilm- und PIA-negative Phänotyp dieser Mutanten erklärbar.

Im weiteren wurde das Vorkommen des *icaADBC*-Genclusters sowie eine mögliche Restriktionsvariabilität dieses Genortes in einer Population von 70 klinischen *S. epidermidis*-Isolate untersucht. Hierbei fanden sich polymorphe *Hind*III-, *Eco*RI- und *Msp*I-Schnittstellen, anhand derer die Etablierung genotypischer Klassen möglich war. Außer einer *Eco*RI-Schnittstelle konnten alle polymorphen Schnittstellen außerhalb des *ica*-Genortes identifiziert werden. Größere strukturelle Unterschiede der codierenden Sequenz scheinen somit nicht vorzuliegen. Diese Konstanz bezüglich des Genotyps steht im Kontrast zur phänotypischen Ausprägung von PIA-Synthese und Biofilmbildung. Für beide Merkmale ließ sich durch Kultur in TSB_{BBL}, TSB_{OXOID} oder TSB_{OXOID} + GlcNAc eine variable Expression in Abhängigkeit von den gewählten Wachstumsbedingungen demonstrieren. Hierbei beruhen Veränderungen der quantitativen Biofilmbildung auf gleichsinnigen Änderungen der PIA-Expression. Es konnte gezeigt werden, daß biofilm-positive Stämme mit einer einzigen Ausnahme auch *icaADBC*-positiv sind. Andererseits konnte *icaADBC* auch bei vielen biofilm-negativen *S. epidermidis*-Stämmen gefunden werden. *IcaADBC* sind daher als wichtige Voraussetzung eines biofilm-positiven Phänotyps *in vitro* zu betrachten. Andererseits ist bei einem biofilm-negativen Phänotyp der Rückschluß auf ein Fehlen von *icaADBC* nicht zulässig.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der phänotypischen Ausprägung von PIA- und Biofilmbildung und dem Nachweis eines definierten Genotyps gefunden werden. Weitere, *icaADBC*-unabhängige Genorte müssen daher Einfluß auf *icaADBC*-Expression, PIA-Synthese und Biofilmbildung nehmen. Durch Restriktionskartierung biofilm-negativer Mutanten des biofilm-positiven *S. epidermidis* 1457 konnten in dieser Arbeit solche *icaADBC*-unabhängigen

Genorte durch Restriktionskartierung charakterisiert werden. Der regulative Einfluß dieser Gene auf *icaADBC*-Expression und PIA-Synthese konnte kürzlich gezeigt werden. Die weitere Untersuchung der bei den Mutanten der Klassen II – IV inaktivierten Gene wird in Zukunft über ein besseres Verständnis der zur Biofilmbildung durch *S. epidermidis* führenden Mechanismen zu einer Verbesserungen in Diagnostik, Therapie und Prophylaxe im Bereich fremdkörper-assoziierter Infektionen beitragen.

6 Literaturverzeichnis

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.

Arvidson, S., L. Janzon, S. Lofdahl. 1990. The role of the delta-lysin gene (*hld*) in the *agr*-dependet regulation of exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. In: Molecular Biology of the Staphylococci. Novick, R.P. (ed.). New York: VCH Publishers, pp. 421 - 432.

Baddour, L. M., and G. D. Christensen. 1987. Prosthetic valve endocarditis due to small colony staphylococcal variants. Rev. Infect. Dis. **9:** 1168 - 1173.

Baddour, L. M., D. L. Smalley, A. P. Kraus, W. J. Lamoreaux, and G. D. Christensen. 1986. Comparison of microbiologic characteristics of pathogenic and saprophytic coagulase-negative staphylococci from patients with continuous ambulatory peritoneal dialysis. Diag. Microbiol. Infect. Dis. **5:** 197 - 205.

Baddour, L. M., G. D. Christensen, M. G. Hester, and A. L. Bisno. 1984. Production of experimental endocarditis by coagulase-negative staphylococci: variability in species virulence. J. Infect. Dis. **150:** 721 - 727.

Baddour, L. M., L. P. Barker, G. D. Christensen, J. T. Parisi, and W. A. Simpson. 1990. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* in infection of transvenous endocardial pacemaker electrodes. J. Clin. Microbiol. **28:** 676 - 679.

Bailey, E. M., T. D. Constance, L. M. Albrecht, and M. J. Rybak. 1990. Coagulase-negative staphylococci. incidence, pathogenicity, and treatment in the 1990s. DICP Ann. Pharmacother. **24:** 714 - 720.

Baldassari, L., W. A. Simpson, G. Donelli, and G. D. Christensen. 1993. Variable fixation of staphylococcal slime by different histochemical fixatives. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **12:** 866 - 868.

Baldassarri, L., G. Donelli, A. Gelosia, M. C. Voglino, A. W. Simpson, an D. D. Christensen. 1996. Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigene and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. Infect. Immun. **64:** 3410 - 3415.

Bandyk, D. F., G. A. Berni, B. L. Thiele, and J. B. Towne. 1984. Aorto-femoral graft infection due to *S. epidermidis*. Arch. Surg. **119:** 102 - 108.

Banerjee, S. N., T.G. Emori, and D.H. Culver. 1991. Secular trends in nosocomial primary blood-stream infections in the United States, 1980 - 1989. Am. J. Med. **91 (Suppl. 3B):** 86 - 89.

