

**Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* an Oberflächen:
Charakterisierung einer Biofilm-negativen
Transposonmutante**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

von

Dipl.-Biol. Katrin Bartscht

aus Bremerhaven

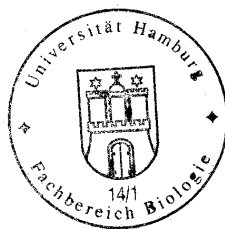
Hamburg 2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. D. Mack

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. E. Bock

Tag der Disputation: 16.11.01

Hamburg, den 18. Oktober 2001



Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	6
1.1 Staphylokokken	6
1.2 Pathogenese fremdkörperassoziierter Infektionen.....	7
1.2.1 Primäre Adhäsion von <i>Staphylococcus epidermidis</i>	8
1.2.2 Die akkumulative Phase der Biofilmbildung.....	10
1.3 Zielsetzung.....	13
2 MATERIAL	14
2.1 Chemikalien	14
2.2 Spezielle Laborgeräte	14
2.3 Medien	14
2.4 Lösungen.....	18
2.5 Bakterienstämme	21
2.6 Zellkulturen.....	22
2.7 Oligonukleotide und Sonden	22
3 METHODEN	24
3.1 Kultivierung der Bakterien	24
3.2 Resistenztestung.....	24
3.3 Biotypisierung.....	25
3.4 Zellkultur	25
3.5 Nachweis der Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> an Polymeroberflächen	26
3.5.1 Anheftungs-ELISA (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)	26
3.5.2 Radioaktiver Nachweis	27
3.6 Transposonmutagenese	28
3.7 Biofilmbildung.....	28
3.8 Immunfluoreszenztest	29
3.9 Bestimmung der relativen Hydrophobizität von Bakterien	29

3.10	DNA-Extraktion.....	30
3.11	Restriktionsanalyse	30
3.12	Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	31
3.13	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	32
3.14	Kapillarer Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southern- <i>Blot</i>).....	32
3.15	Southern-Hybridisierung	33
3.16	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation	34
3.17	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
3.18	Ligation.....	35
3.19	Klonierung	35
3.20	Plasmidpräparation	36
3.21	DNA-Sequenzierung.....	37
3.22	Extraktion von Ribonukleinsäuren (RNA) aus <i>S. epidermidis</i>	37
3.23	Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA	38
3.24	Northern-Hybridisierung	39
3.25	Protoplastentransformation.....	40
4	ERGEBNISSE	42
4.1	Entwicklung eines ELISA zur Messung bakterieller Adhäsion an Oberflächen	42
4.1.1	Einfluss der Bakterienkonzentration im Inokulum auf das ELISA-Signal.	42
4.1.2	Einfluss der Inkubationszeit auf das ELISA-Signal	43
4.1.3	Einfluss von fetalem Kälberserum auf die Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> 1457 an NunclonΔ.....	44
4.1.4	Abhängigkeit der Anzahl adhärenter Bakterien von der Ausgangskonzentration im Inokulum	45
4.1.5	Korrelation von ELISA-Signal und der Anzahl adhärenter Bakterien	47
4.1.6	Einfluss von Kulturbedingungen auf die Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> 1457.....	48
4.2	Anwendungen des Anheftungs-ELISAs	50
4.2.1	Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> 1457 an Epithelzellen	50
4.2.2	Adhäsion gut charakterisierter <i>S. epidermidis</i> -Stämme und ihrer Biofilm- negativen Mutanten.....	53
4.2.3	Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> 1457 und 1457-M10 an Fibronektin und Fibrinogen.....	56
4.2.4	Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> 1457 und M15 an NunclonΔ nach Wachstum mit NaCl und Ethanol	58

4.2.5	Suche nach einer adhäsionsdefizienten Transposonmutante	59
4.3	Genetische Analyse der Transposonmutante M12	61
4.3.1	Klonierung der chromosomalen Tn917-flankierenden Regionen aus M12	62
4.3.2	Sequenzierung, Sequenzvergleich und Sequenzanalyse.....	66
4.3.3	Transkriptionsanalyse durch Northern-Hybridisierung	69
4.4	Phänotypische Charakterisierung der Transposonmutante M12	73
4.4.1	Koloniemorphologie	73
4.4.2	Wachstum in Schüttelkultur und Mikrotiterplatten	75
4.4.3	Relative Hydrophobizität	76
4.4.4	Anheftungsverhalten	78
4.4.5	Immunfluoreszenz	79
4.5	<i>In trans</i> -Komplementierung	80
4.5.1	Phänotypen der <i>in trans</i> -komplementierten Stämme.....	82
4.5.2	Nachweis der Transkriptionsinduktion	84
5	DISKUSSION	86
5.1	Der Anheftungs-ELISA	86
5.2	Anheftungs-ELISA: Anwendungen.....	87
5.2.1	Primäre Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> an NunclonΔ.....	87
5.2.2	Primäre Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> an Epithelzellen.....	88
5.2.3	Primäre Adhäsion an Serumproteine	90
5.2.4	Wirkt PIA als primärer Adhäsionsfaktor?	91
5.3	Die Biofilm-negative Transposonmutante M12	92
5.3.1	Genetische Analyse.....	92
5.3.2	Ist M12 eine adhäsionsdefiziente Mutante?.....	97
6	ZUSAMMENFASSUNG	100
7	LITERATUR	102
8	ANHANG	113
8.1	Sequenz.....	113

Abkürzungsverzeichnis

A ₄₀₅	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 405 nm
ADP	Adenindiphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (englisch: <i>bovine serum albumin</i>)
CFU	koloniebildende Einheiten (englisch: <i>colony forming units</i>)
cpm	Einheiten pro Minute (englisch: <i>counts per minute</i>)
DEPC	Diethylpyrokarbonat
dest.	destilliert
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxy-Nukleotidyl-Triphosphat
ELISA	englisch: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fbe	fibrinogenbindendes Protein (englisch: <i>fibrinogen binding protein</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
<i>ica</i>	interzelluläre Adhäsion (englisch: <i>intercellular adhesion</i>)
IFT	Immunfluoreszenztest
IMP	Inosinmonophosphat
IS256	Insertionselement 256
KNS	koagulasenegative Staphylokokken
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
OD ₅₇₈	optische Dichte bestimmt bei einer Wellenlänge von 578 nm
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: <i>polymerase chain reaction</i>)

PIA	interzelluläres Polysaccharid-Adhäsın (englisch: <i>polysaccharide intercellular adhesin</i>)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PRPP	5-Phosphoribosyl 1-pyrophosphat
PS/A	kapsuläres Polysaccharid/Adhäsın (englisch: <i>capsular polysaccharide adhesin</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: <i>ribonucleic acid</i>)
SAA	schleimassoziiertes Antigen (englisch: <i>slime associated antigen</i>)
SCV	englisch: <i>small colony variants</i>
Tn917	Transposon917
TSB	Trypton Soja Brühe (englisch: <i>tryptic soy broth</i>)
TSBØ	Trypton Soja Brühe ohne Glucose
U	enzymatische Einheiten (englisch: <i>units</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
xg	x-fache Erdbeschleunigung

1 Einleitung

Koagulasenegative Staphylokokken (KNS) bilden einen Hauptbestandteil der normalen Hautflora des Menschen und galten lange Zeit als apathogen. In den vergangenen 25 Jahren haben sie jedoch zunehmend als Erreger nosokomialer, also im Krankenhaus erworbener Infektionen an Bedeutung gewonnen. Inzwischen bilden sie eine der Hauptursachen für nosokomial erworbene Bakteriämien und Fremdkörperinfektionen, die zu erhöhter Morbidität und sogar Mortalität führen können (Rupp und Archer, 1994; Kloos und Bannerman, 1994; Boyce, 1997; Vacheethasanee *et al.*, 1998). Bei Infektionen von Venenkathetern, intraperitonealen Kathetern der kontinuierlichen ambulanten Peritonealdialyse, Liquorshunts, künstlichen Herzklappen, Gelenkprothesen oder Herzschrittmacherelektroden kommt *Staphylococcus epidermidis* mit seiner Fähigkeit zur Biofilmbildung auf Polymeroberflächen eine besondere Bedeutung zu (Kloos und Bannerman, 1994; Kloos, 1997). Die Behandlung solcher Infektionen ist oft kompliziert und eine Heilung nur durch die Entfernung des Fremdmaterials zu erreichen (Rupp und Archer, 1994). Es ist daher ein dringendes Anliegen, die zur Pathogenität dieser opportunistischen Krankheitserreger beitragenden molekularen Mechanismen aufzuklären und daraus wirksame Gegenmaßnahmen zu entwickeln.

Diese Arbeit untersucht das Adhäsionsverhalten von *S. epidermidis* an Zellkulturen und Polymeroberflächen, charakterisiert eine Biofilm-negative Transposonmutante von *Staphylococcus epidermidis* 1457 mit stark veränderter Zelloberfläche und charakterisiert den dafür verantwortlichen Genomabschnitt.

1.1 Staphylokokken

Staphylokokken sind grampositive Kokken von etwa 1 µm Durchmesser und werden gemeinsam mit den Gattungen *Micrococcus*, *Stomatococcus* und *Planococcus* zur Familie der *Micrococcaceae* zusammengefasst. Staphylokokken sind fakultativ anaerobe Bakterien mit der Fähigkeit zur Katalasebildung und komplexen Substratbedürfnissen. Meist benötigen sie eine Reihe von Aminosäuren und B-Vitaminen zum Wachstum. Die Haut, Hautdrüsen oder Schleimhäute von warmblütigen Tieren sind die typischen Habitate dieser Bakterien. Im Gegensatz zu den anderen Gattungen der Gruppe *Micrococcaceae* liegt der GC-Gehalt der Staphylokokken-DNA mit 30-39 Molprozent sehr niedrig (Wilkinson, 1997; Kloos, 1997). Als besondere Eigenschaft enthält das Zellwandpeptidoglycan von Staphylokokken eine aus multiplen Glycinresten bestehende Interpeptidbrücke. Dies führt zu einer Empfindlichkeit gegenüber dem speziell an Glycin-Glycin-Bindungen angreifenden Enzym Lysostaphin.

Derzeit werden 32 Staphylokokkenspezies unterschieden, von denen etwa die Hälfte beim Menschen vorkommt (Kloos, 1997). Gelegentlich können weitere Spezies als transiente oder temporäre Flora beim Menschen gefunden werden (Kloos und

Bannerman, 1994; Kloos, 1997). Anhand der Koagulasereaktion wird beim Menschen die koagulasepositive Spezies *S. aureus* von den übrigen koagulasenegativen Spezies unterschieden. Das pathogene Potential von *S. aureus*, invasive Infektionen oder Toxikosen zu verursachen, ist schon seit langem bekannt (Kayser, 1998). Koagulase-negative Staphylokokken hingegen bilden als kommensale oder saprophytische Organismen im kutanen Ökosystem der Hautflora des Menschen eine Gruppe mit geringem pathogenen Potential (Rupp und Archer, 1994; Kloos und Bannerman, 1994). Sie besiedeln bevorzugt Areale der Haut und Schleimhäute, die natürliche Körperöffnungen umgeben. Die höchsten Populationsdichten finden sich mit 10^3 - 10^6 CFU/cm² an den Ausgängen von Schweißdrüsen, Haartalldrüsen und den Nasenschleimhäuten. Geringere Populationsdichten von bis zu 10^3 CFU/cm² können an trockeneren Habitaten wie beispielsweise den Außenseiten der Extremitäten nachgewiesen werden (Kloos und Bannerman, 1994; Kloos, 1997). Einige Spezies besiedeln bevorzugt bestimmte Körperregionen. So findet sich *S. capitis* fast ausschließlich auf der behaarten Kopfhaut und *S. auricularis* in den äußeren Gehörgängen. Die koagulasepositive Spezies *S. aureus* wird bei Erwachsenen vor allem auf den Nasenschleimhäuten gefunden (Kloos und Bannerman, 1994; Noble, 1997). *S. epidermidis* hingegen kommt auf der gesamten Körperoberfläche vor und bildet mit etwa 60-95 % die größten Populationen der isolierten Staphylokokkenspezies.

1.2 Pathogenese fremdkörperassoziierter Infektionen

Koagulasenegative Staphylokokken sind für immunkompetente Personen weitgehend apathogen. Zu den Risikofaktoren für eine nosokomiale Infektion mit KNS gehören die Immunsuppression (vornehmlich Neutropenie), die intravenöse Applikation von Flüssigkeiten und insbesondere implantierte Fremdkörper oder Katheter auch bei immunkompetenten Personen (Boyce, 1997).

Es wird im allgemeinen angenommen, dass eine Infektion der Fremdkörper bei der Implantation mit einer kleinen Anzahl der Erreger von der Haut des Patienten stattfindet (Rupp und Archer, 1994; Kloos und Bannerman, 1994; Boyce, 1997). Allerdings konnte auch schon eine Kontamination durch den Operateur nachgewiesen werden (Boyce, 1997). Die trotz Antibiotikaphylaxe auftretende Infektionsrate bei Implantaten liegt derzeit bei 0,5 % bis 1 % (Rupp und Archer, 1994). Bei etwa 200 000 Knieendoprothesen, die jährlich in den USA implantiert werden, entwickeln sich sogar bei bis zu 2,5 % der Fälle innerhalb von 10 Jahren Infektionen (An und Friedman, 1997). Eine genaue Abschätzung ist schwierig, da sich manche Fremdkörperinfektionen erst Wochen, Monate oder Jahre nach Implantation, dem Legen eines Katheters oder nach einer Bakteriämie manifestieren (Kloos und Bannerman, 1994).

Angesichts der großen Populationsdichten von Staphylokokken auf der menschlichen Haut und der damit verbundenen hohen Kontaminationsgefahr von Patientenmaterial steht der klinische Mikrobiologe vor der schwierigen Aufgabe, echte Infektionskeime von Kontaminanten zu unterscheiden (Kloos und Bannerman, 1994). Gleichzeitig ist

eine wirksame Therapie von Fremdkörperinfektionen häufig schwierig, da sich die meisten im Krankenhaus akquirierten *S. epidermidis* Stämme durch eine Vielzahl von Antibiotikaresistenzen auszeichnen. So sind bis zu 80 % der Stämme resistent gegen Methicillin und weitere Substanzen (Rupp und Archer, 1994; Archer und Climo, 1994).

Der Prozess der Biofilmbildung bei Fremdkörperinfektionen durch *S. epidermidis* verläuft im wesentlichen in zwei Phasen (Mack *et al.*, 2000a). Ein Modell dieser zwei Phasen ist in Bild 1.1 dargestellt. In der ersten Phase erfolgt die primäre Adhäsion der Bakterien an eine Polymeroberfläche. In einer anschließenden Proliferationsphase wird ein vielschichtiger Biofilm ausgebildet, bei dem die Bakterien in einer extrazellulären, häufig als Schleim oder Glykokalyx bezeichneten Matrix eingebettet sind. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen mehrere Mikrometer dicke, dichte Biofilme, in denen nur wenige Bakterien Kontakt zur Polymeroberfläche haben (Peters *et al.*, 1982; Götz und Peters, 2000). Um in einem solchen mehrschichtigen Biofilm akkumulieren zu können, müssen die Staphylokokken interzelluläre Adhäsine exprimieren, die ein Ablösen von Zellen ohne Kontakt zur Polymeroberfläche verhindern.

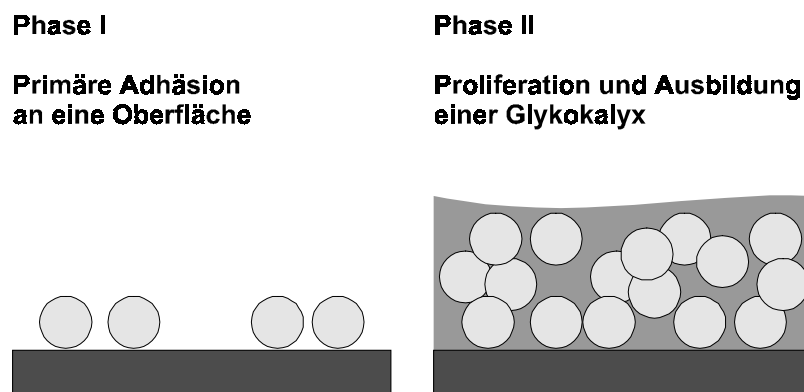


Bild 1.1: Zwei-Phasen-Modell der Biofilmbildung von *S. epidermidis* nach Mack *et al.*, 2000a

1.2.1 Primäre Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis*

Die primäre Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* ist *in vivo* ein komplexer Vorgang, da sowohl Polymeroberflächen als auch Bakterienoberflächen in dem dynamischen System des Wirtes Veränderungen unterworfen sind. Die Oberflächen können durch Serum und Gewebeflüssigkeiten zum Beispiel mit Fibronektin, Fibrinogen, Kollagen und anderen Komponenten, die die Adhäsion beeinflussen, konditioniert werden (Kloos und Bannerman, 1994). Zunächst ist die primäre Phase der Adhäsion von *S. epidermidis* an unbeschichteten Polymeroberflächen abhängig von einer Reihe unspezifischer Faktoren etwa von Oberflächenbeschaffenheit, Ladung oder Hydrophobizität von Polymer- und Bakterienoberfläche (Ludwicka *et al.*, 1984; Heilmann und Peters, 2000). Untersuchungen *in vitro* haben gezeigt, dass hydrophobe Stämme besser als hydrophile an verschiedene medizinische Polymere adhäreren (Pascual *et al.*, 1986; Christensen *et al.*, 1994; Vacheethasane *et al.*, 1998). Dieser Zusammenhang kann zwar häufig, aber nicht in allen Fällen nachgewiesen werden

(Hogt *et al.*, 1985; Kristinsson, 1989). Um jedoch eine erfolgreiche Kolonisation der Oberfläche zu erreichen, ist vermutlich eine spezifischere Adhäsion zur Festigung der primären Adhäsion notwendig (Kloos, 1997). Bislang sind jedoch nur wenige spezifische Faktoren für die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* an beschichteten oder unbeschichteten Polymeren bekannt (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Spezifische Adhäsionsfaktoren von *S. epidermidis* an Oberflächen

Adhäsionsfaktor	Oberfläche	Referenz
Fibrinogenbindendes Protein (Fbe)	Fibrinogen	(Nilsson <i>et al.</i> , 1998; Pei <i>et al.</i> , 1999)
Autolysin (AtlE)	Polystyrol (Sarstedt)	(Heilmann <i>et al.</i> , 1996a; Heilmann <i>et al.</i> , 1997)
<i>Staphylococcal surface protein</i> (SSP-1)	Polystyrol (Sanbio)	(Timmerman <i>et al.</i> , 1991; Veenstra <i>et al.</i> , 1996)
Kapsuläres Polysaccharid/Adhäsion (PS/A)	Silikonkatheter; nicht Polyethylen	(Tojo <i>et al.</i> , 1988; Muller <i>et al.</i> , 1993a; Higashi <i>et al.</i> , 1998)

Durch die Behandlung von *S. epidermidis* mit Proteasen lässt sich die Adhäsion an Polymeroberflächen inhibieren, was auf eine Beteiligung von Proteinstrukturen hindeutet (Hogt *et al.*, 1986; Pascual *et al.*, 1986). Ein solches Protein wurde vor kurzem mit dem Fibrinogenbindenden Protein (Fbe) von *S. epidermidis* beschrieben und das zugehörige Gen kloniert und sequenziert (Nilsson *et al.*, 1998). Sequenzvergleiche ergaben eine Ähnlichkeit des Proteins mit dem zellwandgebundenen Fibrinogenrezeptor (ClfA) von *S. aureus*. Fbe enthält ein für oberflächenassoziierte Proteine typisches LPXTG-Motiv sowie eine charakteristische Transmembranregion. Die funktionelle Beteiligung an der primären Adhäsion wurde experimentell belegt. Sowohl das gereinigte Protein als auch Fbe-spezifische Antikörper sind in der Lage, die Adhäsion von *S. epidermidis* an immobilisiertes Fibrinogen effektiv zu inhibieren (Pei *et al.*, 1999). Allerdings scheint dieser Faktor oder seine Expression in *S. epidermidis* sehr variabel zu sein, denn viele Stämme weisen nur eine schwache Bindung an fibrinogenbeschichtete Polymere auf (Nilsson *et al.*, 1998; Galdart *et al.*, 2000).

Eine Beteiligung an der primären Adhäsion an unbeschichteten Oberflächen ist weiterhin für ein dem Autolysin *atl* von *S. aureus* homologes Gen *atlE* gezeigt worden (Heilmann *et al.*, 1996a; Heilmann *et al.*, 1997). Eine Transposonmutante mit Biofilmmutigativem Phänotyp ist adhäsionsdefizient an Polystyrol und weist eine stark verminderte Hydrophobizität im Vergleich zum Wildtyp *S. epidermidis* O-47 auf. Da der Stamm aber weiterhin in der Lage ist, einen Biofilm an Glas zu bilden, müssen weitere Adhäsionsfaktoren vorhanden sein.

Ein weiteres 280 kDa-Protein, SSP-1 (*staphylococcal surface protein*), wurde als Adhäsionsfaktor an unbeschichteten Polystyrolkugeln beschrieben (Timmerman *et al.*, 1991; Veenstra *et al.*, 1996). Spezifische, gegen dieses Protein gerichtete Antikörper inhibierten konzentrationsabhängig die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* 354 an den Kugeln. Durch proteolytische Prozessierung war es möglich, SSP-1 in ein etwa 220 kDa-Protein SSP-2 ohne adhäsive Funktion zu überführen.

Ebenfalls als Adhäsionsfaktor des Biofilm-positiven Stammes *S. epidermidis* RP62A wurde ein kapsuläres Polysaccharid/Adhäsion (PS/A) isoliert, dessen Zusammensetzung zunächst als komplexe Mischung von Monosacchariden mit hohem Glucose- und Galaktoseanteil beschrieben wurde (Tojo *et al.*, 1988). PS/A vermittelt die Adhäsion an Silikonkatheter (Muller *et al.*, 1993a) nicht aber an Polyethylen (Higashi *et al.*, 1998). Später zeigte sich, dass das Polysaccharid einem anderen in der akkumulativen Phase beteiligten Faktor sehr ähnlich ist (Kap. 1.2.2).

1.2.2 Die akkumulative Phase der Biofilmbildung

Innerhalb eines mehrschichtigen Biofilms, in dem nur die wenigsten Bakterien einen direkten Kontakt zur Polymeroberfläche haben, sind Faktoren notwendig, die eine Adhäsion der Bakterienzellen untereinander bewirken. Als wesentlich wird hierfür das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA) angesehen. Dieses Polysaccharid wurde ursprünglich durch seine spezifische Reaktion mit einem Antiserum gegen den biofilmbildenden Stamm *S. epidermidis* 1457 isoliert (Mack *et al.*, 1992). Die Funktion von PIA als Faktor, der interzelluläre Adhäsion vermittelt, konnte im Vergleich des Wildtyps mit den Biofilm-negativen Transposonmutanten, 1457-M10 und 1457-M11, eindeutig gezeigt werden (Mack *et al.*, 1994). Diese PIA-negativen Mutanten, die als Klasse I-Mutanten bezeichnet werden, sind nicht in der Lage in einem Biofilm zu akkumulieren oder größere Zellaggregate zu bilden.

Es lassen sich aus *S. epidermidis* 1457 zwei sehr ähnliche Polysaccharidfraktionen aufreinigen, die als Polysaccharid I und II bezeichnet werden (Mack *et al.*, 1996a). Polysaccharid I macht mehr als 80 % der Gesamtmenge des gereinigten Polysaccharids aus und ist ein lineares Homoglykan aus durchschnittlich 130 β -(1,6)-verknüpften N-Acetylglucosamineinheiten. Von diesen sind etwa 15-20 % nicht N-acetyliert und somit positiv geladen. Polysaccharid II ist strukturell eng verwandt und enthält Phosphat und Succinat, wodurch es einen leicht anionischen Charakter erhält. Außerdem sind im Mittel mehr Glucosaminreste N-acetyliert als in Polysaccharid I. Für die Antigenität von PIA erwiesen sich sowohl die β -(1,6)-glycosidischen Bindungen als auch die acetylierten Aminogruppen als notwendig (Mack *et al.*, 1996a). Durch eine parallel durchgeführte Polysaccharidpräparation von 1457-M11, die kein Hexosamin enthielt, konnte eine Verunreinigung der PIA-Präparation mit Medienkomponenten oder funktionell unbeteiligten Polysacchariden ausgeschlossen werden.

Heilmann *et al.* isolierten ebenfalls Biofilm-negative Transposonmutanten, Klassen A und B, des Biofilm-positiven *S. epidermidis* Stammes O-47 (Heilmann *et al.*, 1996a).

Eine Komplementierung der Klasse B-Mutanten mit einem korrespondierenden Wildtyp-DNA-Fragment auf einem Plasmid führte zur Wiederherstellung der Biofilmbildung und der PIA-Produktion (Heilmann *et al.*, 1996b). Das auf diesem Fragment identifizierte Operon wurde seiner interzellulären Adhäsion vermittelnden Funktion wegen *ica*-Operon (*intercellular adhesion*) genannt. Es besteht aus den vier Genen *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* (Gerke *et al.*, 1998). Dem Operon ist ein Gen *icaR* vorgelagert, das entgegengesetzt transkribiert wird und möglicherweise regulative Funktion besitzt. Das Protein IcaA weist vier Transmembrandomänen auf und besitzt *in vitro* eine geringe N-Acetylglucosaminyltransferaseaktivität, die in Anwesenheit von IcaD verstärkt wird (Gerke *et al.*, 1998). IcaB ist ein sekretorisches Protein, dessen genaue Funktion noch unklar ist. IcaC ist ein Transmembranprotein, das zwingend für die PIA-Synthese erforderlich ist.

PIA besitzt neben der Funktion als interzelluläres Adhäsion mindestens eine weitere Funktion. Es dient als aktive Substanz bei der Agglutination von Erythrozyten, eine Fähigkeit, die viele *S. epidermidis* Isolate besitzen (Mack *et al.*, 1999). Schon früh war gezeigt worden, dass die Fähigkeit zur Agglutination von Erythrozyten mit der Biofilmbildung korreliert (Rupp und Archer, 1992). Das Hämagglutinin besaß auch viele Eigenschaften, die auf ein Polysaccharid als funktionellen Bestandteil schließen ließen (Rupp *et al.*, 1995). Kürzlich konnte dann eine Korrelation zwischen der Menge an produziertem PIA und Hämagglutinationstern beobachtet werden (Fey *et al.*, 1999). Schließlich wurde PIA als Hämagglutinin oder zumindest als ein notwendiges funktionelles Element desselben identifiziert (Mack *et al.*, 1999).

Das ursprünglich als Adhäsionsfaktor an Silikonkathetern isolierte PS/A von RP62A kann von einem rekombinanten, das *ica*-Operon tragenden *S. carnosus* Stamm gebildet werden (McKenney *et al.*, 1998). Dieser Stamm besitzt dann außerdem die Fähigkeit zur Aggregation und für einen anderen PS/A positiven Stamm und eine Biofilm-negative Transposonmutante konnte gezeigt werden, dass der Verlust von PS/A zu einem Verlust der interzellulären Aggregation führt (Higashi *et al.*, 1998). Nach einer Modifikation der Methoden zur Aufreinigung von PS/A und einer Reevaluation der Zusammensetzung stellte sich PS/A als ein säurestabiles Polymer (>250 000kDa) aus β -(1,6)-verknüpften Glucosamineinheiten dar (McKenney *et al.*, 1998). Die Aminogruppen waren häufig succinyliert und in manchen Präparationen auch acetyliert. Möglicherweise handelt es sich bei PIA und PS/A um Derivate desselben Glucosaminpolymers, das stammspezifisch und/oder durch variierende externe Bedingungen unterschiedlich stark N-acetyliert oder N-succinyliert vorliegt. Die ursprüngliche glucose- und galaktosereiche Präparation war vermutlich durch Medienkomponenten verunreinigt, wie dies in frühen Studien zur Schleimextraktion von *S. epidermidis* häufig der Fall war (Drewry *et al.*, 1990; Hussain *et al.*, 1991b).

Sowohl für PIA als auch für das sehr ähnliche PS/A konnte in Studien mit klinischen Isolaten eine Korrelation zwischen der Expression des Antigens und der Fähigkeit zur Biofilmbildung festgestellt werden (Mack *et al.*, 1996b; Muller *et al.*, 1993b).

Ein weiteres Polysaccharid war wie PS/A aus RP62A isoliert worden und wurde als SAA (*slime associated antigen*) bezeichnet (Christensen *et al.*, 1990). Während erste chemische Analysen durch einen geringen Galaktosegehalt zu einer Abgrenzung von PS/A führten, wurde in einer jüngeren Studie dargelegt, dass gereinigtes SAA zu mehr als 70 % des Trockengewichtes aus N-Acetylglucosamin besteht (Baldassarri *et al.*, 1996). Zudem waren alle getesteten Biofilm-positiven Isolate SAA-positiv, so dass inzwischen vermutet wird, auch dieses Polysaccharid sei PIA, oder zumindest eine Variante dieses Polysaccharids (Götz und Peters, 2000).

Neben den Polysacchariden PIA, PS/A und SAA ist ein 140 kDa-Protein, AAP (*accumulation associated protein*), an der akkumulativen Phase der Biofilmbildung beteiligt (Schumacher-Perdreau *et al.*, 1994; Hussain *et al.*, 1997). Es wurde anhand der durch Mytomycin C entstandenen Biofilm-negativen Mutante M7 von RP62A beschrieben. Da PIA bei dieser Mutante leicht durch mechanische Belastung von der Zelloberfläche gelöst werden kann (de Grahl, persönliche Mitteilung; Baldassarri *et al.*, 1996), wird seine Beteiligung an der Verankerung des Adhäsins an der Zelloberfläche diskutiert.

Regulation der Biofilmbildung

Phänotypische Variabilität der Biofilmproduktion von *S. epidermidis* kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet werden (Baddour *et al.*, 1990; Ziebuhr *et al.*, 1997). Es gibt verschiedene regulative Faktoren der PIA-Produktion und Biofilmbildung. Spontane Phasenvarianten können beispielsweise durch eine Insertion von IS256 im *ica*-Operon hervorgerufen werden (Ziebuhr *et al.*, 1997). Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Insertion reversibel ist. Durch exakte Exzision des Insertions-elements kommt es zu einer Rekonstitution der PIA-Produktion und einer Akkumulation im Biofilm (Ziebuhr *et al.*, 1999).

An einer Regulation der *ica*-Expression ist vermutlich der alternative Sigmafaktor σ^B beteiligt. Eine Transposoninsertion im positiven Regulator *rsbU* von σ^B rief in *S. epidermidis* 1457 einen PIA-negativen und Biofilm-negativen Phänotyp hervor (Knobloch *et al.*, 2001). Auch ließ sich die PIA-Bildung des Wildtyps, aber nicht die der Mutante durch hohe Osmolarität steigern. Da im *ica*-Operon aber nur eine schwache Homologie mit einem σ^B -abhängigen Promotor gefunden werden konnte, erscheint eine direkte Regulation durch diesen Sigmafaktor eher unwahrscheinlich.

Als externer, die Biofilmbildung steigernder Faktor dient außer hohen Konzentrationen an Natriumchlorid auch Ethanol im Medium (Knobloch *et al.*, 2001). Diese Stimulation erfolgt auch in der *rsbU*-Mutante, so dass möglicherweise ein alternativer Weg der σ^B -Stimulation erfolgt. Darüber hinaus fördern Eisenmangel (Deighton und Borland, 1993) und Sauerstofflimitierung (Cramton *et al.*, 2001) sowie erhöhte Temperaturen (Rachid *et al.*, 2000b) die Biofilmbildung von *S. epidermidis*.

Neben dem *sigB*-Operon sind zwei weitere unabhängige Genorte bekannt, deren Inaktivierung durch die Insertion von Tn917 in *Staphylococcus epidermidis* 1457 zu

einer regulativen Transkriptionshemmung des für die PIA-Synthese notwendigen *icaADBC*-Operons und damit zu einem Biofilm-negativen Phänotyp führen (Mack *et al.*, 2000b). Während fünf Transposonmutanten mit Insertionen im *ica*-Operon als Mutanten der Klasse I bezeichnet werden, sind die regulativen Mutanten ihrem phänotypischen und genetischen Profil nach in die Klassen II bis IV eingeordnet (Mack *et al.*, 2000b). Die inaktivierten Gene der Mutanten der Klassen II, M12, und IV, M17 sind bislang nicht identifiziert, während die bereits erwähnte *rsbU*-Mutante als Klasse III-Mutante bezeichnet wird. Da eine Expression des *ica*-Operons von einem rekombinanten Plasmid pTX*icaADBC* auch in den Mutantenklassen II bis IV zu einer Rekonstitution des Biofilm-positiven Wildtyps führte, ist es unwahrscheinlich, dass die Mutationen direkt auf Synthese oder Transport des Polysaccharids einwirken. Ein regulativer Einfluss auf Transkriptionsebene wird daher postuliert (Mack *et al.*, 2000b).

1.3 Zielsetzung

Die beschriebene Variabilität der Adhäsionsfaktoren von *S. epidermidis* weist darauf hin, dass es sich bei dieser ersten Phase der Biofilmbildung um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der primären Adhäsion kann dazu beitragen, wirksame Maßnahmen gegen die Entstehung von Fremdkörperinfektionen zu entwickeln.

Es sollte in der vorliegenden Arbeit ein Testsystem entwickelt werden, das geeignet ist, die Adhäsion von *S. epidermidis* unter variablen Bedingungen zu untersuchen. Dabei stand die Suche nach bakteriell vermittelten Faktoren im Vordergrund. Es sollte möglich sein, Adhäsion an verschiedenen Oberflächen im selben System zu untersuchen. Speziell die Frage, ob und wie Staphylokokken an Haut und Schleimhautzellen adhären, wurde bislang vernachlässigt und sollte deshalb ebenfalls mit diesem System bearbeitet werden können. Ein besonderes Augenmerk lag auf der Entwicklung eines Verfahrens, das für eine Bearbeitung einer großen Anzahl von Proben in einem *Screening* adaptierbar ist. Dieses System sollte sodann für die Suche nach einer adhäsionsveränderten Transposonmutante verwendet werden. Bei erfolgreicher Suche sollte die Mutante näher charakterisiert und der genetische Defekt identifiziert werden.

Möglicherweise ist bei einer der bereits beschriebenen Biofilm-negativen Transposonmutanten der Klassen I bis IV von *S. epidermidis* 1457 die Adhäsionsfähigkeit vermindert, so dass die Phänotypänderung auf eine Störung der ersten Phase der Biofilmbildung zurückzuführen ist. Dies sollte im Verlauf der Arbeit überprüft werden. Des weiteren sollte mit Hilfe der verschiedenen Mutantenklassen geklärt werden, ob das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA) funktionell an der primären Adhäsion beteiligt ist.

2 Material

2.1 Chemikalien

Bei den verwendeten Chemikalien handelte es sich, soweit nicht anders angegeben, um analysereine Chemikalien der Firmen Merck, Fluka, Roth oder Sigma.

2.2 Spezielle Laborgeräte

Im Verlauf der Arbeit wurden die im folgenden aufgeführten Laborgeräte verwendet:

	Gerätebezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R	Heraeus
	Sorvall [®] RC-5B	Du Pont Instruments
	Biofuge 28 RS	Heraeus
Tischzentrifuge	Biofuge <i>pico</i>	Heraeus
Ultrazentrifuge	LS-50B, Rotor SW50	Beckmann
Photometer	Photometer 1101 M	Eppendorf
	ELISA Processor II	Behring
	GeneQuant	Pharmacia
Scintillationszähler	TRI-CARB 460C; <i>Liquid Scintillation System</i>	Packard
Thermocycler	Primus 96 plus	MWG-Biotech
	DNA Thermal Cycler Cetus	Perkin Elmer

2.3 Medien

Alle Medien wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit entionisiertem Wasser angesetzt und durch 15-minütiges Autoklavieren sterilisiert.

Trypticase Soya Broth (TSB)

TSB BBL pH 7,3 ± 0,5 (Becton Dickinson, Cockseyville, MD, USA) 30g/l

Für Agarplatten wurde dem Medium 20 g/l Bacto™-Agar (Difco) zugesetzt.

TSB ohne Glucose (TSBØ; pH 7,3)

Trypton	(Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England)	13,6 g/l
<i>Neutralized Soya Peptone</i>	(Oxoid)	3,0 g/l
NaCl		5,0 g/l
K ₂ HPO ₄		2,5 g/l

Für Agarplatten wurde dem Medium 20 g Bacto™-Agar (Difco) zugesetzt.

Blutagar (pH 7,0)

Columbia™-Agar	(Difco, Becton Dickinson, Cockseyville, MD, USA)	42,0 g/l
Bacto™-Agar	(Difco)	1,0 g/l
Glucose		2,2 g/l
Schafsblut		72 ml/l

Für Humanblutagar wurde das Schafsblut durch Humanblut ersetzt.

Luria Bertani-Medium (LB; pH 7,0)

Trypton	(Oxoid)	10 g/l
Hefeextrakt	(Difco)	5 g/l
NaCl		10 g/l

Für Agarplatten wurde dem Medium 20 g/l Bacto™-Agar (Difco) zugesetzt.

Peptone Yeast-Medium (PY; pH 7,5)

Pepton	(Difco)	10 g/l
Hefeextrakt	(Difco)	5 g/l
NaCl		5 g/l
Glucose		1 g/l

Hirn-Herz-Medien (BHI)

BHI-Brühe	pH 7,4 ± 0,2	(Difco)	37 g/l
BHI-Agar	pH 7,4 ± 0,2	(Difco)	47 g/l

HHW-Medium (pH7,2; Hussain *et al.*, 1991a)

Die Medienbestandteile des chemisch definierten Mediums wurden in fünf separaten Gruppen angesetzt. Die Komponenten der Gruppe 1 wurden in 700 ml destilliertem Wasser gelöst, während die anderen Gruppen als konzentrierte Lösungen angesetzt wurden (Gruppe 2: 10x, Gruppe 3 und 5: 100x, Gruppe 4: 20x). Die Lösungen der Gruppen 3 bis 5 wurden in entsprechenden Anteilen zu Gruppe 1 gegeben, auf 900 ml aufgefüllt und autoklaviert. Gruppe 2 wurde separat autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 50°C zugegeben.

Tabelle 2.1: Komponenten von HHW zur Unterstützung der Biofilmbildung von *S. epidermidis* (Hussain *et al.*, 1991a)

Zutaten	mg/l	Zutaten	mg/l
Gruppe 1		Gruppe 2	
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	10000	Glucose	10000
KH ₂ PO ₄	3000	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	500
L-Asparaginsäure	150	Gruppe 3	
L-Alanin	100	Biotin	0,1
L-Arginin	100	Nicotinsäure	2
L-Cystein	50	D-Panthotensäure (Ca-Salz)	2
Glycin	100	Pyridoxal	4
L-Glutaminsäure	150	Pyridoxalamin Dihydrochlorid	4
L-Histidin	100	Riboflavin	2
L-Isoleucin	150	Thiamin Hydrochlorid	2
L-Lysin	100	Gruppe 4	
L-Leucin	150	Adeninsulfat	20
L-Methionin	100	Guaninhydrochlorid	20
L-Phenylalanin	100	Gruppe 5	
L-Prolin	150	CaCl ₂ • 6 H ₂ O	10
L-Serin	100	MnSO ₄	5
L-Threonin	50	(NH ₄) ₂ SO ₄ • FeSO ₄ • 6 H ₂ O	6
L-Tryptophan	100		
L-Tyrosin	100		
L-Valin	150		

B-Brühe (pH 7,4) zur Protoplastentransformation (Götz und Schumacher, 1987)

Pepton	(Difco)	10 g/l
Hefeextrakt	(Difco)	5 g/l
NaCl		5 g/l
Glucose		1 g/l
K ₂ HPO ₄		1 g/l

DM3-Agar (Götz und Schumacher, 1987)

Die Komponenten für den DM3-Agar wurden in sieben detergenzienfreien Flaschen mit dH₂O angesetzt, separat autoklaviert und bei einer Temperatur von etwa 50°C zusammengeführt. Für das Wachstum von transformierten Protoplasten wurden Platten mit etwa 30 ml Volumen gegossen.

Bacto™-Agar (Difco)	10 g in	250 ml
Natriumsuccinat (1 M, pH 7,3, mit Bernsteinsäure eingestellt)	135 g in	500 ml
Caseinhydrolysat (Merck) / Hefeextrakt (Difco)	5 g / 5 g in	100 ml
K ₂ HPO ₄ • 3 H ₂ O / KH ₂ PO ₄	4,6 g / 1,5 g in	100 ml
Glucose (sterilfiltriert)	5 g in	10 ml
MgCl ₂	1M	20 ml
<i>Albumin bovine fraction V</i> , pH 7,0 (BSA, Serva, sterilfiltriert)	0,5 g in	10 ml

CY-Softagar (Götz und Schumacher, 1987)

Caseinhydrolysat	(Merck)	25,00 g/l
Hefeextrakt	(Difco)	25,00 g/l
NaCl		14,75 g/l
Bacto™-Agar	(Difco)	10,00 g/l

Der CY-Softagar wurde aufgekocht und in 25 ml Portionen autoklaviert. Vor dem Einsatz in der Protoplastentransformation wurde er erneut durch Erhitzen verflüssigt, auf 50°C abgekühlt, mit einem Volumen gleich temperiertem, sterilem 1 M Natriumsuccinat und 4 ml Mix gemischt und nach Bedarf 500 µl Tetracycline (50 mg/ml in 70 % [v/v] Ethanol) zugesetzt.

Der Mix wurde aus seinen Bestandteilen frisch angesetzt und bestand aus:

50 % Glucose (sterilfiltriert)	1 ml
1 M MgCl ₂	2 ml
1,5 M β-Glycerophosphat Dinatriumsalz	4 ml
5 % BSA (sterilfiltriert)	2 ml

Das β-Glycerophosphat wurde zur Sterilisation eine Stunde im Wasserbad gekocht und anschließend bei 4°C gelagert. Stammlösungen von Glucose und BSA wurden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

Difco Antibiotic Medium No. 3

Zur Verwendung in der Protoplastentransformation wurde *Difco Antibiotic Medium No. 3* in konzentrierter Lösung mit 70 g/l (pH 7,0 ± 0,5) hergestellt.

Medium für die Zellkultur (MEM+)

Das Zellkulturmedium MEM+ wurde nach dem Zusammenführen aller Komponenten bei 4°C gelagert.

<i>Minimum Essential Medium Eagle</i> (MEM)	(Sigma)	500 ml
fötale Kälberserum (FKS)	(PAA Laboratories)	50 ml
L-Glutamin	(200 mM, Sigma)	5 ml
MEM <i>Non Essential Amino Acid Solution</i>	(100x, Sigma)	5 ml
Natrium-Pyruvat	(100 mM, Sigma)	5 ml

Serumfreies Keratinozytenmedium (SFM)

Das serumfreie Keratinozytenmedium wurde mit allen Zusätzen von der Firma Gibco BRL, Life Technologies, bezogen und nach dem Vereinigen aller Komponenten bei 4°C gelagert.

<i>Keratinocyte</i> -SFM	500 ml
rekombinanter epidermaler Wachstumsfaktor	2,5 µg
Rinderhypophysenextrakt	25 mg

2.4 Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit entionisiertem Wasser angesetzt und durch 15-minütiges Autoklavieren sterilisiert.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; pH 7,4)

NaCl	8,00 g/l
KCl	0,20 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,44 g/l
KH ₂ PO ₄	0,24 g/l

SDS

Es wurde eine 20 %-ige Stammlösung Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS) in dH₂O angesetzt. Die Lösung wurde ohne Sterilisation verwendet.

3 M Natriumacetat (pH 5,2)

Natriumacetat	246,15 g/l
---------------	------------

5x TBE

TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	54 g/l
---------------------------------------	--------

Borsäure	27,5 g/l
----------	----------

EDTA 0,5 M (pH 8,0)	20 ml/l
---------------------	---------

TE (pH 7,4)

Tris	10 mM
------	-------

EDTA	1 mM
------	------

DNA-Ladepuffer

Bromphenolblau	0,25 %
----------------	--------

Xylen Cyanol FF	0,25 %
-----------------	--------

Ficoll	15 %
--------	------

Ethidiumbromid-Stammlösung

Es wurde eine Ethidiumbromidlösung mit 10 mg/ml in dH₂O angesetzt und ohne Sterilisation verwendet.

