

## 5 Zusammenfassung

*Staphylococcus epidermidis* gehört zur Flora der menschlichen Haut und ist normalerweise apathogen. Durch seine Fähigkeit zur Besiedlung von Kunststoffoberflächen führt dieser Keim zu Infektionen mit implantierten Fremdkörpern, wie z.B. Kathetern, Herzschrittmachern oder Gelenkprothesen. Dabei ist die Ausbildung eines Biofilms ein wichtiger Pathogenitätsfaktor. Die Mechanismen, die zur Entstehung des Biofilms führen, sind vielfältig und bisher noch nicht vollständig geklärt. Ein entscheidender Faktor dabei ist die Matrix der Biofilme, bestehend aus der Glykokalyx von *S. epidermidis*.

Diese Arbeit untersuchte den für *S. epidermidis* ungewöhnlichen mukoiden Phänotyp, um neue Erkenntnisse zur EPS-Produktion und Glykokalyx zu erhalten. Es wurden Faktoren gesucht, die den mukoiden Phänotyp von *S. epidermidis* 1457 induzieren. Der genetische Hintergrund der beiden mukoid-negativen Tn917-Transposonmutanten M16 und M20 wurde ermittelt.

Ein mukoider Phänotyp konnte nur auf peptonhaltigen Medien, die mit den Aminoazuckern Glucosamin oder N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) supplementiert wurden, induziert werden. Dabei waren die Mutanten mit GlcNAc mukoid-negativ, mit Glucosamin allerdings weiterhin mukoid. Mit einem Medium, das den mukoiden Phänotyp nicht induziert, wurde durch Zugabe von Aminosäuren und Glucosamin ebenfalls ein mukoider Phänotyp beobachtet. Die Biofilmbildung war in den Mutanten M16 und M20 mit GlcNAc, wenn sie mukoid-negativ waren, vermindert. Es konnten nur die *S. epidermidis*-Stämme einen mukoiden Phänotyp ausprägen, die einen intakten, für die Synthese des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins (PIA) verantwortlichen *icaADBC*-Genort aufwiesen.

Der mukoide Phänotyp war korreliert mit der Expression sehr großer Mengen des Polysaccharids PIA. Die Bildung von PIA, dessen Bedeutung für die Biofilmbildung und Pathogenität von *S. epidermidis* bereits belegt wurde, wird damit durch die Aminoazucker Glucosamin und GlcNAc, sowie großer Mengen von Stickstoff begünstigt.

Die Genorte der Transposoninsertionen in den Mutanten M16 und M20 wurden kloniert und sequenziert. Die Transposoninsertionen lagen auf zwei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Genorten. Es waren zwei in *S. epidermidis* unbeschriebene Gene des Phosphoenolpyruvat: Zucker Phosphotransferase Systems (PTS) betroffen.

In der Mutante M20 wurde *glcA*, welches das Glucose spezifische Enzym II (EII) codiert, getroffen. In der Mutante M16 inserierte Tn917 im Antiterminatorgen *glcT*. Die Inaktivierung dieser Gene wurde durch Genexpressionsanalysen im Northern Blot bewiesen. Dabei konnte erstmalig das Transkript eines Antiterminatorgens dargestellt werden. Das EII-Gen *glcA* wird entgegen vieler anderer EII-Gene monocistronisch transkribiert. Es ist nicht in einem Operon mit anderen Genen des korrespondierenden Zuckerkatabolismus oder anderen PTS-Genen angeordnet.

Antiterminatoren regulieren die Transkription von dazugehörigen EII-Genen, wobei sie die sogenannte RAT (*ribonucleic antiterminator*) Sequenz vor dem EII-Gen erkennen. Bei allen bisher beschriebenen funktionellen Antiterminator-EII Paaren sind die dafür codierenden Gene miteinander verbunden. Mit *glcA* und *glcT* konnte hier erstmals ein Antiterminator-EII Paar beschrieben werden, bei dem die codierenden Gene auf voneinander unabhängigen Genorten lokalisiert sind. Die vor *glcA* zu findende RAT-Sequenz und das fehlende Transkript des EII-Gens *glcA* in der Mutante M16, in der der Antiterminator inaktiviert war, bewies die Interaktion der beiden Gene.

Durch den signifikant verminderten Transport von Glucose und Glucosamin in die Mutanten M16 und M20 konnte eine Funktion von *glcA* und *glcT* im spezifischen Transport dieser beiden Zucker nachgewiesen werden. Da beide Mutanten mit GlcNAc mukoid-negativ waren, wurde ein ebenfalls verminderter Transport für GlcNAc erwartet. Erstaunlicherweise transportierte sogar der Wildtyp nur sehr geringe Mengen dieses Zuckers, obwohl er große Mengen des Polysaccharids PIA damit produzierte. Tests auf Säureproduktion aus GlcNAc und Wachstumskurven mit diesem Zucker ergaben, dass *S. epidermidis* 1457 GlcNAc nicht im Energiestoffwechsel verwerten kann. Wahrscheinlich gelangt GlcNAc über das EII-Protein GlcA als Substrat mit geringer Affinität mittels „erleichterter Diffusion“ in die Zelle. GlcNAc wird vermutlich intrazellulär aktiviert und in PIA eingebaut. Zum Energiegewinn müssen die Bakterien allerdings auf andere Bestandteile des Mediums zurückgreifen. In dem hier verwendeten PYØ-Medium ist nachweislich Hexose vorhanden. Da die Mutanten M16 und M20 eine verminderte Transportrate für Glucose haben, steht ihnen hier weniger Glucose zum Energiegewinn zur Verfügung als dem Wildtyp. Der mukoid-negative Phänotyp der Mutanten M16 und M20 mit GlcNAc ist damit vermutlich auf einen relativen Energiemangel zurückzuführen.