Barker, D. F., W. A. Simpson, and G. D. Christensen. 1992. Differential production of slime under aerobic and anaerobic conditions. J. Clin. Microbiol. **28:** 2578 – 2579.

Barker, L. P., W. A. Simpson, and G. D. Christensen. 1992. Differential production of slime under aerobic and anaerobic conditions. J. Clin. Microbiol. **28:** 2578 - 2579.

Baselga, R., I. Albizu, M. de la Cruz, E. del Cacho, M. Baberan, and B. Amorena. 1993. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus:* Implications in colonization and virulence. Infect. Immun. **61:** 4857 - 4862.

Bayer, M. G., J. H. Heinrichs, A. L. Cheung. 1996. The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **178**: 4563 - 4570.

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.

Bayston, R., and S. R. Penny. 1989. Excessive production of mucoid substance in *Staphylococcus* SHA: Possible factor of colonization of Holter shunts. Dev. Med. Child. Neurol. **14 (Suppl. 27):** 25 - 28.

Beard-Pegler, M. A., C. L. Gabelish, E. Stubbs, C. Harbour, J. Robinson, M. Falk, R. Benn, and A. Vickery. 1989. Prevalence of peritonitis-associated coagulase-negative staphylococci on the skin of continuos ambulatory peritoneal dialysis patients. Epidemiol. Infect. **102:** 365 - 378.

Beuth, J., H. L. Ko, F. S. Perdreau, G. Peters, P. Heczko, and G. Pulverer. 1988. Haemagglutination by *Staphylococcus saprophyticus* and other coagulase-negative staphylococci. Microb. Pathog. **4:** 379 – 383.

Birnboim, H. R. 1983. Rapid alkaline extraction method for isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol. **100:** 243 - 255.

Brause, B. D. 1986. Infections associated with prosthetic joints. Clin. Rheum. Dis. **12:** 523 - 536.

Burkhardt, B. R., M. Fried, P. L. Schnur, and J. J. Tofield. 1981. Capsules, infection and intraluminal antibiotics. Plast. Reconst. Surg. **68:** 43 - 49.

Calderwood, S. B., L. A. Swinski, and S. M. Waterneaux. 1985. Risk factors for the development of prosthetic valve endocarditis. Circulation. 72: 31 - 37.

Cheung, A. L., J. M. Koomey, C. A. Butler, S. J. Projan, and V. A. Fischetti. 1992. regulation of exoprotein expression by a locus (*sar*) distinct from *agr*. Proc Natl Acad Sci USA. **89:** 6462 - 6466.

Cheung, A. L., K. J. Eberhardt, E. Cheung, M R. Yeaman, P. M. Sullam, M. Ramos, and A. S. Bayer. 1994. Diminished virulence of a *sar*- / *agr*-mutant of *Staphylococcus aureus* in a rabbit model of endocarditis .J. Clin. Invest. **94**: 1815 - 1822.

Choo, M. H., D. R. Holms, B. J. Gersh, 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., J. T. Parisi, A. L. Bisno, W. A. Simpson, E. H. Beachey. 1983. Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. **18:** 258 - 269.

Christensen, G. D., L. Baldassarri, and W. A. Simpson. 1994. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. p. 45 - 78. In: Bisno, A. L., and F. A. Waldvogel (eds.). Infections associated with indwelling medical devices. 2nd ed. Washington D.C. American Society for Microbiology.

Christensen, G. D., L. M. Baddour, and W. A. Simpson. 1987. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production *in vivo* and *in vitro*. Infect. Immun. **55:** 2870 - 2877.

Christensen, G. D., L. M. Baddour, D. L. Hasty, J. H. Lowrance, and W. Simpson. 1990. Colonial morphology of staphylococci on Memphis agar: phase variation of slime production, resistance to β-lactam antibiotics and virulence. J. Infect. Dis. **161:** 1153 - 1169.

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 of *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun. **58:** 2906 - 2911.

Christensen, G. D., W. A. Simpson, A. L. Bisno, and E. H. Beachey. 1982. Adherence of slime producing *S. epidermidis* to smooth surfaces. Infect. Immun. **37:** 318 - 326.

Christensen, G. D., W. A. Simpson, A. L. Bisno, and E. H. Beachey. 1983. Experimental foreign body infections in mice challenged with slime producing *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun. **40:** 407 - 410.

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.

Chuard, C., J. C. Lucet, P. Rohner, M. Herrmann, R. Auckenthaler, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew. 1991. Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body *in vivo* to killing by antimicrobials. J. Infect. Dis. **163**: 1369 - 1373.

Chugh, T. D., G. J. Burns, H. J. Shuhaiber, and G. M. Bahr. 1990. Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to fibrin-platelet clots *in vitro* mediated by lipoteichoic acid. Infect. Immun. **58:** 315 - 319.

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:** 35 - 464.

Crampton, S. E., C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols, and F. Götz. 1999. The intercellular adhesion locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect. Immun. **67:** 5427 – 5433.

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. Boland. 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 *S. epidermidis* infections. J. Clin. Microbiol. **28:** 2442 - 2448.

Deighton, M. A., J. C. Franklin, W. J. Spicer, and B. Balkau. 1988. Species identification, antibiotic sensitivity and slime production of coagulase-negative staphylococci from clinical specimen. Epidemiol. Infect. **101:** 99 - 113.