Denhardts 50x

Ficoll Typ 400	Amersham Pharmacia Biotech	1 %
----------------	----------------------------	-----

Polyvinylpyrrolidone K90	Fluka	1 %
--------------------------	-------	-----

BSA	Serva	1 %
-----	-------	-----

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bis zum Gebrauch in 10 und 50 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

20x SSC (pH 7,0)

NaCl	3,0 M
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	0,3 M

Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)

1 M Na ₂ HPO ₄	57,7 ml
1 M NaH ₂ PO ₄	42,3 ml

SMM (pH 6,5)

Saccharose	1,00 M
Maleinsäure	0,04 M
MgCl ₂ • 6H ₂ O	0,04 M

SMM wurde zur Sterilisation eine Stunde im Wasserbad gekocht und anschließend bis zum Gebrauch in 40 ml Aliquots bei –20°C gelagert.

SMMP (pH 6,5)

SMM (s.o.)	16 ml
<i>Difco Antibiotic Medium No. 3</i> (Kap. 2.3)	4 ml
5 % BSA	1 ml

10x MOPS (pH 7,0)

Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM

2.5 Bakterienstämme

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>S. epidermidis</i> 1457	Katheterisolat (Institut für Med. Mikrobiologie, UKE, Hamburg)	(Mack <i>et al.</i> , 1992)
<i>S. epidermidis</i> 1457c (pTV1ts)	Ausgangsstamm für Transposonmutagenese	(Nedelmann <i>et al.</i> , 1998)
1457-M10	Klasse I Mutante von <i>S. epidermidis</i> 1457; Tn917-Insertion im <i>ica</i> -Operon	(Nedelmann <i>et al.</i> , 1998)
1457-M11	Klasse I Mutante von <i>S. epidermidis</i> 1457; Tn917-Insertion im <i>ica</i> -Operon	(Mack <i>et al.</i> , 1994)
M13, M21, M22, M23, M24	Klasse I Mutanten von <i>S. epidermidis</i> 1457; Tn917-Insertion im <i>ica</i> -Operon	(Mack <i>et al.</i> , 2000b)
M12	Klasse II Mutante von <i>S. epidermidis</i> 1457	(Mack <i>et al.</i> , 2000b)
M15, M19	Klasse II Mutanten von <i>S. epidermidis</i> 1457	(Mack <i>et al.</i> , 2000b; Knobloch <i>et al.</i> , 2001)
M17	Klasse IV Mutante von <i>S. epidermidis</i> 1457	(Mack <i>et al.</i> , 2000b)
M16, M20	Klasse V Mutanten von <i>S. epidermidis</i> 1457	(Kiel <i>et al.</i> , 2000)
M12 (pTXR)	<i>in trans</i> Komplementierungsstamm; <i>purR</i>	diese Arbeit
M12 (pTXJ)	<i>in trans</i> Komplementierungsstamm; <i>yabJ</i>	diese Arbeit
M12 (pTXVG)	<i>in trans</i> Komplementierungsstamm; <i>spoVG</i>	diese Arbeit
M12 (pTXicaADBC)	durch Phagentransduktion aus <i>S. epidermidis</i> 9142 (pTXicaADBC) hergestellt	(Mack <i>et al.</i> , 2000b)
<i>S. carnosus</i> TM300	Ausgangsstamm für die Protoplastentransformation	(Götz und Schumacher, 1987)
<i>S. carnosus</i> TM300 (pTX15)	Donor des Plasmids pTX15	(Peschel und Götz, 1996)
<i>S. carnosus</i> TM300 (pTXicaADBC)		(Gerke <i>et al.</i> , 1998)
8400	Blutkulturisolat (Institut für Med. Mikrobiologie, UKE, Hamburg)	(Mack <i>et al.</i> , 1992)
8400-M10	Tn917-Insertion im <i>ica</i> -Operon	(Mack <i>et al.</i> , 1999)
8400-M11	Tn917-Insertion im <i>ica</i> -Operon	(Mack <i>et al.</i> , 1999)
RP62A	ATCC 35984	(Schumacher-Perdreau <i>et al.</i> , 1994)
M7	Biofilm-negative Mitomycin C Mutante von RP62A	(Schumacher-Perdreau <i>et al.</i> , 1994)
<i>E. coli</i> TOP10	Ausgangsstamm für Transformationen mit Plasmid pCR2.1®-TOPO mit inserierten PCR-Amplifikaten	Invitrogen
<i>E. coli</i> TOP10 (pKBN1.5)	Plasmid trägt 3'-Ende von Tn917 mit flankierender chromosomaler DNA von M12	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 (pKBM2)	Plasmid trägt 5'-Ende von Tn917 mit flankierender chromosomaler DNA von M12	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 (ppurR)	Plasmid pCR2.1®-TOPO mit <i>purR</i>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 (pyabJ)	Plasmid pCR2.1®-TOPO mit <i>yabJ</i>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 (pspoVG)	Plasmid pCR2.1®-TOPO mit <i>spoVG</i>	diese Arbeit

2.6 Zellkulturen

Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

	ATCC	Charakteristika
RPMI 2650	CCL 30	<i>tissue squamous cell carcinoma, nasal septum mucoid</i>
Chang	CCL 20.2	<i>human conjunctiva epithelial</i>
HaCaT ^a		humane Keratinozyten (Boukamp <i>et al.</i> , 1988)
KB	CCL 17	<i>human oral epithelial carcinoma</i>
Hep-2	CCL 23	<i>human laryngeal carcinoma</i>

^a HaCaT-Zellen wurden freundlicherweise von der Beiersdorf AG zur Verfügung gestellt.

2.7 Oligonukleotide und Sonden

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Oligonukleotide wurden zur Amplifikation chromosomaler DNA, zur Sequenzierung von Plasmiden oder als Sonden in der Northern-Hybridisierung eingesetzt.

Bis auf die *Primer* M13 Forward (-20) und M13 Reverse, die aus dem TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) stammen, wurden alle Oligonukleotide von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Oligonukleotide, die für die Sequenzierung nach der Methode des *Primer walkings* verwendet wurden, sind nicht aufgelistet.

Die Lage der als Sonden in der Southern-Hybridisierung eingesetzten Transposonfragmente ist in **Bild 2.1** dargestellt. Eingezeichnet sind auch die Positionen der Oligonukleotide, die als *Primer* in der PCR eingesetzt wurden.

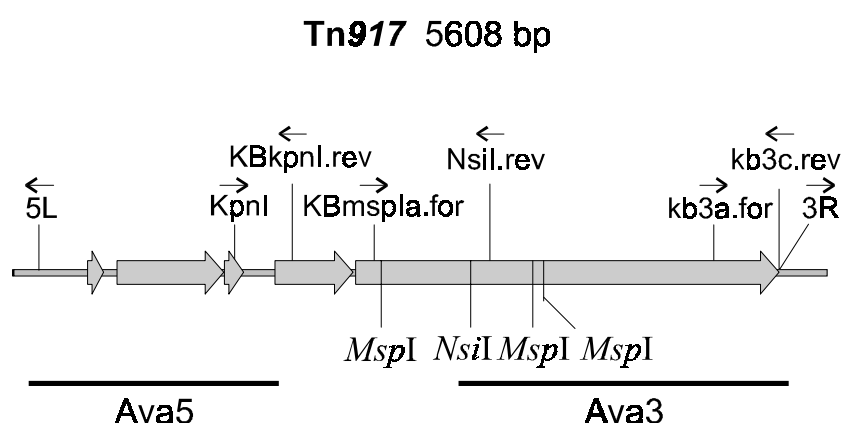


Bild 2.1: Schematische Darstellung des *Enterococcus faecalis* Transposon Tn917 (Shaw und Clewell, 1985). Die Lage der in der Southern-Hybridisierung verwendeten Sonden Ava5 und Ava3 ist markiert. Eingezeichnet sind auch die Positionen der in der PCR verwendeten Oligonukleotide (Pfeile in 5'-3'-Orientierung) sowie die Spaltstellen für die Enzyme *MspI* und *NsiI*

Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide und DNA-Fragmente

Name	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
M13 Forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung aus pCR [®] 2.1-TOPO
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung aus pCR [®] 2.1-TOPO
5L	CTCACAATAGAGAGATGTCACCG	PCR aus Ligation; Tn917
3R	GGCCTTGAAACATTGGTTTAGTGGG	PCR aus Ligation; Tn917
kb3a.for	GAAAGCTAGGCTCATACGCACG	PCR; Tn917
kb3c.rev	CACTAAACCAATGTTTCAAGGCC	PCR; Tn917
KpnI	ACTACTGACAGCTTCCAAGGAGC	PCR; Tn917
KBkpn1.rev	TCTTCTAATTGCGGTCGGTC	PCR; Tn917
NsiI.rev	GTTCTTGTGAATCACGTGTCCC	PCR aus Ligation; Tn917
kbmspIa.for	CGTGGAAGGTCAATAAACTAGG	PCR aus Ligation; Tn917
Ava5 ^a	Ava-Fragment von Tn917 (Bild 2.1)	Southern-Hybridisierung
Ava3 ^a	Ava-Fragment von Tn917 (Bild 2.1)	Southern-Hybridisierung
R7.rev	GGTGGTTCATGAGGTATTGTG	Northern-Hybrid.; <i>purR</i>
R2d.rev	TTGTCGCTTTAACAACAGAATTC	Northern-Hybrid.; <i>yabJ</i>
sespoVG1.as	AAGCTTCATCTAGCGTAATGG	Northern-Hybrid.; <i>spoVG</i>
compR1.s ^b	<u>GGATCC</u> AGATTATTAGGATAGAAGGGTT	PCR; Komplementierung
compR2.as ^c	<u>ACGCGT</u> CCTTATCTGAGTTGATTATT	PCR; Komplementierung
compJ1.s ^b	<u>GGATCC</u> CTTAAAAAAGGAGTGTCAAA	PCR; Komplementierung
compJ2.as ^c	<u>ACGCGT</u> TATTAGAAGCTTGACAACCTT	PCR; Komplementierung
compVG1.s ^b	<u>GGATCC</u> GGGGCTCACTACACGAAAGT	PCR; Komplementierung
compVG2.as ^c	<u>ACGCGT</u> GCTTCGTCTGATTCTTCGTT	PCR; Komplementierung
icaC.as ^d	GAAATAGCCATACCATTGTCC	Northern-Hybrid.; <i>icaC</i>

a die DNA Fragmente wurden mir freundlicherweise aufgereinigt von Frau K. Kiel zur Verfügung gestellt. Sie wurden durch *AvaI* Restriktion aus einem Tn917-tragenden Plasmid mit anschließender Gelelektrophorese und Aufreinigung über GeneClean hergestellt.

b unterstrichen ist eine zusätzliche *Bam*HI-Spaltstelle

c unterstrichen ist eine zusätzliche *Mlu*I-Spaltstelle

d Sequenz nach Dobinsky (Dobinsky und Mack, 2001)

3 Methoden

Für alle Lösungen, Medien oder Puffer, die nicht im Text angegeben sind, finden sich die genauen Zusammensetzungen und Zubereitungsangaben in Kap. 2.3 und 2.4. Dabei handelt es sich in der Regel um Lösungen, die in mehreren Methoden verwendet wurden, oder um Komponenten, die eine spezielle Bearbeitung erforderten.

3.1 Kultivierung der Bakterien

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden in der Regel in Flüssigmedium bei 37°C kultiviert. Vorkulturen wurden entweder für sechs Stunden oder über Nacht in TSBØ inkubiert und anschließend für die im Versuch eingesetzten Kulturen 1:100 im gewünschten Medium verdünnt. Als Medien wurden dabei TSB, TSBØ, HHW oder BHI (Kap. 2.3) verwendet. Schüttelkulturen wurden bei 160 Upm in sterilen Glasgefäßen inkubiert, während Biofilmkulturen statisch in Zellkulturpetrischalen (NunclonΔ, Nunc, Roskilde, Dänemark) inkubiert wurden. Für das ELISA-Verfahren (Kap. 3.5) wurden sowohl die Vor- als auch die Hauptkulturen in Mikrotiterplatten (U-Form, Polystyrol, Greiner) mit einem Volumen von 200 µl pro Stamm angesetzt und die Platten bei 37°C inkubiert. Alle Vorkulturen wurde in TSBØ, die Hauptkulturen in TSB angelegt.

Für eine Stammhaltung wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, 24 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend bis zur Subkultivierung bei 4°C gelagert. Staphylokokkenstämme wurden auf Blutagar, *E. coli*-Stämme auf LB-Agar kultiviert.

3.2 Resistenztestung

Die Resistenzmuster der verwendeten Stämme wurden in regelmäßigen Abständen im Agardiffusionstest bestimmt. Bei dieser Methode werden Filterplättchen, die mit Antibiotika getränkt sind, auf eine gleichmäßig über die ganze Fläche mit dem Testkeim beimpfte Platte aufgelegt und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Diffusion entstehen Konzentrationsgradienten um die Filterplättchen herum. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit des Teststammes entstehen Hemmhöfe, deren Durchmesser in quantitativer Beziehung zur minimalen Hemmkonzentration (MHK) für das Antibiotikum steht. Die Testung wurde für folgende Substanzen durchgeführt: Penicillin G, Flucloxacillin, Chloramphenicol, Nitrofurantoin, Gentamicin, Tobramycin, Netilmicin, Clindamycin, Erythromycin, Tetracyclin, TMP/SMZ (Bactrim) und Ciprofloxacin.

3.3 Biotypisierung

Biotypisierungen wurden mit dem id32Staph (API Systems, bioMérieux) von Stämmen aus Transposonmutageneseexperimenten durchgeführt, um die Identität mit dem Ausgangsstamm zu überprüfen. Die Typisierung beruht auf einer durch Farbumschlag detektierten Umsetzung verschiedener Substrate.

3.4 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in 80 ml Zellkulturflaschen (Nunc) bei 37°C unter 5 % CO₂ kultiviert und einmal wöchentlich passagiert. Zunächst wurde das Medium abgegossen und 1 ml 0,25 % Trypsin mit 0,05 % EDTA (Sigma) zugegeben. Die Flüssigkeit wurde umgehend wieder abpipettiert und durch 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung ersetzt. Nach ca. 5 min wurden die Zellen vom Flaschenboden losgeklopft und in ein 10 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Flasche wurde mit 1 ml FKS gespült und die Spülflüssigkeit in dasselbe Röhrchen gegeben. Nach fünf Minuten Zentrifugation bei 160xg wurde der Überstand vorsichtig abgegossen, die Zellen in 2 ml frischem Medium resuspendiert und aus dieser Suspension neue Kulturen angesetzt. Bis zu drei Passagen wurden in einer Flasche durchgeführt, wobei 0,2 bis 2,0 ml der resuspendierten Kulturen als Inokulum für 25 ml frisches Medium dienten. Welches Medium für die einzelnen Zelllinien verwendet wurde ist Tabelle 3.1 zu entnehmen. Eine dauerhafte Lagerung der Zellkulturen erfolgte in 10 % Dimethylsulfoxid in FKS bei -80°C.

Für den Einsatz im Anheftungs-ELISA (Kap. 3.5) wurden die Zellkulturen in NunclonΔ-Mikrotiterplatten kultiviert. Dabei wurde die Zelldichte so eingestellt, dass bei einer Einsaat von 200 µl nach 24 Stunden ein konfluenten Zellrasen entstand (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Einsaat der Zelllinien für den Anheftungs-ELISA und Verzeichnis der verwendeten Medien

	Einsaat [Z/ml]	Medium
RPMI 2650	1 x 10 ⁶	MEM+ (Kap. 2.3)
Chang	5 x 10 ⁵	Medium 199 (Sigma) mit 10 % FKS
HaCaT	4 x 10 ⁵	SFM (Kap. 2.3)
KB	3 x 10 ⁵	MEM+ ohne Glutamin und Pyruvat
Hep-2	3 x 10 ⁵	MEM+

3.5 Nachweis der Adhäsion von *S. epidermidis* an Polymeroberflächen

3.5.1 Anheftungs-ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Ein Anheftungs-ELISA wurde zum Nachweis von *S. epidermidis* Zellen an der NunclonΔ-Oberfläche entwickelt. Hierbei wurde ein Verfahren benutzt, das die Adhäsion an derselben Oberfläche beobachtet, die auch für die Beurteilung der Biofilmbildung *in vitro* eingesetzt wird.

S. epidermidis wurde wie in Kap. 3.1 beschrieben als Schüttelkultur, in Mikrotiterplatten oder als Biofilm kultiviert. Bakterien, die als Biofilm gewachsen waren, wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Petrischalen gelöst. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 10 min bei 693xg abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit Puffer versetzt und durch dreimaliges Aufziehen durch eine 22G Kanüle (0,7 x 30 mm; Braun, Melsungen) resuspendiert.

Es wurden geometrische Verdünnungsreihen (1:2 Verdünnungen) in PBS angefertigt. Dreimal 100 µl dieser Verdünnungen wurden in die Näpfe einer Mikrotiterplatte (NunclonΔ, Nunc) gefüllt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen wurde die Konzentration der Bakteriensuspensionen bestimmt.

Alle Näpfe wurden fünfmal unter Einsatz einer Mehrkanalpipette mit 200 µl Waschpuffer (0,05 % Tween 20 [v/v] und 0,05 % NaN₃ [w/v] in PBS) gespült und adhärente Zellen mit 50 µl 1 % Paraformaldehyd in PBS [v/v] für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde ein *quenching* der reaktiven Moleküle mit 100 µl 0,1 M Glycin für 20 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Unspezifische Bindungsstellen der NunclonΔ-Oberfläche wurden danach durch Inkubation von 200 µl Blocklösung (3 % BSA [w/v] und 0,05 % NaN₃ [w/v] in PBS) pro Napf für 2 Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen wurden adhärente Zellen durch ELISA detektiert. Als Erstantikörper wurde ein Anti-Staphylokokken-Kaninchenantiserum gegen den Biofilmnegativen Stamm *S. epidermidis* 5179 verwendet. Dieses Antiserum war nach der von Mack beschriebenen Methode gewonnen worden (Mack *et al.*, 1992; Mack *et al.*, 2001). Als zweites wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter, monoklonaler Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Sigma) eingesetzt, der spezifisch an den Erstantikörper band. Das staphylokokkenspezifische Antiserum wurde zunächst 1:2500 in Waschpuffer plus 0,05 % BSA [w/v] verdünnt und dann pro Napf 100 µl für 90 min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde der Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper in einer 1:2500 Verdünnung in Waschpuffer mit 50 µl pro Napf zugegeben und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden erneut dreimal gewaschen und 100 µl Substratpuffer (1 M Diethanolamin, 0,5 mM MgCl₂, 0,02 % NaN₃ [w/v], pH 9,8) mit 1,45 mg/ml Phosphatase Substrat No. 104 (Sigma) zugegeben. Nach 30 min wurde

die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2 M NaOH abgestoppt und die Absorption bei 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 492 nm bestimmt.

Es wurden außer den NunclonΔ-Platten auch Mikrotiterplatten mit Maxisorp- und Polysorp-Oberflächen (Nunc) und aus Polystyrol (Greiner) verwendet. Letztere waren weder strahlensterilisiert, noch für die Zellkultur modifiziert. Diese Oberfläche wurde mit humanem Fibronectin (Boehringer) oder humanem Fibrinogen (Sigma) beschichtet, indem Lösungen von 0,1 mg/ml, 1 mg/ml oder 10 mg/ml Protein in PBS plus 0,05 % NaN₃ [w/v] über Nacht bei 4°C und einem Volumen von 150 µl pro Napf in den Platten inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten Platten, die mit PBS ohne Zusatz beschichtet wurden.

3.5.2 Radioaktiver Nachweis

Die Adhäsion von *S. epidermidis* an Maxisorp-Mikrotiterplatten wurde durch die Verwendung von radioaktiv markierten Zellen quantifiziert. Eine Markierung der Bakterien erfolgte durch Aufnahme von radioaktivem Thymidin.

Für die Adhäsion von Bakterien aus der stationären Wachstumsphase wurden 2 ml Vorkulturen in TSBØ angesetzt, die nach sechs Stunden Inkubation bei 37°C und 160 Upm 1:100 in TSB verdünnt wurden. Diesem Medium wurden 25 µCi/ml [*methyl*-³H]-Thymidin (83 Ci/mmol; 1 mCi/ml; Amersham Pharmacia Biotech) zugesetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Hauptkulturen in einem Volumen von 200 µl pro Napf in einer Mikrotiterplatte (Polystyrol, Greiner) für 16 Stunden bei 37°C. Für die Beurteilung der Adhäsion von Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Hauptkulturen erst nach drei Stunden mit 50 µCi/ml [*methyl*-³H]-Thymidin versetzt und weitere drei Stunden inkubiert.

Die radioaktiv markierten Bakterien wurden durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 13000xg geerntet, einmal mit 400 µl PBS gewaschen und in einem Drittel des Kultivierungsvolumens resuspendiert. Aus einer geometrischen Verdünnungsreihe (1:2) in PBS wurden 100 µl je Verdünnung für eine Stunde bei 37°C zur Adhäsion der Bakterien in einem Napf einer Mikrotiterplatte des Lockwell-Systems mit Maxisorp-Oberfläche (Nunc) inkubiert. Das Lockwell-System erlaubt das einfache Herausnehmen einzelner Näpfe aus der Platte. Diese wurden dreimal mit dem auch im Anheftungs-ELISA verwendeten Waschpuffer gespült, getrocknet und in ein Scintillationsgefäß überführt. Zwei Milliliter Scintillatorflüssigkeit (Pic-Fluor 15; Packard, Bioscience BV, Groningen, Niederlande) wurden zugegeben und die durch adhärente, markierte Bakterien verursachte Radioaktivität bestimmt. Es war notwendig, auf die Maxisorp-Oberfläche auszuweichen, da ein entsprechendes System mit NunclonΔ-Oberfläche leider nicht zur Verfügung stand.

Das Verhältnis von Bakterien (CFU) zu Radioaktivität (cpm) wurde durch direkte Scintillationsmessung von drei Proben der Verdünnungsreihe bestimmt bei gleichzeitigem Ausplattieren geeigneter Verdünnungen.

Als interne Kontrollen wurden ab der Zugabe des [*methyl*-³]H-Thymidin sterile Kontrollen mitgeführt. Die so beschickten Näpfe wiesen eine sehr niedrige Radioaktivität auf, die als Hintergrund von den übrigen Werten abgezogen wurde.

3.6 Transposonmutagenese

Die Transposonmutagenese wurde im wesentlichen nach der Methoden von Mack durchgeführt (Mack *et al.*, 1994). Als Ausgangsstamm für zwei Mutageneseexperimente diente der Biofilm-positive Stamm *S. epidermidis* 1457c (pTV1ts) (Nedelmann *et al.*, 1998). Eine Kolonie des Stammes wurde in 2 ml PY-Medium mit 10 µg/ml Chloramphenicol und 10 µg/ml Erythromycin bei 30°C und 160 Upm inkubiert. Diese Vorkultur wurde 1:100 in PY-Medium mit 2,5 µg/ml Erythromycin verdünnt und für weitere fünf Stunden bei 30°C und 160 Upm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 1:100 in PBS verdünnt und je 100 µl dieser Verdünnung auf BHI-Agar ausplattiert. Zur Selektion auf das Transposon enthielten diese Platten 10 µg/ml Erythromycin. Die Platten wurden bei einer nichtpermissiven Temperatur für die Replikation des Plasmids pTV1ts von 46°C inkubiert. Nach 48 Stunden wurden Klone mit sterilen Zahnstochern von den Platten gepickt und auf BHI-Agar mit 10 µg/ml Erythromycin übertragen. Diese Platten wurden erneut für 24 Stunden bei 46°C inkubiert. Um Stämme, die das Plasmid zu diesem Zeitpunkt nicht eliminiert hatten, auszusortieren, wurden danach alle Klone auf BHI-Agar mit 10 µg/ml Chloramphenicol übertragen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Differenzierung war möglich, da die Erythromycinresistenz durch das Transposon vermittelt wird während die Chloramphenicolresistenz auf dem Trägerplasmid kodiert ist.

Alle so identifizierten Transposonmutanten wurden über Nacht in Mikrotiterplatten (U-Form, Greiner) in 120 µl TSB mit 10 µg/ml Erythromycin kultiviert. Zur Archivierung der Mutantenbank wurden 30 µl steriles Glycerin in den Näpfen von 384-Loch Platten (Nunc) vorgelegt, 50 µl der gut resuspendierten Kulturen zugefügt und durch dreimaliges Aufziehen in eine Mehrkanalpipette durchmischt. Die Archivierungsplatten wurden bei –80°C gelagert. Sie wurden von K1 bis K15 durchnummeriert und für die Benennung der einzelnen Klone die alphanumerische Bezeichnung des Napfes in der Platte angehängt. Für das *Screening* der Mutantenbank wurden die Platten bei Raumtemperatur aufgetaut und 5 µl als Inokulum für die Vorkulturen des Anheftungs-ELISAs (Kap. 3.5) verwendet.

3.7 Biofilmbildung

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung von *S. epidermidis* wurde mit Hilfe eines semiquantitativen Tests ermittelt (Christensen *et al.*, 1985). Eine Einzelkolonie wurde in 2 ml TSBØ suspendiert und für sechs Stunden oder über Nacht bei 37°C und 160 Upm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde eine 1:100 Verdünnung in TSB hergestellt und hiervon viermal 200 µl in die Näpfe einer Mikrotiterplatte (Nunc) gegeben.

Nach etwa 20-stündigem Wachstum bei 37°C wurde das Medium aus der Platte geschlagen und diese dreimal mit 200 µl PBS pro Napf gewaschen. Die Platte wurde anschließend bei 37°C getrocknet und die anheftenden Bakterien mit 50 µl pro Napf Kristallviolett für 5 min gefärbt. Die Färbelösung wurde im Anschluss daran unter fließendem Wasser vorsichtig ausgespült. Nach erneutem Trocknen wurde die Absorption im ELISA Processor II (Behring) bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm bestimmt. Lag der Mittelwert der OD₅₇₀ von vier Parallelen unter 0,1 galt ein Stamm als Biofilm-negativ darüber als Biofilm-positiv.

3.8 Immunfluoreszenztest

Ein Immunfluoreszenztest wurde nach der von Mack beschriebenen Methode durchgeführt (Mack *et al.*, 1992; Mack *et al.*, 2001). Für den Nachweis von Oberflächenantigenen mit Hilfe des Anti-Staphylokokken-Antiserums und einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper wurden 20 µl Bakteriensuspension mit einer OD₅₇₈ von 0,3 in die Felder eines Objektträgers für Immunofluoreszenz (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) aufgebracht und getrocknet. Die Proben wurden für zwei Minuten in kaltem Aceton fixiert und erneut getrocknet. Dann wurden 20 µl des 1:50 in PBS verdünnten Anti-Staphylokokken-Antiserums aufgetragen und 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für drei Minuten in PBS gewaschen und erneut getrocknet. Es folgte eine weitere Inkubation für 30 min bei 37°C in der feuchten Kammer mit 20 µl 1:80 in PBS verdünntem Anti-Kaninchen-IgG-FITC-Konjugat (Ziegenantikörper, Sigma). Zuletzt wurden die Objektträger zweimal für drei Minuten in PBS und einmal in entionisiertem Wasser gewaschen und ein letztes Mal getrocknet. Die Proben wurden mit Immersionsöl benetzt und direkt mikroskopiert. Eine Beurteilung wurde an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan) bei 1000-facher Vergrößerung vorgenommen und die Proben wurden mit der angeschlossenen Fotoeinrichtung (MC100 Spot) dokumentiert.

3.9 Bestimmung der relativen Hydrophobizität von Bakterien

Die relative Hydrophobizität von Bakterien wurde nach der Methode von Rosenberg (Rosenberg *et al.*, 1980) bestimmt. Dabei wird eine Bakteriensuspension mit einer hydrophoben Lösung überschichtet und ausgeschüttelt. Anschließend wird der in der wässrigen Phase verbleibende Anteil an Bakterien bestimmt und die relative Hydrophobizität der Zelloberfläche daraus abgeleitet.

Die Bakterien wurden für sechs oder 16 Stunden in TSB kultiviert und durch Zentrifugation geerntet. Nach einmaligem Waschen mit kaltem PBS wurde die OD₅₇₈ exakt auf 1,0 eingestellt. Zu diesen Zellsuspensionen wurde p-Xylen (Merck) zugegeben, so dass Konzentrationen von 4 %, 8 % und 12 % [v/v] in einem Endvolumen von einem Milliliter erreicht wurden. Die Proben wurden für 60 s kräftig auf einem Mixer geschüttelt und zur Phasentrennung 30 min bei Raumtemperatur

stehen gelassen. Anschließend wurde die optische Dichte der wässrigen Phase bestimmt. Der prozentuale Anteil an Xylen adhärierender Bakterien y wurde nach der Gleichung $y = (OD_{\text{vor}} - OD_{\text{nach}}) / OD_{\text{vor}} \times 100$ berechnet und als relative Hydrophobizität bezeichnet.

3.10 DNA-Extraktion

Vor einer DNA Extraktion wurde *S. epidermidis* in PY-Medium mit 1 % Glycin in Schüttelkultur angezogen. Der Zusatz von Glycin im Überschuss erhöht den Anteil dieser Aminosäure in den Pentapeptidvernetzungen der Zellwand. Dadurch wird eine höhere Sensibilität gegenüber Lysostaphin erreicht, das Glycin-Glycin Bindungen spaltet. Der Aufschluss der Zellwand wird somit deutlich effektiver.

Aus stationärer Wachstumsphase wurden 30 ml Bakterienkultur durch Zentrifugation bei 6232xg für 15 min geerntet und in 0,5 ml NaCl-Puffer (2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7,0) resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Zugabe von 22,5 U Lysostaphin (Sigma) bei 37°C lysiert. Durch den gleichzeitigen Zusatz von 2 µl RNase (500 µg/ml; Boehringer) wurde die RNA abgebaut. Nach drei Stunden wurde die Suspension mit 0,5 ml 7 % SDS gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die DNA durch Mischen mit 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) von den Zellresten getrennt und die Proben wurden zur Phasentrennung 60 min bei 6232xg zentrifugiert. Die obere, wässrige, DNA-reiche Phase wurde in ein steriles 14 ml Falconröhrchen überführt, ohne Vermischen mit 50 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 versetzt und mit 1 ml 96 %-igem Ethanol überschichtet. Die DNA konnte mit Hilfe einer sterilen, umgebogenen Pasteurpipette aufgewickelt und auf dieser getrocknet werden. Anschließend wurde sie in 0,7 ml sterilem TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4) resuspendiert. Es folgte ein weiterer Reinigungsschritt, in dem die Lösung mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und ausgeschüttelt wurde. Die Phasentrennung wurde durch 10 min Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge bei 13000xg erreicht, wonach der Überstand durch nochmaliges Ausschütteln und Zentrifugation mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) von Phenolresten befreit wurde. Zum Schluss wurde die DNA durch Zusatz von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2 Volumen 96 %-igem Ethanol bei 4°C über Nacht gefällt. Die so gereinigte DNA wurde abzentrifugiert, in 70 %-igem Ethanol [v/v] gewaschen, in 500 µl TE aufgenommen und bei 4°C gelagert. Sie wurde für Restriktionsanalysen (Kap. 3.11), PCR (Kap. 3.17) und Auftrennung in der Ultrazentrifugation eingesetzt (Kap. 3.16).

3.11 Restriktionsanalyse

DNA wurde aus *S. epidermidis* M12 extrahiert (Kap. 3.10) und einer Spaltung mit Restriktionsenzymen unterzogen, die keine Erkennungssequenz im Transposon besitzen. Die Restriktionsansätze enthielten 3 µl DNA, 1 µl Enzym sowie den

geeigneten Puffer und wurden mit sterilem dH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Es erfolgte eine Inkubation für 1-4 Stunden bei 37°C. Die gespaltene DNA wurde dann in einer Gelelektrophorese (Kap. 3.12) aufgetrennt und durch kapillaren Transfer (Kap. 3.13) auf eine Membran übertragen. Die Größe von transposontragenden Fragmenten wurde durch Southern-Hybridisierung (Kap. 3.15) mit Tn917-spezifischen Sonden bestimmt. Für die relative Lokalisation des Transposons im Fragment wurde für jedes Enzym ein weiterer Ansatz zusätzlich mit *SalI* gespalten, um das Transposon etwa mittig zu teilen.

Als Enzyme ohne Erkennungssequenzen in Tn917 wurden eingesetzt *BamHI*, *SphI*, *MluI*, *ScaI*, *EcoRV*, *NarI*, *SacI*, *ApaI*, *PvuII*, *PstI* und *NotI*.

In einem zweiten Ansatz wurden Restriktionsenzyme eingesetzt, die eine oder mehrere Spaltstellen im Transposon aufwiesen. Ein Doppelansatz mit *SalI* war in diesen Fällen nicht notwendig. Hierbei kamen die Enzyme *KpnI*, *MspI*, *NcoI*, *XhoI* und *NsiI* zum Einsatz.

Für eine Auftrennung in einer Saccharosegradienten-Ultrazentrifugation wurden 355 µl M12-DNA (Kap. 3.10) mit 40 U *NsiI* oder *MspI* für 19 Stunden gespalten, durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und zwei Volumen 96 %-igem Ethanol für 1 Stunde bei -80°C gefällt, und in 200 µl TE resuspendiert.

Die Enzyme wurden von den Firmen Roche, Amersham Pharmacia Biotech oder Boehringer Mannheim mit ihren zugehörigen Puffern bezogen. Restriktionsanalysen wurden in vergleichbaren Ansätzen auch mit Plasmid-DNA durchgeführt.

3.12 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die horizontale Gelelektrophorese wurde zur größenabhängigen Auftrennung von gespaltener DNA, von Fragmenten gespaltener Plasmide oder dem Nachweis von Amplifikaten aus der PCR eingesetzt. Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden 0,6 bis 1,5 %-ige [w/v] Agarosegele verwendet. Hochreine Agarose (SeaKem[®] ME Agarose, BIOZYM) wurde in 100 ml 0,5x TBE-Puffer aufgeköcht, abgekühlt, mit 3,3 µl Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Die Proben wurden mit 2-5 µl DNA-Ladepuffer versetzt und nach Entfernung des Kamms in die Taschen des ausgehärteten Gels eingefüllt. Eine Auftrennung erfolgte je nach Größe der zu analysierenden Fragmente bei konstanter Spannung von 3-6 V/cm in 0,5x TBE als Laufpuffer. Als Größenmarker wurde *HindIII* gespaltene λ-DNA (Amersham Pharmacia Biotech) oder ein Mix aus *HindIII* gespaltener λ-DNA und *HaeIII* gespaltener φX174-DNA (Finnzymes) aufgetragen. Die Gele wurden auf einem Transilluminator mit einem angeschlossenen Bilddokumentationssystem (PHASE, Lübeck) fotografiert.

3.13 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

QIAquick Gelextraktion DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Dabei wurden die gewünschten Banden mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in einem Eppendorfreaktionsgefäß gewogen. Pro 100 mg Gel wurden 300 µl QG-Puffer zugefügt und das Gel bei 50°C im Heizblock aufgelöst. Anschließend wurde ein ¼ Volumen Isopropanol zugegeben, gemischt und die DNA durch Zentrifugation durch eine Silicatmatrix an diese gebunden. Das Bindungsverhalten war dabei abhängig von pH und Salzgehalt der Lösung. Die an der Matrix gebundene DNA wurde nacheinander mit 500 µl QG-Puffer und 750 µl PE-Puffer gespült und anschließend in 30 µl EDTA-freiem Puffer eluiert. Die DNA-Konzentration des Eluats wurde durch Gelelektrophorese eines Aliquots überprüft.

So gereinigte Fragmente wurden zur Ligation in den linearisierten Staphylokokkenvektor pTX15 eingesetzt (Kap. 3.18). Für diesen ergaben sich mit der geschilderten Methode sehr schlechte Ausbeuten, so dass hier die GeneClean-Methode verwendet wurde.

GeneClean-Methode Zur Aufreinigung des linearisierten Staphylokokkenvektors pTX15 aus Agarosegelen wurde GeneClean® II (BIO 101) eingesetzt. Die DNA-Banden wurden wie beschrieben aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Anschließend wurden ½ Volumen TBE-Modifizier und 4,5 Volumen 3 M NaI zugegeben und das Gel darin bei 55°C aufgelöst. Die DNA wurde durch Zugabe von Glasmilch und nachfolgende Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur an Silicatpartikel gebunden. Diese wurden abzentrifugiert und dreimal mit NEW WASH-Lösung gewaschen. Die DNA wurde durch Zugabe von sterilem dH₂O wieder von den Partikeln gelöst und diese durch eine letzte Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand mit der gereinigten Vektor-DNA wurde in ein frisches Gefäß überführt und die DNA-Konzentration durch Gelelektrophorese eines Aliquots überprüft. Die Ausbeute mit dieser Methode war etwas besser als mit der QIAquick Gelextraktion. Der Vorteil liegt im wesentlichen in der Möglichkeit, größere Ausgangsmengen des linearisierten Vektors einsetzen zu können.

Die DNA-Lösungen aus beiden Methoden wurden möglichst frisch zur Ligation eingesetzt oder aber bei -20°C gelagert.

3.14 Kapillarer Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southern-Blot)

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennte DNA wurde durch alkalischen, kapillaren Transfer auf eine Zeta-Probe® Blotting Membran (BIO-RAD) übertragen. Dabei wurde im wesentlichen nach den Herstellerangaben vorgegangen.

Zwei Puffertanks, die mit einer aufliegenden Glasplatte verbunden waren, wurden mit 0,4 M NaOH gefüllt. Über vier Lagen Filterpapier (Machery-Nagel, Type 713) wurden

die Tanks mit einer Brücke verbunden. Darauf wurden vier weitere Lagen Filterpapier platziert, deren Größe der des Agarosegels entsprach. Das von den Taschen befreite Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf die feuchten Filter gelegt und mit einer zuvor in 0,4 M NaOH getränkten Nylonmembran bedeckt. Weitere vier Lagen getränktes Filterpapier und ein Stapel trockener Papierhandtücher wurden entsprechend der Gelgröße darauf gestapelt. Bei allen Lagen wurde darauf geachtet, dass sie luftblasenfrei aufgelegt wurden. Abschließend wurde eine Glasplatte aufgelegt und diese mit ca. 500 g Gewicht beschwert. Die Puffertanks wurden mit Klarsichtfolie (Saran[®], DOW Chemicals) bedeckt und das Gel mit dieser umrandet, so dass der kapillare Fluss nur über die Membran stattfinden konnte. Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen und für eine Stunde bei 80°C getrocknet.

3.15 Southern-Hybridisierung

Markierung der Sonden Die für die Hybridisierung eingesetzten DNA-Sonden wurden mit Hilfe des Ready-To-Go[®] DNA (-dCTP) Labelling Kits (Amersham Pharmacia Biotech) radioaktiv markiert. Dazu wurden 25-50 ng der Sonden-DNA und 5 ng *Hind*III gespaltene λ -DNA (Roche) als Größenstandard auf 45 μ l mit dH₂O aufgefüllt und 10 min bei 95°C in einem Heizblock denaturiert. Unmittelbar danach wurde der Ansatz für zwei Minuten auf Eis gestellt und anschließend auf den lyophilisierten Ready-To-Go[®] Mix gegeben. Die Kristalle wurden gut resuspendiert und die DNA-Fragmente durch Zugabe von 5 μ l [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech) für 10 bis 15 min bei 37°C markiert. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide wurden anschließend durch dreiminütige Zentrifugation über eine selbsthergestellte Sephadex[®] G-50-Säule (Sambrook et al., 1989) bei etwa 6000xg abgetrennt. Das Eluat wurde für die nachfolgende Hybridisierung verwendet, nachdem ein Aliquot desselben im Scintillationszähler auf eine Markierung überprüft worden war.

Hybridisierung Eine Membran mit aufgetrennten DNA-Fragmenten (Kap. 3.13 und Kap. 3.12) wurde für 20 min in 50 ml Hybridisierungslösung (1 mM EDTA; 0,16 M NaH₂PO₄, 0,34 M Na₂HPO₄, pH 7,2, 7 % [w/v] SDS) bei 65°C und leichtem Schwenken in einem Schüttelwasserbad prähybridisiert. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde wurden in dieser Zeit für 10 min bei 95°C denaturiert, dann 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend zur prähybridisierten Membran gegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht ebenfalls bei 65°C im Schüttelwasserbad statt. Nach Abgießen der Hybridisierungslösung wurde die Membran erst zweimal 30 min bei 65°C in Waschlösung I (1 mM EDTA, 12,6 mM NaH₂PO₄, 12,6 mM Na₂HPO₄, pH 7,2, 5 % [w/v] SDS) und anschließend zweimal in Waschlösung II (1 mM EDTA, 12,6 mM NaH₂PO₄, 12,6 mM Na₂HPO₄, pH 7,2, 1 % [w/v] SDS) gewaschen. Die noch feuchte Membran wurde in Kunststoffolie eingeschweißt und in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm (X-Omat[®] AR, KODAK) für 3-16 Stunden bei -80°C exponiert. Die Größe des Tn917-

tragenden Fragments konnte aus dessen relativer Lage auf der Membran im Vergleich zum Größenstandard abgeleitet werden.

3.16 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Um eine Auftrennung der gespaltenen M12-DNA nach der Größe der Fragmente zu erreichen, wurde eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Eine anschließende Fraktionierung des Gradienten sollte den gezielten Einsatz der DNA einer Fraktion in einer Autoligationsreaktion erlauben, in der das gesuchte Fragment angereichert war. Anschließend sollte das autoligierte Fragment über PCR amplifiziert, in *E. coli* kloniert und sequenziert werden.

Es wurde ein Saccharosegradient von 10-40 % hergestellt, indem je 800 µl verschieden konzentrierter sterilfiltrierter Stammlösungen vorsichtig in ein Ultrazentrifugationsröhrchen (Ultraclear Centrifuge tubes, Beckmann) eingeschichtet wurden. Die Saccharosekonzentrationen der einzelnen Schichten betrugen 40, 34, 28, 22, 16 und 10 % [w/v]. Zur vollständigen Ausbildung des Gradienten wurden die Röhrchen zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Anschließend wurden 100 µl gesplattene M12-DNA (Kap. 3.11) in TE aufgetragen und die Proben für vier Stunden bei 20°C bei 45000 Upm in der Ultrazentrifuge aufgetrennt. Es folgte eine Fraktionierung der Gradienten, indem die Röhrchen unten angestochen und die ausfließenden Tropfen in mehreren Aliquots aufgefangen wurden. Die Fraktionen wurden durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und zwei Volumen 96 %-igem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt, abzentrifugiert, in 70%-igem Ethanol gewaschen, in 20 µl sterilem dH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Um Fraktionen der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation auf die Anwesenheit von Anteilen des Transposons Tn917 zu prüfen, wurde die PCR (Kap. 3.17) eingesetzt. Für den Nachweis des 3'-Endes des Transposons, das durch Spaltung von M12-DNA mit *NsiI* entstanden war, wurden die *Primer* kb3a.for und kb3c.rev verwendet, für den Nachweis des 5'-Endes, das durch Spaltung von M12-DNA durch *MspI* entstanden war, die *Primer* Kpn1 und KBkpn1.rev. Die Lage der *Primer* im Transposon sind in Bild 2.1, Kap. 2.7 dargestellt.

3.17 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die *Polymerase chain reaction* (PCR) ist eine Standardmethode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dabei dient doppelsträngige DNA als Vorlage (*template*). Zwei zu den Einzelsträngen komplementäre, gegenläufige Oligonukleotide, die sogenannten *Primer*, dienen der DNA-Polymerase als Start. Durch abwechselnde Zyklen von Denaturierung der DNA, Anlagerung der *Primer* und Synthese des komplementären Stranges kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung des ursprünglichen Fragments.

