

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 Nunclon Δ (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 Fibronektin 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 (Keratinozyten) 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 Nunclon Δ -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.