Deighton, M. A., S. Pearson, J. Capstick, D. Spelman, and R. Boland. 1992. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* isolated from a patient with native valve endocarditis. J. Clin. Microbiol. **30:** 2385 - 2390.

Deighton, M. A., V. A. Fleming, and C. J. Wood. 1990. Slime production by coagulase-negative staphylococci causing single and recurrent episodes of peritonitis, p. 465 - 478. In: T. Waldstrom, I. Eliasson, I. Holder, and A. Ljungh (eds.), Pathogenesis of Wound and Biomaterial Associated Infections. Springer-Verlag, London.

Deneyer, S. , M. C. Davies, J. A. Evans, R. G. Finch, D. G. E. Smith, M. H. Wilcox, and P. Williams. 1990. Influence of carbon dioxide on the surface characteristics and adherence potential of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. **28:** 1813 - 1817.

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 ventricularperitoneal shunt infections caused by coagulase-negative staphylococci. J. Infect. Dis. **156:** 555 - 560.

Dominguez de Villota, E., A. Algora-Weber, and I. Millan. 1987. Early evaluation in blood samples of intensive care unit patients. a clinically uncertain judgement. Intensive Care Med. 13: 390 - 394.

Drewry, D. T., L. Galbraith, B. J. Wilkinson, and S. G. Wilkinson. 1990. Staphylococcal slime: a cautionary tale. J. Clin. Microbiol. **28:** 1292 - 1296.

Duguid, I. G., E. Evans, M. R. Brown, and P. Gilbert. 1992. Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *S. epidermidis*: evidence for cell-cycle dependency. J. Antimicrob. Chemother. **30:** 791 - 802.

Dunne, W., M. D. B. Nelson, and M. J. Chusid. 1987. Epidemiologic markers of pediatric infections caused by coagulase-negative staphylococci. Pediatr. Infect. Dis. J. **6:** 1031 - 1035.

Espersen, F., B. J. Wilkinson, B. Gahrn-Hansen, V. T. Rosdahl, and I. Clemmensen. 1990. Attachment of staphylococci to silicon catheters *in vitro*. APMIS **98:** 471 - 478.

Evans, R. C., and C. J. Holmes. 1987. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicon elastomer. Antimicrob. Agents Chemother. **31:** 889 - 894.

Farber, B. F., M. H. Kaplan, and A. G. Clogston. 1990. *S. epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. J. Infect. Dis. **161**: 37 - 40.

Farrell, A. M., T. J. Foster, and K. T. Holland. 1993. Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. J. Gen. Microbiol. **139:** 267 – 277.

Fey, P. D., J. S. Ulphani, F. Götz, C. Heilmann, D. Mack, and M. E. Rupp. 1999. Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. J. Infect. Dis.**179:** 1561 - 1564.

Fidalgo, S., F. Vasquez, M. C. Mendoza . 1990. Bacteremia due to *S. epidermidis*: Microbiologic, epidemiologic and prognostic features. rev. Infect. Dis. 12: 520 - 528.

Finlay, B. B., and S. Falkow. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61:** 136 - 169.

Finlay, B., and S. Falkner. 1988. Common themes in microbial pathogenicity. Microbiol. Rev. **53:** 210 – 239.

Fleer, A., and J. Verhoef. 1989. An evaluation of surface hydrophobicity and extracellular slime in the pathogenesis of foreign-body-related infections due to coagulase-negative staphylococci. J. Invest. Sur. **2:** 391 - 396.

Fluckiger, U., C. Wolz, and A.L. Cheung. 1998. Characterization of a *sar* homologue in *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun. **66**: 2871 - 2878.

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.

Galas, D. J., and M. Chandler. 1989. Bacterial insertion sequences. p. 109 - 169. In: Berg, D. E., and M. M. Howe (eds.). Mobile DNA. Washington D. C. American Society for Microbiology

Gander, S. 1996. bacterial biofilms: resistance to antimicrobial agents. J. Antimicrob. Chemother. **37:** 1047 - 1050.

Gatermann, S., H.-G.W. Meyer, and G. Wanner. 1992. *Staphylococcus saprophyticus* haemagglutinin is a 160 kilodalton surface polypeptide. Infect. Immun. **60:** 4127 – 4132.

Gatermann, S., R. Marre, J. Heesemann, and W. Henkel. 1988. Haemagglutinating and adherence properties of *Staphylococcus saprophyticus*: epidemiology and virulence in experimental urinary tract infection of rats. FEMS Microbiol. Immunol. **47:** 168 – 179.

George, R. V., 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-acetyl-glucosaminytransfersase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. J. Biol. Chem. **273:** 18586 - 18593.

Goldmann, D. A., and G. B. Pier. 1993. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. Clin. Microbiol. Rev. **6:** 176 - 192.

Gristina, A. G., R. A. Jennings, P. T. Naylor, Q. N. Myrvik, and L. X. Web. 1989. Comparative *in vitro* antibiotic resistance of surface-colonizing coagulase-negtive staphylococci. J. Antimicrob. Chemother. **33:** 813 - 816.

Gross, R. 1993. Signal transduction and virulence regulation in human and animal pathogens. FEMS Microbiol. Rev. **10:** 301 – 326.