Standardmäßig wurde die PCR mit Hilfe des DyNAzymeTM DNA Polymerase Kit (Finnzyme) in einem DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) durchgeführt. In einem 50 µl Ansatz wurde ca. 25-100 ng *template*-DNA, *Primer* in einer Konzentration von 0,3 µM, dNTPs mit je 200 µM, 2 U Polymerase und der Optimized-DyNAzymeTM-buffer eingesetzt. Der Ansatz wurde mit zwei Tropfen Mineralöl überschichtet. Initial wurde die DNA zwei Minuten bei 94°C denaturiert, in den anschließenden Zyklen nur für 40 s. Für die Anlagerung der *Primer* wurde die Temperatur für 30 s auf 55°C abgesenkt. Der Zweitstrang wurde bei 72°C synthetisiert, wobei sich die Dauer nach der Länge des zu amplifizierenden DNA Fragments richtete und mit etwa 1 min/kb angesetzt wurde. In der Regel wurden 25 Zyklen durchlaufen, worauf sich eine siebenminütige Synthesephase anschloss, um eine vollständige Komplementierung aller Einzelstränge zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt und bei dieser Temperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Kontrolle der PCR fand in einer anschließenden Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.12) statt.

Sollte die amplifizierte DNA kloniert und sequenziert bzw. zur Komplementierung *in trans* verwendet werden, so wurde das ExpandTM High fidelity-Polymerase Kit (Roche) mit *proofreading* Aktivität verwendet. Gleichzeitig wurde die Synthesetemperatur auf 68°C herabgesetzt.

3.18 Ligation

Ligationen wurden durchgeführt, um eine Amplifikation von Restriktionsfragmenten durchführen zu können, die einen Teil des Transposon Tn917 sowie einen flankierenden chromosomalen Abschnitt von M12-DNA enthielten, oder um einzelne Gene in den linearisierten Staphylokokkenvektor pTX15 einzufügen.

Alle Ligationen fanden bei 16°C über Nacht in 30 µl Ansätzen mit 1 U T4-DNA-Ligase (Roche) und dem dazugehörigen Puffer statt. Zur Autoligation von Restriktionsfragmenten wurden 5 µl der aufgereinigten Fraktionen aus der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (Kap. 3.16) unverdünnt, 1:10, 1:100 oder 1:1000 verdünnt eingesetzt. Für die Konstruktion von Vektorplasmiden wurden linearisierte Vektoren und Einzelgenfragmente aus der Gelelektrophorese im molaren Verhältnis von 3:1, 1:1 und 1:3 eingesetzt.

3.19 Klonierung

Eine Klonierung von PCR-Amplifikaten erfolgte mit Hilfe des TOPO TA Cloning[®] Kits (Invitrogen, K4700, Vers. J) nach Angaben des Herstellers. Dabei besitzt der linearisierte Vektor pCR2.1[®]-TOPO beidseitig 3'-Thymidin-Überhänge während die Amplifikate 3'-Deoxyadenosin-Überhänge aufweisen. Mit Hilfe der Topoisomerase I wurden Vektor und Amplifikate ligiert und anschließend in chemokompetente *E. coli* TOP 10 Zellen transformiert.

Es wurden 1-5 µl eines PCR-Amplifikats und 1 µl Salzlösung mit sterilem dH₂O auf 5 µl aufgefüllt und mit 1 µl Vektor gemischt. Die Ligation fand für 5 min bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt. Chemo-kompetente *E. coli* TOP10 (im Kit enthalten) wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl des Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 s bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und erneut auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit 250 µl SOC-Medium (Kit) versetzt und für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Während dieser Zeit wurde 40 µl X-Gal (40 mg/ml in Dimethylformamid) auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert und die Platten bei 37°C vorgewärmt. Es wurden 20-100 µl Bakteriensuspension unverdünnt ausplattiert und nach 24 Stunden weiße oder nur leicht bläuliche Kolonien zur weiteren Analyse ausgewählt.

3.20 Plasmidpräparation

Plasmidpräparation aus *E. coli* Plasmidpräparationen aus *E. coli* wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) durchgeführt. Das System beruht auf alkalischer Lyse der in LB-Medium angezogenen Bakterienzellen gefolgt von einer Adsorption der DNA an eine Silicatmatrix in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. Die anschließende Elution der DNA erfolgte in salzarmem Puffer. Das Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers. In der Regel wurden 1,5 ml einer Schüttelkultur zur Plasmidpräparation eingesetzt. Die Bakterien wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß pelletiert, in 250 µl Puffer 1 (Kit) resuspendiert und mit 250 µl Puffer 2 (Kit) gemischt. Nach Zugabe des Lysepuffers Puffer 3 (Kit) wurde die Suspension durch mehrfaches Invertieren gemischt und anschließend für 10 min bei ca. 13000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in auf eine QIAprep Säule (Kit) überführt und durch Zentrifugation die Plasmid-DNA an die Silicatmatrix gebunden. Die an die Matrix gebundene DNA wurde nacheinander mit 500 µl PB-Puffer (Kit) und 750 µl PE-Puffer (Kit) gewaschen. Zuletzt wurde die Plasmid-DNA in 50 µl EB (Kit) eluiert. Das Eluat wurde direkt in der Sequenzierung oder zu Restriktionsanalysen eingesetzt.

Plasmidpräparation aus Staphylokokken Da Staphylokokken sich durch das für *E. coli* beschriebene Verfahren nicht aufschließen lassen, wurde das Protokoll für *S. carnosus* TM300 und *S. epidermidis* M12 leicht abgewandelt und um einen weiteren Lyseschritt ergänzt. Zunächst wurden die Zellen in PY-Medium mit 1 % Glycin [w/v] angezogen und 5 ml Bakteriensuspension eingesetzt. Puffer 1, in dem die Bakterien nach der Ernte resuspendiert wurden, wurde mit 15 U/ml Lysostaphin versetzt und die Bakterien zur Lyse für 30 min bei 37°C inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden nach Anleitung wie bei *E. coli* durchgeführt. Um die Plasmide mit Restriktionsenzymen spalten oder in der Sequenzierung einsetzen zu können, war eine Phenolextraktion und anschließende Fällung notwendig. Hierzu wurde das Eluat mit Elutionspuffer auf 200 µl aufgefüllt, mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und ausgeschüttelt. Es erfolgte eine Phasentrennung durch 10 minütiges Zentrifugieren in

einer Tischzentrifuge bei 13000xg. Der Überstand wurde durch Ausschütteln und erneutes Zentrifugieren mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) von Phenolresten befreit. Abschließend wurden die Plasmide durch Zusatz von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2 Volumen 96 %-igem Ethanol bei 4°C über Nacht gefällt. Die gereinigten Plasmide wurden abzentrifugiert, in 70 %-igem Ethanol [v/v] gewaschen, in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

3.21 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden aus Plasmidpräparationen (Kap. 3.20) durchgeführt. Hierzu wurde das ABI PRISM® dGTP BigDye™ Terminator Ready Reaction Kit (PE Biosystems, Warrington, England) verwendet. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Eine Sequenzierreaktion enthielt 2 µl der Plasmidpräparation, 1 µl *Primer* (10 pmol/µl), 4 µl BigDye™ und 13 µl entionisiertes, steriles Wasser. Im Thermocycler (MWG-Biotech) mit beheiztem Deckel wurden die Reaktionen initial für 5 min bei 96°C denaturiert. Danach wurden 25 Zyklen mit 10 s Denaturierung bei 96°C, 5 s Oligonukleotidanlagerung bei 45°C und 4 min Reaktionszeit bei 60°C durchgeführt. Anschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt. Die Sequenzieransätze wurden nach dem Prinzip der Gelfiltration über Centri-Sep-Säulen (Princeton Separations, Adelphia, N.J.) von überschüssigen Nukleotiden getrennt, 5 µl des gereinigten Ansatzes mit 20 µl *Template suppression reagent* (ABI PRISM, Applied Biosystems) versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde die Sequenz mit dem automatischen Sequenzierapparat ABI Prism S310 über Kapillarelektrophorese analysiert. Für die weitere Verarbeitung der Sequenzen und einen Vergleich mit den internationalen Datenbanken das Programm Vector NTI Version 6.0 (SSPS, Science Software GmbH, Erkrath, Deutschland) verwendet. Dabei wurden BLAST-Suchen (Altschul *et al.*, 1990) über den Server des National Center for Biotechnology Information (NCBI) und die Datenbank von The Institute for Genomic Research (TIGR) durchgeführt.

3.22 Extraktion von Ribonukleinsäuren (RNA) aus *S. epidermidis*

Die Ribonukleinsäuren aus *S. epidermidis* wurden mit Hilfe des FastRNA™ Kit blue (BIO 101) nach der von Dobinsky beschriebenen Methode extrahiert (Dobinsky und Mack, 2001). Um eine Degradierung der RNA zu verhindern, wurden alle Arbeitsgänge mit vorgekühlten sterilen Gefäßen und Zentrifugen bei 4°C und auf Eis durchgeführt.

Für die Extraktion von RNA wurden Schüttelkulturen in TSB der exponentiellen oder der stationären Wachstumsphase (Ernte nach 6 bzw. 16 Stunden) eingesetzt. Zur Zellernte wurden 10 bis 25 ml der Kulturen entnommen und für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 4332xg zentrifugiert und mit 10 ml PBS gewaschen. Nach diesem Schritt wurden die Zellen in 100 µl H₂O_{ai} (aqua ad injectabile; Braun AG, Melsungen) und 500 µl CRSR (chaotrophisches, RNA stabilisierendes

Reagenz; BIO 101) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte mit 100 µl CIA (Chloroform/Isoamylalkohol; BIO 101) und 500 µl kaltem, saurem Phenol pH 4,5 (AMRESCO, Ohio, USA) gefüllte FastRNA™-Tubes (mit Silicat-Keramik Perlen gefüllt; BIO 101) überführt. Der Zellaufschluss erfolgte im FastPrep™ cell disruptor (FP 120, BIO 101, Savant instruments, Farmingdale, N.Y.) dreimal 20 s bei maximaler Geschwindigkeit (Stufe 6). Sofort wurde der Ansatz 10 min auf Eis gestellt, anschließend wurden die Zelltrümmer 30 min bei 16000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Vortexen für 10 s mit 500 µl CIA gemischt und erneut 5 min bei 16000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µl DIPS (DEPC-behandeltes Isopropanol; BIO 101) und 50 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 versetzt und die RNA über Nacht bei -20°C gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 16000xg wurde das Pellet mit 200 µl SEWS (RNase freie Salz/Ethanol Waschlösung; BIO 101) gewaschen, das SEWS anschließend abpipettiert und die RNA in 100 µl SAFE (DEPC behandeltes Wasser; BIO101) gelöst.

Mittels des GeneQuant Spectralfotometers (Amersham Pharmacia Biotech) wurde die RNA-Menge fotometrisch bei 260 nm bestimmt. Exopolysaccharide, die vor allem Biofilm-positive *S. epidermidis* Zellen in starkem Maße bilden, wurden durch eine zusätzliche Fällung mit 20 µl LiCl-Lösung (12 M; BIO 101) pro 100 µl SAFE für eine Stunde bei -20°C entfernt. Die gereinigte RNA wurde darauf 15 min bei 16000xg abzentrifugiert, mit 200 µl SEWS gewaschen und abschließend in SAFE zu einer Endkonzentration von 2 µg/µl RNA aufgenommen. Nach nochmaliger Quantifizierung wurde die RNA in Aliquots zu 10µg in Eppendorfgefäßen bei -80°C gelagert.

3.23 Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA

Für eine Northern-Analyse (Kap. 3.24) der extrahierten RNA wurde diese zunächst in einem Agarose-Formaldehydgel der Größe nach aufgetrennt. Hierzu wurden die Elektrophoresekammer sowie Gelträger und Kamm gründlich nacheinander mit 1 M HCl, 1 M NaOH und 70 % [w/v] Ethanol gewaschen. Es wurde ein Agarose-Formaldehydgel hergestellt, indem 1 g Agarose in 10 ml 10x MOPS und 73,4 ml autoklaviertem dH₂O aufgekocht wurde. Die Zugabe von 16,6 ml Formaldehyd (Fluka) und 3,3 µl Ethidiumbromid erfolgte nach Abkühlung auf ca. 60°C. Das flüssige Gel wurde sofort nach Durchmischung in den Gelträger gegossen und härtete für mindestens 30 min aus.

RNA-Aliquots von 10 µg (Kap. 3.16) wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 µl frischem Probenpuffer (Formamid/Formaldehyd/10x MOPS/dH₂O im Verhältnis 15:5:3:3) versetzt, 10 min bei 65°C erhitzt und direkt anschließend wieder auf Eis gestellt. Die so vorbereiteten Proben wurden noch mit 2,5 µl Ladepuffer (50 % [v/v] Glycerin, 0,4 % [w/v] Bromphenolblau, 0,2 % [w/v] Xylen-Cyanol) gemischt und in die Taschen des Gels eingefüllt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 1 V/cm für 15-20 Stunden mit 1x MOPS als Laufpuffer. Die Wanderung der RNA im Gel wurde

auf einem Transilluminator mit einem angeschlossenen Bilddokumentationssystem (PHASE, Lübeck) dokumentiert.

3.24 Northern-Hybridisierung

Nach Auftrennung der RNA im Agarose-Formaldehydgel (Kap. 3.23) und der zugehörigen Dokumentation wurde das Gel 30 min in 15x SSC equilibriert. Anschließend wurde die RNA entsprechend des Southern-Blots (Kap. 3.13) mit 15x SSC über Nacht auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde hinterher kurz in 2x SSC gespült und für zwei Stunden bei 80°C getrocknet.

Markierung der Sonden Sonden zur Detektion transkribierter Gene wurden 5'-terminal mittels der Polynukleotid-Kinase-Reaktion radioaktiv markiert (Sambrook *et al.*, 1989). Dabei wird in einer Reaktion γ - ^{32}P von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP auf eine durch Dephosphorylierung des 5'-Endes entstandene Hydroxy-Gruppe übertragen. In einer Austausch-Reaktion wird zudem nicht markiertes Phosphat der DNA auf ADP übertragen und die dephosphorylierte DNA mit ^{32}P rephosphoryliert.

Die Markierung wurde in einem 20 μl Gesamtansatz durchgeführt. Dazu wurden 20 pmol Oligonukleotid mit dH₂O, 10 U Polynukleotid-Kinase (Roche), dem zugehörigen Reaktionspuffer und 5 μl $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) für 43 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde dann mit 2 μl 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 70 μl eiskaltem, 96 %-igem Ethanol vier Stunden bei -20°C oder eine Stunde bei -80°C gefällt. Anschließend wurde er 15 min bei 10000xg abzentrifugiert, mit 100 μl 70 %-igem [v/v] Ethanol gewaschen und in 100 μl dH₂O aufgenommen. Nachdem ein Aliquot der Sonde im Scintillationszähler auf eine ausreichende Markierung überprüft worden war, wurde der Gesamtansatz der Hybridisierungslösung zugesetzt.

Hybridisierung Eine Membran mit der Größe nach aufgetrennter RNA (Kap. 3.23) wurde in 25 ml Prähybridisierungslösung (7 % [w/v] SDS, 20 mM Natriumphosphatpuffer [pH 7,0], 10x Denhardts, 5x SSC) bei 50°C und leichtem Schwenken in einem Schüttelwasserbad prähybridisiert. Nach etwa 20 min wurden die radioaktiv markierte DNA-Sonde und 10 % [w/v] Dextransulfat (Roth) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 50°C über Nacht unter leichtem Schwenken im Schüttelwasserbad. Nach Abgießen der Hybridisierungslösung wurde die Membran einmal 30 min in Oligo-Waschlösung I (5 % [w/v] SDS, 10x Dehnhardts, 20 mM Natriumphosphatpuffer [pH 7,0], 3x SSC) und anschließend zweimal in Oligo-Waschlösung II (1 % SDS und 1x SSC) gewaschen. Die noch feuchte Membran wurde in Kunststoffolie eingeschweißt und in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm (X-Omat® AR, KODAK) bei -80°C exponiert. Die Filme wurden frühestens nach 4 Stunden und spätestens nach 2 Tagen entwickelt. Die Sonden wurden maximal dreimal innerhalb von 14 Tagen verwendet.

Entfernung der Sonden (*Stripping*) und Rehybridisierung Um eine Membran nacheinander mit verschiedenen Sonden hybridisieren zu können, wurde sie fünfmal für 5 min unter Schütteln bei 80°C im Wasserbad mit *Stripping*-Lösung (1 % SDS [w/v], 0,1x SSC, 40 mM TrisHCl [pH 8,0]) gewaschen. Die quantitative Entfernung der Sonde konnte mit Hilfe eines 2 Tage exponierten Films nachgewiesen werden. Nur wenn dieser Film keine Schwärzung mehr aufwies, wurde die Membran rehybridisiert. Eine Membran wurde mit höchstens zwei verschiedenen Sonden nacheinander hybridisiert.

3.25 Protoplastentransformation

Zur Transformation von *Staphylococcus carnosus*-Protoplasten wurde im wesentlichen das Protokoll von Götz und Schumacher verwendet (Götz und Schumacher, 1987). Um sicher zu stellen, dass sich keine Detergenzienreste in den verwendeten Gefäßen befanden, wurden alle Glasgeräte und Zentrifugenbecher vor Gebrauch über Nacht mit entionisiertem Wasser eingeweicht und anschließend fünfmal mit solchem und einmal mit dH₂O gespült. Außerdem wurden für die Protoplasten ausschließlich Glaspipetten verwendet, um die Einwirkung von Scherkräften auf die labilen Protoplasten gering zu halten.

Herstellung der Protoplasten

Eine Kolonie *S. carnosus* TM300 wurde in 15 ml B-Brühe (Kap. 2.3) eingerührt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Aus dieser Vorkultur wurden 2,5 ml in 800 ml B-Brühe zur Hauptkultur überführt und diese für etwa drei weitere Stunden inkubiert. Dabei wurde das Wachstum anhand der optischen Dichte verfolgt und die Zellen wurden bei einer OD₅₇₈ von exakt 0,5 geerntet. Um weiteres Zellwachstum zu verhindern, wurden alle nachfolgenden Schritte der Zellernte auf Eis bzw. mit kalten Lösungen durchgeführt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 6232xg bei 4°C für 15 min pelletiert und von Restmedium befreit. Das Pellet wurde in 100 ml SMMP (Kap. 2.4) resuspendiert und in vier 100 ml Erlenmeyerkolben aufgeteilt. Zur Lyse der Zellwände wurden die Kolben mit 10, 20, 40 und 80 µl Lysostaphin (1500 U/ml) beschickt und für 16 Stunden bei 30°C im Wasserbad ohne Schütteln inkubiert.

Die Protoplasten wurden durch Zentrifugation bei 27000xg und 4°C für 40 min geerntet und die Pellets durch Abgießen vom Restmedium befreit. Die Protoplasten wurden in 2 ml SMMP (Kap. 2.4) ohne BSA durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert und in 300 µl Aliquots in 10 ml Polystyrolröhrchen bei -80°C gelagert. Es trat keine merkliche Verminderung der Transformationseffizienz durch die Lagerung auf.

Transformation

Zur Transformation wurden entweder frische Protoplasten oder bei Raumtemperatur aufgetaute Aliquots eingesetzt und mit 10 µl eines gereinigten Plasmids (Kap. 3.20) oder 30 µl Ligationsansatz (Kap. 3.18) versetzt. Die Fusion der Protoplasten wurde durch Zugabe von 2 ml Fusogen (40 % [w/v] Polyethylenglycol in 50 % [v/v] SMM, pH 6,5) ausgelöst. Zur Sterilisation war das Fusogen zuvor eine Stunde im Wasserbad

gekocht worden. Die Suspension wurde vorsichtig durch Umschwenken des Röhrchens gemischt, bis kaum noch Schlieren zu sehen waren. Nach exakt zwei Minuten wurde das Fusogen durch Zugabe von 7 ml SMMP (Kap. 2.4) verdünnt und durch Invertieren des Röhrchens gemischt. Die Protoplasten wurden bei Raumtemperatur für 25 min bei 6232xg zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde in 2 ml SMMP (Kap. 2.4) durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert und die Protoplasten wurden unverdünnt auf DM3-Agar ausplattiert.

Die DM3-Agarplatten wurden für 4 Stunden bei 37°C inkubiert, um die Expression der plasmidkodierten Gene zu gewährleisten. Anschließend wurden die Platten mit 3 ml CY-Softagar (Kap. 2.3) mit 100 µg/ml Tetracycline (Sigma) überschichtet. Transformanten erschienen in der Regel nach etwa 48 Stunden.

Protoplastentransformation von *S. epidermidis*

Für die Protoplastentransformation von *S. epidermidis* wurde das gleiche Verfahren wie für *S. carnosus* angewendet. Dazu wurden Protoplasten der Biofilm-negativen Mutante M12 hergestellt. Ein großer Teil der Protoplasten war nach 16 Stunden bei 30°C stark lysiert, so dass eine große Menge DNA freigesetzt wurde. Der Überstand musste deshalb nach der Ernte der Protoplasten mit der Pipette abgenommen werden. Die M12-Protoplasten resuspendierten sich schlechter als die von *S. carnosus* TM300 und die Transformationseffizienz war etwa hundertfach geringer. Es wurden daher nur intakte aus *S. carnosus* aufgereinigte Plasmide und keine Ligationsansätze zur Transformation verwendet.

4 Ergebnisse

Es sollte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, die primäre Adhäsion von *S. epidermidis*-Zellen an unterschiedlichen Zellkultur- und Kunststoffoberflächen zu detektieren und miteinander zu vergleichen. Es sollte gleichzeitig möglich sein, eine Transposonmutantenbank auf adhäsionsveränderte Klone zu testen. Ein ELISA vereint die geforderten Aspekte: eine große Anzahl von Proben kann parallel bearbeitet werden und in Form von Mikrotiterplatten steht eine Vielzahl verschiedener Oberflächen zur Verfügung. Diese sind ihrerseits durch Beschichtung mit geringem Aufwand zu modifizieren. Die Bakterien sollten durch den Einsatz von staphylokokkenspezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Ein Anti-Staphylokokken-Antiserum stand in Form des durch Immunisierung eines Kaninchens mit fixierten *S. epidermidis* 5179-Zellen gewonnenen Antiserums zur Verfügung. Auf diese Weise enthielt das Antiserum keine Anti-PIA-Antikörper, die eine Variation des ELISA-Signals durch unterschiedlich starke PIA-Produktion einzelner Stämme oder Mutanten hervorrufen könnten.

4.1 Entwicklung eines ELISA zur Messung bakterieller Adhäsion an Oberflächen

Zur Entwicklung des ELISA für die Detektion adhärierender Staphylokokken wurden Mikrotiterplatten mit Nunclon Δ -Oberfläche verwendet, die im Biofilmtest zum Nachweis der Biofilmbildung benutzt werden. Da die primäre Adhäsion eine Grundvoraussetzung für die Biofilmbildung an der Oberfläche dieser Platten ist, mussten hier adhärente Bakterien nachzuweisen sein.

4.1.1 Einfluss der Bakterienkonzentration im Inokulum auf das ELISA-Signal

Als erstes musste gezeigt werden, dass Abhängigkeiten zwischen einem variablen Parameter und dem ELISA-Signal prinzipiell nachweisbar sind. In der Annahme, dass die Zahl adhärenter Bakterien abhängig ist von der Anzahl der inkubierten Bakterien, wurden dazu Staphylokokkensuspensionen mit steigenden Konzentrationen für eine Stunde in den Näpfen einer Mikrotiterplatte inkubiert und getestet, ob ein Nachweis der Bakterien an Nunclon Δ möglich war.

Näpfe, die zur Kontrolle mit PBS ohne Bakterien inkubiert worden waren, wiesen nur eine sehr geringe Absorption (A_{405}) von durchschnittlich 0,05 auf. Damit konnte gezeigt werden, dass weder der Anti-Staphylokokken-Antikörper noch der mit alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper unspezifisch an Nunclon Δ binden. Es wurde auch in allen folgenden Versuchen eine Reihe von Näpfen als Negativkontrolle mit sterilem PBS beschickt und deren Mittelwert als Hintergrund von den Mittelwerten der übrigen Parallelansätze abgezogen.

Mit zunehmender Anzahl inkubierter *S. epidermidis* 1457-Zellen in den Näpfen der Mikrotiterplatten stieg das ELISA-Signal stetig an (Bild 4.1). Dabei war eine über dem Hintergrund liegende Absorption ab einer Zelldichte von etwa 10^6 CFU/ml im Inokulum messbar. Der durch das Photometer bedingte maximale Messwert von 2,5 wurde bei einer Zelldichte von ca. 10^8 CFU/ml erreicht.

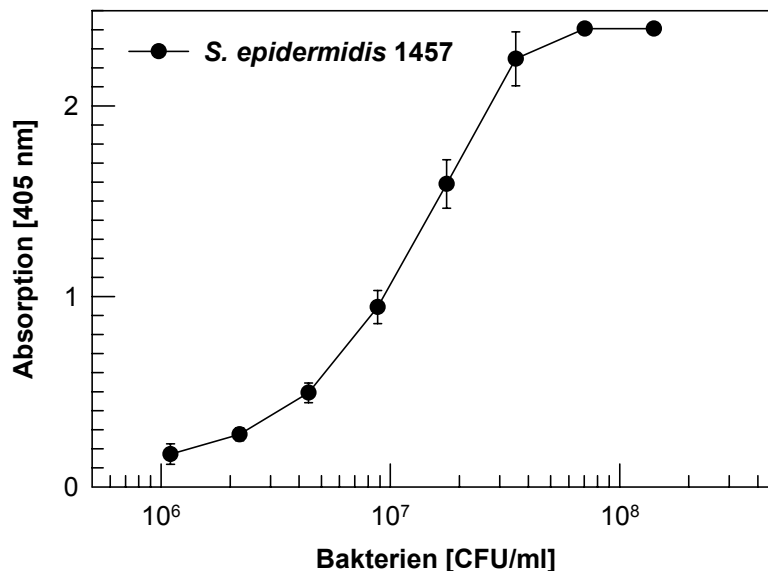


Bild 4.1: Abhängigkeit der Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an NunclonΔ von der inkubierten Zelldichte. Die Bakterien wurden für eine Stunde in Mikrotiterplatten inkubiert und adhärenente Zellen mittels ELISA detektiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei Parallelen und ihre Standardabweichung

Ein spezifischer Nachweis von *S. epidermidis* 1457 an der gewählten Oberfläche war folglich möglich und der Anheftungs-ELISA erfüllte damit die geforderte Grundvoraussetzung für den gewünschten Anwendungsbereich.

4.1.2 Einfluss der Inkubationszeit auf das ELISA-Signal

Es musste überprüft werden, ob der willkürlich gewählte Anheftungszeitraum von einer Stunde geeignet war, die primäre Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* zu erfassen. Zu diesem Zweck wurde eine Bakteriensuspension mit 2×10^7 CFU/ml für null bis 120 Minuten in der Mikrotiterplatte inkubiert und anschließend im ELISA entwickelt.

Es stellte sich heraus, dass die Adhäsion scheinbar einer Sättigungskinetik folgte, bei der nach 15 min der halbmaximale Messwert erreicht war und nach 60 min nur noch geringe Änderungen pro Zeit auftraten (Bild 4.2). Eine Inkubationszeit von genau einer Stunde erschien daher geeignet, um eine methodisch bedingte Schwankung der ELISA-Absorption gering zu erhalten. Gleichzeitig sollte ein starker Einfluss von bakteriellem Wachstum während des Adhäsionszeitraumes ausgeschlossen sein. Im weiteren wurden alle Anheftungsexperimente mit einstündiger Inkubationszeit durchgeführt.

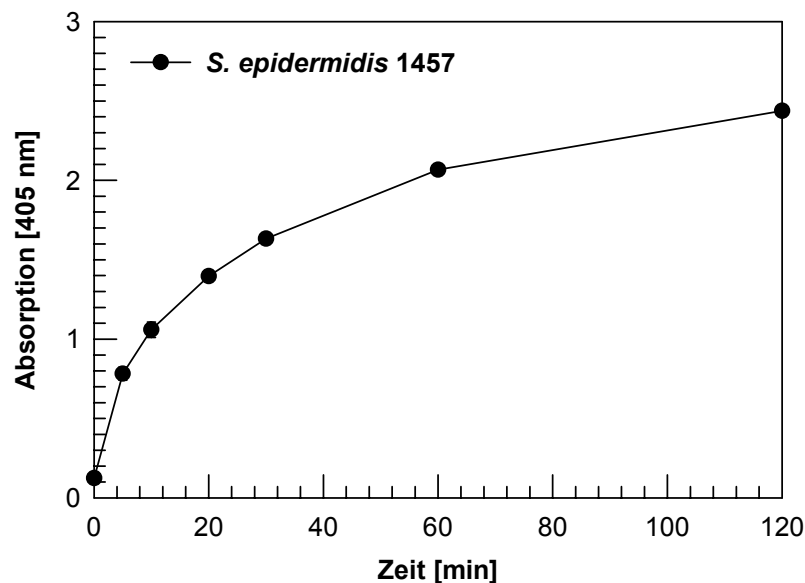


Bild 4.2: Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an NunclonΔ in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Bakterien wurden in Mikrotiterplatten inkubiert und adhärenente Zellen mittels ELISA detektiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei Parallelen und ihre Standardabweichung. Sind keine Fehlerbalken erkennbar, so ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol des Datenpunktes

4.1.3 Einfluss von fetalem Kälberserum auf die Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an NunclonΔ

Es sollte überprüft werden, ob eine Detektion verminderter Adhäsion im Anheftungs-ELISA möglich ist. Da die Adhäsion koagulasenegativer Staphylokokken an verschiedenen Materialien wie Teflon- oder Silikonkathetern durch eine Beschichtung mit Serumproteinen herabgesetzt wird (Pascual *et al.*, 1986), wurde die Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an nativem NunclonΔ mit der an einer mit fetalem Kälberserum beschichteten Platte verglichen. Eine Beschichtung der Platten erfolgte mit 10 % FKS in PBS [v/v] für zwei Stunden bei 37°C. Die unbeschichtete Oberfläche wurde währenddessen mit PBS ohne FKS inkubiert. Vor dem Anheftungs-ELISA wurden die Platten einmal mit PBS gespült. Der Inkubationspuffer enthielt kein FKS.

Es zeigte sich, dass etwa 100-fach mehr Bakterienzellen eingesetzt werden mussten, um an der beschichteten Platte einen ELISA-Kurvenverlauf hervorzurufen, der dem an der nativen NunclonΔ-Oberfläche entspricht (Bild 4.3). Das bekannte Phänomen der Adhäsionsverminderung von *S. epidermidis* durch Serumproteine an einer Kunststoffoberfläche konnte hier nachvollzogen werden. Der Anheftungs-ELISA ist demnach gut dazu geeignet, das Adhäsionsverhalten von *S. epidermidis* 1457 an verschiedenen Oberflächen zu vergleichen und Unterschiede zu detektieren.

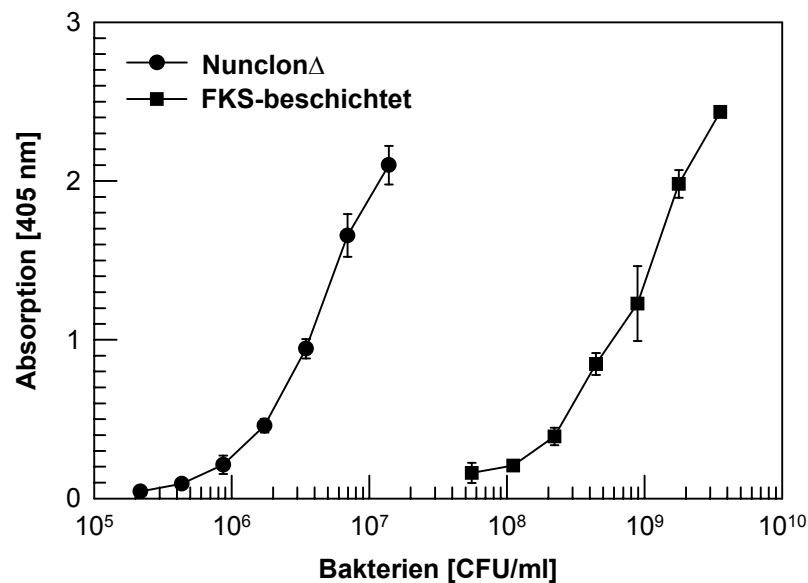


Bild 4.3: Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an NunclonΔ und FKS-beschichtetem NunclonΔ. Der Test wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt und adhärente Bakterien mittels ELISA detektiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei Parallelen und ihre Standardabweichung. Sind keine Fehlerbalken erkennbar, so ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol des Datenpunktes

4.1.4 Abhängigkeit der Anzahl adhärenter Bakterien von der Ausgangskonzentration im Inokulum

Es war gezeigt worden, dass der Anheftungs-ELISA gut geeignet war, die Adhäsion von *S. epidermidis* an verschiedenen Oberflächen zu vergleichen. Nun sollte die im ELISA ermittelte Absorption mit der Anzahl adhärenter Staphylokokkenzellen korreliert werden. In einem ersten Schritt musste also möglichst exakt die Anzahl adhärenter Bakterienzellen bestimmt werden. Dies konnte nur mit Hilfe von radioaktiv markierten Bakterien durchgeführt werden.

Zunächst war es notwendig, ein System zu finden, in dem sowohl der Anheftungs-ELISA durchgeführt als auch eine Messung der einzelnen Proben im Scintillationsmessgerät vorgenommen werden konnte. Mikrotiterplatten des Lockwell-Systems (Nunc), deren Näpfe aus dem Rahmen zu lösen sind, boten diese Möglichkeit. Da jedoch keine NunclonΔ-Oberfläche in diesem System verfügbar war, wurde die Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an den erhältlichen Maxisorp- und Polysorpoberflächen mit der an der NunclonΔ-Oberfläche verglichen.

Die Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an Maxisorp entsprach der des Stammes an NunclonΔ, während die Adhäsion an Polysorp bei hohen Bakterienkonzentrationen etwas schwächer war (Bild 4.4). Für den Nachweis der Adhäsion mit radioaktiv markierten Bakterien wurden deshalb Lockwell-Platten mit Maxisorp-Oberfläche eingesetzt.

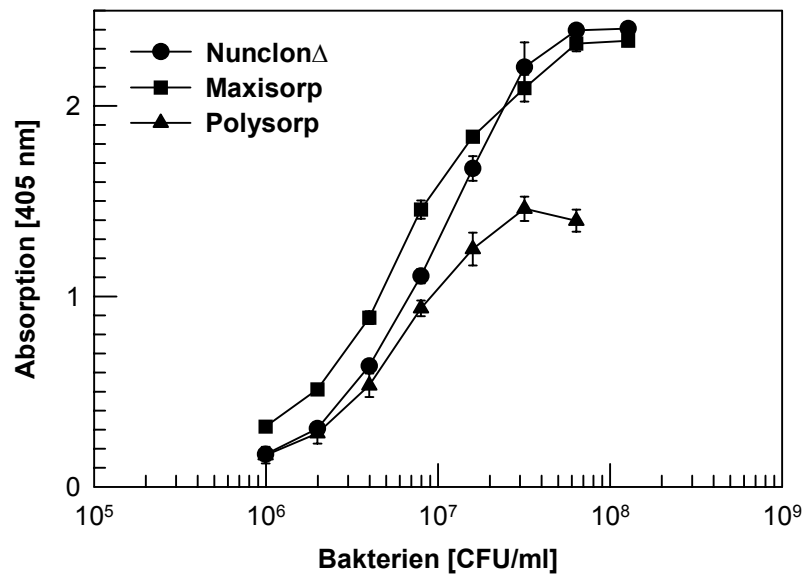


Bild 4.4: Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an NunclonΔ, Maxisorp und Polysorp. Der Test wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt und adhärenente Bakterien mittels ELISA detektiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei Parallelen und ihre Standardabweichung. Sind keine Fehlerbalken erkennbar, so ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol des Datenpunktes

S. epidermidis 1457 wurde durch Wachstum mit ³H-Thymidin radioaktiv markiert und die Bakterien wurden wiederum für eine Stunde zur Anheftung in der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach den anschließenden Waschschritten wurden die Scintillationsmessungen durchgeführt. Es wurden drei Versuche an unterschiedlichen Tagen durchgeführt, bei denen sterile Proben vom Zeitpunkt der ³H-Thymidinzugabe an mitgeführt wurden. In diesen Kontrollen war nur eine geringe Radioaktivität in den Näpfen messbar, die als Blindwert von allen Messwerten abgezogen wurde. Je nach Stamm und Anzuchtbedingungen lag die Markierung der Bakterien zwischen 7 und 441 CFU/cpm.

Es konnte in drei unabhängigen Versuchen ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl adhärenente *S. epidermidis* 1457 Zellen und der Konzentration der inkubierten Bakteriensuspension beobachtet werden (Bild 4.5). Dieser lässt sich durch die Gleichung

$$y = 0.02 \times x - 0.028 \quad (4.1)$$

beschreiben ($r^2 = 0,997$). Dabei entspricht y der Anzahl adhärenente Bakterien und x der Bakterienkonzentration im Inokulum.

Die Linearität erstreckte sich über den kompletten untersuchten Konzentrationsbereich von 5×10^5 bis 2×10^8 CFU/ml inkubierter Staphylokokkenzellen (Bild 4.5). Beim Einsatz von 100 µl Bakteriensuspension pro Napf, ergab sich eine Anheftungsrate von 20 % der inkubierten Bakterien. Wenn die Maxisorp-Oberfläche vor der Anheftung der Bakterien für eine Stunde mit 3 % BSA in PBS [w/v] beschichtet wurde, so reduzierte sich der Anteil adhärenente Zellen um etwa 90 % (Bild 4.5). Damit konnte gleichzeitig

die Validität dieser Methode zum Nachweis von Anheftungsunterschieden demonstriert werden.

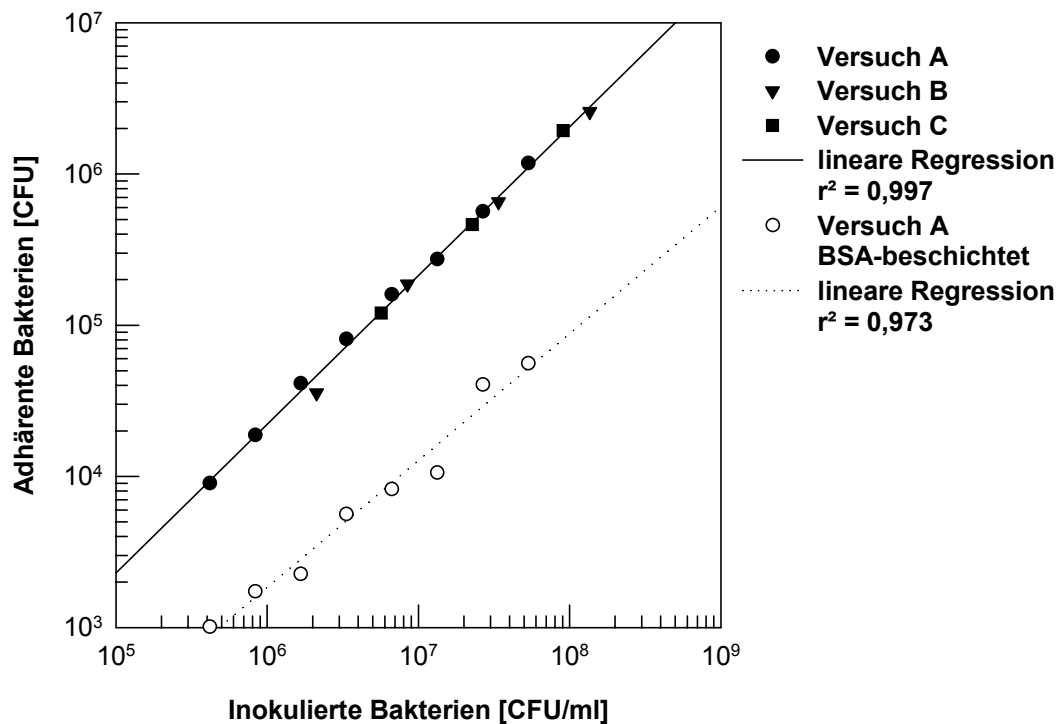


Bild 4.5: Anzahl adhärenter *S. epidermidis* 1457-Zellen in Abhängigkeit von der Bakterienkonzentration im Inokulum. Verglichen wurde die Anheftung an der nativen Maxisorp-Oberfläche mit einer BSA-beschichteten Maxisorp-Mikrotiterplatte in drei unabhängigen Versuchen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Die radioaktiv markierten Bakterien wurden mittels Scintillationsmessung der einzelnen Näpfe detektiert

4.1.5 Korrelation von ELISA-Signal und der Anzahl adhärenter Bakterien

Um die Absorptionswerte des Anheftungs-ELISAs mit der Anzahl adhärenter Bakterien zu korrelieren, wurden die beiden Adhäsionstests an der Maxisorp-Oberfläche zueinander in Beziehung gesetzt (Bild 4.6). Dabei wurde zuerst die Anzahl der adhärenten Staphylokokkenzellen aus der inokulierten Zellkonzentration nach Gleichung (4.1) berechnet. Eine anschließende Regressionsanalyse aller ELISA-Werte zwischen 0,2 und 2,2 aus mehreren unabhängig durchgeführten Versuchen ergab, dass die Absorption (A_{405}) y vom natürlichen Logarithmus der Anzahl adhärenter Bakterien x nach der Gleichung

$$y = -5.1 + 0.54 \ln x \quad (4.2)$$

abhängig ($r^2 = 0,975$; Bild 4.6). Die Anzahl adhärenter Bakterien lässt sich folglich aus der gemessenen Absorption nach

$$x = e^{\frac{y+5.1}{0.54}} \quad (4.3)$$

berechnen.

Im bei der Regressionsanalyse berücksichtigten Messbereich des ELISA adhärten demnach zwischen 2×10^4 und 6×10^5 Bakterien am Boden eines Napfes (Bild 4.6). Damit lässt sich die Anzahl adhärenter Bakterien auch an NunclonΔ gut abschätzen. Für eine Übertragung auf andere Oberflächen wurde angenommen, dass die ELISA-Reaktivität im wesentlichen auf die Antikörperbindungskapazität des eingesetzten Stammes zurückzuführen ist. Sie spiegelt eine bakterielle Eigenschaft wider, die unabhängig sein sollte von der zur Adhäsion angebotenen Oberfläche.

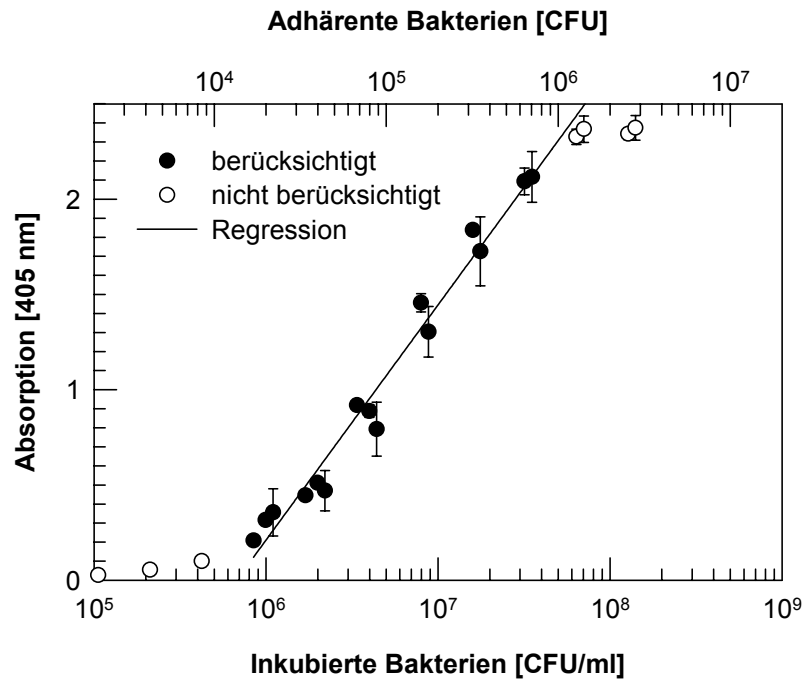


Bild 4.6: Korrelation zwischen ELISA-Signal und adhärenen Bakterienzellen an der Maxisorp-Oberfläche. Der Anheftungs-ELISA wurde in Mikrotiterplatten mit Maxisorp-Oberfläche durchgeführt. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei Parallelen und ihre Standardabweichung. Sind keine Fehlerbalken erkennbar, so ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol des Datenpunktes. Die Anzahl der adhärenen Bakterien wurde nach Gleichung (4.1) berechnet. Die gefüllten Symbole markieren die Datenpunkte, die in der Regressionsanalyse berücksichtigt wurden

Um adhäsionsveränderte Mutanten in einem *Screening* mit dem ELISA erfassen zu können, sollte das Inokulum so gewählt werden, dass der Referenzstamm eine Absorption zwischen 1,0 und 1,5 aufweist. In diesem Fall können Mutanten detektiert werden, die etwa um den Faktor 4 bis 10 besser oder schlechter anheften.