Grosserode, M. H., and R. P. Wenzel. 1991. The continuing importance of staphylococci as major hospital pathogens. J. Hosp. Infect. **19 (Suppl. B):** 3 - 17.

Gutierrez, J. A., J. Crowley, D. P. Brown, J. D. Hillmann, P. Youngman, and A. S. Bleiweis. 1996. Insertional mutagenesis and recovery of interrupted genes of *Streptococcus mutans* by using

Tn*917*: preliminary characterization of mutans displaying acid sensitivity and nutritional requirements. J. Bacteriol. **178:** 4166 - 4175.

Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhlendorfer, and H. Tschape. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol. Microbiol. **23**: 1089 – 1097.

Hamory, B. H., and J. T. Parisi. 1985. *S. epidermidis*: a significant nosocomial pathogen. Am. J. Infect. Control. **15:** 59.

Hartstein, A. I., M. A. Valvano, and V. H. Morthland.1987. Antimicrobic susceptibility and plasmid profile as identity test for multiple blood isolates of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. **25:** 589 -593.

Heaven, C. J., P. J. Mann, and D. L. Boase. 1992..Endophthalmitis following extracapsular cataract surgery: A review of 32 cases. Br. J. Ophthalmol. **76:** 419 - 442

Hecker , M., and S. Engelmann. 2000. Proteomics, DNA arrays and the analysis of still unknown regulons and unknown proteins of *Bacillus subtilis* and pathogenic gram-positive bacteria. Int. J. Med. Microbiol. **290:** 123 – 134.

Heilmann, C., and F. Götz. 1998. Further characterization of *Staphylococcus epidermidis* transposon mutants deficient in primary attachment or intercellular adhesion. Zbl. Bakteriol. **287:** 69 - 83.

Heilmann, C., C. Gerke, F. Pedreau-Remington, and F. Götz. 1996b. Characterization of Tn*917* insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. Infect. Immun. **64:** 277 - 282.

Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters, and F. Götz. 1997. Evidence for autolysin-mediated attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polysterene surface. Mol. Microbiol. **24:** 1013 - 1024.

Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, and F. Götz. 1996a. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm.-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol. Microbiol. **20:** 1083 - 1091.

Heimberger, T. S., and R. J. Duma. 1989. Infections of prostethic heart valves and cardiac pacemakers. Infect. Dis. Clin. North Am. **3:** 221 - 245.

Heinrichs, J. H., M. G. Bayer, and A. L. Cheung. 1996. Characterization of the *sar* locus and his interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **178**: 418 - 423.

Heinzelmann, M., D. O. Herzig, B. Swain, M. A. Mercer-Jones, T. M. Bergami, and J. C. Polk Jr.. 1997. Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus*

epidermidis RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **4:** 705 - 710.

Hell, W., H.-G.W. Meyer, and S. Gatermann. 1998. Cloning of *aas*, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* protein with adhesive and autolytic properties. Mol. Microbiol. **29:** 871 – 881.

Herrmann, M., P. E. Vaudaux, D. Pittet, R. Auckenthaler *et al*. 1988. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. J. Infect. Dis. **158:** 693 - 701.

Herwaldt, L. A., L.D. Boyken, and M. A. Pfaller. 1990. Biotyping of coagulase-negative staphylococci: 108 isolates from nosocomial bloodstream infections. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **13:** 461 - 466.

Herwaldt, L. A., M. Geiss, C., and M. A. Pfaller. 1996. The positive predictive value of isolating coagulase-negative staphylococci from blood cultures. Clin. Infect. Dis. **22:** 14 - 20.

Hogt, A. H., J. Dankert, and J. Feijn. 1985. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. J. Gen. Microbiol. **131:** 2485 - 2491.

Hogt, A. H., J. Dankert, C. E. Hulstaert, and J. Feijn. 1986. Cell surface characteristics of coagulase-negative staphylococci and their adherence to poly (ethylenepropylene). Infect. Immun. **51:** 294 - 301.

Huebner, 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 *S. epidermidis* bacteriemia isolates in a neonatal intensive care unite over 10 years. J. Infect. Dis. **169:** 526 - 531.

Hussain, M., J. G. M. Hastings, and P. J. White. 1991. A chemically defined medium for slime production by coagulase-negative staphylococci. J. Med. Microbiol. **34:** 143 - 147.

Hussain, M., J. G. M. Hastings, and P. J. White. 1992a. Isolation and composition of extracellular slime made by coagulase-negative staphylococci in a chemically defined medium. J. Infect. Dis. **163:** 534 - 541.

Hussain, M., J. G. M. Hastings, and P. J. White. 1992b. Comparison of cell wall teichoic acid with high-molecular-weight 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. 1992. Importance of medium and atmosphere type to both slime production and adherence by coagulase-negative staphylococci. J. Hosp. Infect. **20:** 173 - 184.

Hussain, M., M. Herrmann, C. von Eiff, F. Pedreau-Remington, and G. Peters. 1997. A 140-kilodalton extracellular protein 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. **104:** 191 - 208.

Inman, R. D., K. V. Gallegos, B. D. Brause, P. B. Redecha, and C. L. Christian.1984. Clinical and microbiologic features of prosthetic joint infections. Am. J. Med. **77:** 47 - 53.

Ishak, M. A., D. G. M. Gröschel, G. L. Mandell, and R. P. Wenzel. 1985. Association of slime with pathogenicity of cns causing nosocomial septicemia. J. Clin. Microbiol. **22:** 1025 - 1029.

Jansen, B., F. Schumacher-Perdeau, G. Peters, and G. Pulverer. 1989. New aspects in the pathogenesis and prevention of polymer-associated infections caused by coagulase-negative staphylococci. J. Invest. Sur. **2:** 361 - 380.

Janzon, L., and S. Arvidson. 1990. The role of the delta-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genesby the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus.* EMBO J. **9**: 1391 - 1399.

Ji, , G., R. Beavis, and R. P. Novick. 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. Science **276**: 2027 - 2030.

Ji, G., R. C. Beavis, and R. P. Novick. 1995. Cell density control of staphylococcal virulence by an octapeptide pheromone. Proc Natl Acad Sci USA **92:** 12055 - 12059.

Karamanos, A. Syrokou, H. S. Panagiotopoulou, and E. D. Anastassiou. 1997. The major 20-kDa polysaccharide of *Staphylococcus epidermidis* extracellular slime and its antibodies as powerful agents for detecting antibodies in blood serum and differentiating among slime-positive and -negative *S. epidermidis* and other staphylococcal species. Arch. Biochem. Biophys. **342:** 389 - 395.

Karamanos, N.K., H. S. Panagiotopoulou, A. Syrokou *et al*.. 1995. Identity of macromolecules present in the extracellular slime layer of *Staphylococcus epidermidis*. Biochimie **77:** 217 - 224.

Karchmer, A. W., G. L. Archer, and W. E. Dismukes. 1983. *S. epidermidis* causing prosthetic valve endocarditis: microbiologic and clinical observations as guides to therapy. Ann. Intern. Med. **98:** 447 - 455.

Kiel, K., J. K.-M. Knobloch, H. Rohde, and D. Mack. Mucoid-negative phenotype of *Staphylococcus epidermidis* caused by transposon insertions in two unlinked genes of the PTS-system. In: DGHM-Kongreß München. 52. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Abstractband 13.P.2.25, S. 56.

Kirby, K. A. 1957. A new method for the isolation of deoxyribonucleotid acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleotide acid and protein. Biochem. J. **66:** 495 - 504.

Kirchoff, L. V., and J. N. Sheargren. 1985. Epidemiology and clinically significance of blood-cultures positive for coagulase-negative staphylococci. Infect. Control. **6:** 479 - 486.

Kleemann, K. T., T. L. Bannermann, and W. E. Kloos. 1993. Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. J. Clin. Microbiol. **31:** 1318 - 1321.

Kloos, W. E. 1997. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. p. 113 - 137. In: Crossley, K. B., and G. L. Archer. The staphylococci in human disease. New York: Churchill Livingston

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 T. L. Bannermann. 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin. Microbiol. Rev. **7:** 117 - 140.

Kloos, W.E. 1986. Ecology of human skin. p. 37 - 50. In P.A. Mardh and K.H. Schleifer (eds.), Coagulase-negative staphylococci. Almqvist and Wiksell International, Stockholm

Kornblum, J., B. N. Kreiswirth, S. J. Projan, H. F. Ross, and R. P. Novick. 1990. *Agr*. A polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. In: Molecular Biology of the Staphylococci. Novick, R. P. (ed.). New York: VCH Publishers, pp. 373 - 402.

Kotilainen, P., J. Nikoskilainen, and P. Houvinen. 1990. Emergence of ciprofloxacin-resistant coagulase-negative staphylococcal skin flora in immunocompromised patients receiving ciprofloxacin. J. Infect. Dis. **161:** 41 -44.

Kraus, E. S., and D. A. Spector. 1983. Characteristics and sequel of peritonitis of diabetics and nondiabetics receiving chronic intermittent peritoneal dialysis. Medicine **62:** 52 -57.

Kullik, I., and P. Giachino. 1997. The alternative sigma factor σ^B in *Staphylococcus aureus*: regulation of the sigB operon in response to growth phase and heat shock. Arch. Microbiol. **167:** 151 – 159.

Lewin, B.. 1997. In: Genes VI.. Oxford: Oxoford University Press, pp. 1122 – 1129.

Lindahl, M. P. Johnson, and P. A. Mardh. 1989. Haemagglutination by *Staphylococcus aureus*. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. **97:** 175 – 180.

Ludwicka, A., B. Jansen, T. Waldström, and G. Pulverer. 1984. Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A. **256:** 479 - 489.

Ludwicka, A., G. Uhlenbruck, G. Peters, *et al*.. 1984. Investigations on extracellular slime produced by *Staphylococcus epidermidis*. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A**. 258:** 256 - 267.

Mack, D. 1999b. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. J. Hosp. Infect. **43 (Suppl)**: S113 - S125.

Mack, D., H. Rohde, S. Dobinsky, J. Riedewald, M. Nedelmann, Johannes K.-M . Knobloch, H.-A. Elsner, and H. H. Feucht. 2000. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intracellular adhesin and biofilm formation. Inf. Immun. **68:** 3799 – 3806.

Mack, D., J. Riedewald, H. Rohde, T. Magnus, H. H. Feucht, H.-A. Elsner, R. Laufs and M. E. Rupp. 1999a. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutínation. Infect. Immun. **67:** 1004 - 1008.