4.1.6 Einfluss von Kulturbedingungen auf die Adhäsion von *S. epidermidis* 1457

Adhäsionsvermindernde Mutationen treten am deutlichsten hervor, wenn ein Vergleich mit dem Wildtyp durchgeführt wird, während dieser seine Adhäsionsfaktoren am stärksten exprimiert. Um die dafür geeigneten Kulturbedingungen zu ermitteln, wurde die Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 nach Anzucht im Standardmedium TSB als Schüttelkultur oder Biofilmkultur sowie nach Anzucht in den Medien TSB, TSBØ und HHW im Anheftungs-ELISA untersucht.

Nach Anzucht der Bakterien in Biofilmkultur wurde eine ebenso starke Adhäsion des Stammes an Nunclon Δ detektiert wie nach Anzucht in Schüttelkultur (Bild 4.7A). Auch eine Anzucht in den Medien TSB $\emptyset$ und HHW rief im Vergleich zum Standardmedium TSB keine Unterschiede in der Anheftung hervor (Bild 4.7B). *S. epidermidis* adhärte unter allen gewählten Anzuchtbedingungen gleichermaßen gut an die gebotene Oberfläche. Der Kurvenverlauf änderte sich auch dann nicht, wenn die Zellen stationär in Mikrotiterplatten angezogen wurden (ohne Bild).

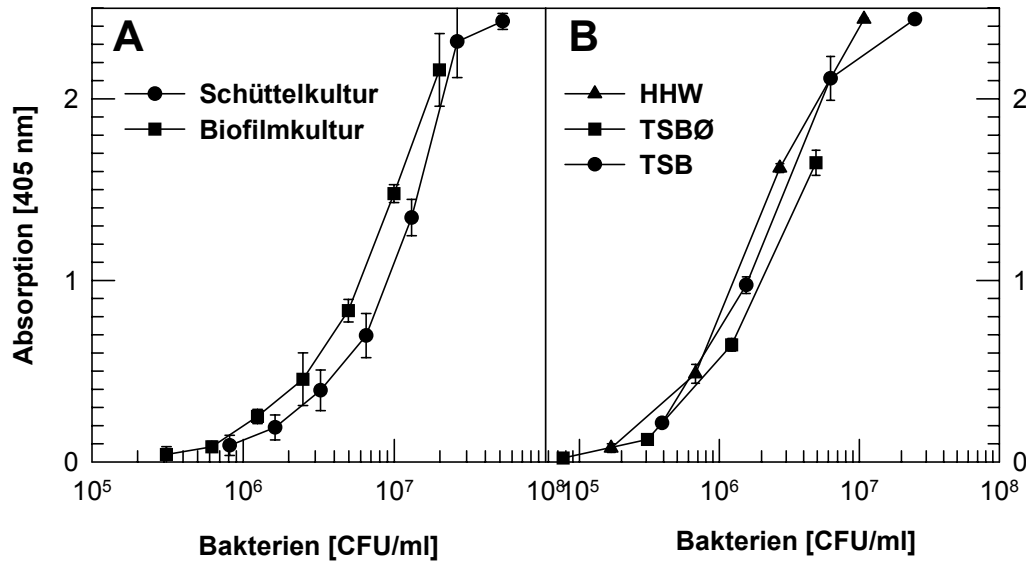


Bild 4.7: Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an Nunclon Δ in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen A als Biofilm oder in Schüttelkultur im Standardmedium TSB oder B in den Medien TSB, HHW und TSB $\emptyset$. Die Tests wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt und adhärente Bakterien mittels ELISA detektiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei Parallelen und ihre Standardabweichung. Sind keine Fehlerbalken erkennbar, so ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol des Datenpunktes

Die für eine Adhäsion an Nunclon Δ notwendigen Faktoren sind also entweder von den Medienkomponenten und Kulturbedingungen unabhängig oder konstitutiv in so großer Menge vorhanden, dass eine unterschiedlich starke Expression keine Auswirkungen auf die Adhäsion an Nunclon Δ hat. Dieser Umstand ermöglichte es, die Staphylokokken für weitere Versuche in Mikrotiterplatten zu kultivieren, was die parallele Anzucht vieler Stämme erheblich erleichterte.

Sowohl Vor- als auch Hauptkulturen wurden in Folge in Mikrotiterplatten angelegt. Die zwangsläufig auftretenden Abweichungen in den Anzuchtbedingungen der einzelnen Stämme, zum Beispiel durch höhere Verdunstung in den äußeren Näpfen der Platten, drückten sich nicht in starken Schwankungen der Messwerte aus.

4.2 Anwendungen des Anheftungs-ELISAs

4.2.1 Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an Epithelzellen

Koagulasenegative Staphylokokken gehören zur natürlichen Hautflora des Menschen. Man geht davon aus, dass diese bei Patienten als Inokulum für Infektionen von Fremdkörpern dient. Eine Verringerung der Populationsdichte von Staphylokokken an der Eintrittsstelle beispielsweise eines Venenkatheters, die über das durch Desinfektionsmittel erreichte Maß hinaus geht, könnte unter Umständen das Infektionsrisiko stark herabsetzen. Bislang ist jedoch über Mechanismen der Adhäsion der Bakterien an die Haut wenig bekannt.

Mit Hilfe des neu entwickelten Anheftungs-ELISAs sollte nun das Adhäsionsverhalten von *S. epidermidis* an Epithelzellen charakterisiert werden. Hierzu wurde mit fünf verschiedenen epithelialen Zelllinien gearbeitet. Diese wurden in Mikrotiterplatten kultiviert und im ELISA eingesetzt, sobald sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte.

Versuche mit Zellkulturen auf Deckgläsern hatten gezeigt, dass die Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an einem fixierten Zellrasen deutlich stärker war als an einem unfixierten (Daten nicht gezeigt). Ob als Fixativ Paraformaldehyd, Methanol oder Aceton verwendet worden waren, spielte dabei eine untergeordnete Rolle. Um solche verfälschende Faktoren möglichst gering zu halten, wurde eine Fixierung daher erst nach dem Adhäsionsvorgang der Bakterien und fünfmaligem Waschen vorgenommen.

Es erwies sich außerdem als notwendig, *S. epidermidis* 1457 für den Einsatz im Zellkultur-ELISA in Zellkulturmedium zu verdünnen. Eine Inkubation mit einer Bakteriensuspension in PBS führte dazu, dass die Epithelzellen schon bei den ersten Waschgängen nach der Adhäsionsphase von der Platte gespült wurde. Da sich gezeigt hatte, dass FKS an Nunclon Δ einen stark adhäsionsvermindernden Einfluss ausübte (Kap. 4.1.3), wurden die Zellkulturen vor Zugabe der Bakterien einmal mit FKS-freiem Medium gespült und die Bakterien in eben solchem aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation der Bakterien mit dem Zellrasen mussten die ersten Waschschritte auch trotz dieser Maßnahmen sehr vorsichtig durchgeführt werden. Um ein weiteres Ablösen des Zellrasens während der vielen anschließenden Waschvorgänge im ELISA effizient zu verhindern, wurden die Zellkulturen mit den adhärenen Staphylokokken dann mit Paraformaldehyd fixiert.

Die Zelllinien KB, Hep-2 und HaCaT wiesen starke alkalische Phosphataseaktivität auf, was eine Quantifizierung anheftender Bakterien mit dem alkalische Phosphatasegekoppelten Antikörper verhinderte. Allein die Zelllinien Chang und RPMI 2650 wiesen keine oder nur geringe Eigenaktivität auf. Es wurde daher versucht, den ELISA auf einen Peroxidase-gekoppelten Antikörper zu adaptieren. Trotz intensiver Bemühungen konnte jedoch mit dem neuen Antikörper keine mit dem bereits etablierten System vergleichbare Reaktivität nachgewiesen werden. Eine Umstellung der Kultivierung der HaCaT-Zellen auf FKS-freies Medium (SFM) führte andererseits zu

einer deutlichen Verringerung der zelleigenen alkalischen Phosphataseaktivität, so dass eine Durchführung des Anheftungs-ELISAs in gewohnter Form möglich wurde. Hep-2 und KB-Zellen wuchsen in diesem Medium nur sehr schlecht, so dass auf weitere Untersuchungen mit diesen Zelllinien verzichtet wurde.

Für die Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an konjunktivale Changzellen konnte bei einer Bakterienkonzentration im Inokulum von 10^9 CFU/ml eine maximale Absorption von 0,6 gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Unter der Annahme, dass die Antikörperbindungskapazität des Stammes unabhängig ist von der Oberfläche, an die er adhärirt, entspricht das nach Gleichung (4.3) etwa einer Anzahl von 4×10^4 Bakterien auf dem konfluenten Zellrasen eines Napfes. Die Einsaat der Changzellen hatte bei 10^5 Zellen pro Napf gelegen, um nach 18 Stunden einen konfluenten Zellrasen zu erhalten. So konnte maximal jede dritte Epithelzelle eine *S. epidermidis* 1457-Zelle tragen. Da sich die Zahl der Epithelzellen bis zur Bildung eines Zellrasens aber gegenüber der Einsaat vermutlich noch erhöht, liegt die Zahl der Bakterien-tragenden Zellen vermutlich noch niedriger. In mehreren Versuchen wiesen die Changzellen jedoch zelleigene alkalische Phosphataseaktivität auf, die im Bereich der durch bakterielle Adhäsion verursachten Aktivität lag. Damit war eine saubere Bestimmung der bakteriellen Adhäsion an dieser Zelllinie nicht möglich und weitere Untersuchungen konzentrierten sich auf HaCaT- und RPMI 2650-Zellen.

Nachdem die alkalische Phosphataseaktivität der HaCaT-Zellen durch Kultivierung in SFM weitgehend unterdrückt werden konnte, wurden mehrere Anheftungskurven für *S. epidermidis* 1457 aufgenommen. Zunächst schwankten die drei Parallelen einer Verdünnung extrem stark. Eine mikroskopische Beurteilung ergab, dass die Bakterien sehr stark an der Nunclon Δ -Oberfläche adhärirten, die noch nicht von dem Zellrasen bedeckt war. Solche Löcher können in einem einschichtigen Rasen einer Zellkultur immer wieder auftreten, auch wenn der überwiegende Teil konfluent ist. Aus diesem Grund wurde die Nunclon Δ -Oberfläche vor Einsaat der HaCaT-Zellen für zwei bis fünf Stunden bei 37°C mit 10 % FKS in PBS [v/v] beschichtet. Zusätzlich wurde durch mikroskopische Kontrolle sichergestellt, dass der Zellrasen mindestens 95 % der Oberfläche bedeckte, bevor er im Anheftungs-ELISA eingesetzt wurde. Eine starke Verfälschung der ELISA-Signale durch Staphylokokkenzellen, die zwischen den Zellen an der nativen Nunclon Δ -Oberfläche adhärirten, konnte so ausgeschlossen werden.

Das Adhäsionsverhalten von *S. epidermidis* 1457 an HaCaT-Zellen war meist vergleichbar mit dem an FKS-beschichteter Nunclon Δ -Oberfläche (Bild 4.8). Bakteriendichten im Inokulum zwischen 10^8 und 10^{10} CFU/ml ließen die Absorption stetig bis auf 1,2 ansteigen, was nach Gleichung (4.3) einer Anzahl von etwa $1,2 \times 10^5$ CFU/ml entspricht. Die Bakterien riefen an den HaCaT-Zellen etwas flachere Adhäsionskurven hervor als an der beschichteten Oberfläche. Möglicherweise deutet dies auf eine Sättigung der Bindungsstellen hin. Es kam jedoch wiederholt vor, dass selbst bei einer Inkubation von 3×10^{10} CFU/ml Bakterien die Absorption nicht über 0,4 anstieg.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den adhäsionshemmenden Faktor in diesen Fällen aufzuklären.

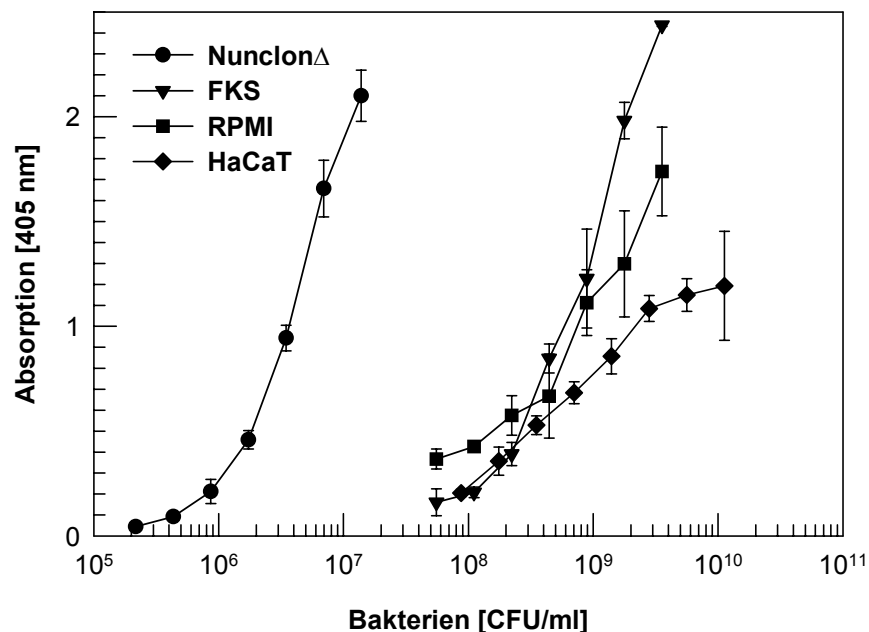


Bild 4.8: Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an NunclonΔ, FKS-beschichtetes NunclonΔ, die epitheliale Zelllinie RPMI 2650 und die Keratinozytenzelllinie HaCaT. Die Tests wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt und adhärenente Bakterien mittels ELISA detektiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei Parallelen und ihre Standardabweichung. Sind keine Fehlerbalken erkennbar, so ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol des Datenpunktes

Für die epitheliale Tumorzelllinie RPMI 2650 konnte reproduzierbar eine Anheftung von *S. epidermidis* 1457 nachgewiesen werden (Bild 4.8). Da das Kulturmedium für diese Zellen 10 % FKS enthielt, war eine Vorinkubation der Mikrotiterplatten mit FKS in PBS wie bei HaCaT-Zellen nicht notwendig. Ein durch adhärenente Bakterien verursachtes ELISA-Signal war erkennbar, wenn die Konzentration der inkubierten Bakteriensuspension zwischen 10^8 und 4×10^9 CFU/ml lag (Bild 4.8). Die Anheftungskurve verlief annähernd parallel der Kurve an der unbehandelten NunclonΔ-Oberfläche und war nahezu identisch mit der Anheftungskurve an FKS-gesättigter Oberfläche. Es wurde eine maximale Absorption von 1,7 erreicht, was nach Gleichung (4.3) einer Anzahl von etwa 3×10^5 *S. epidermidis* 1457-Zellen auf dem Rasen der Schleimhautzellen entspricht. Bei einer mikroskopischen Kontrolle der einzelnen Näpfe nach dem ELISA zeigten sich vereinzelt freigespülte Stellen, was die größere Schwankungsbreite der parallelen Einzelwerte des Zellkultur-ELISA gegenüber den Schwankungen an der nativen Oberfläche erklärte.

Die Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an den beiden epithelialen Zelllinien HaCaT und RPMI 2650 war etwa um den Faktor 100 geringer als an NunclonΔ. Dabei war die Adhäsion an die Zellkulturen vergleichbar mit der an FKS-beschichtetem Polystyrol. Möglicherweise handelt es sich um ähnliche Faktoren, die in diesen Systemen die Adhäsion vermitteln.

Es steht mit den beiden Zelllinien HaCaT und RPMI 2650 ein System zur Verfügung, das ein *Screening* auf adhäsionsdefiziente Mutanten oder Stämme an humanen, epithelialen Zellen erlaubt. Erste Untersuchungen an 380 Transposonmutanten von *S. epidermidis* 1457, bei denen die Staphylokokken mit etwa 10^9 CFU/ml mit den Zellkulturen inkubiert wurden, zeigten reproduzierbare Ergebnisse mit Absorptionen größer als 1,0 für alle Mutanten. Dies entsprach der Absorption des mitgeführten Wildtyps. Somit wurden bislang keine adhäsionsverminderten Mutanten identifiziert. An einer Weiterführung des *Screenings* soll zukünftig gearbeitet werden.

4.2.2 Adhäsion gut charakterisierter *S. epidermidis*-Stämme und ihrer Biofilm-negativen Mutanten

Die Klasse I Mutanten des Biofilm-positiven Stammes *S. epidermidis* 1457 besitzen Transposoninsertionen an verschiedenen Stellen des *icaADBC*-Operons, was einen Biofilm-negativen Phänotyp hervorruft (Mack *et al.*, 2000b). Diese Stämme produzieren kein PIA, welches die interzelluläre Adhäsion vermittelt (Mack *et al.*, 1996a). Auch die Transposonmutanten der Klassen II-IV, bei denen das Transposon Tn917 nicht im *ica*-Operon inseriert ist, produzieren dieses Polysaccharid nicht oder nur in geringen Mengen. Der Verlust der Fähigkeit zur Biofilmbildung könnte auch auf eine mangelnde Adhäsionsfähigkeit zurückzuführen sein. Es sollte daher überprüft werden, ob PIA einen Einfluss auf die primäre Adhäsion besitzt, und ob die Biofilm-negativen Phänotypen durch verminderte Adhäsionseigenschaften hervorgerufen werden. Außerdem sollte geprüft werden, ob der mukoid-negative Phänotyp, der die Mutanten der Klasse V vom Wildtyp unterscheidet, mit veränderten Adhäsionseigenschaften korreliert.

S. epidermidis 1457 und die isogenen Transposonmutanten der Klassen I bis V wurden in vier Parallelen in Mikrotiterplatten kultiviert. Für den Anheftungs-ELISA wurden dann je 100 µl einer 1:100 Verdünnung eingesetzt, um mit der inkubierten Bakterienkonzentration des Wildtyps in den Messbereich zu gelangen.

Die Absorption des Wildtyps erreichte 1,5 (Bild 4.9). Die Mutante der Klasse II, M12, wies nur eine A_{405} von 0,1 auf (Bild 4.9). Sie wurde als stark auffällig eingestuft. Die Mutanten der Klassen I und III (1457-M10, 1457-M11, M13, M21, M22, M23 und M24 sowie M15 und M19) wiesen keine deutlich vom Wildtyp differierenden ELISA-Signale auf (Bild 4.9). M16 und M20, die Mutanten der Klasse V, unterschieden sich in ihrer Absorption nicht von *S. epidermidis* 1457 (Bild 4.9).

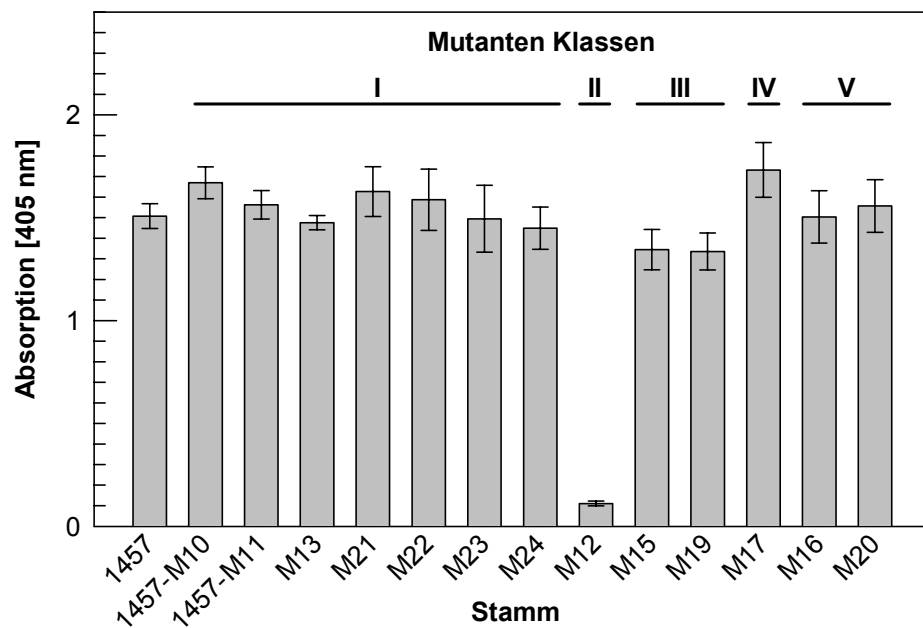


Bild 4.9: Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 und seiner Transposonmutanten der Klassen I-V an NunclonΔ. Vier Näpfe einer Mikrotiterplatte wurden pro Stamm mit 100 µl einer 1:100 Verdünnung einer Übernachtskultur beschickt und für 1 Stunde inkubiert. Adhäreente Bakterien wurden anschließend mittels ELISA detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Parallelen und ihre Standardabweichung

Die Ergebnisse der Messungen mit nur einer Bakterienkonzentration konnten anhand von Verdünnungsreihen bestätigt werden (Bild 4.10).

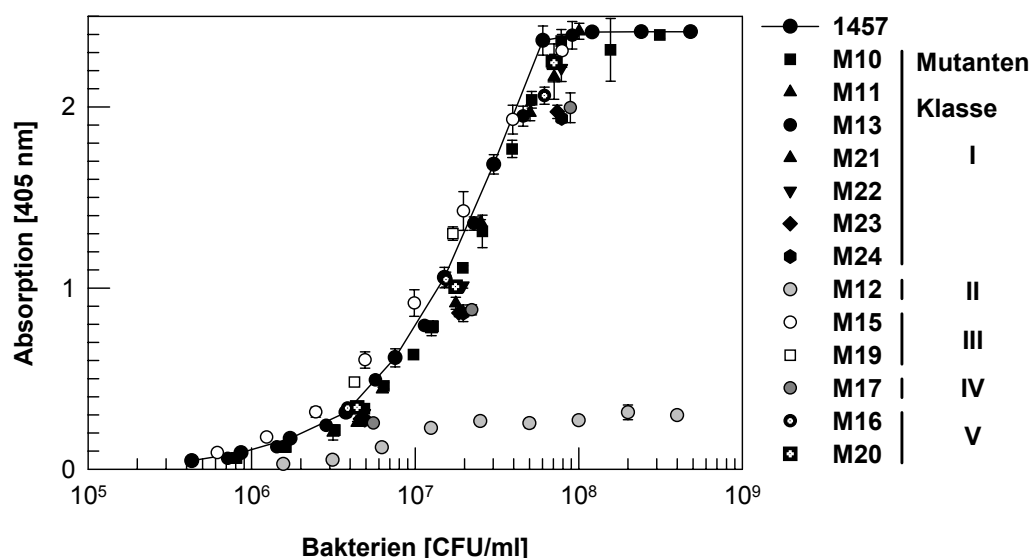


Bild 4.10: Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 und seiner Transposonmutanten der Klassen I bis V an NunclonΔ. Je Verdünnung wurde dreimal 100 µl für 1 h in Mikrotiterplatten inkubiert. Adhäreente Bakterien wurden anschließend mittels ELISA detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Parallelen und ihre Standardabweichung

M12 blieb auch bei hohen Konzentrationen im Inokulum als einzige Mutante weit unter den Werten des Wildtyps, was auf eine stark verminderte Adhäsionsfähigkeit hinzu

deuten schien. Die Mutante erreichte eine maximale Absorption von 0,3. Die übrigen Mutanten lagen mit ihren Absorptionswerten sehr dicht auf der von *S. epidermidis* 1457 vorgezeichneten Linie (Bild 4.10). Da sich die Mutanten der Klasse I, die nachweislich kein PIA produzieren, und der Klasse III, die in TSB nur geringe Mengen PIA synthetisieren (Mack *et al.*, 2000b; Knobloch *et al.*, 2001), nicht vom Wildtyp unterschieden, kann PIA als Adhäsionsfaktor an der Nunclon Δ -Oberfläche ausgeschlossen werden.

Weiterhin wurden *S. epidermidis* 8400 und seine Biofilm-negativen Mutanten 8400-M10 und 8400-M11 sowie *S. epidermidis* RP62A und seine Biofilm-negative, PIA-negative Mutante M7 mit Hilfe des Anheftungs-ELISAs verglichen (Bild 4.11). In beiden Fällen konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten festgestellt werden.

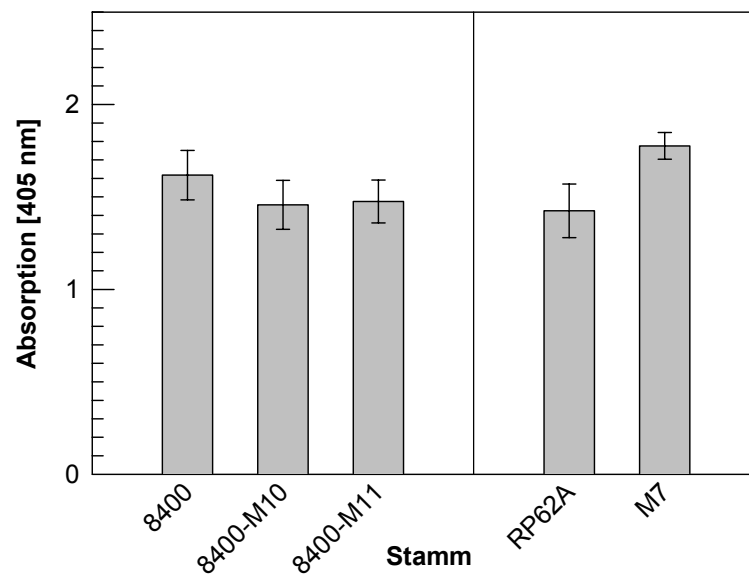


Bild 4.11: Adhäsion von *S. epidermidis* 8400 und seiner Biofilm-negativen Mutanten 8400-M10 und 8400-M11 sowie RP62A und seiner Biofilm-negativen Mutante M7 an Nunclon Δ . Näpfe einer Mikrotiterplatte wurden pro Stamm mit 100 μ l einer 1:100 Verdünnung einer Übernachtskultur beschickt und für 1 Stunde inkubiert. Adhärenente Bakterien wurden anschließend mittels ELISA detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Parallelen und ihre Standardabweichung

Die Mutante M7 bildet zwar im selben Maße PIA wie der Wildtyp, das Polysaccharid löst sich aber durch Schütteln der Kultur oder resuspendieren durch häufiges Pipettieren von der Zelloberfläche (de Grahl, persönliche Mitteilung; Baldassarri 1996). Die Stämme *S. epidermidis* RP62A und M7 stimmten auch in ihren Anheftungskurven mit *S. epidermidis* 1457 überein (Daten nicht gezeigt).

Es zeigte sich, dass PIA an Nunclon Δ keinen Einfluss auf die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* hat. Anhand dreier Stämme mit unabhängigem genetischen Hintergrund konnte PIA folglich als Adhäsionsfaktor an dieser Oberfläche ausgeschlossen werden. Andere Faktoren müssen dafür verantwortlich sein.

4.2.3 Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 und 1457-M10 an Fibronektin und Fibrinogen

Nachdem gezeigt worden war, dass PIA an Nunclon Δ nicht als Adhäsionsfaktor fungiert, sollte dieser Umstand auch für Bedingungen überprüft werden, die denen *in vivo* näher kommen. Da Kunststoffoberflächen innerhalb kürzester Zeit nach Implantation durch Anlagerung mit Serumproteinen konditioniert werden, wurden die Serumproteine Fibronektin und Fibrinogen ausgewählt, um die Adhäsionseigenschaften von *S. epidermidis* 1457 und 1457-M10 *in vitro* zu vergleichen. Dazu wurden Mikrotiterplatten (Greiner) mit 0,1, 1,0 oder 10 $\mu\text{g/ml}$ der Proteine in PBS beschichtet (Kap. 3.5.1) und anschließend der Anheftungs-ELISA durchgeführt.

Um sicher zu stellen, dass die detektierte Adhäsion auf eine spezifische Interaktion zwischen Protein und Staphylokokkenzellen zurückzuführen war, wurden für diese Experimente Mikrotiterplatten verwendet, an deren unbeschichteter Oberfläche im Anheftungs-ELISA keine Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 und 1457-M10 nachweisbar war (Bild 4.12).

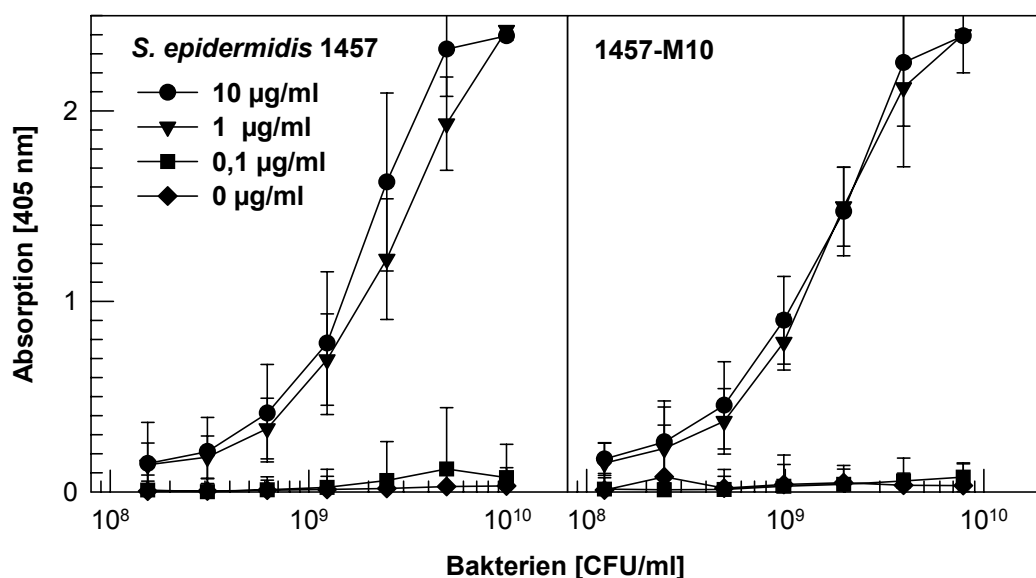


Bild 4.12: Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 und seiner Biofilm-negativen Mutante 1457-M10 an Fibronektin (0 bis 10 $\mu\text{g/ml}$). Verdünnungsreihen der beiden Stämme wurden für eine Stunde in fibronektin-beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert und adhärenente Bakterien mittels ELISA detektiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus vier Parallelen und ihre Standardabweichung

Eine Adhäsion an Fibronektin war für *S. epidermidis* 1457 nachweisbar, wenn die Konzentration des Proteins bei der Beschichtung mindestens 1 $\mu\text{g/ml}$ betragen hatte (Bild 4.12). Das ELISA-Signal begann ab einer Bakterienkonzentration im Inokulum von 3×10^8 CFU/ml anzusteigen und erreichte die obere Grenze des Messbereichs bei einem Inokulum von 5×10^9 CFU/ml. Die PIA-negative Mutante 1457-M10 wies die gleichen Anheftungskurven auf wie der Wildtyp (Bild 4.12). Für beide Stämme war keine Adhäsion nachweisbar, wenn die Mikrotiterplatten mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Fibronektin oder sterilem PBS beschichtet worden waren (Bild 4.12).

An Fibrinogen konnte bei keiner der zur Beschichtung eingesetzten Konzentrationen eine Bindung von *S. epidermidis* 1457 oder 1457-M10 nachgewiesen werden, obwohl bis zu 10^{10} CFU/ml im Inokulum eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt). Das könnte auf eine sehr geringe Adhäsionsfähigkeit an dieses Protein zurückzuführen sein. Auch denkbar wäre, dass nur wenig Fibrinogen an die Polymeroberfläche gebunden hat, so dass keine ausreichende Beschichtung vorlag.

In den für diese Adhäsionsexperimente eingesetzten Mikrotiterplatten ist ohne Beschichtung keine Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457 festzustellen. Alle Bakterien werden beim Waschen sofort aus der Platte gespült. Es sollte nun untersucht werden, ob die im Anheftungs-ELISA festgestellte Bindung an die Serumproteine ausreicht, einen Biofilm an der Kunststoffoberfläche zu fixieren. Dazu wurden jeweils acht parallele Näpfe einer Mikrotiterplatte mit einer der Lösungen wie für den Anheftungs-ELISA beschichtet. Daran anschließend wurde in dieser Platte ein Biofilmtest mit *S. epidermidis* 1457 und 1457-M10 durchgeführt.

Wie erwartet, bildete der PIA-defiziente, akkumulationsgestörte Stamm 1457-M10 an keiner der Oberflächen einen Biofilm (Bild 4.13). Der Wildtyp *S. epidermidis* 1457 hingegen bildete in den mit 10 µg/ml Fibronektin beschichteten Näpfen einen starken Biofilm (Bild 4.13). Diese Beobachtung korreliert gut mit der an dieser Oberfläche detektierten Adhäsion des Stammes. Der Biofilm in den mit 1 µg/ml Fibronektin beschichteten Näpfen wurde durch das Waschen zwar vom Rand der Näpfe abgespült, war aber noch gut sichtbar (Bild 4.13). Die Beschichtung mit 0,1 µg/ml Fibronektin reichte offensichtlich nicht aus, einen Biofilm gegen die beim Waschen auftretenden Scherkräfte zu schützen, so dass hier ebenso wenig ein Biofilm detektiert werden konnte wie an der unbeschichteten Oberfläche. An Fibrinogen konnte keinerlei Biofilmbildung festgestellt werden (Bild 4.13).

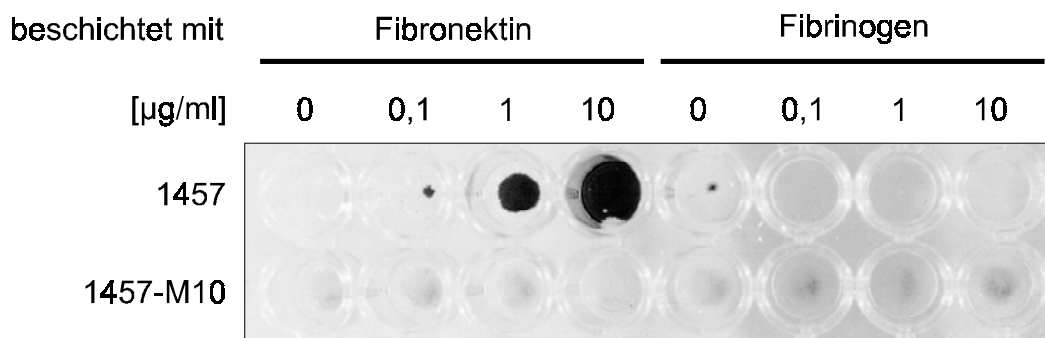


Bild 4.13: Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457 und 1457-M10 in einer mit Serumproteinen beschichteten Mikrotiterplatte (Greiner). Die Platte wurde nach 24 Stunden Wachstum gewaschen und adhären Biofilme durch Färbung mit Kristallviolett sichtbar gemacht

Es konnten keine Differenzen im Adhäsionsverhalten zwischen *S. epidermidis* 1457 und 1457-M10 nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass es an einer geringfügig adhäsionsvermittelnden Oberfläche durch die Konditionierung mit Fibronektin zu einer verstärkten Adhäsion von *S. epidermidis* und zur Etablierung eines Biofilms kommen kann.

4.2.4 Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 und M15 an Nunclon Δ nach Wachstum mit NaCl und Ethanol

Es hatte sich gezeigt, dass bei den isogenen Mutanten M15 und M19 der Klasse III von *S. epidermidis* 1457 die Insertion von Tn917 in *rsbU*, dem ersten Gen des *sigB*-Operons, lag (Knobloch *et al.*, 2001). Der alternative Sigmafaktor σ^B reguliert in *B. subtilis* und *S. aureus* unterschiedlichste Gene (Haldenwang, 1995; Gertz *et al.*, 2000). Er wird vor allem in der stationären Phase sowie unter Stressbedingungen wie osmotischem Schock oder in Gegenwart von Ethanol induziert. M15 und M19 waren unter Standardbedingungen Biofilm-negativ, wurden aber durch Ethanol zur Biofilmbildung angeregt. Der Zusatz von 4 % NaCl zum Wachstumsmedium hingegen steigerte zwar die Biofilmbildung des Wildtyps, aber nicht die der Mutanten (Knobloch *et al.*, 2001).

Sigmafaktoren wirken in der Regel nicht nur auf ein einzelnes Gen, sondern beeinflussen die Expression einer ganzen Reihe von Genen. Dabei kann es sich sowohl um positive als auch negative Regulation durch ein und denselben Sigmafaktor handeln. Es sollte nun festgestellt werden, ob die Inaktivierung von *rsbU* neben der negativen Regulation auf das *ica*-Operon einen Einfluss auf die primäre Adhäsion ausübt. Es wurde also die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 mit der von M15 und M19 unter erhöhter Osmolarität und Ethanolstress verglichen. Die Stämme wurden hierzu unter Zusatz von 4 % NaCl oder 4 % Ethanol im Wachstumsmedium kultiviert und anschließend im Anheftungs-ELISA untersucht.

Die Inaktivierung von *rsbU* bei den Mutanten M15 und M19 hatte weder unter erhöhter Osmolarität noch unter Ethanolstress eine Verminderung der primären Adhäsionsfähigkeit gegenüber dem Wildtyp zur Folge (Bild 4.14). Wie *S. epidermidis* 1457 zeigten die beiden Stämme bei 10^6 bis 10^8 CFU/ml inkubierter Bakterien ansteigende ELISA-Signale. Unabhängig von der Transposoninsertion wurde bei einem Wachstum der Bakterien in Medium mit hoher Salzkonzentration jedoch niedrigere Absorptionen aller drei Stämme gemessen. Die obere Grenze des Messbereichs wurde mit einer maximalen Absorption von 1,5 nicht erreicht. Dies galt sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutanten, so dass auch hier kein Unterschied in der primären Adhäsion zwischen den Stämmen detektiert werden konnte.

Unter der Annahme, dass die Antigenität der Stämme trotz der erhöhten Salzkonzentration nicht verändert ist, lässt sich die Differenz nach Gleichung (4.3) abschätzen. Danach adhärten die unter Osmolaritätsstress kultivierten Stämme etwa dreimal schlechter als in TSB kultivierte Stämme. Der Effekt der verminderten Adhäsion trat nicht auf, wenn die Bakterien in Medium ohne NaCl-Zusatz kultiviert wurden, die Salzkonzentration im Adhäsionspuffer jedoch erhöht wurde (Daten nicht gezeigt).

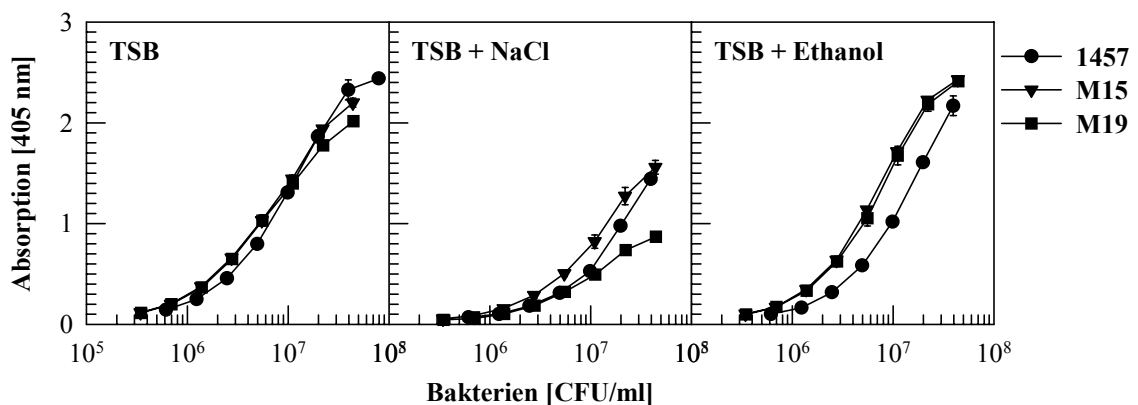


Bild 4.14: Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 und der isogenen Mutanten M15 und M19 an NunclonΔ nach Wachstum in TSB, TSB + NaCl und TSB + Ethanol. Verschiedene Verdünnungen der Bakterien wurden für 1 Stunde in Mikrotiterplatten inkubiert und anschließend mittels ELISA detektiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei Parallelen und ihre Standardabweichung. Sind keine Fehlerbalken erkennbar, so ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol des Datenpunktes

4.2.5 Suche nach einer adhäsionsdefizienten Transposonmutante

In einer Transposonmutagenese werden in zufälliger Weise einzelne Genorte durch die Insertion eines Transposonelements inaktiviert. Das hier verwendete temperatursensitive Plasmid pTV1ts trägt das Transposon Tn917, welches eine Erythromycinresistenz vermittelt (Shaw und Clewell, 1985). Bei Wachstum des plasmidtragenden Stammes *S. epidermidis* 1457c (pTV1ts) bei einer Temperatur von 46°C kann das Plasmid nicht repliziert werden. Bei gleichzeitiger Selektion auf Erythromycin erfolgt eine gezielte Vermehrung von Klonen, bei denen eine Transposition von Tn917 in das Genom stattgefunden hat. Ein *Screening* der so erzeugten Mutanten mit einer stabilen Transposoninsertion im Genom auf den Verlust oder eine Veränderung eines phänotypischen Merkmals von Interesse kann auf diese Weise zur Entdeckung der an der Merkmalsausprägung beteiligten Gene führen. In diesem Experiment sollten Klone mit veränderten Adhäsionseigenschaften detektiert werden.

In zwei aufeinanderfolgenden Mutageneseexperimenten wurden insgesamt etwa 7500 Klone isoliert, die eine Transposoninsertion aufwiesen. Etwa 20 % dieser Klone wuchsen auch unter Chloramphenicolselektion und hatten das Plasmid offensichtlich nicht eliminiert. Sie wurden verworfen. Die übrigen 6000 Klone wurden in Mikrotiterplatten in TSB unter Selektionsdruck (10 µg/ml Erythromycin) für 16 bis 20 Stunden kultiviert und dann in einer 1:20 Verdünnung im Anheftungs-ELISA untersucht. Da die Anzucht der Stämme unter Selektionsdruck erfolgte, wurde statt des erythromycinsensiblen Stammes 1457c die Biofilm-negative Transposonmutante 1457-M10 mitgeführt. Diese unterscheidet sich wie bereits dargelegt (Kap. 4.2.3) in ihren Adhäsionseigenschaften nicht vom Wildtyp, verfügt aber durch die Tn917-Insertion im *ica*-Operon über die erforderliche Erythromycinresistenz. Da das Hauptaugenmerk auf der Detektion adhäsionsdefizienter Mutanten lag, wurde die Bakterienkonzentration so gewählt, dass das Signal des Kontrollstammes 1457-M10 im oberen

Messbereich des ELISA lag ($A_{405} > 1,5$). Als auffällig wurden alle Klone eingestuft, deren ELISA-Signal unterhalb von 0,5 lag.

Alle als auffällig eingestuften Stämme wurden subkultiviert und erneut getestet. In der zweiten Testung waren noch 91 Klone auffällig und wurden weiter untersucht. Zwei der Stämme wiesen zwar das erwartete Resistenzmuster auf, erwiesen sich in der biochemischen Differenzierung jedoch als *S. warneri* und *S. saprophyticus*. Weitere sieben Stämme erwiesen sich als nicht subkultivierbar. Eine optische Beurteilung der Hauptkulturen in den Mikrotiterplatten ergab weiterhin, dass bei den meisten dieser Stämme eine geringere Zelldichte in der stationären Wachstumsphase und damit eine geringere Konzentration im Inokulum der Anheftungsversuche der Grund für das geringe ELISA-Signal sein könnte. Durch Kultivierung auf Agarplatten konnte festgestellt werden, dass BHI das Wachstum dieser Stämme deutlich besser unterstützte als TSB. Trotzdem waren Kolonien bei 26 Stämmen nur schwer mit bloßem Auge zu erkennen und es dauerte mindestens 48 Stunden, bevor diese sichtbar wurden. Dieser Phänotyp war über mindestens vier Passagen konstant.