Mack, D., M. Haeder, N. Siemssen, and R. Laufs. 1996b. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide adhesin. J. Infect. Dis. **174:** 881 - 884.

Mack, D., M. Nedelmann, A. Krokotsch, A. Schwartzkopf, J. Heesemann, and R. Laufs. 1994a. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm formation: genetic identification of a hexosamine containing polysaccharide intercellular adhesin. Infect. Immun. **62:** 3244 - 3253.

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., N. Siemssen, and R. Laufs. 1994b. Identification of a cell cluster associated antigen specific for plastic-adherent *S. epidermidis* which is functional related to intercellular adhesion. Zbl. Bakt. Suppl. **26:** 411 - 413.

Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, H. Egge, and R. Laufs. 1996a. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation is a linear β(1-6)-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J. Bacteriol. **178:** 175 - 183.

Maki, D. G., and J. A. Stevens. 1984. Nosocomial colonization of cardiac and cardiology patients with methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. In: Program and abstracts of the 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington D.C., American Society for Microbiology. Abstract 472.

Marrie, T. J., and J. W. Costerton. 1984. Scanning and transmission electron microscopy of *in situ* bacterial colonization of intravenous and intra-arterial catheters. J. Clin. Microbiol. **19:** 687 - 63.

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.

Martin, M. A., M. A. Pfaller, and R. P. Wenzel. 1989. Coagulase-negative staphylococci bacteremia. Ann. Int. Med. **110:** 9 - 16.

Martin, M. A., M. A. Pfaller, R. M. Massanari, and R. P. Wenzel. 1989. Use of cellular hydrophobicity, slime production and species identification markers for the clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolates. Am. J. Infect. Control. **17:** 130 - 135.

McKenny, D., L. K. Pouliot, Y. Wing, V. Murthy, M. Ulrich, G. Döring, J. C. Lee, D. A. Goldmann, and G. B. Pier. 1999. Broadly protective vaccine for Staphylococcus aureus based on an in vivio-expressed antigen. Science **284:** 1253 – 1257.

Mempel, M., H.-H. Feucht, W. Ziebuhr, M. Endres, R. Laufs, and L. Grüter. 1994. Lack of *mecA* transcription in slime-negative phase variants of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agent. Chemother. **38:** 1251 - 1255.

Morfeld, E., K. Tegmark, and S. Arvidson. 1996. Transcriptional control of the *agr* dependent gene regulator, RNAIII, in *Stahylococcus aureus*. Mol. Microbiol. **21:** 1227 - 1237.

Muller, E., J. Hübner, N. Gutuirrez, S. Takeda, D. Goldman, and G. B. Pier. 1993a. Isolation and characterization of transposon mutants deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. Infect. Immun. **61:** 551 - 558.

Muller, E., S. Takeda, H. Shiro, D. Goldman, and G. B. Pier. 1993b. Occurrence of polysaccharide / adhesin among clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. J. Infect. Dis. **168:** 1211 - 1218.

Nedelmann, M. 1999. Genetische Untersuchungen zur Entstehung von adhärenten Biofilmen von *Staphylococcus epidermidis* auf Kunststoffoberflächen. Medizinische Dissertation. Universität Hamburg

Nedelmann, M., A. Sabottke, R. Laufs, and D. Mack. 1998. Generalized transduction for genetic linkage analysis and transfer of transposon insertions in different *Staphylococcus epidermidis* strains. Zbl. Bakt. Int. J. Med. Microbiol. **287:** 85 - 92.

Needham, C. A., and W. Stempsey. 1984. Incidence, adherence, and antibiotic resistance of coagulase-negative *Staphylococcus* species causing human disease. Diagn. Microbiol. Dis. **168:** 1211 - 1218.

Nobel, W. C. 1997. Staphylococci carriage and skin and soft tissue infection. p. 401 - 412. In: Crossley, K. B., and G. L. Archer. The staphylococci in human disease. New York: Churchill Livingston

Nobel, W. C., and J. Naidoo. 1986. coagulase-negative staphylococci as skin commensals. J. Med. Microbiol. **22:** 287.

Novick, R. P., H. F. Ross, S. J. Projan, J. Kornblum, B. Kreiswirth, and S. Moghazeh. 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. EMBO J. **12:** 3967 - 3975.

Otto, M., R. Süssmuth, G. Jung, and F. Götz. 1998. Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis agr* system. FEBS Lett. **424**: 89 - 94.

Pascual, A., A. Fleer, 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. 1990. Coagulase-negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. J. Pediatr. **116:** 497 - 507.

Pedreau-Remington, F., M. A. Sande, G. Peters, and H. F. Chambers. 1998. The abilities of a *Staphylococcus epidermidis* wild type strain and its slime-negative mutant to induce endocarditis in rabbits are comparable. Infect. Immun. **66:** 2778 - 2781.

Peters, G., F. Schuhmacher-Pedreau, and B. Jansen. 1987. Biology of *S. epidermidis* extracellular slime. Zbl. Bakt. Suppl. **16:** 15 - 31.

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., R. Locci, and G. Pulverer. 1982. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. Zbl. Bakt. Suppl. **16:** 15 - 32**.**

Pfaller, M.A., and L.A. Herwaldt. 1988. Laboratory, clinical and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. Clin. Microbiol. Rev. **1:** 281 - 299.