Für erneute Adhäsionstests wurden also Hauptkulturen in BHI-Brühe angelegt. Insgesamt blieben 50 Stämme auch in dieser Testung auffällig oder wiesen eine um mindestens 0,5 Einheiten geringere Absorption auf als der Referenzstamm 1457-M10. Unter den verbleibenden Stämmen waren 88 % der phänotypisch ungewöhnlichen Stämme mit den kleinen Kolonien (23 von 26).

Ein Vergleich der Anheftungskurven mit denen von *S. epidermidis* 1457c (pTV1ts) zeigte, dass alle 50 Stämme bezogen auf die eingesetzte Zellkonzentration mit den Kontrollstämmen übereinstimmten. Eine Auswahl von drei Mutanten ist in **Bild 4.15** gezeigt.

Da die Verdünnungsreihen für den Anheftungs-ELISA direkt aus den Hauptkulturen angelegt wurden, ist die höchste in der Kurve ablesbare Zelldichte zugleich die Endkonzentration der Hauptkultur. Daraus ist ersichtlich, dass die Bakteriendichten der Transposonmutanten in der Hauptkultur bis zu zehnfach niedriger waren als die des Wildtyps (Bild 4.15).

Da sich herausgestellt hatte, dass alle im Anheftungs-ELISA auffälligen neuen Transposonmutanten keine offensichtlichen Änderungen in ihren Adhäsionseigenschaften aufwiesen, der Schwerpunkt aber auf der Suche nach einer adhäsionsdefizienten Mutante lag, wurde auf eine weitere Bearbeitung dieser Klone zunächst verzichtet. Die Mutanten entsprechen allerdings in ihrem bislang beobachteten Wachstumsverhalten und ihrer Koloniemorphologie durchaus dem der sogenannten *small-colony variants* (SCV). Dieser Phänotyp ist schon für viele Bakterienspezies beschrieben worden und wird meist durch einen defekten Elektronentransport ausgelöst (Proctor und Peters, 1998). Staphylokokken SCVs können bei lang persistierenden Infektionen gefunden werden und zeichnen sich durch ihr langsames Wachstum und hohe Antibiotikaresistenz aus. Eine Charakterisierung der beschriebenen auffälligen

Mutanten könnte in Zukunft zu einem besseren Verständnis dieser Phänomene beitragen.

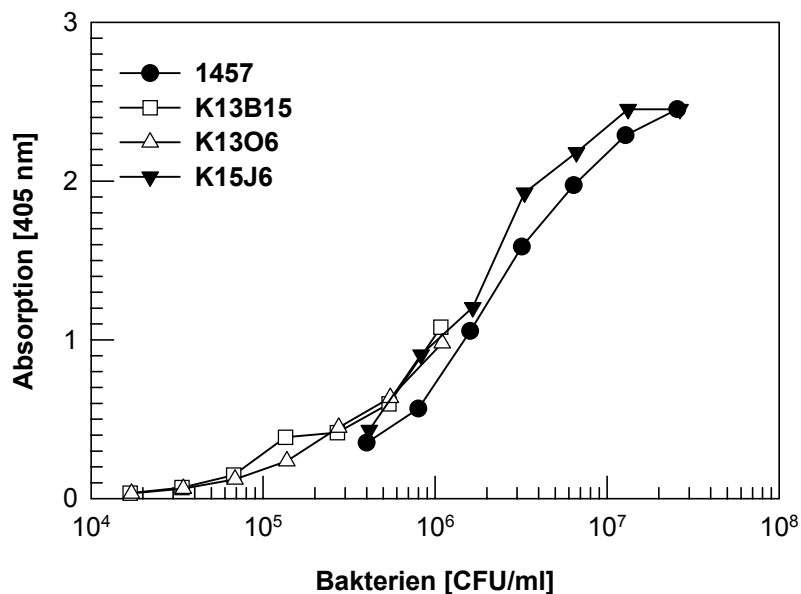


Bild 4.15: Adhäsion ausgewählter Transposonmutanten von *S. epidermidis* 1457 an NunclonΔ im Vergleich zum Wildtyp. Verschiedenen Verdünnungen wurden für eine Stunde in Mikrotiterplatten inkubiert und adhärenente Bakterien mittels ELISA detektiert

4.3 Genetische Analyse der Transposonmutante M12

Die isogene Transposonmutante M12 war inzwischen in zweierlei Hinsicht sehr interessant geworden. Zum einen besitzt sie einen Biofilm-negativen Phänotyp und synthetisiert unter den bislang getesteten Bedingungen kein PIA. Zum anderen ist sie durch ein stark vermindertes Signal im Anheftungs-ELISA aufgefallen (Kap. 4.2.2). Damit handelt es sich möglicherweise um eine der gesuchten adhäsionsdefizienten Mutanten. Diese Mutante wurde deshalb eingehender genetisch charakterisiert. Zunächst wurde die chromosomale, das Transposon flankierende Region kloniert und sequenziert. Eine vergleichende Transkriptionsanalyse von Wildtyp und Mutante sollte dann zur Identifikation eines oder mehrerer für die Veränderungen verantwortlichen Gene führen.

Eine Restriktionsanalyse und anschließende Southern-Hybridisierung mit einer Tn917-spezifischen Sonde sollte ein Fragment identifizieren, das zu beiden Seiten des Transposons 1-3 kb chromosomaler DNA besaß (Bild 4.16). Dieses sollte durch Autoligation zu einem Ring geschlossen werden, damit durch inverse PCR mit *Primern*, die aus dem Transposon herauslesen, ein im TOPO-System klonierbares Fragment hergestellt werden konnte (Bild 4.16). Dieses sollte dann kloniert und sequenziert werden.

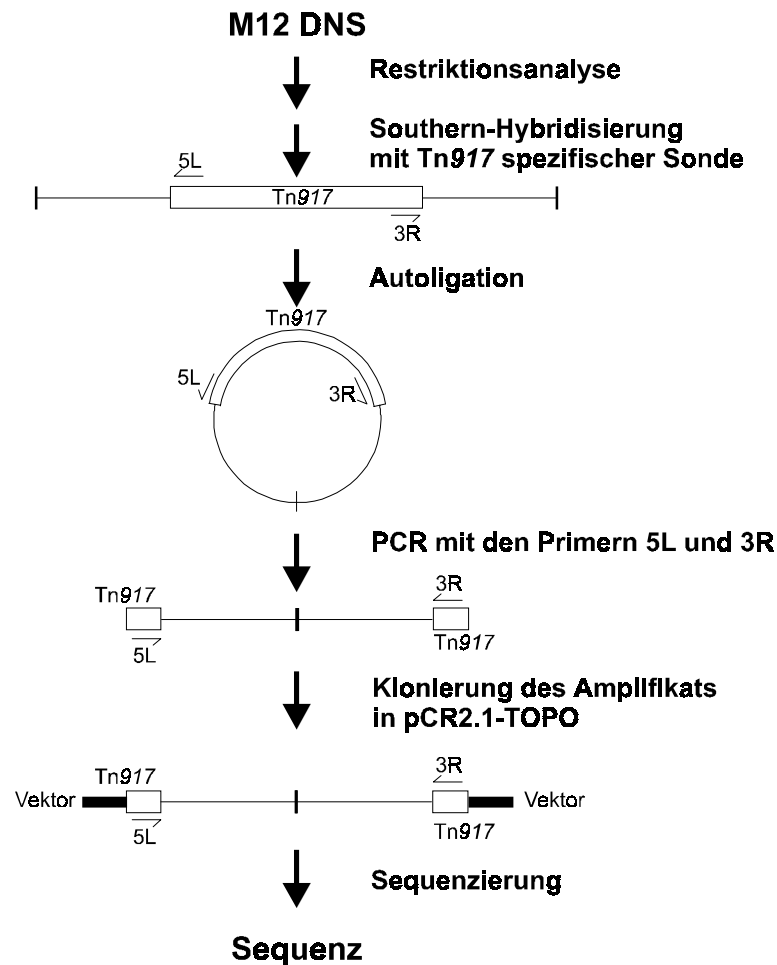


Bild 4.16: Schematische Darstellung der Strategie zur Klonierung und Sequenzierung der chromosomalen Tn917-Insertionsregion der *S. epidermidis* 1457-Mutante M12

4.3.1 Klonierung der chromosomalen Tn917 flankierenden Regionen aus M12

Southern Hybridisierung

Zur Identifikation von zur Klonierung geeigneten chromosomalen Fragmenten wurde eine Southern-Hybridisierung mit Sonden vorgenommen, die spezifisch für die beiden Ende von Tn917 waren (Ava5 bzw. Ava3). Die M12-DNA war zunächst mit Enzymen gespalten worden, die keine Spaltstelle im Transposon aufweisen. Um feststellen zu können, wie groß die flankierenden chromosomalen Abschnitte zu beiden Seiten des Transposons waren, wurden alle Restriktionsansätze parallel zusätzlich durch *SalI* gespalten, das eine Spaltstelle im Transposon besitzt. Eine Hybridisierung mit den beiden Sonden und die dabei auftretenden Verschiebungen der Hybridisierungsmuster erlaubte nun die Größenabschätzung der chromosomalen Abschnitte beiderseits des Transposons.

Elf Enzyme wurden auf diese Weise getestet (Kap. 3.11). Es konnte jedoch keines gefunden werden, bei dem nach der Restriktion in gewünschter Größe transposon-tragende M12-DNA-Fragmente auftraten.

In einer zweiten Strategie wurden Enzyme zur Fragmentierung der M12-DNA eingesetzt, die das Transposon mindestens einmal spalten. Hierbei war ein Doppelansatz mit *SalI* nicht länger notwendig. Eine Größenbestimmung der flankierenden, chromosomalen Abschnitte war allein aus den Hybridisierungsmustern mit den beiden Sonden Ava5 und Ava3 möglich. Diese Strategie erforderte abweichend zur schematisch dargestellten Strategie (Bild 4.16) eine getrennte Autoligation der beiden Transposonhälften mit flankierenden DNA-Abschnitten. Anschließend erfolgte ebenfalls eine getrennte PCR-Amplifikation und Klonierung der chromosomalen Abschnitte beiderseits von Tn917.

Schließlich konnten zwei Fragmente identifiziert werden, die eine für die Klonierung und Sequenzierung günstige Größe hatten. Für die das 5'-Ende flankierende, chromosomale Region wurde ein nach Spaltung mit *MspI* auftretendes ca. 5,3 kb großes Fragment bestimmt, welches einen chromosomalen Abschnitt von etwa 2,7 kb enthalten sollte (Bild 4.17A). Für die das 3'-Ende des Transposon flankierende Region konnte nach Spaltung mit *NsiI* ein ca. 3,5 kb großes Fragment bestimmt werden, das einen chromosomalen Abschnitt von etwa 1,1 kb enthalten sollte (Bild 4.17B).

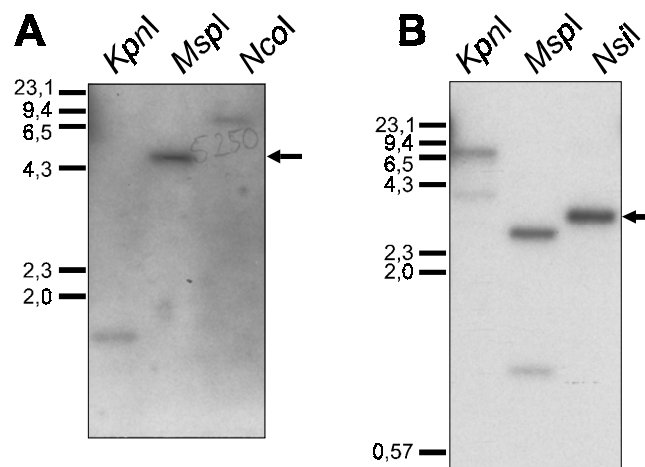


Bild 4.17: Southern-Hybridisierung von gelelektrophoretisch aufgetrennter M12-DNA. Als Sonden dienten (A) die für das 5'-Ende von Tn917 spezifische Sonde Ava5 und (B) die für das 3'-Ende spezifische Sonde Ava3. Die Röntgenfilme wurden durch Scannen digitalisiert und sind in Originalgröße abgebildet. Die Größenstandards sind in kb angegeben und die zur weiteren Bearbeitung ausgewählten Banden durch Pfeile markiert

Durch eine Überlappung der Ava3-Sonde mit zwei Fragmenten, die durch mehrfache Spaltung von Tn917 durch *KpnI* und *MspI* entstehen (siehe Bild 2.1), sind in der Hybridisierung je zwei Banden für die mit diesen Enzymen gespaltene DNA zu erkennen (Bild 4.17B).

Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Um für die Autoligation der ausgewählten Fragmente eine ausreichend große Menge des gewünschten Fragmentes zu erhalten, wurde gereinigte M12-DNA mit den

Enzymen *NsiI* oder *MspI* gespalten und anschließend durch Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten nach Fragmentgrößen aufgetrennt.

Es wurden je zwei Gradienten mit *NsiI*-gespaltener und zwei mit *MspI*-gespaltener M12-DNA beladen. Die nach der Auftrennung durch Austropfen der Gradienten gewonnenen Fraktionen wurden mit Nsi1-Nsi15 und Nsi16-Nsi32 sowie Msp1-Msp9 sowie Msp10-Msp25 benannt. Durch PCR-Amplifikation wurden die Fraktionen identifiziert, die die gewünschten Fragmente enthielten. Mit spezifischen *Primern* für einen 420 bp langen Abschnitt des 5'-Endes von Tn917 (KpnI und KBkpnI.rev; **Bild 2.1**) und einen 474 bp langen Abschnitt des 3'-Endes von Tn917 (kb3a.for und kb3c.rev; **Bild 2.1**) zeigten sich in mehreren Fraktionen Amplifikate in den erwarteten Größen (**Bild 4.18**). Weil die Rate an unerwünschten Ligationen durch kleine DNA-Fragmente steigt, wurden die Fraktionen Nsi24 und Msp18 der Gradienten zur weiteren Verarbeitung ausgewählt. Sie waren in der PCR positiv und wiesen gleichzeitig eine möglichst hohe Dichte auf.

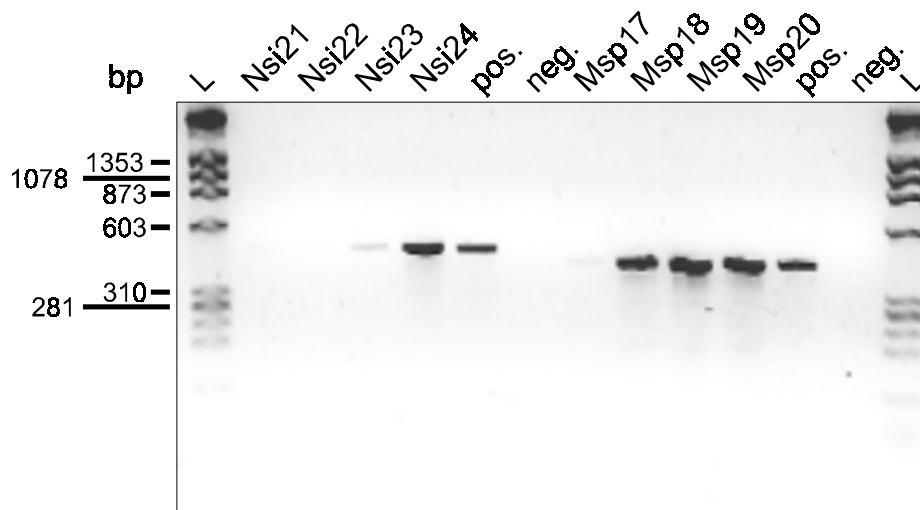


Bild 4.18: Nachweis von Tn917-tragenden Fragmenten in den Fraktionen der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation mittels PCR. Für die Fraktionen **Nsi21-Nsi24** wurden die Primer kb3a.for und kb3c.rev verwendet, für die Fraktionen **Msp17-Msp20** die Primer KpnI und KBkpnI.rev. Als Positivkontrolle (**pos.**) wurden Ansätze mit M12-DNA mitgeführt, als Negativkontrollen (**neg.**) dienten Ansätze ohne DNA. L Längenstandard. Die Amplifikate wurden in einem 1 %-igen Agarosegel bei 4 V/cm für 2 Stunden aufgetrennt. Das Foto des Gels ist invers dargestellt

Für eine Autoligation wurden Verdünnungsreihen der aus den Fraktionen Nsi24 und Msp18 gereinigten DNA hergestellt (1:10, 1:100, 1:1000). Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 5 µl eingesetzt. Weitere Ansätze enthielten ein entsprechendes Volumen unverdünnter Fraktionen.

Amplifikation der chromosomalen DNA

Die Autoligation führte zu ringförmigen DNA-Molekülen, die bei den gesuchten Fragmenten jeweils ein Ende des Transposons enthielten. Damit war eine selektive Amplifikation der chromosomalen Abschnitte durch PCR mit aus dem Transposonanteil

herauslesenden *Primern* möglich (inverse PCR). Um Fehler durch die PCR möglichst gering zu halten, wurde hierfür das Expand High Fidelity PCR System (Roche) verwendet.

In Ligationsansätzen, die 5 µl der unverdünnten Fraktionen Nsi24 und Msp18 enthielten, konnten nach anschließender PCR mit den *Primerpaaren* Nsi1.rev/3R sowie KBmsp1a.for/5L Amplifikate in den erwarteten Größen nachgewiesen werden (Bild 4.19). War die Konzentration der DNA in der Ligation um den Faktor 10, 100 oder 1000 niedriger, so waren keine Amplifikate nachweisbar (Bild 4.19).

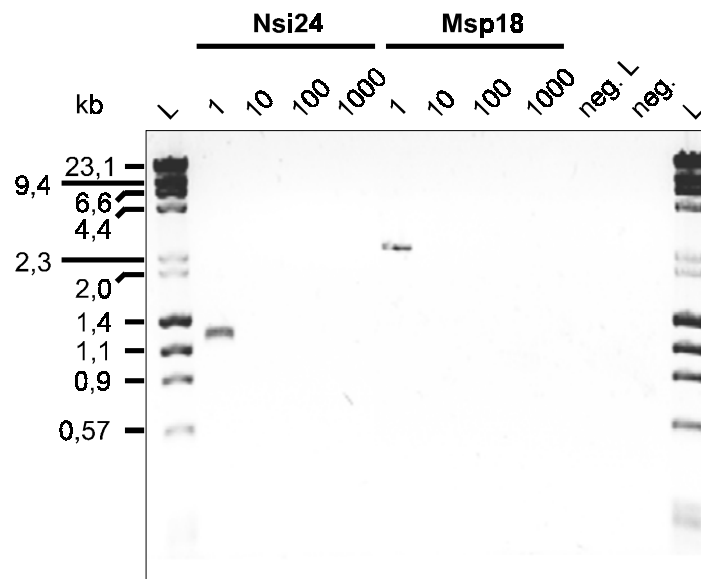


Bild 4.19: Amplifikation der chromosomalen, Tn917-flankierenden Abschnitte aus Autoligationsansätzen der Fraktionen Nsi24 und Msp18 mittels PCR. Angegeben ist die Verdünnung der DNA im Ligationsansatz (**1**) unverdünnt, (**10**) 1:10, (**100**) 1:100 und (**1000**) 1:1000 verdünnt. Als Negativkontrollen dienen (**neg. L**) ein Ligationsansatz ohne DNA und (**neg.**) ein PCR-Ansatz ohne DNA. L Längenstandard. Die Amplifikate wurden in einem 1 %-igen Agarosegel bei 4 V/cm für 2 Stunden aufgetrennt. Das Foto des Gels ist invers dargestellt

Die auf diese Weise gewonnenen Amplifikate von ca. 1,2 und 2,5 kb Länge wurden anschließend in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert und in *E. coli* TOP10 transformiert (Kap. 3.19). Mehrere Klone wurden auf eine Trägerschaft der gewünschten Fragmente überprüft. Dazu wurden die Plasmide aus 1,5 ml Flüssigkultur aufgereinigt, mit *EcoRI* gespalten und in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Ein Vergleich der Bandenmuster der klonierten Fragmente mit den Bandenmustern der zur Klonierung eingesetzten und ebenfalls *EcoRI* gespaltenen PCR-Amplifikate gab Aufschluss über den Erfolg der Bemühungen.

Sowohl für das *NsiI*-Fragment als auch für das *MspI*-Fragment konnte die Identität der klonierten Fragmente auf diese Weise nachgewiesen werden. Dabei wurde gleichzeitig festgestellt, dass keines der beiden Fragmente zusätzliche *EcoRI*-Spaltstellen aufwies. Die Fragmente wurden von dem Enzym sauber aus dem Vektor herausgetrennt. Von den so konstruierten Plasmiden wurden die beiden mit pKBN1.5 (trägt das *NsiI*-

Fragment) und pKBM2 (trägt das *MspI*-Fragment) bezeichneten erneut extrahiert und zur Sequenzierung eingesetzt.

4.3.2 Sequenzierung, Sequenzvergleich und Sequenzanalyse

Eine Sequenzierung der klonierten Fragmente mit anschließender Rekonstruktion des chromosomalen Bereichs ohne die Transposoninsertion ergab einen insgesamt 3,2 kb langen Abschnitt. In diesem lagen drei dicht aufeinanderfolgende, offene Leserahmen von 822, 378 und 300 Basen Länge (Bild 4.20), orf1, orf2 und orf3. Die vorderen beiden Leserahmen, orf1 und orf2, lagen im selben Leseraster, während das von orf3 um eine Base verschoben war. Die Transposoninsertion befand sich hinter Position 792 von orf1 zehn Basentriplets vor dem Stoppcodon. Die Orientierung von Tn917 war dabei entgegengesetzt der Transkriptionsrichtung der chromosomalen offenen Leserahmen. Es konnte eine typische Verdopplung von 5 Basen an der Insertionsstelle von Tn917 festgestellt werden.

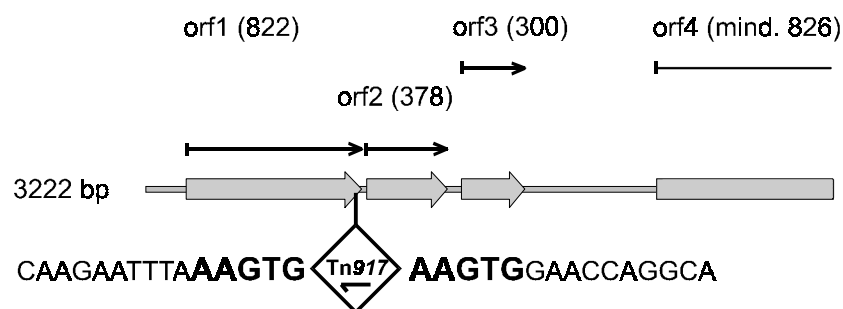


Bild 4.20: Schematische Darstellung des sequenzierten, chromosomalen M12-DNA-Abschnitts. Die Transposoninsertionsstelle ist eingezeichnet wobei der kleine Pfeil die Transkriptionsrichtung von *erm* markiert. Die typische Verdopplung von fünf Basen an der Insertionsstelle ist fett hervorgehoben. Offene Leserahmen sind als breite Pfeile gekennzeichnet. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die Länge der orfs in bp. Die Höhe der dünnen Pfeile gibt die unterschiedlichen Leseraster an. Im sequenzierten Bereich besitzt orf4 kein Stoppcodon

Auf orf3 folgte eine nicht kodierende Region von 612 bp. Daran schloss sich ein weiterer offener Leserahmen, orf4, von 826 bp im selben Leseraster an, der innerhalb des sequenzierten Abschnitts kein Stoppcodon aufwies (Bild 4.20).

Eine Sequenzsuche mit BLASTn ergab zu diesem Zeitpunkt (Juli 2000) für orf1 keine signifikanten Homologien zu bekannten Genen. Mit Hilfe der Sequenzen von orf2 bis orf4 und der aus ihnen abgeleiteten Proteine konnten jedoch sowohl in *B. subtilis* (Genbank über den NCBI-Server) als auch in *S. aureus* (TIGR *unfinished genomes*) genomische Regionen gefunden werden, die eine identische Genfolge aufweisen (Bild 4.21).

Eine Erweiterung der *S. epidermidis* Sequenz um das vor orf1 gelegene Gen und den ansequenzierten orf4 sollte durch Amplifikation geeigneter Genomabschnitte mit anschließender Klonierung und Sequenzierung erreicht werden. Ein *Alignment* der Sequenzen von *B. subtilis* und *S. aureus* wurde durchgeführt, und es wurden *Primer*

generiert, die vor bzw. hinter den gewünschten Bereichen lagen und in möglichst konservierten Abschnitten lokalisiert waren. In Anbetracht größerer phylogenetischen Nähe wurde im Zweifel die *S. aureus* Sequenz für die Auswahl der Oligonukleotide herangezogen.

Auf diese Weise war es möglich, den vierten offenen Leserahmen auf seine gesamte Länge von 1353 bp zu vervollständigen (Bild 4.21; Gesamtsequenz siehe Anhang). Es gelang jedoch trotz intensiver Bemühungen nicht, ein Amplifikat zu erzeugen, das den Bereich vor orf1 umschloss. Die vier offenen Leserahmen wurden in Anlehnung an die homologen Gene von *B. subtilis* mit *purR*, *yabJ*, *spoVG* und *gcaD* bezeichnet (Bild 4.21).

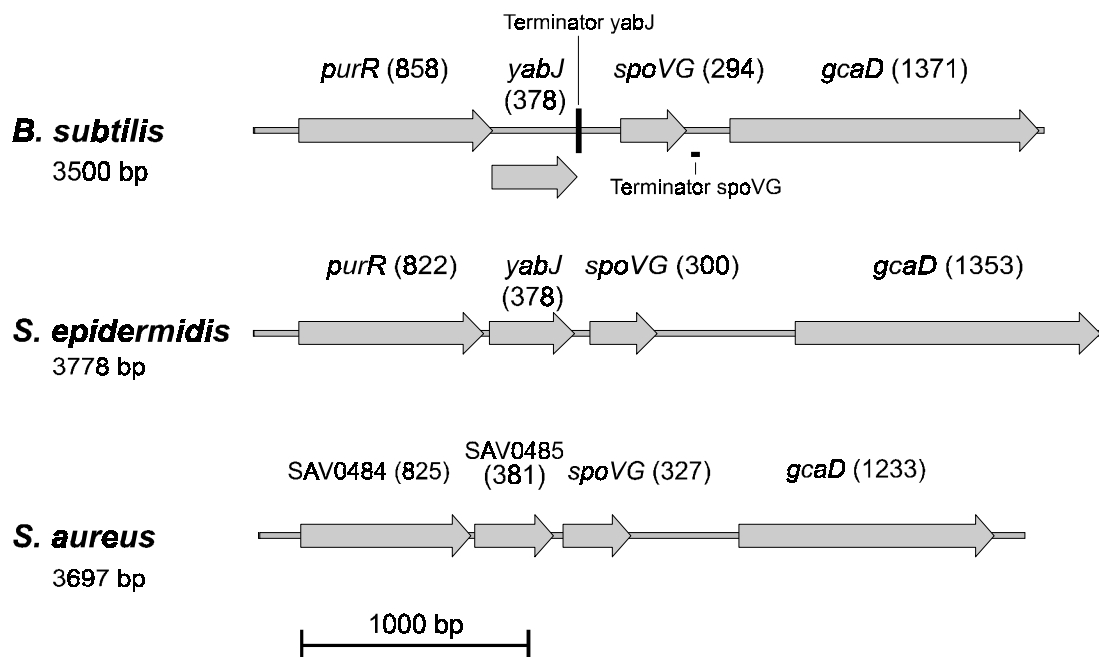


Bild 4.21: Schematische Darstellung der homologen DNA-Abschnitte von *B. subtilis* (Accession No. Z99104), *S. epidermidis* (eigene Sequenzierung) und *S. aureus* Mu50 (Accession No. AP003359). Offene Leseraster sind als breite Pfeile angegeben. Darüber sind die Namen der Gene bzw. Leseraster angegeben und in Klammern die Länge in bp

Die Homologien auf Nukleotidebene variierten von 55,5 bis 60,8 % zu *B. subtilis* und von 72,4 bis 90 % zu *S. aureus* (Tabelle 4.1). Auch die vier abgeleiteten, hypothetischen Proteine von M12 wiesen die stärksten Homologien zu den hypothetischen Proteinen von *S. aureus* auf. Die höchste Übereinstimmung zwischen diesen beiden Stämmen konnte für PurR mit 96,7 % (94,9 % identische Aminosäuren) nachgewiesen werden (

Tabelle 4.2). Die geringste Übereinstimmung lag bei 83 % für *gcaD*. Die Proteine von *B. subtilis* wiesen zwischen 56 % (PurR) und 61 % (SpoVG) Homologie zu den *S. epidermidis* Proteinen auf

Tabelle 4.2).

Tabelle 4.1: Homologie der Nukleotidsequenzen der orfs von *S. epidermidis* 1457 zu den entsprechenden Genen von *B. subtilis* und *S. aureus*

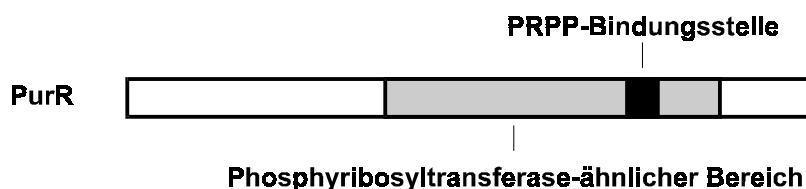
		Homologie zum Gen von	
		<i>B. subtilis</i> [%]	<i>S. aureus</i> [%]
orf1:	<i>purR</i>	55,5	82,8
orf2:	<i>yabJ</i>	58,3	77,5
orf3:	<i>spoVG</i>	60,8	90,0
orf4:	<i>gcaD</i>	58,1	72,4

Tabelle 4.2: Homologie der abgeleiteten, hypothetischen Aminosäuresequenzen von M12 zu den entsprechenden Proteinen von *B. subtilis* und *S. aureus*

		Homologie zum Protein von			
		<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i>	
		ähnlich [%]	identisch [%]	ähnlich [%]	identisch [%]
PurR		70,2	51,2	96,7	94,9
YabJ		66,9	50,4	87,3	77,8
SpoVG		67,6	56,9	94,0	92,0
GcaD		66,9	54,2	83,0 ^a	75,0 ^a

^a die Homologie bezieht sich auf die Gesamtlänge des um 39 Aminosäuren kürzeren *S. aureus* Gens

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von PurR zeigt von Position 101-234 Ähnlichkeit mit einer Phosphoribosyltransferasedomäne (RPS-BLAST 2.2.1; Bild 4.). Innerhalb dieser Region befindet sich an Position 199-211 eine mögliche Phosphoribosylpyrophosphat-(PRPP)-Bindungsstelle.

**Bild 4.22:** Schematische Darstellung von PurR aus *S. epidermidis* 1457. Grau unterlegt ist der Bereich, der Ähnlichkeit zu einer Phosphoribosyltransferase aufweist. Als schwarze Box gekennzeichnet ist die Lage des PRPP-Bindungsmotivs

Der Purinrepressor PurR von *B. subtilis* weist die gleichen Merkmale auf (Weng *et al.*, 1995). Eine Bindung von PRPP an PurR verhindert in diesem Stamm eine Interaktion des Repressorproteins mit der DNA, so dass eine Regulation über die intrazelluläre

PRPP-Konzentration erfolgen kann (Weng *et al.*, 1995). Für *S. epidermidis* 1457 kann daher für PurR ebenfalls eine PRPP-abhängige DNA-Bindung postuliert werden.

In M12 folgte auf *purR* eine 24 bp lange intergenische Region, bevor der zweite offene Leserahmen im selben Leseraster begann. Diese Region war in *S. aureus* nur 19 bp lang, was zu einer Verschiebung des Leserasters führt. In *Bacillus subtilis* wiederum überlappt das Startcodon von *yabJ* mit dem letzten kodierenden Triplet von *purR*, was ebenfalls zu einer Verschiebung des Leserasters führt. Die beiden überlappenden Gene bilden hier ein Operon, dessen Transkription am *yabJ*-Terminator endet. Eine homologe Sequenz zu diesem Terminator konnte in der *S. epidermidis* Sequenz nicht lokalisiert werden.

Für die Suche nach möglichen Promotorregionen wurden die von Haldenwang für *B. subtilis* beschriebenen Konsensussequenzen verwendet (Haldenwang, 1995). Damit konnte etwa 160 Basen *upstream* des *yabJ* Startcodons eine Region mit starker Homologie zu einem hypothetischen σ^B -Promotor identifiziert werden. Dieselbe Basenfolge wurde schon von Kullik und Giachino bei der Beschreibung des *sigB*-Operons von *S. aureus* als mögliche σ^B -Bindungsstelle beschrieben (Kullik und Giachino, 1997). Ein Vergleich mit sieben für *S. aureus* beschriebenen Promotoren, deren Funktionalität belegt ist (Novick, 1990), ergab keine starken Homologien. Für *purR*, *spoVG* und *gcaD* konnten 65, 64 und 38 bp vor dem jeweiligen putativen Startcodon mögliche σ^A -Promotorregionen gefunden werden. In allen drei Fällen zeigten die putativen σ^A -Promotoren eine klassische TATAAT-Box (siehe Anhang).

4.3.3 Transkriptionsanalyse durch Northern-Hybridisierung

Eine Transkriptionsstörung mindestens der beiden Gene *purR* und *yabJ* erschien wahrscheinlich, da sich die Insertionsstelle des Transposons 30 Basen vor dem Stoppcodon des ersten und nur 55 Basen vor dem vermuteten Startcodon des zweiten befand. Aufgrund der geringen Länge von *yabJ* von nur 300 bp und dem in gleicher Leserichtung orientierten folgenden *spoVG* wurde auch dessen Transkription überprüft.

Zunächst sollte festgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt die Gene *purR*, *yabJ* und *spoVG* aktiv transkribiert werden. RNA für die Transkriptionsanalysen wurde daher sowohl aus Bakterien der exponentiellen als auch der stationären Wachstumsphase von Schüttelkulturen extrahiert. Bei den Analysen wurden immer *S. epidermidis* 1457, M12 und 1457-M10 parallel bearbeitet und direkt miteinander verglichen. 1457-M10 diente als Kontrolle, um zu belegen, dass Differenzen zwischen Wildtyp und M12 nicht sekundär durch die Inaktivierung des *ica*-Operons bedingt sind.

Mit der *purR*-spezifischen Sonde R7.rev konnte im Wildtyp *S. epidermidis* 1457 sowie in 1457-M10 ein ca. 2,6 kb großes Transkript detektiert werden, das nur in der exponentiellen Wachstumsphase nachzuweisen war (Bild 4.23). Bei M12 fand keine Hybridisierung mit der Sonde statt. In der stationären Phase war für keinen der Stämme ein Transkript nachweisbar.

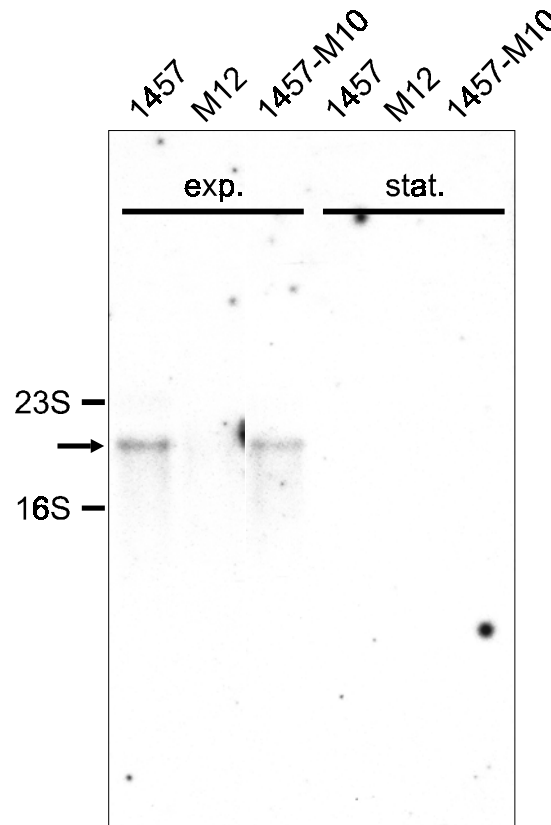


Bild 4.23: Nachweis eines Transkripts in der Northern-Hybridisierung mit der *purR*-spezifischen Sonde R7.rev. Die RNA von *S. epidermidis* 1457, M12 und 1457-M10 aus Zellen der exponentiellen (exp.) und der stationären (stat.) Wachstumsphase wurde über Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran geblottet

Eine *yabJ*-spezifische Sonde, R2d.rev, hybridisierte in der aufgetrennten RNA von *S. epidermidis* 1457 mit zwei Banden (Bild 4.24). Eine stark hervortretende Bande entsprach einem Transkript mit einer ungefähren Größe von 950 bp, während eine schwächere Bande einem etwa 2,6 kb großen Transkript entsprach (Bild 4.24). Die gleichen Transkriptgrößen konnten bei RNA von 1457-M10 gefunden werden (Bild 4.24). Bei M12 konnte keine der beiden Banden nachgewiesen werden. Auch in der stationären Wachstumsphase war das kleinere der beiden Transkripte im Wildtyp und 1457-M10 nachweisbar, nicht aber in M12 (Bild 4.24). Die Transkriptmenge, die sich in der Schwärzung des Röntgenfilms ausdrückt, ist jedoch geringer als in der exponentiellen Wachstumsphase. Die schwächere, 2,6 kb große Bande war in der stationären Kultur nicht mehr detektierbar.

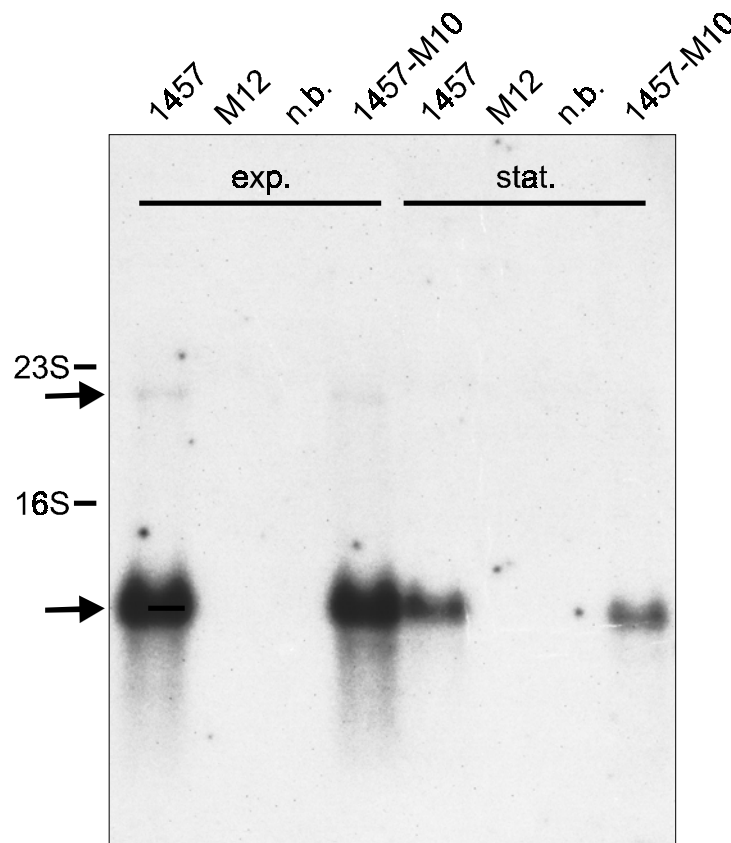


Bild 4.24: Nachweis zweier Transkripte in der Northern-Hybridisierung mit der *yabJ*-spezifischen Sonde R2d.rev. RNA von *S. epidermidis* 1457, M12 und 1457-M10 aus Zellen der exponentiellen (exp.) und der stationären (stat.) Wachstumsphase wurde über Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran geblottet. n.b. Spur nicht belegt

Für die Hybridisierung mit der *spoVG*-spezifischen Sonde, sespoVG1.as, ergab sich dasselbe Bild wie für die *yabJ*-spezifische Sonde. Auch hier waren im Wildtyp und in 1457-M10 zwei unterschiedlich starke Banden von etwa 0,95 und 2,6 kb Größe zu sehen (Bild 4.25). Wieder war vom kleineren Transkript deutlich mehr vorhanden als vom größeren. Auch konnte keine Hybridisierung der Sonde mit dem 2,6 kb großen Transkript in RNA aus Bakterien der stationären Wachstumsphase festgestellt werden. RNA von M12 hybridisierte in keinem Fall mit der Sonde für *spoVG*.

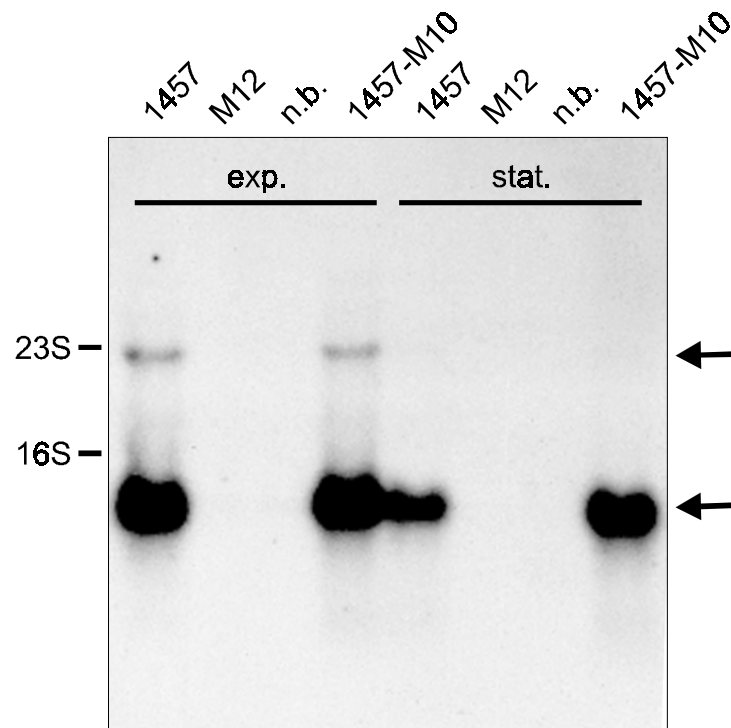


Bild 4.25: Nachweis zweier Transkripte in der Northern-Hybridisierung mit der *spoVG*-spezifischen Sonde sespoVG1.as. RNA von *S. epidermidis* 1457, M12 und 1457-M10 aus Zellen der exponentiellen (exp.) und der stationären (stat.) Wachstumsphase wurde über Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran geblottet. n.b. Spur nicht belegt

Durch *stripping* und Rehybridisierung verschiedener Membranen konnte nachgewiesen werden, dass dasselbe Transkript von etwa 950 bp Größe mit den spezifischen Sonden für *yabJ* und für *spoVG* hybridisierte. Es konnte gezeigt werden, dass *yabJ* und *spoVG* sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase cotranskribiert werden. Die beiden Gene bilden somit ein Operon. Zusätzlich hybridisierten die beiden Sonden ebenso mit dem 2,6 kb großen Transkript, welches nur in der exponentiellen Wachstumsphase in *S. epidermidis* 1457 und 1457-M10 nachzuweisen ist. Dieses größere Transkript, von dem grundsätzlich geringere Mengen vorlagen, konnte ebenso mit der *purR*-spezifischen Sonde nachgewiesen werden. Die drei Gene umfassen allerdings gemeinsam nur einen chromosomalen Abschnitt von etwa 1,6 kb. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass mindestens ein weiteres, viertes Gen in diesem Transkript enthalten ist.

Dem offenen Leserahmen von *spoVG* folgt zunächst eine 600 bp lange nicht kodierende Region, wonach sich ein 1353 bp langes Gen, *gcaD*, anschließt. Ein Transkript, das die Gene *purR* bis *gcaD* umfassen würde, müsste noch länger sein als das detektierte. Daher ist die Cotranskription eines *upstream* gelegenen Gens wahrscheinlich.