Proctor, R. A., P. van Langevelde, M. Kritjanson, J.N. Maslow, and R. D. Arbeit. 1995. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis. **20:** 95 - 102.

Pulverer, G. 1985. On the pathogenicity of coagulase-negative staphylococci. In: Jeljaszewicz, J. (ed.): The Staphylococci. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Renier, D., J. Lacombe, A. Pierre-Kahn. 1984. Factors causing acute shunt infection. J. Neurosurg. **61:** 1071 - 1078.

Ringberg, H., A. Thoren, and A. Bredberg. 1991. Evaluation of coagulase-negative staphylococci in blood cultures: a prospective clinical and microbiological study. Scand. J. Infect. Dis. **23:** 315 - 323.

Rupp, M. E. 1997. Coagulase-negative staphylococcal infections: an update regarding recognition and management. Curr. Clin. Top. Inf. Dis. : 51 - 87.

Rupp, M. E., and G. L. Archer. 1992. Haemagglutination and adherence to plastic by *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun. **60:** 4322 - 4327.

Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, and D. Mack. 1999b. 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., J. S. Ulphani, P. D. Fey, K. Bartscht, and D. Mack. 1999a. Characterization of the importance 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., N. Sloot, H. G. W. Meyer, J. Han, and S. Gatermann. 1995. Characterization of the hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis*. J. Infect. Dis. **172:** 1509 - 1518.

Rupp, M.E. and G. L. Archer. 1994. Coagulase-negative staphylococci: Pathogens associated with medical progress. Clin. Infect. Dis.**19:** 231 - 245.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning - a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour, N.Y.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. **74:** 5463 - 5467.

Saravia-Otten, P., H.-P. Müller, and S. Arvidson. 1997. Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by *agr* and *agr*-independent mechanisms. J. Bacteriol. **179**: 5259 - 5263.

Schaberg, D. R., D. H. Culver, and R. P. Gayens. 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. Am. J. Med. **91(Suppl. 3B):** 72S - 75S.

Schmidt, D. D., D. F. Bandyk, A. J. Pequet, M. A. Malangoni, and J. B. Towne. 1986. Mucin production by *S. epidermidis*: a virulence factor promoting adherence to vascular grafts. Ann. Surg. **121**: 89 - 95.

Schumacher-Pedreau, F., C. Heilmann, G. Peters, F. Götz, and G. Pulverer. 1994. Comparative analysis of a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* and its adhesion-positive, accumulation-negative mutant M7. FEMS Microbiol. Lett. **117:** 71 - 78.

Schwarzkopf, A., H. Karch, H. Schmidt, J. Heesemann. 1993. Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping-factor negative, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **31:** 2281 - 2285.

Shaw, and Clewell. 1985. Complete nucleotide sequence of macrolid-lincosamin streptogramin B-resistance transposon Tn*917* in *Streptococcus faecalis* . J. Bacteriol. **185:** 782 - 796

Sheehan, B. J., T. J. Foster, C. J. Dorman, S. Park, and G. S. Stewart. 1992. Osmotic and growth-phase dependent regulation of the eta gene of *Staphylococcus aureus*: a role for DNA supercoiling. Mol. Gen. Genet. **232**: 49 - 57.

Sheth, N. K., T. R. Franson, and P. G. Sohnle. 1985. Influence of bacterial adherence to intravascular catheters on *in vitro* antibiotic susceptibility. Lancet **ii:** 1266 - 1268.

Simons, J.–W. F. A., M. D. van Kampen, S. Riel, F. Götz, M. R. Egmond, and H. M. Verheij. 1998. Cloning, purification and characterization of the lipase from *Staphylococcus epidermidis.* Eur. J. Biochem. 253: 675 – 683.

Spanu, G., G. Karussos, D. Adinolfi, and N. Bonfanti. 1986. An analysis of cerebrospinal fluid shunt infections in adults: a clinical experience of twelve years. Acta Neurol. **80:** 79 - 82.

Sperber, W. H., and S. R. Tantini. 1975. Interpretation of tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol. **29:** 502 - 505.

Tegmark, K., E. Morfeldt, and S. Arvidson. 1998. Regulation of *agr*-dependent virulence genes in *Staphylococcus aureus* by RNAIII from coagulase-negative staphylococci. J. Bacteriol. **180**: 3181 - 3186.

Timmerman, C. P., A. Fleer, J. M. Besnier, L. de Graaf, F. Cremers, and J. Verhoef. 1991. Characterization of a proteinacous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. Infect. Immun. **59:** 4187 - 4192.

Tojo, M., N. Yamashita, D. A. Goldman, and G. B. Pier. 1988. Isolation and characterization of a polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. J. Infect. Dis. **157:** 713 - 722.

U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 1996. National nosocomial surveillance (NNIS) report, Data summary from October 1986 - April 1996. Am. J. Infect. Control. **24:** 380 - 388.

Van Wamel, W. J., G. van Rossum, J. Verhoef, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and A. C. Fluit. 1998. Cloning and characterization of an accessory gene regulator (*agr*)- like locus from *Staphylococcus epidermidis*. FEBS Microbiol. Lett. **163:** 1 - 9.