Es konnte gezeigt werden, dass die Insertion von Tn917 30 Basenpaare vor Ende des offenen Leserahmens, der mit *purR* bezeichnet wurde, mindestens drei Gene beeinflusst. Die Transkription aller drei untersuchten Gene *purR*, *yabJ* und *spoVG* wurde durch die Transposoninsertion in M12 unterbunden.

4.4 Phänotypische Charakterisierung der Transposonmutante M12

Die Biofilm-negative Transposonmutante M12 zeigte im Adhäsions-ELISA deutlich geringere Aktivität als der Wildtyp *S. epidermidis* 1457 (Kap. 4.2.2). Hinweise auf eine geringere primäre Bindung an Polystyrolkugeln (Precision Plastic Balls Co., Chicago, Ill.) dieser Mutante hatte auch eine Untersuchung von Riedewald (Riedewald 2001) ergeben. Hierbei war die Anzahl adhärenter Bakterien durch Abschallen und anschließendes Ausplattieren geeigneter Verdünnungen bestimmt worden. Die Mutante wurde deshalb im Verlauf dieser Arbeit weitergehend phänotypisch charakterisiert und ihr Adhäsionsverhalten eingehender untersucht.

4.4.1 Koloniemorphologie

Bei Wachstum auf Blutagarplatten waren die Kolonien von *S. epidermidis* 1457 weißlich und gewölbt (Bild 4.26), während die von M12 gräulich und flach waren. Der Unterschied trat besonders deutlich hervor, wenn die Stämme auf Blutagarplatten ausgestrichen wurden, die Humanblut an Stelle von Schafsblut enthielten. Hier zeigte sich auch nach 48-stündiger Inkubation ein weiteres Merkmal, in dem sich M12 vom Wildtyp abhebt. Bei *S. epidermidis* 1457 bildeten sich deutliche Hämolysehöfe um die Einzelkolonien (Bild 4.26), die bei M12 fehlten. Gelegentlich traten spontane Phasenvariationen auf, die zu einer Wiederherstellung des weißen Phänotyps und einem starken Hämolyseverhalten führten (Bild 4.27). Diese Varianten waren trotz ihres wildtypähnlichen Phänotyps weiterhin Biofilm-negativ.

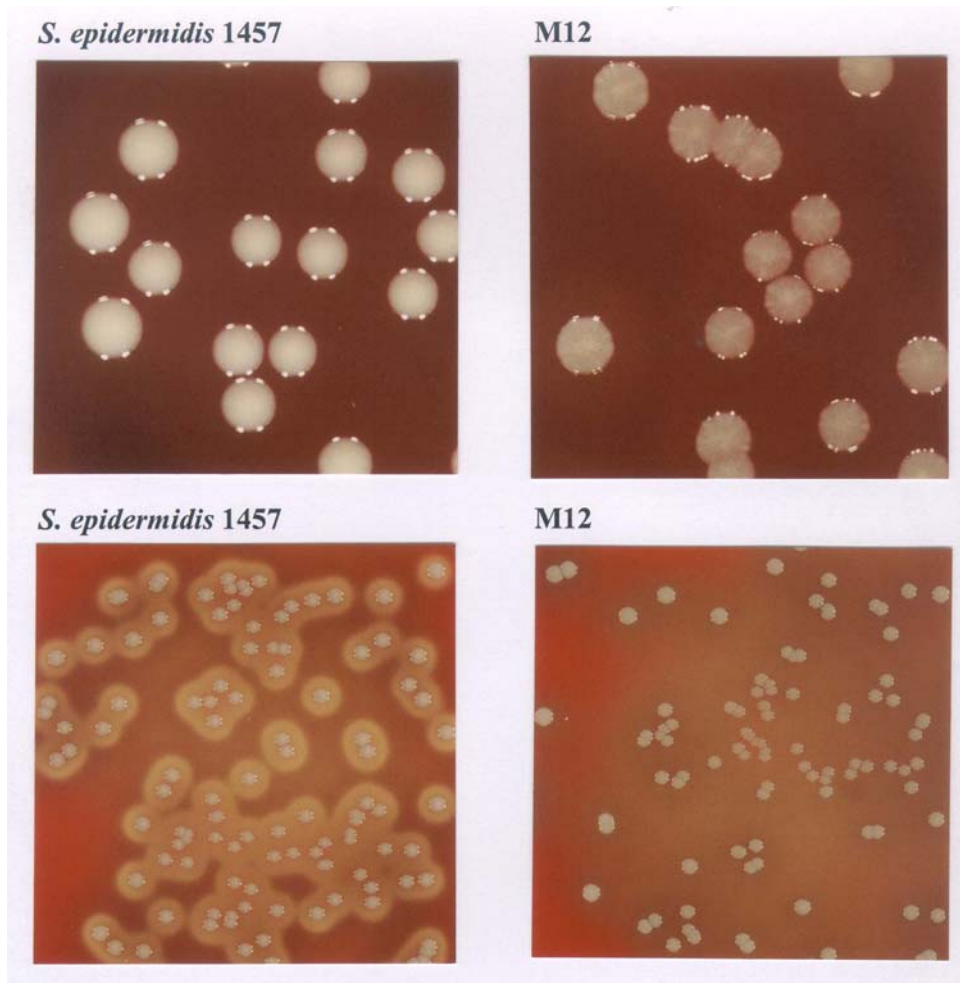


Bild 4.26: Koloniemorphologie und Hämolyseverhalten von *Staphylococcus epidermidis* 1457 und M12 auf Humanblut-Agar. Es ist deutlich der Unterschied in Pigmentierung (oben) sowie im Hämolyseverhalten (unten) zu erkennen. Um die beiden Phänomene besser sichtbar zu machen, wurden die Platten einmal mit dunklem (oben) und einmal mit hellem (unten) Hintergrund fotografiert

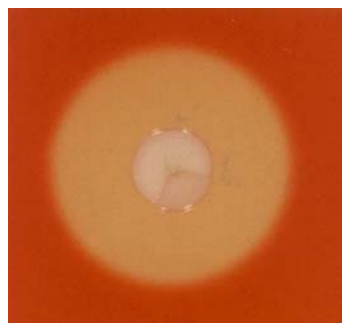


Bild 4.27: Einzelkolonie von M12 auf Humanblut-Agar. Deutlich zu erkennen ist eine spontane Phasenvariante mit heller Pigmentierung und Hämolysehof

4.4.2 Wachstum in Schüttelkultur und Mikrotiterplatten

Bei der Untersuchung der Adhäsion an Nunclon Δ war aufgefallen (Kap. 4.2.2), dass M12 in der stationären Wachstumsphase eine geringere Zelldichte aufwies als *S. epidermidis* 1457. Deswegen wurde das Wachstum der beiden Stämme unter verschiedenen Kulturbedingungen anhand der optischen Dichte der Kulturen miteinander verglichen.

Die Transposonmutante M12 zeigte annähernd das gleiche Wachstum wie der Wildtyp (Bild 4.28). Exponentielles Wachstum setzte in Schüttelkulturen nach 2,5-stündiger *Lag*-Phase ein und die stationäre Phase war nach 10 Stunden erreicht. Zu diesem Zeitpunkt lag die OD₅₇₈ bei 9,0. Während die OD₅₇₈ bei *S. epidermidis* 1457 weitere sieben Stunden etwa konstant blieb, sank sie in Kulturen von M12 auf 5,5 ab (Bild 4.28). Möglicherweise tritt M12 früher als der Wildtyp in die Absterbephase ein. Nach 16 Stunden betrug die durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen bestimmte Bakterienkonzentration etwa 2×10^9 CFU/ml in einer Kultur des Wildtyps. Die Konzentration von M12 lag in der Regel fünffach niedriger.

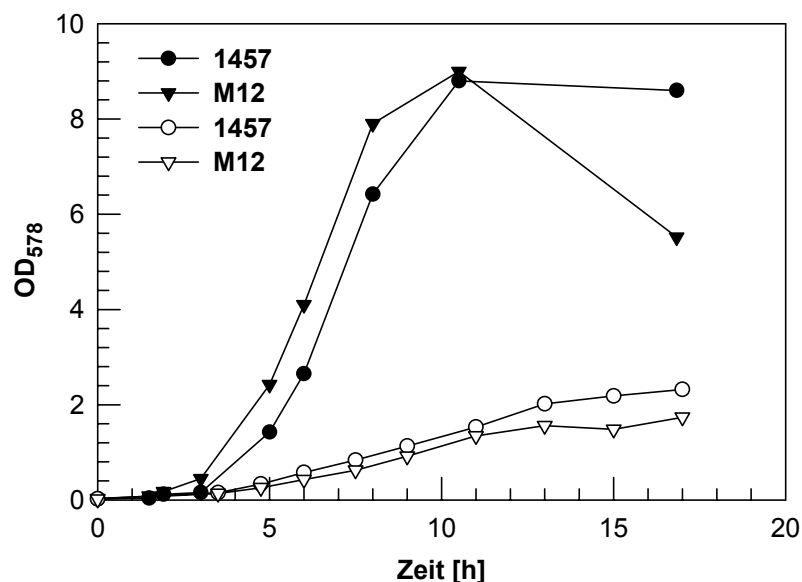


Bild 4.28: Wachstumskurven von *S. epidermidis* 1457 und M12 in Schüttelkultur (gefüllte Symbole) und bei Kultivierung in Mikrotiterplatten (offene Symbole). Gemessen wurde die optische Dichte geeigneter Verdünnungen bei 578 nm

Wurden die Stämme in Mikrotiterplatten unter statischen Bedingungen kultiviert, so wuchsen die Bakterien langsamer und erreichten erst nach etwa 13 Stunden die stationäre Phase (Bild 4.28). *S. epidermidis* 1457 erreichte dabei nur eine maximale OD₅₉₈ von 2,3, M12 von 1,7. Ein Abfall der OD₅₇₈ war unter diesen Bedingungen im Beobachtungszeitraum von 17 Stunden nicht zu bemerken. Obwohl das gleiche Kulturmedium wie in der Schüttelkultur verwendet wurde, war die maximal erreichte OD bei Kulturen aus Mikrotiterplatten vierfach niedriger. Wurden die Bakterienkonzentrationen nach 16 Stunden durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen bestimmt, so waren diese in den Mikrotiterplatten um die Hälfte geringer als in den entsprechenden

Schüttelkulturen. Auch hier enthielten die Kulturen des Wildtyps in der stationären Phase fünffach mehr Bakterien als die der Mutante. Bestimmungen der Bakterienkonzentration in der exponentiellen Wachstumsphase ergaben keine gravierenden Unterschiede zwischen den Kulturen der beiden Stämme. Es ist daher wahrscheinlich, dass durch die Transposoninsertion ein Genort ausgeschaltet worden ist, der mit der physiologischen Umstellung der Zellen in der stationären Phase in Zusammenhang steht. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden in den folgenden Untersuchungen zusätzlich zu den Bakterien der stationären Wachstumsphase auch Bakterien aus exponentieller Wachstumsphase eingesetzt.

4.4.3 Relative Hydrophobizität

Eine frühe Studie hatte einen Zusammenhang zwischen der relativen Hydrophobizität von Staphylokokkenstämmen und ihrem Adhäsionsvermögen beobachtet (Pascual *et al.*, 1986). Je hydrophober die Zelloberfläche war, desto besser adhärten die untersuchten Stämme an Teflonkatheter. Um zu erfassen, ob die im ELISA auffällige Mutante M12 im Vergleich zu ihrem Wildtyp eine Verringerung der Hydrophobizität der Zelloberfläche aufweist, wurde daher die relative Hydrophobizität dieser Stämme bestimmt. 1457-M10 wurde als Kontrolle mitgeführt, um zu zeigen, dass eine Änderung nicht auf fehlendes PIA zurückzuführen ist.

Die Biofilm-negative und möglicherweise adhäsionsverminderte Mutante M12 unterschied sich deutlich in ihrer relativen Hydrophobizität vom Wildtyp, wenn die Zellen einer Schüttelkultur in stationärer Wachstumsphase entnommen wurden (Bild 4.29).

M12 wies unter diesen Bedingungen und bei Verwendung von 8 % p-Xylen zum Ausschütteln der Bakterien aus einer wässrigen Lösung eine relative Hydrophobizität von ca. 47 % auf. Die Hydrophobizität von *S. epidermidis* 1457 und 1457-M10 lag mit etwa 94 % doppelt so hoch. Wurden die drei Stämme in Mikrotiterplatten kultiviert, so konnte kein Unterschied festgestellt werden (Bild 4.29). Hier waren die Zellen von M12 weder in der exponentiellen noch in der stationären Wachstumsphase hydrophiler als die von *S. epidermidis* 1457. Die relative Hydrophobizität lag zwischen 93 % und 95 %. Bei einer p-Xylenkonzentration von 4 % schwankten die erzielten Werte sehr stark, während sich bei einer Konzentration von 12 % das in Bild 4.29 gezeigte Bild bestätigte.

Die hydrophoben Eigenschaften der Zelloberfläche in M12 veränderten sich mit der Wachstumsphase und der Kulturmethode. Da nur Bakterien der stationären Phase vom Wildtyp abwichen, ist ein Zusammenhang zwischen dem Eintritt in diese Wachstumsphase und der Veränderung der Oberflächenstruktur der Mutante wahrscheinlich.

Obwohl M12 in der stationären Phase von Schüttelkulturen eine hydrophilere Zelloberfläche zu besitzen scheint, konnte darin nicht die einzige Erklärung für eine verminderte Anheftung liegen. Im ELISA unterschied sich M12 in der stationären Wachstumsphase auch vom Wildtyp, wenn die Bakterien in der Mikrotiterplatte kultiviert wurden.

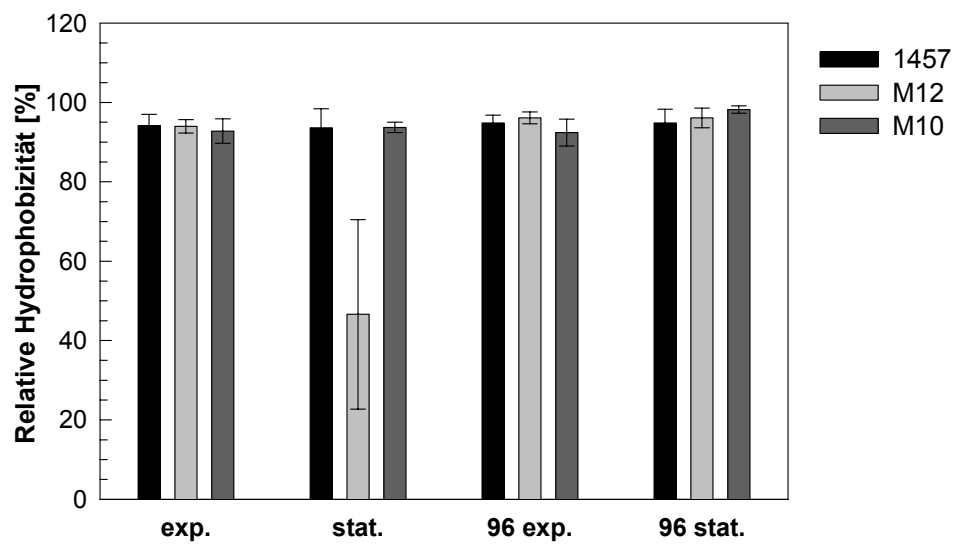


Bild 4.29: Relative Hydrophobizität von *S. epidermidis* 1457, M12 und 1457-M10 mit 8 % p-Xylen. Verglichen wurden Zellen der exponentiellen Wachstumsphase einer Schüttelkultur (exp.) und einer Mikrotiterplattenkultur (96 exp.) sowie Zellen der stationären Wachstumsphase einer Schüttelkultur (stat.) und einer Mikrotiterplattenkultur (96 stat.). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen

4.4.4 Anheftungsverhalten

Nachdem festgestellt worden war, dass die Mutante in der exponentiellen Wachstumsphase weder in ihrer Wachstumskurve und Kultivierbarkeit (Kap. 4.4.2) noch in der relativen Hydrophobizität (Kap. 4.4.3) vom Wildtyp zu unterscheiden war, wurden die Stämme auch im Anheftungs-ELISA in der exponentiellen Wachstumsphase miteinander verglichen.

Die Kurvenverläufe von *S. epidermidis* 1457 und M12 waren im Anheftungs-ELISA sehr ähnlich, wenn die Bakterien 6 Stunden in Mikrotiterplatten gewachsen waren (Bild 4.30). Sie stimmten etwa mit der von *S. epidermidis* 1457 in der stationären Phase überein.

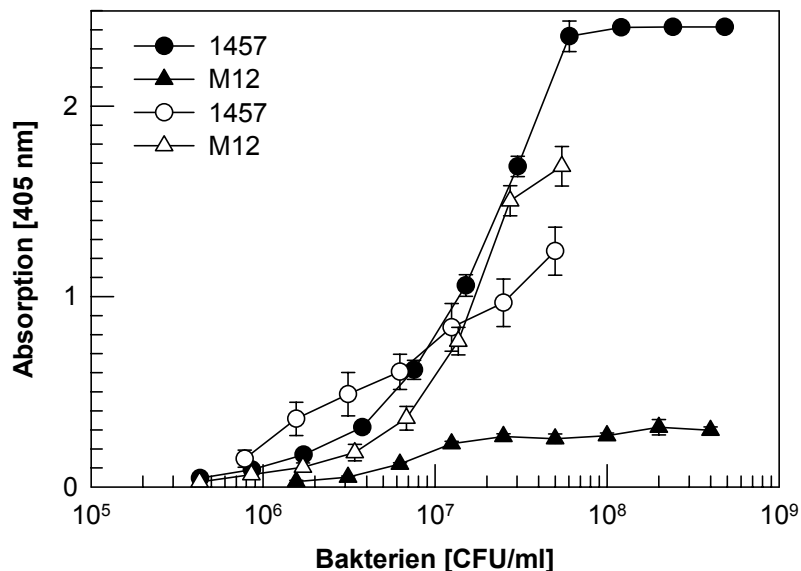


Bild 4.30: Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 und M12 an NunclonΔ in Abhängigkeit von der Wachstumsphase. Die Tests wurden mit Bakterien der stationären Wachstumsphase (geschlossene Symbole) und der exponentiellen Wachstumsphase (offene Symbole) in Mikrotiterplatten durchgeführt und adhärenente Bakterien mittels ELISA detektiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei Parallelen und ihre Standardabweichung. Sind keine Fehlerbalken erkennbar, so ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol des Datenpunktes

Um die Anheftung in einem antikörperunabhängigen Verfahren zu testen, wurden die gleichen Experimente mit radioaktiv markierten Bakterien durchgeführt. Die Kultivierung der beiden Stämme erfolgte zu diesem Zweck in Mikrotiterplatten mit ³H-Thymidin supplementiertem Medium. Anschließend wurde die Adhäsionstestung wie in Kap. 3.5.2 beschrieben an der Maxisorp-Oberfläche durchgeführt.

M12 adhärierte unabhängig von der Wachstumsphase ebenso gut wie der Wildtyp *S. epidermidis* 1457 (Bild 4.31). Dabei galt hier der gleiche lineare Zusammenhang zwischen inkubierter Zelldichte und der Anzahl adhärenente Bakterien wie in Gleichung (4.1) für den Wildtyp und 1457-M10 beschrieben.

Es konnte mit dieser unabhängigen Methode kein signifikanter Unterschied der Adhäsionseigenschaften von M12 und *S. epidermidis* 1457 festgestellt werden. Das legt die Vermutung nahe, dass der im Anheftungs-ELISA detektierte Unterschied auf eine differenzielle Expression von Oberflächenantigenen zurückzuführen ist.

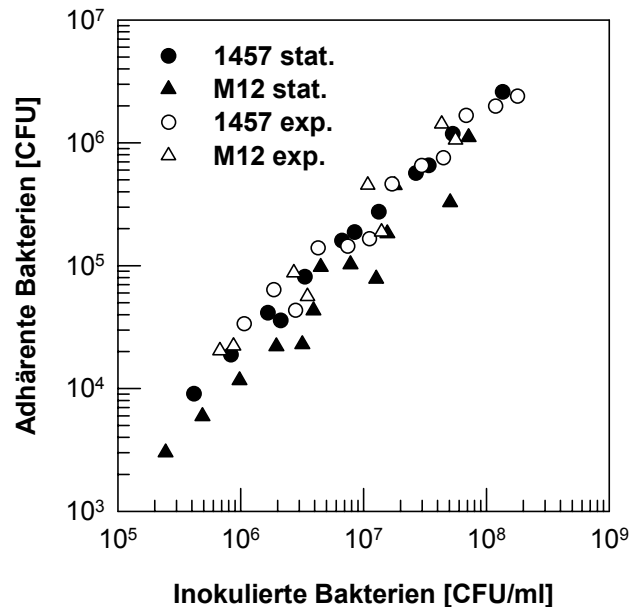


Bild 4.31: Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 und M12 an Maxisorp. Verglichen wurden Bakterien aus exponentieller und stationärer Wachstumsphase (offene bzw. gefüllte Symbole). Die radioaktiv markierten Bakterien wurden mittels Scintillationsmessung in einzelnen Näpfen von Mikrotiterplatten detektiert. Dargestellt sind alle Werte aus sechs unabhängigen Versuchen

4.4.5 Immunfluoreszenz

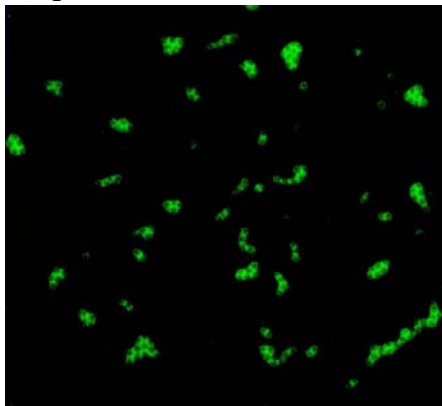
Hydrophobizitätstest und Anheftungs-ELISA wiesen auf eine Veränderung der Zelloberfläche bei der Transposonmutante M12 zwischen exponentieller und stationärer Wachstumsphase hin. Darin unterschied sich die Mutante von ihrem Wildtyp *S. epidermidis*. Bei der durch Radioaktivität bestimmten Anheftung an die Maxisorp-Oberfläche war diese Differenzierung nicht möglich. Denkbar ist daher, dass das verminderte ELISA-Signal nicht durch eine geringere Anzahl adhärenter Bakterien sondern durch eine geringere Reaktivität der Bakterien mit dem Anti-Staphylokokken-Antiserum hervorgerufen wurde. Die Präsentation von Oberflächenantigenen und die damit verbundene Reaktivität mit dem verwendeten Anti-Staphylokokken-Antiserum wurde daher mit dem Immunfluoreszenztest untersucht. Dieser Test wurde mit dem gleichen Anti-Staphylokokken-Antiserum wie der ELISA durchgeführt. Die Bindung an die Bakterien wurde diesmal jedoch mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper nachgewiesen und die Bindungskapazitäten wurden anhand der Fluoreszenzintensität mikroskopisch beurteilt.

Im Immunfluoreszenztest fluoreszierten alle Zellen von *S. epidermidis* 1457-Kulturen gleichmäßig stark (Bild 4.32A). Die Fluoreszenz und damit die Antigenität dieses

Stammes war bei Zellen aus Schüttelkultur und Mikrotiterplatten gleich. Auch die Zellen aus exponentieller und stationärer Wachstumsphase unterschieden sich nicht erkennbar.

Die meisten Zellen von M12 hingegen fluoreszierten nicht oder nur sehr schwach und nur vereinzelt wurden Zellen oder Zellhaufen gefunden, deren Fluoreszenzintensität der des Wildtyps entsprach (Bild 4.32B). Die eigentümliche Reaktivität von M12 im Immunfluoreszenztest war unabhängig von der Wachstumsphase und den Kulturbedingungen. Sie trat sowohl in exponentiell wachsenden Zellen auf als auch in der stationären Phase, sowohl in Schüttelkultur als auch bei Kultivierung in Mikrotiterplatten.

***S. epidermidis* 1457**



M12

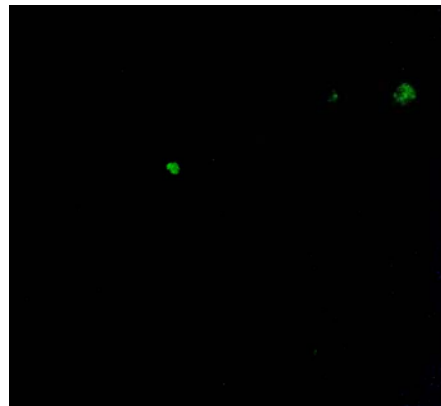


Bild 4.32: Immunfluoreszenztest von *S. epidermidis* 1457 und M12, durchgeführt mit Anti-Staphylokokken-Antiserum und FITC-gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper

Eine geringere Fluoreszenz und damit eine geringere Antikörperbindungskapazität von M12 gegenüber dem Wildtyp könnte eine mögliche Erklärung für das schwache Signal im Anheftungs-ELISA sein. Dann jedoch müsste auch die Anheftungs-Kurve von M12-Zellen aus exponentieller Wachstumsphase so niedrig sein wie die von Zellen aus stationärer Phase. Die schwache Antikörperbindung bietet damit keine ausreichende Erklärung für die niedrigen ELISA-Signale.

4.5 *In trans* -Komplementierung

Die drei in M12 in ihrer Transkription gestörten Gene *purR*, *yabJ* und *spoVG* wurden separat in den Staphylokokkenvektor pTX15 kloniert und *in trans* komplementiert. Hiermit sollte überprüft werden, ob die Expression eines einzelnen Gens ausreicht, die phänotypischen Eigenschaften des Wildtyps *S. epidermidis* 1457 wiederherzustellen. Der ausgewählte Vektor verfügt über einen Xylose-induzierbaren Promotor, der eine gezielte Induktion des klonierten Gens ermöglicht (Peschel und Götz, 1996).

Der Vektor wurde aus *S. carnosus* TM300 (pTX15) isoliert und durch Spaltung mit den Enzymen *Bam*HI und *Mlu*I linearisiert, wobei große Teile des Lipasegens eliminiert wurden (Bild 4.33). Die Gene *purR*, *yabJ* und *spoVG* wurden mitsamt ihren

postulierten Shine-Dalgarno-Sequenzen mittels PCR aus *S. epidermidis* 1457 amplifiziert und durch die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide mit *Bam*HI und *Mlu*I-Spaltstellen versehen (Primer siehe Kap. 2.7). Danach wurden sie in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert und in *E. coli* TOP10 transformiert. Die Gene wurden anschließend aus dem Plasmid durch Spaltung mit den beiden Enzymen wieder heraus getrennt. Die so erhaltenen Fragmente wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die generierten Spaltstellen funktionell waren. Die aufgereinigten Fragmente wurden in den vorbereiteten Vektor ligiert (Bild 4.33) und der komplette Ligationsansatz in *S. carnosus* TM300 Protoplasten transformiert. Nach diesem Verfahren entstanden die Plasmide pTXR, pTXJ und pTXVG.

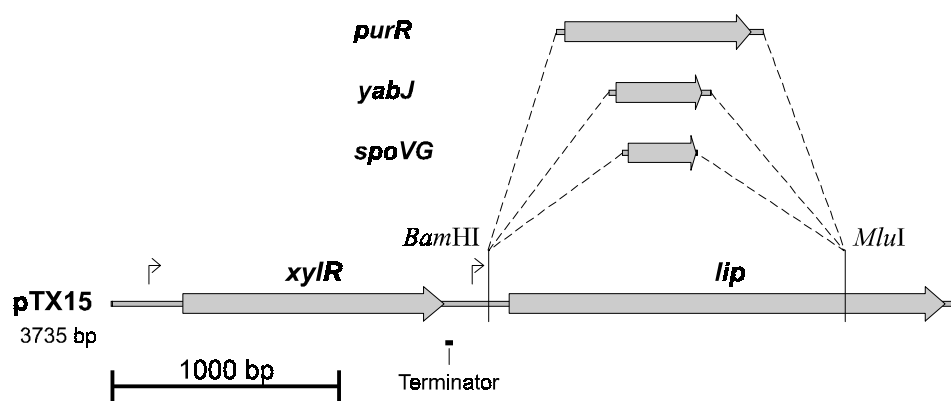


Bild 4.33: Schematische Darstellung der Konstruktion der Vektoren pTXR, pTXJ und pTXVG aus pTX15. Gene sind als graue Pfeile dargestellt, DNA-Abschnitte als einfache Linie. *xylR* kodiert für den Xylose-Repressor aus *Staphylococcus xylosus*, *lip* ist das Gen für die Lipase in *Staphylococcus hyicus* und die kleinen eckigen Pfeile markieren die Promotoren der beiden Gene. Die Gene *purR*, *yabJ*, und *spoVG* wurden über PCR mit den gewünschten Spaltstellen versehen, zunächst in pCR2.1-TOPO kloniert, enzymatisch herausgetrennt und anschließend an Stelle der Lipase in pTX15 ligiert

Aus *S. carnosus* wurden die kompletten Plasmide erneut extrahiert, gereinigt und zur Transformation von M12 Protoplasten verwendet. Die isolierten Klone wurden mit M12 (pTXR), M12 (pTXJ) und M12 (pTXVG) und einer fortlaufenden Nummer hinter den Buchstaben bezeichnet. Die Plasmide dieser Stämme wurden aufgereinigt und zur Kontrolle erneut eine Restriktionsanalyse und eine Sequenzierung durchgeführt.

Bei der Sequenzierung der Plasmide aus den M12-Transformanten stellte sich heraus, dass in pTXVG der offene Leserahmen gegenüber dem Wildtypgen um 39 bp verlängert war. Dies war auf einen Wegfall des Stoppcodons zurückzuführen, so dass eine Transkription in den hinteren Teil des Lipasegens möglich wurde. Das postulierte Transkript war damit vermutlich um 39 bp, das induzierte Protein damit eventuell um dreizehn Aminosäuren länger als das natürliche von *S. epidermidis* 1457. Die Funktionalität des Genprodukts musste daher kritisch beurteilt werden.

4.5.1 Phänotypen der komplementierten Stämme

Die Biofilmbildung der komplementierten Stämme M12 (pTXR), M12 (pTXJ) und M12 (pTXVG) wurde unter Induktion durch Xylose geprüft. Weder mit 0,4 % noch mit 4 % Xylose im Wachstumsmedium TSB ließ sich der Phänotyp der Biofilmbildung wiederherstellen. Alle Mutanten blieben weiterhin Biofilm-negativ. Die Biofilmbildung der beiden als Kontrollen der Induktion mitgeführten Stämme M12 (pTXicaADBC) und *S. carnosus* TM300 (pTXicaADBC) wurde jedoch durch 4 % Xylose im Medium induziert.

Der erneut durchgeführte Immunfluoreszenztest ergab, dass weder in M12 (pTXR) noch in M12 (pTXJ) eine Induktion der fehlenden Oberflächenantigene erfolgte. Es war bei diesen beiden Stämmen auch nach Wachstum mit Xylose keine Änderung des Fluoreszenzbildes im Vergleich zur M12 zu erkennen. Die Bakterien wiesen bis auf wenige Zellen keine Fluoreszenz auf. Der Stamm M12 (pTXVG) hingegen fluoreszierte ähnlich wie der Wildtyp, wenn eine Induktion mit Xylose erfolgt war (Bild 4.34). Überraschenderweise war diese Fluoreszenz auch zu beobachten, wenn die Bakterien ohne Xylosezugabe in TSB angezogen wurden. Möglicherweise enthält dieses Komplexmedium ausreichend Xylose, um eine geringe Promotoraktivität zu erlauben. Da weder M12 noch die anderen zwei *in trans* komplementierten Stämme diese Veränderung der Antigenpräsentation aufwiesen, muss die beobachtete Veränderung jedenfalls auf das komplementierte Gen zurückzuführen sein.

Neben der wiederhergestellten Antigenität konnte bei M12 (pTXVG) erneut eine Hämolyse auf Humanblutagar festgestellt werden. Gleichzeitig wiesen die Kolonien wieder die weißliche, leicht gewölbte Morphologie des Wildtyps auf. Diese Veränderung trat bei allen untersuchten Klonen von M12 (pTXVG) auf, so dass die zufällige Selektion einer spontanen Variante unwahrscheinlich ist.

Die Mutanten M12 (pTXR) und M12 (pTXJ) ergaben keinerlei Hinweise auf eine Rekonstitution der Wildtypeigenschaften. In M12 (pTXVG) hingegen konnte eine partielle Rekonstitution der Wildtypeigenschaften festgestellt werden. Die anhand der Immunfluoreszenz beurteilte Antigenität und die Koloniemorphologie entsprachen der von *S. epidermidis* 1457. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung konnte jedoch nicht wiederhergestellt werden.

Es ist zu vermuten, dass für den komplexen Vorgang der Biofilmbildung die Coexpression mindestens eines weiteren Gens notwendig ist. Andererseits ist das komplementierte Protein SpoVG wahrscheinlich 13 Aminosäuren länger als das native Gegenstück. Damit kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass eine Funktionsstörung verursacht wird. Erfahrungen mit Fusionsproteinen zeigen jedoch, dass eine Proteinverlängerung häufig keine Funktionsstörung bewirkt.

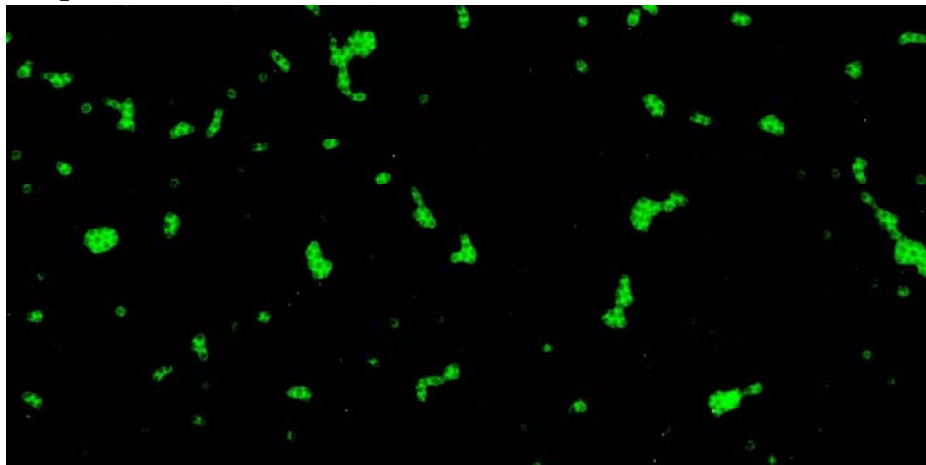
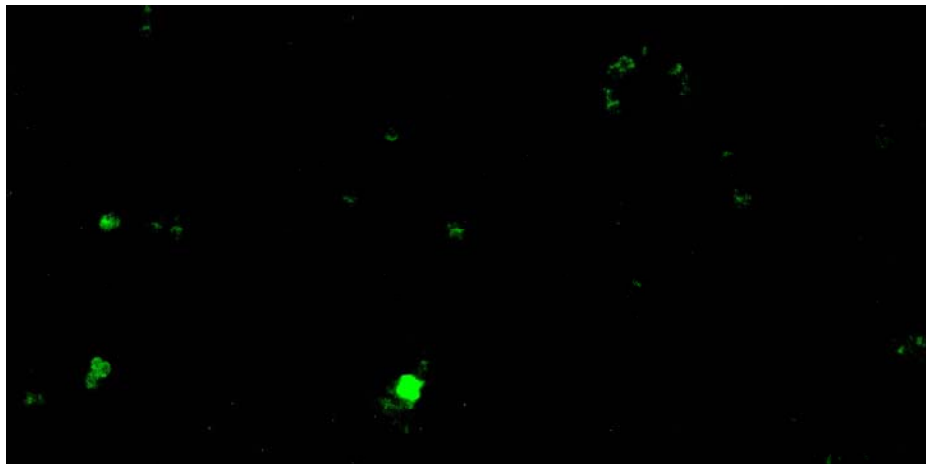
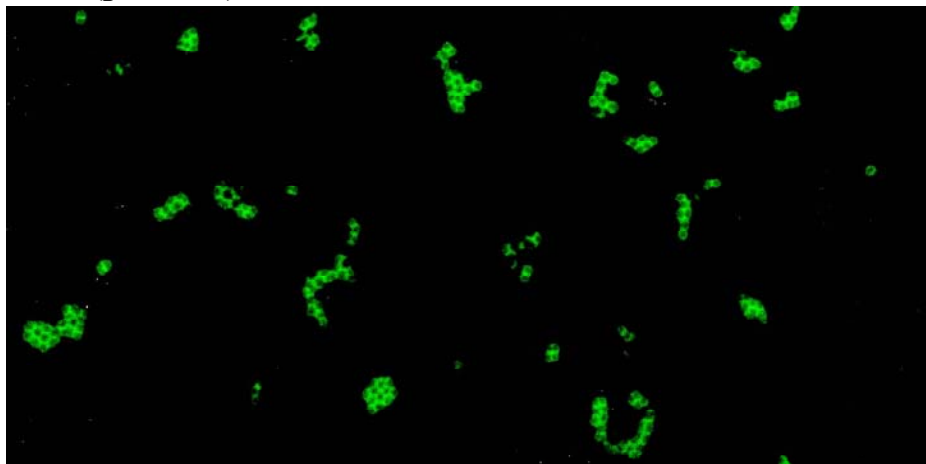
***S. epidermidis* 1457****M12****M12 (pTXVG)**

Bild 4.34: Immunfluoreszenztest von *S. epidermidis* 1457 (oben), M12 (Mitte) und M12 (pTXVG) (unten) durchgeführt mit Anti-Staphylokokken-Antiserum und FITC-gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper nach Wachstum unter Xylose-Induktion

4.5.2 Nachweis der Transkriptionsinduktion

Die Komplementierung und Induktion der Einzelgene *in trans* hatte nicht zu einer kompletten Wiederherstellung des ursprünglichen Phänotyps geführt. Es sollte daher gezeigt werden, dass dies nicht auf eine fehlende Transkription der komplementierten Gene zurückzuführen war.

Ein geeigneter Zeitpunkt zum Nachweis der Transkription eines Gens, das unter der Kontrolle des Xylose-induzierbaren Promotors steht, wurde mit Hilfe von M12 (pTXicaADBC) in der Northern-Hybridisierung bestimmt. Ein Vergleich einiger Induktionsstrategien ergab, dass ein Transkript des unter Xylose-Kontrolle stehenden *icaADBC* am besten 30 min nach Induktion einer Kultur der stationären Wachstumsphase mit 0,4 % Xylose nachgewiesen werden konnte (Bild 4.35). Als Positivkontrolle wurde *S. epidermidis* 1457 mitgeführt, bei dem, wie beschrieben (Mack *et al.*, 2000b), nur in der exponentiellen Wachstumsphase ein *icaADBC*-Transkript nachzuweisen war.

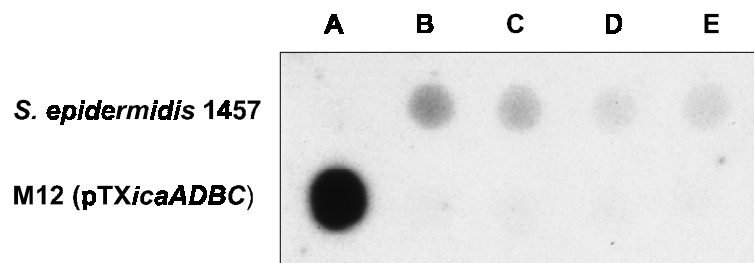


Bild 4.35: Nachweis der Transkription von *icaADBC* durch Northern-Hybridisierung mit Hilfe der radioaktiv markierten, *icaC*-spezifischen Sonde *icaC.as*. RNA aus *S. epidermidis* 1457 und M12 (pTXicaADBC) wurde 30 min nach Xyloseinduktion extrahiert und gleiche Mengen auf eine Nylonmembran geblottet. Die Kulturen befanden sich entweder in der stationären oder der exponentiellen Wachstumsphase und wurden mit verschiedenen Xylosekonzentrationen induziert. Kulturen A stationäre Phase; 0,4 % Xylose, B exponentielle Phase; 4 % Xylose, C exponentielle Phase, 4 % Xylose, D exponentielle Phase, ohne Xylose, E exponentielle Phase, Wachstum für sechs Stunden mit 0,4 % Xylose

Aufgrund dieser Beobachtung wurden für den Induktionsnachweis der neu konstruierten Plasmide pTXR, pTXJ und pTXVG Schüttelkulturen in stationärer Wachstumsphase geteilt und eine Hälfte mit 0,4 % Xylose versetzt. Nach einer weiteren halben Stunde Inkubation wurden alle Ansätze gleichzeitig geerntet und die RNA extrahiert. *S. epidermidis* 1457 wurde parallel mit M12 (pTXR), M12 (pTXJ), M12 (pTXVG), M12 (pTXicaADBC) und *S. carnosus* TM300 (pTXicaADBC) in einem umfassenden Vergleich bearbeitet.

Eine Hybridisierung mit einer *icaC*-spezifischen Sonde ergab, dass wie erwartet keine Transkripte des *ica*-Operons in *S. epidermidis* 1457 nachzuweisen waren (Bild 4.36). Auch die Stämme M12 (pTXR), M12 (pTXJ) und M12 (pTXVG) wiesen keine Transkripte auf. In den beiden mit dem *ica*-Operon komplementierten Stämmen M12 (pTXicaADBC) und *S. carnosus* TM300 (pTXicaADBC) waren hingegen *icaC*-Transkripte nachweisbar. Hierbei fiel auf, dass auch in den stationären Kulturen, die nicht mit Xylose versetzt worden waren, eine Hybridisierung stattfand. Die Schwärzung

des Films war in beiden Fällen deutlich geringer als im induzierten Zustand. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass durch einen niedrigen Xylosegehalt des komplexen Mediums TSB eine geringe Promotoraktivität möglich ist.

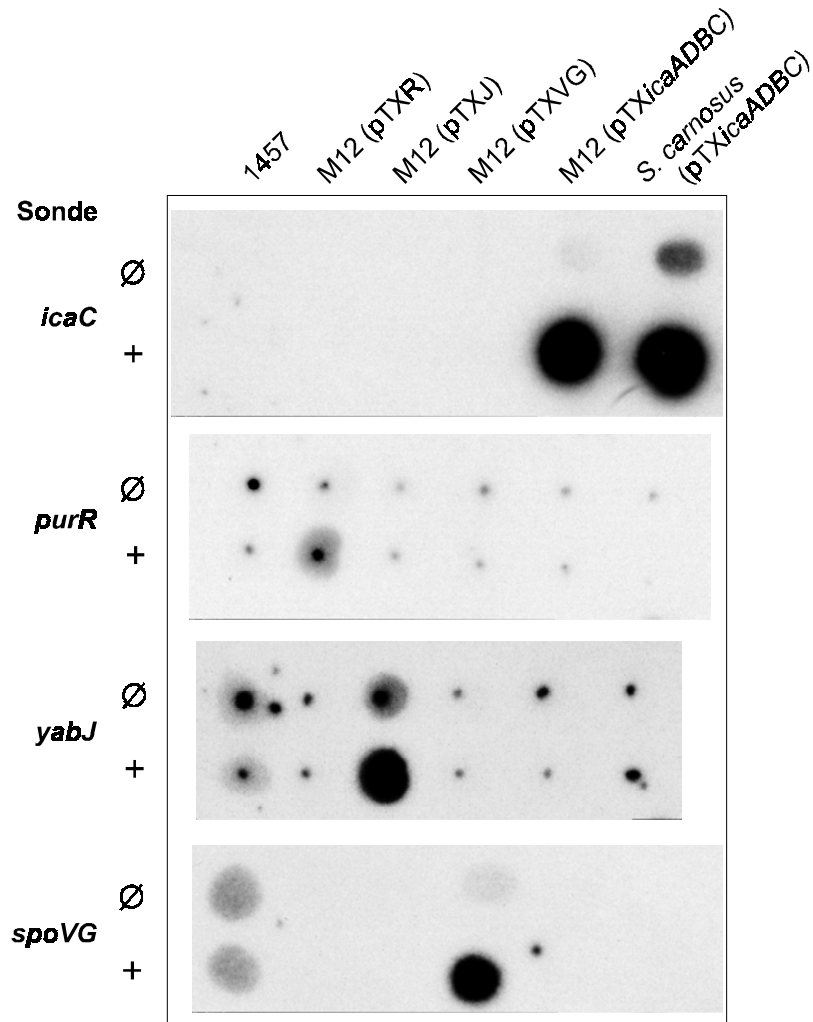


Bild 4.36: Nachweis der Transkription der in *trans*-komplementierten Gene unter Xyloseregulation in der Northern-Hybridisierung. Als Sonden wurden genspezifische, radioaktiv markierte Oligonukleotide verwendet. RNA wurde aus Zellen der stationären Wachstumsphase (Ø) ohne Induktion und (+) 30 min nach Induktion durch 0,4 % Xylose extrahiert. Es wurden gleiche Mengen auf eine Nylon-Membran geblottet. Die kleinen dunklen Punkte auf den mittleren beiden Filmen wurden durch Bleistiftmarkierungen der Auftragungspunkte hervorgerufen

Eine Induktion der Transkription konnte für alle drei konstruierten Plasmide nachgewiesen werden (Bild 4.36). Die Stämme M12 (pTXR), M12 (pTXJ) und M12 (pTXVG) wiesen alle nach Induktion ein Transkript des komplementierten Gens auf. In den nicht induzierten Kulturen waren ebenfalls geringe Mengen Transkript nachweisbar. Die Komplementierung und Induktion des *ica*-Operons hatte innerhalb des Induktionszeitraumes keinen stimulierenden Einfluss auf die Transkription von *purR*, *yabJ* oder *spoVG*. In keinem der drei neuen *in trans*-komplementierten Stämme ist eine Induktion des *icaADBC*-Genlocus mittels *icaC*-spezifischer Sonde nachzuweisen.