Vas, S. I. 1994. Infections associated with peritoneum and hemodialysis. In: Bisno, A. L., and F. A. Waldvogel (eds.): Infections associated with indwelling medical devices. 2nd ed. Washington D. C. American Society for Microbiology, 309 - 346.

Vaudaux, P., D. Pittet, A. Haeberli, E. Huglr, U. E. Nydegger, D. P. Lew, and F. A. Waldvogel. 1989. Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin, and fibrinogen or fibrin. J. Infect. Dis. **160:** 865 - 875.

Veenstra, G. J. C., F. F. M. Cremers, H. van Dijk, and A. Fleer. 1996. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. J. Bacteriol. **178:** 537 - 548.

Villafane, R., D. H. Bechhofer, C. S. Narayanan, and D. Duban. 1987. Replication control genes of plasmid pE194. J. Bacteriol. **169:** 4822 - 4829.

Vishniavsky, N., and G. L. Archer. 1984. The epidemiology of antibiotic-resistant coagulase-negative staphylococci in a cardiac surgery unit. In: Program and abstracts of the 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington D.C., American Society for Microbiology. Abstract 465.

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.

Wang, I. W., J. M. Anderson, and R. E. Marchant. 1993. *Staphylococcus epidermidis* adhesion to hydrophobic materials is mediated by platelets. J. Infect. Dis. **167:** 329 - 336.

Weber, D. J., K. L. Hoffmann, R. A. Thoft, and A. S. Baker. 1986. Endophthalmitis following intraocular lens implantation: report of 30 cases and review of the literature. Rev. Infect. Dis. **8:** 12 - 20.

Weinstein, M. P., L. B. Reller, J. R. Murphy, and K. A. Lichtenstein. 1983. The clinical significance of positive blood cultures: a comparative analysis of 500 episodes of bacteriemia and fungemia in adults. Rev. Infect. Dis. **5:** 35 - 70.

Widmer, A. F., R. Frei, Z. Rajacic, and W. Zimmerli. 1990. Correlation between *in vivo* and *in vitro* efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. J. Infect. Dis. **162:** 96 - 102.

Wolz, C., D. McDevitt, T. J. Foster, and A. L. Cheung. 1996. Influence of *agr* on fibrinogen binding in *Staphylococcus aureus* Newman. Infect. Immun. **64:** 3142 - 3147.

Wu, S., H. de Lancastre, and A. Tomasz. 1996. Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. J. Bacteriol. **178**: 6036 – 6042.

Younger, J. J., G. D. Christensen, D. L. Bartley, J. C. H. Simmons. 1987. Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal for clinical outcome. J. Infect. Dis. **156:** 548 - 554.

Youngman, P. J., J. B. Perkins, and R. Losick. 1983. Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn*917*. Proc. Natl. Acad. Sci. **80:** 2305 - 2309.

Ziebuhr, W., C. Heilmann, F. Götz, P. Meyer, E. Straube, and J. Hacker. 1997. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *S. epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. Infect. Immun. **65:** 890 - 896.

Ziebuhr, W., V. Krimmer, S. Rachid, I. Lößner, F. Götz, and J. Hacker. 1999. A novel mechanism of phase variation in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for the control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS*256* . Mol. Microbiol. **32:** 345 - 356.

7 Danksagungen

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. D. Mack für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Seine Freude an experimenteller Arbeit gab den hier vorgelegten Untersuchungen viele wertvolle Impulse.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Laufs für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte sowie seinem Verdienst, mein Interesse an der Medizinischen Mikrobiologie geweckt zu haben.

Herrn Prof. Dr. H. H. Feucht sowie Herrn Dr. H.-A. Elsner danke ich für die Hilfe bei den Sequenzierungsarbeiten sowie der Pulsfeldgelelektrophorese.

Frau C. Schlüter sei für die ausgezeichnete photographische Arbeit gedankt.

Schließlich möchte ich mich bei Frau Dr. S. Dobinsky, Herrn J. Riedewald, Herrn Dr. J. K.-M. Knobloch und Herrn A. Sabottke für die angenehmen Stunden im Labor bedanken.

8 Lebenslauf

Name: Holger Rohde

Geboren: 16.8.1971 in Hamburg

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulische Laufbahn:

1979 Einschulung

1983 Besuch des Walddörfer Gymnasiums in Hamburg

1991 Abitur

Zivildienst: 1991 – 1992 im Altenpflegeheim

Studium: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg im Wintersemester 1992

1994 Physikum

1995 1. Staatsexamen

1998 2. Staatsexamen

1999 3. Staatsexamen

2.6.1999 Erteilung der Teilapprobation

Berufliche Laufbahn: 1.7.1999 AiP im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie am UK Eppendorf / Hamburg

Wissenschaftliche Laufbahn: 1995 – 1997 Arbeit als Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Mack am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie am UK Eppendorf / Hamburg

Publikationen:

Mack, D., J. Riedewald, H. Rohde, T. Magnus, H. H. Feucht, H.-A. Elsner, R. Laufs and M. E. Rupp. 1999a. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutínation. Infect. Immun. **67:** 1004 - 1008.

Mack, D., H. Rohde, S. Dobinsky, J. Riedewald, M. Nedelmann, Johannes K.-M . Knobloch, H.-A. Elsner, and H. H. Feucht. 2000. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intracellular adhesin and biofilm formation. Infect. Immun. **68:** 3799 – 3806.