5 Diskussion

Die Adhäsionsfaktoren, die *S. epidermidis* die Besiedlung der menschlichen Haut und Schleimhäute ermöglichen, sind bislang kaum charakterisiert. In vielen Fällen erfolgen Fremdkörperinfektionen jedoch mit *S. epidermidis*-Stämmen aus der endogenen Hautflora des Patienten (Rupp und Archer, 1994). Ein verbessertes Verständnis der Adhäsionsmechanismen könnte daher zur Entwicklung von Methoden führen, die die Belastung mit Bakterien in stark besiedelten Arealen kurzzeitig bedeutend verringern. Denkbar wäre ein Einsatz zur Unterstützung der Hautdesinfektion, um damit das Infektionsrisiko weiter zu senken. Es wäre außerdem wünschenswert, Faktoren zu identifizieren, die ausschließlich eine Adhäsion an Polymere, nicht aber an Haut oder Schleimhäute vermitteln. Dann wäre eine gezielte Infektionsprophylaxe möglich, ohne die normale Hautflora, die einen natürlichen Schutz vor der Besiedlung mit weitaus pathogeneren Bakterien bietet, dauerhaft zu schädigen. Auch dazu ist ein besseres Verständnis der molekularen Adhäsionsmechanismen von *Staphylococcus epidermidis* notwendig.

5.1 Der Anheftungs-ELISA

Es konnte gezeigt werden, dass der Anheftungs-ELISA die Grundvoraussetzungen zur Untersuchung der primären Adhäsion von *S. epidermidis* erfüllt. Das Signal war abhängig von der eingesetzten Bakteriendichte und der Inkubationszeit der Bakterien in der Mikrotiterplatte (Kap. 4.1.1 und 4.1.2). Außerdem konnten Differenzen in der Adhäsion an Nunclon Δ und FKS-beschichteter Oberfläche nachgewiesen werden (Kap. 4.1.3). Die Methode war daher zur Bearbeitung weiterer Fragestellungen geeignet.

Der Anheftungs-ELISA verbindet gegenüber den bislang üblichen Verfahren wie dem Einsatz von radioaktiv markierten Bakterien (Muller *et al.*, 1991), einem elektronenmikroskopischen Nachweis (Peters *et al.*, 1982) oder der lichtmikroskopischen Beurteilung (van der Mei *et al.*, 1997) mehrere Vorteile. Neben der Vermeidung des Umganges mit radioaktiven Materialien, ist die Aufbereitung der Bakterien für die Verwendung im ELISA denkbar einfach. Die Durchführung der Methode in Mikrotiterplatten ermöglicht zudem die gleichzeitige Bearbeitung vieler Stämme und einen hohen Probendurchsatz. Damit ist die Möglichkeit gegeben, in einem *Screening* nach adhäsionsdefizienten Transposonmutanten zu suchen. Hierdurch können an der Adhäsion beteiligte Genorte identifiziert und weiter charakterisiert werden.

Da Puffer und Untersuchungszeitraum im Anheftungs-ELISA so gewählt waren, dass ein Wachstum der Bakterien während der Adhäsionsphase unwahrscheinlich ist, war eine Zuordnung der beobachteten Effekte zur primären Adhäsion möglich. Damit wird ein Problem umgangen, das nicht nur bei dem als Adhäsionstest beschriebenen und in

der Literatur auch weithin so bezeichneten Test von Christensen auftritt (Christensen *et al.*, 1985). Dieses Verfahren weist einen etablierten Biofilm nach Wachstum in einer Mikrotiterplatte durch Anfärben der Bakterien und anschließender Bestimmung der Absorption nach. Die lange Inkubationszeit dieses Tests lässt eine Differenzierung zwischen primärer Adhäsion und der akkumulativen Phase der Biofilmbildung nicht zu. Diese undifferenzierte Begriffsverwendung ist in der Literatur noch häufig zu finden (Peters *et al.*, 1982; Merritt *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1998; Arciola *et al.*, 1998) und erschwert zusätzlich zur Vielzahl der angewendeten Methoden Vergleich und Beurteilung der von verschiedenen Arbeitsgruppen erzielten Ergebnisse.

Ein weiterer positiver Aspekt des neuen Verfahrens ist die Möglichkeit zur Quantifizierung der adhärennten Staphylokokkenzellen (Kap. 4.1.5). Die dabei aufgestellten Gleichungen erlauben eine Abschätzung der adhärennten Zellzahlen im ELISA-Messbereich von 2×10^4 bis 6×10^5 Bakterien.

Der geschilderte Anheftungs-ELISA ist mit seinen vielfältigen Anwendungs- und Modifikationsmöglichkeiten mehr als nur ein weiterer Adhäsionstest. Aufgrund der großen Bandbreite kommerziell erhältlicher Mikrotiterplatten sind vergleichende Analysen an einer Vielzahl von Oberflächen möglich, die ihrerseits wiederum durch Beschichtung modifiziert werden können. So kann der Anheftungs-ELISA leicht für viele Fragestellungen adaptiert werden. Einige der geschilderten Möglichkeiten sind bereits im Verlauf der Arbeit verwendet worden und haben sich bewährt.

5.2 Anheftungs-ELISA: Anwendungen

5.2.1 Primäre Adhäsion von *S. epidermidis* an Nunclon Δ

Über den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Phase der primären Adhäsion von *S. epidermidis* an Polymeroberflächen ist bislang nichts bekannt. Für die PIA-Expression in der akkumulativen Phase ist im Gegensatz dazu der Einfluß externer Parameter bereits gezeigt. Die Expression des *ica*-Operons kann zum Beispiel durch hohe Salzkonzentrationen und andere externe Stressfaktoren induziert werden (Rachid *et al.*, 2000a; Knobloch *et al.*, 2001). Außerdem bewirkt Sauerstoffmangel eine erhöhte PIA-Produktion und verstärkt eine Akkumulation im Biofilm (Cramton *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an Nunclon Δ weitgehend unbeeinflusst von Faktoren wie dem Kulturmedium und den Kulturbedingungen abläuft. Der einzige Faktor, der zu einer Verminderung der ELISA-Signale führte, war der Zusatz von 4 % Natriumchlorid zum Wachstumsmedium (Kap. 4.2.4). Unter der Annahme, dass die Antigenität des Stammes unter allen Kulturbedingungen gleich blieb, wurde eine Verringerung der Adhäsion auf ein Drittel errechnet (Kap. 4.2.4). Vermutlich durch die erhöhte Osmolarität wird unter entsprechenden Bedingungen die Akkumulation von *S. epidermidis* 1457 im Biofilm

jedoch verstärkt (Knobloch *et al.*, 2001). Die Adhäsionsminderung ist folglich nicht stark genug, eine Biofilmbildung zu verhindern.

Für die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 war es unwesentlich, ob der Stamm in Schüttelkultur, in einem Biofilm oder in der Mikrotiterplatte gewachsen war (Kap. 4.1.6). Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen, die bei früheren Arbeiten mit dem gleichen Stamm an Polystyrolkugeln (Precision Plastic Balls Co., Chicago, Ill.) erzielt wurden (Riedewald, 2001). Hier adhärten Zellen, die aus einem Biofilm resuspendiert worden waren, schlechter als planktonisch gewachsene Zellen. Wahrscheinlich ist dies auf unterschiedliche Oberflächeneigenschaften der verwendeten Polymere zurückzuführen.

Die Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an Nunclon Δ blieb gleichermaßen unverändert, wenn verschiedene Medien wie TSB, TSB $\emptyset$ oder HHW zur Kultivierung verwendet wurden (Kap. 4.1.6). Auch die Wachstumsphase beeinflusste die Adhäsion nicht (Kap. 4.4.4). Diese Befunde lassen einen starken Einfluss von unspezifischen Faktoren wie der Oberflächenladung oder Hydrophobizität vermuten. Andererseits ist mit SSP-1 ein Oberflächenprotein bekannt, das über Fimbrien-ähnliche Strukturen die Adhäsion an Polystyrolkugeln (Sanbio, Uden, Niederlande) vermittelt (Timmerman *et al.*, 1991). Möglicherweise wird dieser oder ein ähnlicher Faktor auch von *S. epidermidis* 1457 exprimiert und ist konstitutiv vorhanden. Allerdings wurde die Funktion von SSP-1 bislang nur an der oben genannten Oberfläche untersucht und es ist unklar, ob das Protein auch an Nunclon Δ als primärer Adhäsionsfaktor dient. Auch das Autolysin AtlE wurde als Adhäsionsfaktor von *S. epidermidis* an Polystyrol-Petrischalen (Sarstedt) beschrieben (Heilmann *et al.*, 1997). Allerdings wird durch die Inaktivierung von *atlE* nicht nur die Adhäsion an dieser Oberfläche verringert, sondern gleichzeitig die relative Hydrophobizität des Stammes um etwa 30 % herabgesetzt (Heilmann *et al.*, 1996a). Da außerdem an der hydrophileren Glasoberfläche eine Adhäsion stattfinden kann, ist nicht auszuschließen, dass die Hydrophobizität von Bakterien- und Substratoberfläche eine wichtige Rolle spielt.

Beinahe alle synthetischen Polymere, die bisher untersucht wurden, können von *S. epidermidis* besiedelt werden (Götz und Peters, 2000). Dass die Oberflächenbeschaffenheit des Polymers ein wichtiger Faktor bei der primären Adhäsion ist und Polystyrol je nach Verarbeitung unterschiedliche Eigenschaften aufweist, wurde auch im Verlauf dieser Arbeit deutlich. Die für den Anheftungs-ELISA verwendete Nunclon Δ -Oberfläche, an die *S. epidermidis* offensichtlich gut adhärert, ist für die Zellkultur optimiert und durch Gamma-Strahlung sterilisiert. An unbestrahlten und nicht für die Zellkultur optimierten Mikrotiterplatten aus Polystyrol war dagegen keine Adhäsion nachweisbar (Kap. 4.2.3).

5.2.2 Primäre Adhäsion von *S. epidermidis* an Epithelzellen

Eine Studie mit verschiedenen grampositiven Mikroorganismen der normalen Hautflora zeigte, dass viele Faktoren die Adhäsion an humane Epithelzellen beeinflussen

(Romero-Steiner *et al.*, 1990). So wirkte die Gegenwart von Mannose, N-Acetyl-D-Glucosamin oder Fibronektin inhibierend auf die Adhäsion. Das lässt auf eine große Anzahl verschiedener Adhäsine und Rezeptoren für die unterschiedlichen Organismen schließen. Um den an diesem Vorgang beteiligten spezifischen Faktoren von *Staphylococcus epidermidis* auf die Spur zu kommen, wurde der Anheftungs-ELISA auf konfluente Zellrasen der Zelllinien RPMI 2650 und HaCaT adaptiert (Kap. 4.2.1). Es gelang so ein erster Schritt, den *in vivo* Bedingungen *in vitro* näher zu kommen.

Die Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an Zellkulturen war im Vergleich zur NunclonΔ-Oberfläche in auffälliger Weise vermindert. Es mussten 100-fach mehr Bakterien mit der Keratinozytenzelllinie HaCaT und der mukoiden, epithelialen Zelllinie RPMI 2650 inkubiert werden, um ein ELISA-Signal zu erhalten, das dem an NunclonΔ entsprach (Kap. 4.2.1). Diese Verringerung der Adhäsion konnte in ähnlicher Weise auch an der FKS-beschichteten Oberfläche beobachtet werden. Möglicherweise erfolgt die Adhäsion an Komponenten, die sowohl in Serum als auch auf der Zelloberfläche vorkommen können. In Frage käme dafür zum Beispiel Fibronektin, das von HaCaT-Zellen unter den hier verwendeten Kulturbedingungen an der Zelloberfläche exprimiert wird (Mempel *et al.*, 1998).

Die Anheftungskurve an HaCaT-Zellen verlief etwas flacher als an RPMI-Zellen, FKS-beschichteter Oberfläche oder NunclonΔ (Kap. 4.2.1). Dies könnte ein Hinweis auf eine Sättigung spezifischer Bindungsstellen sein. Die Ergebnisse an HaCaT-Zellen variierten jedoch zwischen den einzelnen Versuchstagen trotz strenger Einhaltung der experimentellen Parameter. Das lässt auf die Beteiligung von spezifischen Rezeptoren schließen, die in wechselnder Menge auf der Zelloberfläche der HaCaT-Zellen exprimiert sein können.

Für die nahe verwandte Spezies *Staphylococcus aureus* sind in den letzten Jahren einige spezifische Adhäsionsfaktoren beschrieben worden. So sind Teichonsäuren funktionell an der Adhäsion an HeLa-Zellen beteiligt (Matsuura *et al.*, 1996). Für weitere Faktoren, das Staphylokokkenprotein A, den *Clumpingfactor*, Koagulase und die fibronektinbindenden Proteine FnBPA und FnBPB wurde eine Beteiligung an der Adhäsion von *S. aureus* an HaCaT-Zellen nachgewiesen (Mempel *et al.*, 1998). Außerdem ist *S. aureus* in der Lage an weitere Wirtsfaktoren wie Laminin, Vitronektin oder Collagen zu adhären (Foster und Höök M., 2000).

Bei *S. epidermidis* können funktionell gleichartige Faktoren erwartet werden. Der Anheftungs-ELISA wurde daher exemplarisch an 380 Klonen aus einer Transposon-mutagenese für ein *Screening* nach adhäsionsveränderten Mutanten an RPMI- und HaCaT-Zellen eingesetzt (Kap. 4.2.1). Die Versuche liefen zufriedenstellend, auch wenn durch die Vorbereitung der Zellkulturen das Verfahren etwas aufwendiger ist als an nativen Mikrotiterplatten. Die erzielten Absorptionen waren reproduzierbar, so dass die Eignung der Methode zur Bearbeitung dieser Fragestellung gezeigt werden konnte und eine Fortführung des *Screenings* in Angriff genommen werden soll.

5.2.3 Primäre Adhäsion an Serumproteine

Da Polymeroberflächen im menschlichen Körper schnell von einem konditionierenden Film aus verschiedensten Molekülen überzogen werden, ist es für das Verständnis der Pathogenese von fremdkörperassoziierten Infektionen wichtig, die bakterielle Adhäsion auch an konditionierten Polymeren zu betrachten.

Es konnte gezeigt werden, dass *S. epidermidis* 1457 in der Lage ist, an Fibronectin zu binden (Kap. 4.2.3). An Fibrinogen hingegen konnte keine Adhäsion nachgewiesen werden. Diese Tendenz wurde auch in einer Studie mit 22 *S. epidermidis*-Stämmen beobachtet (Herrmann *et al.*, 1988). Hier führte die Beschichtung von Polymethylmethacrylat (PMMA) mit Fibronectin immer zu einer verstärkten Adhäsion gegenüber einer Kontrolle mit humanem Serumalbumin. Die Adhäsion an eine fibrinogenbeschichtete Oberfläche variierte zwischen den Stämmen allerdings sehr stark. Die Adhäsion von *S. epidermidis* RP12 an PMMA wurde in ähnlicher Weise wie die von *S. epidermidis* 1457 an Polystyrol durch Beschichtung mit Fibronectin gefördert (Vaudaux *et al.*, 1989). Fibrinogen hingegen hatte auch in dieser Studie keinen adhäsionssteigernden Effekt. Vermutlich verfügt *S. epidermidis* 1457 unter den gewählten Bedingungen nicht über das Fibrinogenbindende Protein Fbe, so dass ebenso wie bei vielen klinischen Isolaten keine Adhäsion an Fibrinogen stattfindet (Nilsson *et al.*, 1998; Carballo *et al.*, 1991). *S. epidermidis* 1457 verfügt aber offensichtlich wie *S. aureus* (Foster und Höök M., 2000) über einen Fibronectinrezeptor. Mit der etablierten Transposonmutantenbank und dem Anheftungs-ELISA stehen die Mittel für eine gezielte Suche nach diesem Rezeptor zur Verfügung.

Die PIA-negative Mutante 1457-M10 unterschied sich in ihrer Adhäsion an Fibronectin und Fibrinogen nicht von *S. epidermidis* 1457 (Kap. 4.2.3). Dies galt ebenso an der Nunclon Δ -Oberfläche (Kap. 4.2.2) und an Polystyrol (Greiner, unbestrahlt, Kap. 4.2.3). Da sich die beiden isogenen Stämme somit nicht in ihren Adhäsionseigenschaften unterschieden, war die geringere Pathogenität der Mutante sowohl in einem Katheterinfektionsmodell in Mäusen (Rupp *et al.*, 1999a) als auch in einem Infektionsmodell in Ratten (Rupp *et al.*, 1999b) nicht auf mangelnde Adhäsion von 1457-M10 zurückzuführen. Die verringerte Pathogenität der Mutante war demnach eine Folge fehlender PIA-Expression. Damit konnte in einem Vergleich zweier isogener Stämme die durch PIA vermittelte Akkumulation in einem Biofilm als Pathogenitätsfaktor belegt werden.

Es zeigte sich, dass die Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an Fibronectin, die mit dem Anheftungs-ELISA detektiert werden konnte, gut mit der Ausbildung eines Biofilms an dieser Oberfläche korrelierte (Kap. 4.2.3). Eine Adhäsion von *S. epidermidis* an Fibronectin *in vivo* könnte demnach ausreichen, um einen Biofilm auf einer konditionierten Polymeroberfläche zu verankern. Die Beobachtung, dass der PIA-positive Wildtyp im Gegensatz zur PIA-negativen Mutante in der Lage ist, einen Biofilm an fibronectinbeschichteter Oberfläche zu bilden (Kap. 4.2.3), ist ein weiterer Beleg für die Zwei-Phasen-Hypothese der Entstehung von Biofilmen. Erst erfolgt eine primäre Adhäsion an den Liganden Fibronectin, die bei beiden Stämmen identisch ist. Darauf folgt eine PIA-

abhängige Akkumulation in einem Biofilm, was zu einem Nachweis des Biofilms nur beim Wildtyp führt. Dass diese beiden Phasen bei fremdkörperassoziierten Infektionen gleichermaßen notwendig sind und zur Pathogenität beitragen, konnte kürzlich auch in einem Katheterinfektionsmodell in Ratten demonstriert werden (Rupp *et al.*, 2001). Die adhäsionsdefiziente *atlE* Transposonmutante und eine PIA-negative Transposonmutante von *S. epidermidis* O-47 riefen bei den Ratten weniger häufig Infektionen eines zentralen Venenkatheters hervor als der Wildtyp.

5.2.4 Wirkt PIA als primärer Adhäsionsfaktor?

Das kapsuläre Polysaccharid/Adhäsine PS/A, dessen Synthesegene wie die von PIA ebenfalls im *ica*-Operon liegen (McKenney *et al.*, 1998), unterstützt die primäre Adhäsion an Silikonkatheter (Muller *et al.*, 1993a; Muller *et al.*, 1993b; McKenzie *et al.*, 1998). Dass diese Funktionalität von der Oberfläche abhängig ist, zeigt sich darin, dass PS/A an Polyethylen ebenso wenig als primärer Adhäsionsfaktor fungiert wie an Polystyrol nach einer Konditionierung der Polymeroberfläche mit thrombozytenarmem Plasma (Higashi *et al.*, 1998). An einer Titanoberfläche konnte schließlich diesbezüglich kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden (König *et al.*, 1998).

Aufgrund dieser funktionellen Variabilität von PS/A und seiner großen Ähnlichkeit mit PIA stellte sich die Frage, ob PIA ein primärer Adhäsionsfaktor von *S. epidermidis* ist. Dies konnte für die Nunclon Δ -Oberfläche gleich in mehrfacher Hinsicht ausgeschlossen werden. Zum einen unterschieden sich Biofilm-negative Transposonmutanten der Klasse I, die kein PIA produzieren (Mack *et al.*, 2000b), im Anheftungs-ELISA nicht von ihrem Wildtyp *S. epidermidis* 1457 (Kap. 4.2.2). Zum anderen konnte in Übereinstimmung mit dieser Beobachtung auch zwischen *S. epidermidis* 8400 und seiner PIA-negativen Mutante 8400-M10 kein Unterschied festgestellt werden (Kap. 4.2.2). Gleiches galt für die Mutante M7 und ihren Wildtyp RP62A. M7 ist eine durch Mytomyacin C-Mutagenese erzeugte Mutante von RP62A, die PIA bildet (de Grahl, unveröffentlichte Daten), aber nicht in der Lage ist, dieses an der Zelloberfläche zu binden (de Grahl; Baldassarri, 1996). Damit konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass PIA an Nunclon Δ keine adhäsive Funktion besitzt.

Ein Vergleich von *S. epidermidis* 1457 und seiner PIA-negativen Mutante 1457-M10 zeigte dann weiterhin, dass PIA auch an Fibronektin keine adhäsive Funktion besitzt (Kap. 4.2.3). Da keine Adhäsion an Fibrinogen erfolgte, ist eine funktionelle Beteiligung von PIA an der primären Adhäsion an *in vivo* konditionierten Oberflächen unwahrscheinlich. Möglicherweise übernimmt PIA jedoch an anderen nativen Oberflächen eine adhäsive Rolle. Dies könnte durch elektrostatische Wechselwirkungen aufgrund der positiven Ladungen von Polysaccharid I und der positiven wie negativen Ladungen von Polysaccharid II verursacht werden (Mack *et al.*, 1996a).

5.3 Die Biofilm-negative Transposonmutante M12

Die Transposonmutante M12 von *S. epidermidis* 1457 fiel durch ein stark vermindertes Signal gegenüber dem Wildtyp im Anheftungs-ELISA auf. Da diese Mutante bereits als Biofilm-negativ charakterisiert war und bekannt war, dass die Transposoninsertion nicht im *ica*-Operon liegt (Mack *et al.*, 2000b), war sie somit doppelt interessant. Die Mutante wurde im weiteren Verlauf phänotypisch charakterisiert sowie die betroffene chromosomale DNA-Region kloniert und sequenziert. Zudem wurden Transkriptionsanalysen durchgeführt und drei der betroffenen Gene *in trans* komplementiert.

5.3.1 Genetische Analyse

Die Sequenzierung des durch Tn917-Insertion veränderten Genabschnitts von M12 führte zur Entdeckung eines neuen, an der Biofilmbildung beteiligten Genortes, der vermutlich eine regulative Funktion besitzt. Es zeigten sich vier offene Leserahmen, die in Anlehnung an homologe Gene mit bekannter Funktion in *B. subtilis* mit *purR*, *yabJ*, *spoVG* und *gcaD* bezeichnet wurden (Kap. 4.3.2). Transkriptionsuntersuchungen ergaben, dass *purR*, *yabJ* und *spoVG* in der Mutante M12 nicht transkribiert werden (Kap. 4.3.3). Wahrscheinlich ist noch ein weiteres, vor der sequenzierten Region liegendes Gen betroffen, das Ähnlichkeit zu dem Gen unbekannter Funktion *yabH* aufweist. Die sequenzierten Gene sind in ihrer Reihenfolge konserviert. In *S. aureus* Mu50 finden sich die vier Gene in der selben Abfolge wie in *B. subtilis* und *S. epidermidis*.

Transkription

Im Gegensatz zu *B. subtilis* zeigen die Transkriptionsanalysen an *S. epidermidis* 1457, dass nicht *purR* und *yabJ*, sondern *yabJ* und *spoVG* eine transkriptionelle Einheit bilden (Weng *et al.*, 1995; Kap. 4.3.3). Das etwa 0,95 kb große Transkript der beiden Gene ist in großen Mengen vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase, in geringeren Mengen aber auch in der stationären Phase nachweisbar. Gleichzeitig existiert ein Transkript, das wie bei *B. subtilis* sowohl *purR* als auch *yabJ* umfasst. Dieses ist mit etwa 2,6 kb Länge allerdings so groß, dass noch weitere Gene darin enthalten sein müssen. Es konnte gezeigt werden, dass das große Transkript mindestens die drei Gene *purR*, *yabJ* und *spoVG* einschließt. Diese drei Gene sind gemeinsam aber nur 1,6 kb lang, was die Vermutung nahe legt, dass ein weiteres Gen mit eingeschlossen ist. Da auf *spoVG* eine nicht-kodierende Region von 600 bp folgt und dann ein Gen von 1.3 kb Länge, beginnt die Transkription vermutlich etwa 1000 Basen vor *purR*.

Eine kürzlich vorgenommene Datenbankrecherche (*TIGR unfinished Genomes*, Stand Mai 2001) ergab ein *S. epidermidis*-Segment, das auch die chromosomale Region vor den hier sequenzierten Genen beinhaltet. Es ist anzunehmen, dass sich die dort veröffentlichte Sequenz, die bis auf vereinzelte Basenaustausche mit der hier ermittelten übereinstimmt, auch im gesuchten Bereich nicht wesentlich unterscheidet. Es kann hier ein weiterer offener Leserahmen gefunden werden, der auch in *B. subtilis* (*yabH*) und

S. aureus in der Genfolge vorhanden ist. Dieser offene Leserahmen ist 846 bp lang und endet 17 Nukleotide vor *purR*. Ein Transkript, das mit diesem Gen beginnt und mit *spoVG* endet, wäre mindestens 2455 bp lang. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem 2,6 kb langen Transkript, das mit spezifischen Sonden für *purR*, *yabJ* und *spoVG* in *S. epidermidis* 1457 nachgewiesen werden kann (Kap. 4.3.3), um das eines vier Gene umfassenden Operons handelt (Bild 5.1). Weder für das homologe Gen in *B. subtilis*, *yabH*, noch für das homologe Gen in *S. aureus* ist bislang eine Funktion oder ein zugehöriges Protein beschrieben worden. Die Zuordnung der in *S. epidermidis* 1457 identifizierten Transkriptgrößen und die beiden daraus abgeleiteten Operons sind in Bild 5.1 dargestellt.

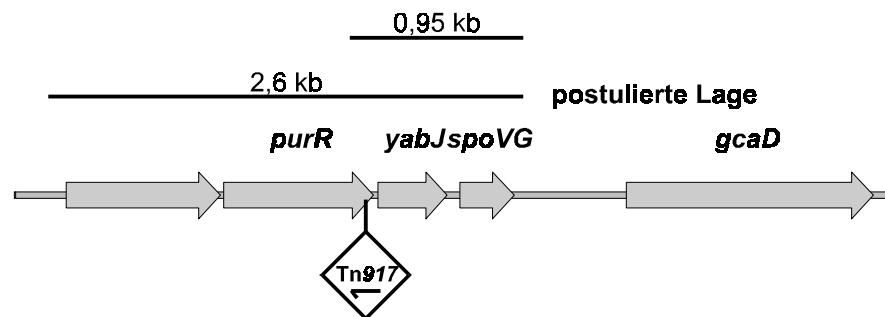


Bild 5.1: Schematische Darstellung der in M12 durch die Tn917-Insertion inaktivierten, chromosomalen Region in *S. epidermidis* 1457. Eingezeichnet sind die beiden identifizierten Transkripte und ihre Lage. Die Sequenz wurde nach einer Homologiesuche in der TIGR-Datenbank (unfinished Genomes) um einen vorgelagerten offenen Leserahmen ergänzt

Das vermutlich vier Gene umfassende Transkript ist in geringen Mengen in der exponentiellen Wachstumsphase nachzuweisen. In Bakterien der stationären Phase kann es nicht gefunden werden. Das kleinere *yabJ* und *spoVG* einschließende Transkript ist ebenfalls in der exponentiellen Wachstumsphase vorhanden, aber in viel größeren Mengen.

In *B. subtilis* bilden die an der Regulation der Purinsynthese beteiligten Gene *purR* und *yabJ* vermutlich ein Operon, das von einem σ^A -abhängigen Promotor 33 bp vom *purR* Translationsstart entfernt, transkribiert wird (Weng *et al.*, 1995). Durch ein putatives faktorunabhängiges Transkriptionsterminationsmotiv, das sich etwa 30 Basen nach dem *yabJ* Translationsstopp befindet, entsteht wahrscheinlich ein bicistronisches Operon. PurR bindet an Kontrollregionen von vier verschiedenen Operons, *pur*, *purA*, *purR* und *pyr* (Shin *et al.*, 1997; Weng *et al.*, 1995). Ein GAAC-N₂₄-GTTC-Motiv ist in allen vier Operons konserviert aber nicht ausreichend für eine Protein-DNA-Interaktion (Shin *et al.*, 1997). Dieses Motiv konnte weder im sequenzierten Genomabschnitt von *S. epidermidis* 1457 noch im *ica*-Operon (Accession No. U43366) gefunden werden, was gegen eine direkte Interaktion zwischen *ica*-Operon und PurR spricht.

purR

Das aus der Sequenz von *S. epidermidis* 1457 abgeleitete Protein PurR ist dem negativen Regulator der Purinsynthese von *B. subtilis* (Ebbole und Zalkin, 1989)

ähnlich. Wie dieser weist es eine Domäne auf, die Ähnlichkeit mit Phosphoribosyltransferasen besitzt (Weng *et al.*, 1995). Innerhalb dieses Bereichs befindet sich eine putative Bindungsstelle für Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP), die in ihrer Position der im homologen *Bacillus*-Gen entspricht. Diese PRPP-Bindungsstelle war schon bei einer ersten Ansequenzierung des chromosomalen Bereichs, der die Tn917-Insertionsstelle flankiert, postuliert worden (Knobloch, 1999). Möglicherweise ist PurR auch in *S. epidermidis* ein DNA-Bindeprotein, bei dem eine Protein-DNA Interaktion durch die Bindung von PRPP an PurR verhindert wird, wie es bei *B. subtilis* der Fall ist (Weng und Zalkin, 2000). Liegt das Repressorprotein frei, also ohne gebundenes PRPP vor, kann es dort an die Kontrollregion vor dem *purEKBCSQLFMNHD*-Operon binden. Diese überlappt die -35 Region des einzigen Promotors und inhibiert so die Transkription der Gene aller für die *de novo*-Synthese von Inosinmonophosphat (IMP) notwendigen Enzyme (Shin *et al.*, 1997). Bei niedrigem PRPP-Spiegel wird also die Purinsynthese inhibiert. Der PRPP-Spiegel wird zum einen durch den Verbrauch bei der Umwandlung von Adenin in Adeninnukleotide gesenkt. Zum anderen wird durch dabei entstehendes ADP die Neusynthese von PRPP durch allosterische Hemmung der PRPP-Synthetase herabgesetzt (Weng *et al.*, 1995). Niedrige PRPP-Konzentrationen spiegeln so vermutlich eine hohe intrazelluläre Verfügbarkeit von Purinkomponenten wider.

In *Lactococcus lactis* dient PurR im Gegensatz zu dem sehr ähnlichen Protein in *B. subtilis* (80 % Homologie bei 51 % identischen Aminosäuren) nicht als negativer, sondern vielmehr als positiver Regulator der Purinsynthese (Kilstrup und Martinussen, 1998; Kilstrup *et al.*, 1998). Der Aktivator enthält gleichfalls die Phosphoribosyltransferase-ähnliche Domäne und eine gleichplatzierte PRPP-Bindestelle (Kilstrup und Martinussen, 1998). Vermutlich bindet das Aktivatorprotein permanent an die DNA und eine PRPP-Bindung bewirkt eine Konformationsänderung von PurR, die eine Interaktion des Regulatorproteins mit der RNA-Polymerase erlaubt. Folge ist dann eine erhöhte Transkriptionsaktivität (Kilstrup und Martinussen, 1998). Das zentrale GAAC-Motiv der für die Bindung des Aktivatorproteins notwendigen PurBox-Sequenz (AWWWCCGAACWWT) (Kilstrup *et al.*, 1998) entspricht dem führenden Motiv der für die Repressorbindung notwendigen GAAC-N24-GTTC-Sequenz (Shin *et al.*, 1997). Ein Vergleich des abgeleiteten Proteins von *S. epidermidis* mit diesem Aktivatorprotein ergab eine Homologie von etwa 65 % (44 % identische Aminosäuren) und lag damit um ca. 5 % niedriger als bei dem Repressorprotein. Die drei Proteine aus *B. subtilis*, *L. lactis* und *S. epidermidis* besitzen insgesamt also eine große Ähnlichkeit. Da die beiden in ihrer Funktion gut untersuchten PurR-Proteine von ihrem Wirkmechanismus als DNA-Bindeproteine mit verwandter Erkennungssequenz ähnlich sind, aber in ihrer Funktion entgegengesetzt, kann noch keine Voraussage über die Funktion von PurR in *S. epidermidis* getroffen werden.

Die Frage, ob PurR in *S. epidermidis* als Aktivator oder als Repressor fungiert, kann möglicherweise anhand von Transkriptionsanalysen des *pur*-Operons geklärt werden. Eine Transduktion des zur Komplementierung von *purR* verwendeten Plasmids pTXR in den Wildtyp ist mit Hilfe des *S. epidermidis*-Phagen 71 möglich (Nedelmann *et al.*,

1998; Mack *et al.*, 2001). Die Induktion des zusätzlichen *purR*-Gens durch Xylose bei gleichzeitiger Beobachtung der Transkription des *pur*-Operons sollte gute Hinweise auf die Funktion des Proteins in *S. epidermidis* ergeben. An der Aufklärung dieser interessanten Frage soll zukünftig gearbeitet werden.

yabJ

Für die Adenin-abhängige Repression des *pur*-Operons in *B. subtilis* ist zusätzlich das an *purR* anschließende Gen *yabJ* notwendig (Weng und Zalkin, 2000). An einer Transkriptionstermination, die bei hohen Guaninkonzentrationen erfolgt, sind die beiden Gene hingegen nicht beteiligt. Das Protein YabJ ist außerdem notwendig für die Regulation von *purA* durch PurR (Rappu *et al.*, 1999; Weng und Zalkin, 2000). Im Gegensatz zum Mechanismus der Regulation ist die Struktur von YabJ aufgeklärt (Sinha *et al.*, 1999). Das säurelösliche 14 kDa-Protein besitzt eine trimerische Organisation und einen inneren wassergefüllten Hohlraum. In einer tiefen, engen Spalte zwischen den Untereinheiten konnte in der Kristallstrukturanalyse eine stark konservierte Region von neun Aminosäureresten gefunden werden. Die Region ist zwischen den 25 ähnlichsten Homologen einer 38 Mitglieder umfassenden Proteinfamilie unverändert vorhanden und bildet möglicherweise eine Bindungsstelle für einen Liganden oder ein Substrat, das den Mitgliedern dieser Proteinfamilie gemeinsam ist (Sinha *et al.*, 1999). Allerdings konnte noch keinem dieser Proteine ein definierter biochemischer Wirkmechanismus zugeordnet werden.

spoVG

Neben den beiden in M12 inaktivierten, vermutlich regulativen Genen *purR* und *yabJ* handelt es sich bei *spoVG* möglicherweise ebenfalls um einen regulativen Faktor. Das homologe Gen in *B. subtilis* dient anscheinend als negativer Regulator der Sporulation (Matsuno und Sonenshein, 1999). In *B. subtilis* wird *spoVG* in der exponentiellen Phase transkribiert, beim Eintritt in die stationäre Phase findet jedoch noch einmal eine substantielle Induktion statt (Matsuno und Sonenshein, 1999). In *S. epidermidis* konnte ebenfalls in beiden Wachstumsphasen ein Transkript nachgewiesen werden. Allerdings lagen hier größere Mengen des Transkripts in Zellen der exponentiellen Wachstumsphase vor. Eine Interaktion des DNA-Bindeproteins AbrB und einer A+T-reichen *upstream activating sequence* (UAS) vor dem σ^H -Promotor von *spoVG* reguliert in *B. subtilis* die Transkriptionsstärke (Robertson *et al.*, 1989; Frisby und Zuber, 1991). Eine A+T-reiche Region, die als UAS fungieren könnte, ist in *S. epidermidis* 1457 nicht zu finden. Möglicherweise verfügt *spoVG* hier nicht über einen eigenen Promotor, der durch eine solche Sequenz aktiviert werden könnte, sondern bildet immer mit dem vorgelagerten *yabJ* ein Operon. Diese Theorie wird unterstützt durch die Tatsache, dass in *S. epidermidis* 1457 kein Einzeltranskript von *spoVG* nachweisbar war.

Komplementierung der Mutante M12

Die genetische Manipulation von *S. epidermidis*-Stämmen ist in der Regel problematisch, da sich besonders Biofilm-positive Stämme selten für eine Protoplastentransfor-

mation eignen. Nur wenige Stämme konnten bislang mit dieser Methode manipuliert werden (Heilmann *et al.*, 1996a; Grüter und Laufs, 1991; Grüter *et al.*, 1993). Auch eine Elektroporation konnte bislang nur bei wenigen Stämmen erfolgreich durchgeführt werden (Augustin und Götz, 1990). Die hohe Saccharosekonzentration im Protoplastierungsmedium führt vermutlich zu einer so starken Induktion der PIA-Bildung, dass die Zellen aggregieren und keine Protoplasten zu gewinnen sind (Mack unveröffentlicht). Daher waren mehrere Schritte notwendig, um eine Komplementation von *S. epidermidis* 1457 Transposonmutanten mit einem intakten *icaADBC*-Operon *in trans* zu erreichen. Zunächst wurde der Donorstamm *S. carnosus* TM300 (pTXicaADBC) durch Konjugation mit *S. aureus* WBG4883 mit dem mobilisierenden Plasmid pWBG636 versehen. Da ein direkter konjugativer Transfer von pTXicaADBC in *S. epidermidis* 1457 nicht gelang, wurde das Plasmid stattdessen in *Staphylococcus epidermidis* 9142 transferiert. Anschließend diente dieser Stamm als Donor für eine mit Phage 48 durchgeführte Transduktion von pTXicaADBC in *S. epidermidis* 1457. Durch eine Transduktion mit Phage 71 wurde das Plasmid dann in die Transposonmutanten der Klassen I bis IV geschleust (Mack *et al.*, 2000b).

Mit der erfolgreichen Protoplastentransformation von M12 (Kap. 4.5) konnte der Weg zur genetischen Manipulation von *S. epidermidis* 1457 wesentlich verkürzt werden. Zwar ist die Effizienz geringer als bei einer Transformation von *S. carnosus*, aber durch den Wegfall von zwei Konjugationsschritten und einer Phagentransduktion steht ein erheblich besser geeignetes System für die *in trans*-Komplementation zur Verfügung. Da eine Transduktion von Plasmiden aus diesem Stamm mit Hilfe der Phagen 71 oder 48 in andere Transposonmutanten, den Wildtyp oder andere *S. epidermidis*-Stämme möglich ist, ist zukünftig auch die gezielte Inaktivierung von Genen über allelen Genaustausch in dem gut charakterisierten Stamm *S. epidermidis* 1457 möglich.

Für die Eignung von M12 für eine Protoplastentransformation gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Möglicherweise reicht die Inaktivierung des *ica*-Operons aus, eine Aggregation der Zellen zu verhindern und die Lyse der Zellwand durch Lysostaphin zu gewährleisten. Dann müssten sich auch andere Biofilm-negative Transposonmutanten von *S. epidermidis* 1457 auf diese Weise transformieren lassen. Andererseits konnte klar gezeigt werden, dass M12 wichtige Oberflächenantigene fehlen, so dass ein Grund für die effizientere Protoplastierung in der veränderten Zelloberfläche liegen könnte. Alternativ ist weiterhin eine Inaktivierung der Restriktionsmechanismen für Fremd-DNA als ein zusätzlicher Effekt der Transposoninsertion in einem regulativen Genort in M12 denkbar.

Es wurde in M12 eine separate Komplementation der drei durch die Transposoninsertion inaktivierten Gene *purR*, *yabJ* und *spoVG* unter Kontrolle eines durch Xylose induzierbaren Promotors vorgenommen (Kap. 4.5). Obwohl *spoVG* im Wildtyp nicht als singuläres Transkript nachgewiesen werden konnte, reichte eine Komplementation dieses Gens *in trans* für eine partielle Rekonstitution der Wildtypeigenschaften in M12. So war als auffälligste Eigenschaft die Reaktivität mit dem Antiserum nicht mehr von

der des Wildtyps zu unterscheiden (Kap. 4.5.1). Möglicherweise stellt SpoVG selbst ein Oberflächenprotein dar oder es reguliert die Expression anderer wesentlicher Oberflächenantigene. Schon eine schwache Induktion des komplementierten Gens durch TSB reichte aus, diesen Wechsel zu bewirken. Auch ist der komplementierte Stamm zur Hämolyse fähig und entspricht in der Pigmentierung dem Wildtyp. Da mehrere unabhängige Faktoren rekonstituiert sind, ist eine regulative Funktion von SpoVG wahrscheinlich. Mit der gleichzeitigen Inaktivierung von *spoVG* und *yabJ* sowie *purR* liegt eindeutig eine Mehrfachmutante vor. Auch in *B. subtilis* war ein starker Effekt bei einer *spo0IIBspoVG* Doppelmutante beobachtet worden (Margolis *et al.*, 1993). In dieser Mutante wird die Sporulation in Phase II bei der Ausbildung des polaren Septums blockiert. *spoVG*-Nullmutanten unterscheiden sich hingegen kaum von *B. subtilis* Wildtypzellen (Margolis *et al.*, 1993; Resnekov *et al.*, 1995).

Durch Komplementierung mit *spoVG* aus *S. epidermidis* 1457 konnten einige der Wildtypeigenschaften wiederhergestellt werden. So entsprachen sowohl die Antigenpräsentation als auch Koloniemorphologie und Hämolyseverhalten von M12 (pTXVG) wieder denen des Wildtyps. Die Biofilmbildung hingegen ließ sich nicht rekonstruieren. Dies bestätigt die Vermutung, dass es sich um PIA-unabhängige Faktoren handelt.

Auch eine Komplementierung der Mutante mit *purR* oder *yabJ* hatte keine Wiederherstellung des Biofilm-positiven Phänotyps zur Folge. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Gene *in trans* durch Xylose induziert wurden. Damit ist ausgeschlossen, dass der negative Befund auf ein defektes Plasmidsystem zurückzuführen ist.

Die Transkription des *ica*-Operons wurde durch keines der drei *in trans* exprimierten Gene induziert, was mit dem weiterhin Biofilm-negativen Phänotyp korreliert. Eine multifaktorielle Regulation erscheint hier notwendig. Voraussichtlich wird eine Rekonstitution der Biofilmbildung nur durch eine Komplementierung mit einer der Genkombinationen, die den Transkriptionseinheiten entsprechen, erreicht werden können. Dieser interessanten Fragestellung wird zukünftig in unserer Arbeitsgruppe nachgegangen.

Insgesamt wurden drei Gene, die starke Homologien zu regulativen Elementen in *B. subtilis* oder *L. lactis* aufweisen, bei der Biofilm-negativen Transposonmutante M12 inaktiviert. Damit ist die Beteiligung eines zweiten regulativen Faktors neben *rsbU* an der Regulation des *icaADBC*-Operons äußerst wahrscheinlich und es wird deutlich, dass die Synthese des Polysaccharids PIA, das nachweislich ein Virulenzfaktor von *S. epidermidis* ist, einer komplexen Regulation unterliegt.

5.3.2 Ist M12 eine adhäsionsdefiziente Mutante?

Die Mutante M12 war in zweierlei Hinsicht aufgefallen, durch einen Biofilm-negativen Phänotyp und geringe Signale im Adhäsions-ELISA. Sie sollte daher weitergehend charakterisiert werden. Außerdem war die dringende Frage zu klären, ob es sich tatsächlich um die vermutete, gesuchte adhäsionsdefiziente Mutante handelt.

Bei Wachstum auf Humanblutagar konnten zwei Veränderungen gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden. Die Kolonien der Mutante M12 wiesen eine gräuliche Färbung auf, die eventuell durch fehlende Pigmente hervorgerufen wird und mit flacheren Kolonien einhergeht. Zudem konnte eine fehlende Hämolyse von M12 (Kap. 4.4.1) beobachtet werden. Das erste Phänomen wurde bereits von Mack beschrieben (Mack *et al.*, 2000b) und ist bislang nur bei M12 und M15 bzw. M19, den Klasse III Mutanten, beobachtet worden. Da die Biofilm-negativen Mutanten der Klasse I mit einer Tn917-Insertion im *ica*-Operon keine veränderte Pigmentierung aufweisen, scheint die Pigmentbildung nicht direkt mit der PIA-Synthese gekoppelt zu sein. Gleiches gilt für den Verlust des Hämolsins, da die Klasse I Mutanten das gleiche Hämolyseverhalten zeigen wie der Wildtyp (ohne Bild). Die Veränderung mehrerer unabhängiger Eigenschaften weist auf den Defekt eines regulativen Elementes hin, wie auch die genetischen Analysen von M12 mit hohen Homologien zu regulativen Genen von *B. subtilis* auf eine regulative Funktion des in M12 inaktivierten Genortes weisen.

Ein Vergleich der Wachstumskurven von M12 und *S. epidermidis* 1457 zeigte, dass die Transposoninsertion ein schnelleres Absterben der Bakterien in der stationären Phase von Schüttelkulturen bewirkte (Kap. 4.4.2). Dieser Defekt ist abhängig von den Kulturbedingungen, denn in Mikrotiterplatten konnte unter statischen Bedingungen während des gesamten Beobachtungszeitraumes kein Absterben der Zellen festgestellt werden. Der Anstieg der OD in der exponentiellen Wachstumsphase war bei beiden Stämmen gleich, so dass eine Wachstumsstörung unwahrscheinlich ist.

Bei der Bestimmung der relativen Hydrophobizität fiel auf, dass M12 wiederum in stationärer Wachstumsphase einer Schüttelkultur vom Wildtyp abweichende Eigenschaften aufwies (Kap. 4.4.3). M12 war unter den Bedingungen auffallend hydrophil, in denen auch die Wachstumskurve eine abfallende OD aufwies. Möglicherweise sind zu diesem Zeitpunkt ein Teil der Mutantenzellen in der Lyse begriffen, so dass die Abnahme der Hydrophobizität auf totes, hydrophileres Zellmaterial zurückzuführen ist. Die relativen Hydrophobizitäten der beiden Stämme unterschieden sich nicht, wenn Bakterien der exponentiellen Phase oder aus Kultur in Mikrotiterplatten verwendet wurden.

Bakterien der beiden Stämme *S. epidermidis* 1457 und M12 aus der exponentiellen Wachstumsphase unterschieden sich auch im Anheftungs-ELISA nicht wesentlich (Kap. 4.4.4). Allerdings ist dies nur scheinbar eine Bestätigung der Theorie, dass Bakterien schlechter an ein hydrophobes Polymer adhärieren, je hydrophiler ihre Oberfläche ist (Christensen *et al.*, 1994). Die geringen ELISA-Signale wurden bei M12 sowohl bei Zellen der stationären Phase aus Schüttelkulturen als auch aus Mikrotiterplatten nachgewiesen. Nur im ersten Fall jedoch war die Hydrophobizität geringer als die des Wildtyps. Geringe Adhäsion verursacht durch eine hydrophilere Zelloberfläche von M12 kann folglich nicht der einzige Grund der schwachen ELISA-Signale sein.

Eine mögliche Erklärung für die niedrige Reaktivität der Mutante im Anheftungs-ELISA könnte ebenso in einer mit der Wachstumsphase korrelierenden geringeren Antigenität liegen. Fehlten M12 in der stationären Wachstumsphase ein oder mehrere wichtige Antigene, so wäre der Anheftungs-ELISA möglicherweise falsch-negativ. In einem zur Überprüfung dieser Hypothese durchgeführten Immunfluoreszenztest zeigte M12 deutlich geringere Fluoreszenz gegenüber dem Wildtyp (Kap. 4.4.5), die nur auf das Fehlen von Oberflächenantigenen zurückzuführen sein kann. Allerdings war die schwache Fluoreszenz nicht abhängig von der Wachstumsphase. Nach diesem Befund sollte der Anheftungs-ELISA mit Bakterien beider Wachstumsphasen für M12 geringere Signale ergeben als für *S. epidermidis* 1457. Dies ist jedoch, wie bereits dargelegt, nicht der Fall.

Um die Frage zu klären, ob es sich bei M12 um eine adhäsionsdefiziente Mutante handelt, wurde mit einer antikörperunabhängigen Methode die Adhäsion untersucht (Kap. 4.5.1). Bei der Verwendung von radioaktiv markierten Bakterien adhärten Zellen von M12 ebenso gut an die Polymeroberfläche wie *S. epidermidis* 1457. Dies galt für Zellen der exponentiellen Phase gleichermaßen wie für Zellen der stationären Phase, bei denen im Anheftungs-ELISA die starken Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp auftraten. Diese Experimente wurden wegen der besseren Handhabung der radioaktiven Proben statt an Nunclon Δ an einer Maxisorp-Oberfläche durchgeführt. Da die Anheftungskurven beider Stämme an Maxisorp mit denen an Nunclon Δ übereinstimmten, kann davon ausgegangen werden, dass auch an dieser Oberfläche beide Stämme gleich gut adhäreren. M12 ist damit an dieser Oberfläche nicht die gesuchte adhäsionsdefiziente Mutante.

Es bleibt festzuhalten, dass die Insertion von Tn917 in *purR* neben der Biofilmbildung noch weitere Eigenschaften wie Hämolyseexpression, Koloniemorphologie und Antigenpräsentation von M12 beeinflusst. Sowohl die Wachstumskurven als auch der Hydrophobizitätstest deuten darauf hin, dass diese Effekte in der stationären Phase am deutlichsten hervortreten. Außerdem zeigt sich an der verringerten Antigenität von M12, dass exponierte Strukturen an der Zelloberfläche fehlen.

6 Zusammenfassung

Staphylococcus epidermidis gehört zur Normalflora der menschlichen Haut. Als pathogener Keim hat er an Bedeutung gewonnen, da er in der Lage ist Kunststoffoberflächen, wie z.B. Katheter, künstliche Herzklappen oder Gelenkprothesen zu besiedeln und dadurch fremdkörperassoziierte Infektionen zu verursachen. Als Kontaminationsquelle der Biopolymere gilt allgemein die Hautflora des Patienten. Es gibt jedoch nur wenige Daten, die sich auf die Adhäsion an Haut und Schleimhautzellen beziehen. Da die molekularen Mechanismen der Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* nicht besonders gut untersucht sind, zielte diese Arbeit darauf ab, Faktoren zu untersuchen, die die Besiedlung von Polymeren sowie von Haut und Schleimhäuten beeinflussen.

Zunächst wurde ein Anheftungs-ELISA zum spezifischen Nachweis der primären Adhäsion von *S. epidermidis* an Polymeroberflächen und Zellkulturen entwickelt. Diese Methode eignete sich gut für Untersuchungen an einer Vielzahl von Oberflächen. Auch war das Verfahren so konzipiert, dass ein *Screening* auf adhäsionsveränderte Transposonmutanten vorgenommen werden konnte. Obwohl in einem ersten *Screening* keine adhäsionsdefiziente Mutante identifiziert werden konnte, hat sich die Methode in diesem Einsatzbereich bewährt und steht für weitere Anwendungen zur Verfügung.

Es konnte im Anheftungs-ELISA gezeigt werden, dass die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* an NunclonΔ (Polystyrol) unabhängig von Kulturbedingungen und physiologischem Zustand der Bakterien abläuft. Wachstum als planktonische Zellen oder als Biofilm, verschiedene Kulturmedien, hohe Osmolarität oder Ethanolstress zeigten nur geringen Einfluss auf die Adhäsion. Ein starker Einfluss unspezifischer Faktoren oder die Beteiligung konstitutiv exprimierter Faktoren ist daher wahrscheinlich. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass das für die interzelluläre Adhäsion verantwortliche PIA zweifelsfrei als primärer Adhäsionsfaktor an dieser Polymeroberfläche ausgeschlossen werden konnte. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass PIA auch an Fibronectin und vermutlich auch an Fibrinogen keine Funktion als primäres Adhäsion besitzt.

Die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* 1457 an den epithelialen Zelllinien RPMI 2650 (Nasenschleimhautkarzinom) und HaCaT (Keratinocyten) war quantitativ vergleichbar mit der an durch Serumproteine konditionierten Oberfläche. Es mussten 100-fach mehr Bakterien eingesetzt werden, um ein ELISA-Signal wie an nativer NunclonΔ-Oberfläche zu erzielen. Möglicherweise sind ähnliche Mechanismen an der Kolonisation von Haut und Schleimhäuten und der primären Adhäsion an mit Serumproteinen konditionierten Implantaten beteiligt.

Bei bekannten Biofilm-negativen Transposonmutanten von *S. epidermidis* 1457 mit intaktem *ica*-Operon wurde überprüft, ob der Verlust der Biofilmbildung auch auf einen

Mangel an Adhäsionsfähigkeit zurückzuführen ist. Dabei fiel die Mutante M12 durch ein stark vermindertes Signal im Anheftungs-ELISA auf. Diese somit doppelt interessante Mutante wurde im weiteren Verlauf phänotypisch charakterisiert, die betroffene chromosomale DNA-Region kloniert und sequenziert, Transkriptionsanalysen durchgeführt und drei der inaktivierten Gene *in trans* komplementiert.

Die Mutante M12 unterschied sich durch dunklere, flache Kolonien und fehlende Hämolyse auf Blutagar von *S. epidermidis* 1457. Die Zelloberfläche von M12 in der stationären Phase war mit 47 % relativer Hydrophobizität deutlich hydrophiler als die des Wildtyps mit 94 %. Außerdem konnten je nach Kulturbedingungen und Wachstumsphase wechselnde Antikörperbindungskapazitäten der Mutante festgestellt werden.

In dieser Mutante sind mindestens drei Gene durch die Insertion von Tn917 beeinträchtigt. Sie wurden nach den homologen regulativen Genen in *B. subtilis* mit *purR*, *yabJ* und *spoVG* bezeichnet. In *S. epidermidis* 1457 wurde für die beiden Gene *yabJ* und *spoVG* ein gemeinsames Transkript nachgewiesen, das vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase in großer Menge vorhanden war. In derselben Wachstumsphase konnte eine geringe Menge eines längeren Transkripts detektiert werden, das mindestens die drei Gene *purR*, *yabJ* und *spoVG* und vermutlich noch ein weiteres *upstream* liegendes Gen umfasst. Beide Transkripte fehlen in der Biofilmmutante M12, was die Beteiligung dieser Gene am veränderten Phänotyp belegt.

Eine Komplementierung von *spoVG* führte in M12 zu einer partiellen Rekonstitution des ursprünglichen Phänotyps. Wiederhergestellt wurden neben der Koloniemorphologie die Fähigkeit zur Hämolyse und die Antigenpräsentation. Die Biofilmbildung konnte durch eine separate Komplementierung der Gene *purR*, *yabJ* und *spoVG* nicht rekonstituiert werden. Vermutlich ist das Zusammenspiel mehrerer Gene oder Genprodukte hierfür nötig. Auch die Transkription des *ica*-Operons wurde nicht wiederhergestellt. Die hohen Homologien zu bekanntermaßen regulativen Genen und eine partielle Rekonstitution gleich mehrerer Faktoren lässt den Schluss zu, dass es sich auch in *S. epidermidis* um einen regulativen Genort handelt.

Bei Kontrolluntersuchungen in einem antikörperunabhängigen Anheftungstest konnte schließlich gezeigt werden, dass die Auffälligkeit der Mutante M12 im Anheftungs-ELISA nicht auf ein vermindertes Adhäsionsvermögen an dieser Oberfläche zurückzuführen ist. Die niedrigen ELISA-Signale sind vermutlich auf fehlende Oberflächenantigene und damit auf eine reduzierte Antikörperbindung zurückzuführen.

7 Literatur

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman (1990) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acid Res.* **25**: 3389-3402
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- An, Y. H., and Friedman, R. J. (1997) Laboratory methods for the study of bacterial adhesion. *J Microbiol Meth* **30**: 141-152.
- Archer, G. L., and Climo, M. W. (1994) Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 2231-2237.
- Arciola, C. R., Montanaro, L., Caramazza, R., Sassoli, V., and Cavedagna, D. (1998) Inhibition of bacterial adherence to a high-water-content polymer by a water-soluble, nonsteroidal, anti-inflammatory drug. *J Biomed Mater Res* **42**: 1-5.
- Augustin, J., and Götz, F. (1990) Transformation of *Staphylococcus epidermidis* and other staphylococcal species with plasmid DNA by electroporation. *FEMS Microbiol Lett* **54**: 203-207.
- Baddour, L. M., Barker, L. P., Christensen, G. D., Parisi, J. T., and Simpson, W. A. (1990) Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* in infection of transvenous endocardial pacemaker electrodes. *J Clin Microbiol* **28**: 676-679.
- Baldassarri, L., Donnelly, G., Gelosia, A., Voglino, M. C., Simpson, A. W., and Christensen, G. D. (1996) Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Infect Immun* **64**: 3410-3415.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**: 761-771.
- Boyce, J. M. (1997) Epidemiology and Prevention of Nosocomial Infections. In *The staphylococci in human disease*. Crossley, K. B., Archer, G. L. (eds). New York: Churchill Livingston, pp. 309-323.

- Carballo, J., Ferreiros, C. M., and Criado, M. T. (1991) Importance of experimental design in the evaluation of the influence of proteins in bacterial adherence to polymers. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **180**: 149-155.
- Christensen, G. D., Baldassarri, L., and Simpson, W. A. (1994) Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In *Infections associated with indwelling medical devices*. Bisno, A. L., Waldvogel, F. A. (eds). Washington DC: American Society of Microbiology, pp. 45-78.
- Christensen, G. D., Barker, L. P., Mawhinney, T. P., Baddour, L. M., and Simpson, W. A. (1990) Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **58**: 2906-2911.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., and Beachey, E. H. (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.
- Cramton, S. E., Ulrich, M., Götz, F., and Döring, G. (2001) Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **69**: 4079-4085.
- Deighton, M., and Borland, R. (1993) Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun* **61**: 4473-4479.
- Dobinsky, S., and Mack, D. (2001) Efficient RNA isolation method for analysis of transcription in sessile *Staphylococcus epidermidis* biofilm cultures. *Methods Enzymol* **336**: 255-262.
- Drewry, D. T., Galbraith, L., Wilkinson, B. J., and Wilkinson, S. G. (1990) Staphylococcal slime: a cautionary tale. *J Clin Microbiol* **28**: 1292-1296.
- Ebbole, D. J., and Zalkin, H. (1989) Interaction of a putative repressor protein with an extended control region of the *Bacillus subtilis* pur operon. *J Biol Chem* **264**: 3553-3561.
- Fey, P. D., Ulphani, J. S., Götz, F., Heilmann, C., Mack, D., and Rupp, M. E. (1999) Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **179**: 1561-1564.

- Foster, T. J., and Höök M. (2000) Molecular Basis of Adherence of *Staphylococcus aureus* to Biomaterials. In *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*. Bisno, A. L., Waldvogel, F. A. (eds). Washington DC: American Society of Microbiology, pp. 27-39.
- Frisby, D., and Zuber, P. (1991) Analysis of the upstream activating sequence and site of carbon and nitrogen source repression in the promoter of an early-induced sporulation gene of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **173**: 7557-7564.
- Galdbart, J. O., Allignet, J., Tung, H. S., Ryden, C., and El Solh, N. (2000) Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J Infect Dis* **182**: 351-355.
- Gerke, C., Kraft, A., Süssmuth, R., Schweitzer, O., and Götz, F. (1998) Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* **273**: 18586-18593.
- Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ziebandt, A. K., Tischer, K., Scharf, C., Hacker, J., and Hecker, M. (2000) Characterization of the sigma(B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **182**: 6983-6991.
- Götz, F., and Peters, G. (2000) Colonization of Medical Devices by Coagulase-Negative Staphylococci. In *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*. Bisno, A. L., Waldvogel, F. A. (eds). Washington DC: American Society of Microbiology, pp. 55-88.
- Götz, F., and Schumacher, B. (1987) Improvements of protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiol Lett* **40**: 285-288.
- Grüter, L., Feucht, H., Mempel, M., and Laufs, R. (1993) Construction of a slime negative transposon mutant in *Staphylococcus epidermidis* using the *Enterococcus faecalis* transposon Tn917. *Microbiol Immunol* **37**: 35-40.
- Grüter, L., and Laufs, R. (1991) Protoplast transformation of *Staphylococcus epidermidis*. *J Microbiol Meth* **13**: 299-304.
- Haldenwang, W. G. (1995) The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* **59**: 1-30.
- Heilmann, C., Gerke, C., Perdreau-Remington, F., and Götz, F. (1996a) Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect Immun* **64**: 277-282.

- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G., and Götz, F. (1997) Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* **24**: 1013-1024.
- Heilmann, C., and Peters, G. (2000) Biology and Pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis*. In *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A., and Rood, J. I. (eds). Washington D.C.: ASM Press; American Society for Microbiology, pp. 442-449.
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., and Götz, F. (1996b) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* **20**: 1083-1091.
- Herrmann, M., Vaudaux, P. E., Pittet, D., Auckenthaler, R., Lew, P. D., Schumacher-Perdreau, F., Peters, G., and Waldvogel, F. A. (1988) Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* **158**: 693-701.
- Higashi, J. M., Wang, I. W., Shlaes, D. M., Anderson, J. M., and Marchant, R. E. (1998) Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and transposon mutant strains to hydrophobic polyethylene. *J Biomed Mater Res* **39**: 341-350.
- Hogt, A. H., Dankert, J., and Feijen, J. (1985) Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. *J Gen Microbiol* **131** (Pt 9): 2485-2491.
- Hogt, A. H., Dankert, J., Hulstaert, C. E., and Feijen, J. (1986) Cell surface characteristics of coagulase-negative staphylococci and their adherence to fluorinated poly(ethylenepropylene). *Infect Immun* **51**: 294-301.
- Hussain, M., Hastings, J. G., and White, P. J. (1991a) A chemically defined medium for slime production by coagulase-negative staphylococci. *J Med Microbiol* **34**: 143-147.
- Hussain, M., Hastings, J. G., and White, P. J. (1991b) Isolation and composition of the extracellular slime made by coagulase-negative staphylococci in a chemically defined medium. *J Infect Dis* **163**: 534-541.
- Hussain, M., Herrmann, M., von Eiff, C., Perdreau-Remington, F., and Peters, G. (1997) A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* **65**: 519-524.

- Kayser, F. H. (1998) Bakterien als Krankheitserreger. In *Medizinische Mikrobiologie*. Kayser, F. H., Bienz Kurt A., Eckert Johannes, and Zinkernagel Rolf M. (eds). Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, pp. 221-350.
- Kiel, K., Knobloch, J. K. M., Rohde, H., and Mack, D. (2000) Mucoid-negative phenotype of *Staphylococcus epidermidis* caused by transposon insertions in unlinked genes of the PTS. *BIOSpektrum Suppl.*: 56.
- Kilstrup, M., Jessing, S. G., Wichmand-Jorgensen, S. B., Madsen, M., and Nilsson, D. (1998) Activation control of pur gene expression in *Lactococcus lactis*: proposal for a consensus activator binding sequence based on deletion analysis and site-directed mutagenesis of purC and purD promoter regions. *J Bacteriol* **180**: 3900-3906.
- Kilstrup, M., and Martinussen, J. (1998) A transcriptional activator, homologous to the *Bacillus subtilis* PurR repressor, is required for expression of purine biosynthetic genes in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **180**: 3907-3916.
- Kloos, W. E. (1997) Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In *The staphylococci in human disease*. Crossley, K. B., Archer, G. L. (eds). New York: Churchill Livingstone, pp. 113-137.
- Kloos, W. E., and Bannerman, T. L. (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **7**: 117-140.
- Knobloch, J. K. M., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H. H., and Mack, D. (2001) Biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* depends on RsbU, a functional activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J Bacteriol* **183**: 2624-2633.
- Knobloch, Johannes K.-M., (1999) Molekulare Charakterisierung von Transposoninsertionsstellen biofilmb negativer und mukoid-negativer *Staphylococcus epidermidis* Mutanten. Hamburg, Universität, Fachbereich Medizin, Dissertation.
- Konig, D. P., Perdreau-Remington, F., Rutt, J., Stossberger, P., Hilgers, R. D., and Plum, G. (1998) Slime production of *Staphylococcus epidermidis*: increased bacterial adherence and accumulation onto pure titanium. *Acta Orthop Scand* **69**: 523-526.
- Kristinsson, K. G. (1989) Adherence of staphylococci to intravascular catheters. *J Med Microbiol* **28**: 249-257.

- Kullik, I., and Giachino, P. (1997) The alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus*: regulation of the sigB operon in response to growth phase and heat shock. *Arch Microbiol* **167**: 151-159.
- Ludwicka, A., Jansen, B., Wadstrom, T., and Pulverer, G. (1984) Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* **256**: 479-489.
- Mack, D., Bartscht, K., Dobinsky, S., Horstkotte, M. A., Kiel, K., Knobloch, J. K. M., and Schäfer, P. (2000a) Staphylococcal factors involved in adhesion and biofilm formation on biomaterials. In *Handbook for studying bacterial adhesion: Principles, methods, and applications*. An, Y. H., Friedman, R. J. (eds). Totowa, N.J.: Humana Press, pp. 307-330.
- Mack, D., Bartscht, K., Fischer, C., Rohde, H., de Grahl, C., Dobinsky, S., Horstkotte, M. A., Kiel, K., and Knobloch, J. K. (2001) Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Methods Enzymol* **336**: 215-239.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., and Laufs, R. (1996a) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* **178**: 175-183.
- Mack, D., Haeder, M., Siemssen, N., and Laufs, R. (1996b) Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J Infect Dis* **174**: 881-884.
- Mack, D., Nedelmann, M., Krokotsch, A., Schwarzkopf, A., Heesemann, J., and Laufs, R. (1994) Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* **62**: 3244-3253.
- Mack, D., Riedewald, J., Rohde, H., Magnus, T., Feucht, H. H., Elsner, H. A., Laufs, R., and Rupp, M. E. (1999) Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect Immun* **67**: 1004-1008.
- Mack, D., Rohde, H., Dobinsky, S., Riedewald, J., Nedelmann, M., Knobloch, J. K., Elsner, H. A., and Feucht, H. H. (2000b) Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun* **68**: 3799-3807.

- Mack, D., Siemssen, N., and Laufs, R. (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.
- Margolis, P. S., Driks, A., and Losick, R. (1993) Sporulation gene spoIIB from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **175**: 528-540.
- Matsuno, K., and Sonenshein, A. L. (1999) Role of SpoVG in asymmetric septation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 3392-3401.
- Matsuura, T., Miyake, Y., Nakashima, S., Komatsuzawa, H., Akagawa, Y., and Suganaka, H. (1996) Isolation and characterization of teichoic acid-like substance as an adhesin of *Staphylococcus aureus* to HeLa cells. *Microbiol Immunol* **40**: 247-254.
- McKenney, D., Hubner, J., Muller, E., Wang, Y., Goldmann, D. A., and Pier, G. B. (1998) The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect Immun* **66**: 4711-4720.
- Mempel, M., Schmidt, T., Weidinger, S., Schnopp, C., Foster, T., Ring, J., and Abeck, D. (1998) Role of *Staphylococcus aureus* surface-associated proteins in the attachment to cultured HaCaT keratinocytes in a new adhesion assay. *J Invest Dermatol* **111**: 452-456.
- Merritt, K., Gaiand, A., and Anderson, J. M. (1998) Detection of bacterial adherence on biomedical polymers. *J Biomed Mater Res* **39**: 415-422.
- Muller, E., Hubner, J., Gutierrez, N., Takeda, S., Goldmann, D. A., and Pier, G. B. (1993a) Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. *Infect Immun* **61**: 551-558.
- Muller, E., Takeda, S., Goldmann, D. A., and Pier, G. B. (1991) Blood proteins do not promote adherence of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *Infect Immun* **59**: 3323-3326.
- Muller, E., Takeda, S., Shiro, H., Goldmann, D., and Pier, G. B. (1993b) Occurrence of capsular polysaccharide/adhesin among clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* **168**: 1211-1218.

- Nedelmann, M., Sabottke, A., Laufs, R., and Mack, D. (1998) Generalized transduction for genetic linkage analysis and transfer of transposon insertions in different *Staphylococcus epidermidis* strains. *Zentralbl Bakteriol* **287**: 85-92.
- Nilsson, M., Frykberg, L., Flock, J. I., Pei, L., Lindberg, M., and Guss, B. (1998) A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **66**: 2666-2673.
- Noble, W. C. (1997) Staphylococcal carriage and skin and soft tissue infection. In *The staphylococci in human disease*. Crossley, K. B., Archer, G. L. (eds). New York: Churchill Livingstone, pp. 401-412.
- Park, K. D., Kim, Y. S., Han, D. K., Kim, Y. H., Lee, E. H., Suh, H., and Choi, K. S. (1998) Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces. *Biomaterials* **19**: 851-859.
- Pascual, A., Flier, A., Westerdaal, N. A., and Verhoef, J. (1986) Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to Teflon catheters in vitro. *Eur J Clin Microbiol* **5** : 518-522.
- Pei, L., Palma, M., Nilsson, M., Guss, B., and Flock, J. I. (1999) Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **67**: 4525-4530.
- Peschel, A., and Götz, F. (1996) Analysis of the *Staphylococcus epidermidis* genes *epiF*, *-E*, and *-G* involved in epidermin immunity. *J Bacteriol* **178**: 531-536.
- Peters, G., Locci, R., and Pulverer, G. (1982) Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* **146**: 479-482.
- Proctor, R. A., and Peters, G. (1998) Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Infect Dis* **27**: 419-422.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M., and Ziebuhr, W. (2000a) Alternative transcription factor sigma(B) is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J Bacteriol* **182**: 6824-6826.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., and Ziebuhr, W. (2000b) Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 3357-3363.

- Rappu, P., Shin, B. S., Zalkin, H., and Mantsala, P. (1999) A role for a highly conserved protein of unknown function in regulation of *Bacillus subtilis* *purA* by the purine repressor. *J Bacteriol* **181**: 3810-3815.
- Resnekov, O., Driks, A., and Losick, R. (1995) Identification and characterization of sporulation gene *spoVS* from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 5628-5635.
- Riedewald, Joachim (2001) Phänotypische Charakterisierung biofilmbnegativer Transposonmutanten: Identifizierung des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins als Hämagglutinin von *Staphylococcus epidermidis*. Hamburg, Universität, Fachbereich Medizin, Dissertation.
- Robertson, J. B., Gocht, M., Marahiel, M. A., and Zuber, P. (1989) *AbrB*, a regulator of gene expression in *Bacillus*, interacts with the transcription initiation regions of a sporulation gene and an antibiotic biosynthesis gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 8457-8461.
- Romero-Steiner, S., Witek, T., and Balish, E. (1990) Adherence of skin bacteria to human epithelial cells. *J Clin Microbiol* **28**: 27-31.
- Rosenberg, M., D. Gutnick, and E. Rosenberg (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**:29-33.
- Rupp, M. E., and Archer, G. L. (1992) Hemagglutination and adherence to plastic by *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **60**: 4322-4327.
- Rupp, M. E., and Archer, G. L. (1994) Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* **19**: 231-243.
- Rupp, M. E., Fey, P. D., Heilmann, C., and Götz, F. (2001) Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J Infect Dis* **183**: 1038-1042.
- Rupp, M. E., Sloot, N., Meyer, H. G., Han, J., and Gattermann, S. (1995) Characterization of the hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **172**: 1509-1518.
- Rupp, M. E., Ulphani, J. S., Fey, P. D., Bartscht, K., and Mack, D. (1999a) Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun* **67**: 2627-2632.

- Rupp, M. E., Ulphani, J. S., Fey, P. D., and Mack, D. (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.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schumacher-Perdreau, F., Heilmann, C., Peters, G., Götz, F., and Pulverer, G. (1994) Comparative analysis of a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain and its adhesion-positive, accumulation-negative mutant M7. *FEMS Microbiol Lett* **117**: 71-78.
- Shaw, J. H., and Clewell, D. B. (1985) Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B- resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* **164**: 782-796.
- Shin, B. S., Stein, A., and Zalkin, H. (1997) Interaction of *Bacillus subtilis* purine repressor with DNA. *J Bacteriol* **179**: 7394-7402.
- Sinha, S., Rappu, P., Lange, S. C., Mantsala, P., Zalkin, H., and Smith, J. L. (1999) Crystal structure of *Bacillus subtilis* YabJ, a purine regulatory protein and member of the highly conserved YjgF family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13074-13079.
- Timmerman, C. P., Fleer, A., Besnier, J. M., De Graaf, L., Cremers, F., and Verhoef, J. (1991) Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun* **59**: 4187-4192.
- Tojo, M., Yamashita, N., Goldmann, D. A., and Pier, G. B. (1988) Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **157**: 713-722.
- Vacheethasane, K., Temenoff, J. S., Higashi, J. M., Gary, A., Anderson, J. M., Bayston, R., and Marchant, R. E. (1998) Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. *J Biomed Mater Res* **42**: 425-432.
- van der Mei, H. C., Belt-Gritter, B., Reid, G., Bialkowska-Hobrzanska, H., and Busscher, H. J. (1997) Adhesion of coagulase-negative staphylococci grouped according to physico-chemical surface properties. *Microbiology* **143** (Pt 12): 3861-3870.

- Vaudaux, P., Pittet, D., Haeberli, A., Huggler, E., Nydegger, U. E., Lew, D. P., and Waldvogel, F. A. (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., Cremers, F. F., van Dijk, H., and Fleer, A. (1996) Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **178**: 537-541.
- Weng, M., Nagy, P. L., and Zalkin, H. (1995) Identification of the *Bacillus subtilis* pur operon repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7455-7459.
- Weng, M., and Zalkin, H. (2000) Mutations in the *Bacillus subtilis* purine repressor that perturb PRPP effector function in vitro and in vivo. *Curr Microbiol* **41**: 56-59.
- Wilkinson, B. J. (1997) Biology. In *The staphylococci in human disease*. Crossley, K. B., Archer, G. L. (eds). New York: Churchill Livingston Inc., pp. 1-38.
- Ziebuhr, W., Heilmann, C., Götz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E., and Hacker, J. (1997) Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* **65**: 890-896.
- Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Löbner, I., Götz, F., and Hacker, J. (1999) A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* **32**: 345-356.

8 Anhang

8.1 Sequenz

Nukleotidsequenz des klonierten, chromosomalen DNA-Abschnitts von M12, der die Transposoninsertion flankiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der offenen Leserahmen ist im *single-letter code* oberhalb der Sequenz über dem mittleren Nukleotid eines Kodons angegeben. Stoppcodons sind mit * markiert. Der Name jedes offenen Leserahmens ist unterhalb des Startcodons notiert und mögliche Shine-Dalgarno-Sequenzen fett hervorgehoben. Putative Promotoren sind durch Unterstreichung ihrer -10 und -35 Region kenntlich gemacht. Die *MspI*-Spaltstelle in *gcaD* ist doppelt unterstrichen. Die typischerweise bei einer Insertion von Tn917 verdoppelten Basen sind fett und vergrößert hervorgehoben.

```

1      TGCATCCTGA CATTAAAAGG ATTAAAGATA ACATGCTACA ATGTGGTGCT
51     GATGGTGCTT TGATGAGTGG AAGCGGTCCT ACTGTTTACG GGCTAGCTCA
101    AAAAGAAAAGA CAAGCTAAAA ATATTTATAA TGCAGTGAAT GGTGTTGTGA
      -35          (sigA)          -10

151    ATGAAGTTTA CTTAGTAAGA TTATTAGGAT AGAAGGGTTT GAAAAGATGA
      M R
      purR
      • Y K R S E R I V F M T Q Y L M N
201    GATATAAAAG AAGCGAACGT ATTGTATTTA TGACACAATA CCTCATGAAC

      H P N K L I P L T Y F V K K F K Q •
251    CACCCAAATA AGTTGATACC CCTCACTTAT TTTGTAAAGA AATTTAAACA

      • A K S S I S E D V Q I I K N T F Q
301    AGCAAAATCG TCAATTAGTG AAGACGTTCA AATCATTAAA AATACGTTTC

      • N E K L G T I I T T A G A S G G
351    AAAATGAAAA ATTAGGAACT ATTATTACTA CAGCAGGTGC TAGCGGTGGA

      V T Y K P M M S K S E A T E V V D •
401    GTAACCTATA AGCCTATGAT GAGTAAATCA GAGGCCACAG AGGTTGTTGA

      • E V I E Q L Q E K D R L L P G G Y
451    TGAGGTGATA GAGCAATTAC AAGAGAAAGA CCGTTTGCTA CCTGGAGGAT

      • L F L S D L V G N P S L L N K V
501    ATTTATTTTT ATCCGATTTA GTTGGTAATC CTTCTCTATT AAATAAAGTA

      G K L I A S I Y M N E E L D A V V •
551    GGTAAGTTAA TTGCTAGTAT ATATATGAAC GAAGAACTTG ATGCTGTTGT
```

• T I A T K G I S L A N A V A N V L
TACCATAGCG ACTAAAGGGA TATCACTTGC GAATGCAGTC GCAAACGTAT

• N L P V V V I R K D N K V T E G
TAAATTTACC TGTAGTG GTT ATAAGAAAGG ACAATAAAGT TACAGAAGGT

S T V S I N Y V S G S S R K I E T •
TCTACGGTTT CAATCAATTA TGTTTT CAGGA TCATCTAGAA AAATAGAAAC

• M V L S K R T L A E N S N V L V V
AATGGTGTTA TCGAAACGAA CTTTAGCTGA GAATTCTAAT GTCCTCGTAG

• D D F M R A G G S I N G V M N L
TAGACGATTT TATGAGGGCT GGTGGCTCAA TTAATGGAGT AATGAATTTA

M N E F K A H V K G V S V L V E S •
ATGAATGAGT TTAAAGCCCC TGTAAAAAGGG GTATCCAGTAC TTGTAGAATC
-35 (sigB) -10

• K E V K Q R L I E D Y T S L V R L
AAAAGAAGTA AACAAAGAT TAATTGAAGA TTACTACTCC TTAGTCAGAT

• S D V D E Y N Q E F K V E P G N
TGTCAGATGT CGACGAGTAC AACCAAGAAT TTA**AAGT**GGA ACCAGGCAAC
Tn917-Insertionsstelle

S L S K F S * M K I •
AGTTTGTCTA AATTTTCTTA AAAA**GGAGT GT**CAAATTCA TCATGAAAAAT
yabJ

• I N S D K V P E A L G P Y S H A T
AATCAACTCA GATAAGGTAC CCGAAGCACT AGGCCCATAT TCGCATGCAA

• V I N G F V F T S G Q I P L T L
CTGTTATAAA CGGTTTTGTC TTTACATCAG GTCAAATTCC ACTCACACTT

D G T I V S D D V Q E Q T K Q V L •
GATGGAACAA TTGTTAGCGA TGATGTTCAA GAACAALCTA AGCAAGTTTT

• E N L T V V L K E A D S D L N S V
AGAAAATTTA ACTGTGGTAT TAAAGAAGC AGATTCTGAT TTGAATTCTG

• V K A T I Y I S D M N D F Q Q I
TTGTTAAAGC GACAATCTAT ATTTCTGATA TGAATGATTT TCAACAAATT

N Q I Y G N Y F V E H Q P A R S C •
AATCAATCT ATGGAACTA TTCGTCGAA CACCAACCAG CTCGTAGTTG

• V E V S R L P K D V K V E I E L I
TGTTGAAGTG TCACGGTTGC CTAAAGACGT AAAGGTAGAA ATTGAATTGA
-35

• G K V K E L *
TAGGTAAAGT GAAGGAATTA TAATTTTCTT AAAAGTTGTC AAGCTTCTAA
sigA -10

V T D V
TAACATAAAG ATATACTAGG **GGGG**CTCACT ACACGAAAGT GACAGATGTA
spoVG

R L R K I Q T D G R M K A L V S I .
 1501 AGACTTAGAA AAATACAAAC AGACGGCAGA ATGAAAGCAC TCGTTTCCAT
 . T L D E A F V I H D L R V I E G N
 1551 TACGCTAGAT GAAGCTTTTG TAATTCATGA TTTACGTGTA ATTGAAGGAA
 . S G L F V A M P S K R T P D G E
 1601 ACTCAGGTCT TTTCGTCGCA ATGCCAAGTA AACGTACACC AGATGGTGAA
 F R D I A H P I N S D M R Q E I Q .
 1651 TTCCGTGACA TCGCGCATCC TATCAATTCT GATATGAGAC AAGAAATCCA
 . D A V M K V Y D E T D E V I P D K
 1701 AGATGCAGTG ATGAAAGTAT ATGATGAAAC TGATGAAGTT ATTCCAGACA
 . N A T S D N E E S D E A *
 1751 AAAATGCTAC TTCAGATAAC GAAGAATCAG ACGAAGCTTA ATTAAAGAAA
 1801 TGTATTCAAT TATAAAATAA GCCTGGGACA TTGATGATAT ATTGTCTCAG
 1851 GCATTTTAAT GTATTGTTAG TCAATGGCAA AATTAGTAAT GATTGTGTAA
 1901 TGGGTTACTT GAAATTTATA CCATATTGTT CGGGAGGGAC TGCGACTTCT
 1951 TATTGAAGTT GTAGTCCCTC CGTTATTTTT AATGTACTTT GTATTTCCAT
 2001 AAACGAAAAC GAAATAAACA TTTAACGATA AATAAGAATT ATAGAAGTAA
 2051 AATACTGATA TGTTTCTCTG ACAACAATTC ATCTATAAAA ATTTACTTAT
 2101 GATAGACGTA ATTAATATGT CTGTATGATT ATAACTTTAT CGTCATAAAT
 2151 TATGATTGAT AATATGATGA TTTAGACACT GAAATAAAAT ACCAATGATT
 2201 AATAAAGAGG TTGAATATGT AATGTAAGT TGGGGTTTGA TGACCTCGTT
 2251 TTCCTTATTA AAGCATAACA ACTTATTTGA ATTTCTAAAA TTATCAAACC
 2301 TTTAATGAAT GATTAACAAA ACCTTTTATA AGTTGAAACT CTCTTTGTTA
 -35 sigA
 2351 TTCAACTATA ATAAGTATGA AGTGTAAATT TTAATGGAGG GTTAGCATTC
 -10
 M Q R H A I I L A A G K G T R M K .
 2401 ATGCAAAGAC ATGCGATTAT TCTGGCAGCA GGTAAGGGCA CAAGAATGAA
gcaD
 . S K K Y K V L H E V A G K P M V E
 2451 ATCAAAGAAA TATAAAGTGC TCCATGAGGT TGCTGGCAAA CCAATGGTTG
 . H V L N N V K Q A G V D Q I V T
 2501 AACATGTGCT TAACAACGTA AAACAAGCTG GCGTTGATCA AATTGTAACT
 I I G H G A E S V K D T L G N Q S .
 2551 ATTATTGGTC ATGGCGCTGA GAGTGTGAAA GATACATTGG GTAATCAATC
 . L Y S F Q D K Q L G T A H A V K M
 2601 ATTATATAGT TTTCAGGATA AACAACTTGG AACAGCTCAT GCTGTGAAAA
 . A H E H L A D K E G T T L V V C
 2651 TGGCACATGA ACATTTAGCA GATAAAGAAG GAACTACTCT AGTAGTATGT
 G D T P L I T Y Q T L Q S L I E H .
 2701 GGAGATACWC CACTTATTAC ATACCAAAC TTAACAATCAC TTATTGAACA

2751 • H E S T Q S H V T V L S A S T I N
 TCATGAAAGT ACACAATCAC ATGTTACTGT ATTATCTGCT TCTACTATCA

2801 • P Y G Y G R I I R N H N G I L E
 ATCCTTATGG TTATGGACGA ATTATTAGAA ATCATAATGG AATATTAGAG

2851 R I V E E K D A N D S E R A I K E •
 CGTATTGTTG AAGAGAAAGA CGCAAATGAC TCAGAACGTG CGATTAAAGA

2901 • I S S G I F A F N N R V L F E K L
 AATTAGTTCA GGTATTTTTG CCTTTAATAA TCGAGTACTA TTTGAGAAGT

2951 • E Q V K N D N A Q G E Y Y L P D
 TAGAACAAAGT TAAAAATGAT AATGCTCAAG GAGAATATTA TTTACCTGAT

3001 V L S L I L K D G G K A E V Y C T •
 GTTTTGTCTT TAATTTTAAA AGACGGAGGT AAAGCTGAAG TTTATTGTAC

3051 • E D F D E I I G V N D R L M L S E
 CGAAGATTTT GATGAAATCA TTGGTGTTAA TGATCGTTTG ATGTTAAGTG

3101 • A E K A L Q Q R I N R Y H M E N
 AAGCTGAAAA GGCTTTGCAA CAACGTATCA ATCGCTATCA TATGGAAAAT

3151 G V T I I D P S S T F I G T D V K •
 GGTGTGACAA TCATTGACCC TAGTTCAACA TTTATTGGAA CAGATGTGAA

3201 • I G I D T T I E P G V R I G G H T
 AATTGGAATA GATACAATA TTGAACCGGG CGTGCGCATC GGAGGTCATA
 MspI

3251 • T I E E D V W I G Q Y S E I N N
 CAACGATTGA AGAAGATGTG TGGATAGGCC AATACTCTGA AATTAATAAT

3301 S T I H S N A N I K Q S V I N D S •
 AGCACAAATC ATTCGAATGC TAACATAAAA CAATCGGTTA TCAATGACTC

3351 • I V G E N X X V G P F A Q L R P G
 TATTGTTGGA GAGAACMCAM CAGTTGGACC TTTCGCTCAA CTACGCCAG

3401 • S N L G S E V K V G N F V E V K
 GATCTAATTT AGGTTCTGAA GTTAAAGTAG GAAACTTTGT TGAAGTGAAG

3451 K A D I K D G A K V S H L S Y I G •
 AAAGCAGATA TTAAAGATGG TGCTAAAGTA TCACACTTGA GCTACATTGG

3501 • D A E I G E R T N I G C G S I T V
 AGATGCTGAA ATAGGTGAGC GTACAAATAT CGGATGTGGT TCTATCACTG

3551 • N Y D G A N K F K T I V G K D A
 TAAACTATGA CGGCGCTAAC AAATTTAAAA CAATAGTAGG TAAAGATGCT

3601 F I G C N T N L I A P V T V G N H •
 TTTATAGGAT GTAATACGAA CCTTATAGCA CCTGTAACAG TAGGTAATCA

• T L I A A G S T I T D N I P E D S
3651 TACTCTTATT GCAGCTGGAT CCACAATTAC AGATAATATC CCTGAAGATA

• L A L A R A R Q V N K E G Y L K
3701 GTTTAGCATT AGCGCGTGCA AGACAAGTAA ATAAAGAGGG CTACCTAAAA

K *
3751 AAATAGTTCT TGCCCTGAAT TGCTATCG