

**Untersuchung zur
Interaktion biofilmbildender
Staphylococcus epidermidis (Winslow und Winslow, 1908)-
Stämme mit murinen Makrophagen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Department Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von
Nina Nathalie Schommer
geboren in Moers

Hamburg im April 2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herr Professor Dr. M. AEPFELBACHER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. W. STREIT
Tag der Disputation: 12. Februar 2010

Hamburg, den 29. Januar 2010



A. Temming
Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Staphylokokken	3
2.1.1. Systematische Stellung der Staphylokokken im Reich der Prokaryota	3
2.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.1.3. <i>S. epidermidis</i> und Fremdkörper-assoziierte Infektionen	4
2.2. Biofilme	5
2.3. Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i>	6
2.3.1. Anheftung	7
2.3.2. Akkumulation	8
2.3.2.1. Das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsिन	8
(PIA; <i>polysaccharide intercellular adhesin</i>)	
2.3.2.2. Das Akkumulations-assoziierte Protein	10
(Aap; <i>accumulation-associated protein</i>)	
2.3.2.3. Das Extrazelluläre-matrixbindende Protein	14
(Embp; <i>extracellular matrix binding protein</i>)	
2.3.3. Freisetzung und Verbreitung planktonischer Zellen aus dem Biofilm	16
2.4. Das Immunsystem- ein Überblick	17
2.5. Toll-Like Rezeptoren	19
2.5.1. TLR2 und TLR4-vermittelte NF-κB- und MAPK-Aktivierung	20
2.6. Immunmodulatoren der angeborenen Immunantwort	23
2.6.1. Zytokine	23
2.6.1.1. Interleukin-1 beta (IL-1β)	24
2.6.1.2. Interleukin-1α (IL-1α)	25
2.6.1.3. Interleukin-6 (IL-6)	25
2.6.1.4. Interleukin-8 (IL-8)	25
2.6.1.5. Chemoattraktives Protein 1 (MCP-1)	25
2.6.1.6. Makrophagen-Inflammatorisches Protein-1α	26
(MIP-1α; <i>Macrophage inflammatory protein-1 α</i>)	
2.6.1.7. Makrophagen-Inflammatorisches Protein- 1γ	26
(MIP-1γ; <i>Macrophage inflammatory protein-1γ</i>)	
2.6.1.8. Tumornekrosefaktor alpha (TNFα)	26

2.6.1.9. RANTES (CCL5)	26
2.7. <i>S. epidermidis</i>-Biofilmbildung: Bedeutung für Pathogenität und Immunevasion	27
3. Zielsetzung	33
4. Materialien und Methoden	34
4.1. Geräte	34
4.1.1. Laborgeräte	34
4.1.2. Mikroskope	35
4.2. Glas- und Plastikwaren	36
4.3. Kulturmedien und Zusätze	36
4.3.1. Kulturmedien Makrophagen	37
4.3.2. Kulturmedien Bakterien	37
4.4. Chemikalien	37
4.5. Puffer und Lösungen	38
4.6. Kits	39
4.7. Antikörper und Farbstoffe	39
4.8. Bakterienstämme	40
4.9. Zelllinie	40
4.10. Plasmide	40
4.11. Molekularbiologische Methoden	41
4.11.1. Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	41
4.11.2. Konzentrationsbestimmung von DNS	41
4.11.3. Analytische Gelelektrophorese	41
4.11.4. DNS-Restriktion	42
4.12. Mikrobiologische Methoden	42
4.12.1. Kultivierung der Staphylokokken	42
4.12.2. Lagerung und Stammerhaltung der Staphylokokken	43
4.12.3. Biofilmbildung	43
4.12.4. Biofilmadhärenztest	43
4.12.5. Sonifizierung der Staphylokokken	43
4.13. Zellbiologische Methoden	44
4.13.1. Kultivierung von J774.A.1-Makrophagen	44
4.13.2. Zellzählung	44
4.13.3. Kryokonservierung von Zellen	44

4.13.4. Transfektion von J774.A.1-Makrophagen	44
4.13.5. Infektion der J774.A.1-Makrophagen mit Staphylokokken	45
4.13.6. Stimulation der J774.A.1-Makrophagen	45
4.13.7. Lyse der J774.A.1-Makrophagen	45
4.13.8. Luciferase-Report	45
4.13.9. Fixierung mit Paraformaldehyd	46
4.13.10. Fixierung mit Aceton	46
4.13.11. Permeabilisierung mit TritonX100	46
4.13.12. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	46
4.13.13. Innen- und Aussenfärbung (Zweifachfärbung)	47
4.13.14. Membranfärbung von J774.A.1-Makrophagen	47
4.13.15. Mikroskopieren lebender Zellen (<i>Live-cell imaging</i>)	47
4.13.16. Immunfluoreszenzfärbung zur Charakterisierung von Biofilmstrukturen	48
4.14. Proteinchemische Methoden	48
4.14.1 ELISA (<i>enzyme-linked-immunoabsorbent-assay</i>)	48
4.14.2. Natriumdodecylsulfat (SDS; <i>sodium dodecylsulfate</i>)- Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
4.14.3. Zytokin-Array	50
5. Ergebnisse	52
5.1. Struktur PIA-, Aap- und Embp-vermittelter <i>S. epidermidis</i>-Biofilme	52
5.1.1. Polysaccharid-abhängige Biofilme zeigen makroskopische Unterschiede zu Protein-abhängigen Biofilmen	52
5.1.2. Polysaccharid-abhängige Biofilme weisen kompaktere und widerstands- fähigere Strukturen im Vergleich zu Protein-abhängigen Biofilmen auf	53
5.1.3. Nachweis von PIA, Embp und Aap in Biofilmen	54
5.2. Interaktion zwischen <i>S. epidermidis</i>-Biofilmen und J774A.1.- Makrophagen	57
5.2.1. Protein-abhängige Biofilme sind gleichermaßen vor der Phagozytose durch J774A.1.-Makrophagen geschützt wie Polysaccharid-abhängige Biofilme	57
5.2.2. Polysaccharid- und Protein-abhängige <i>S. epidermidis</i> -Biofilme hemmen die NF-κB-Aktivierung in J774A.1.-Makrophagen	62
5.2.3. <i>S. epidermidis</i> interferiert mit der AP-1-Aktivierung in J774A.1.- Makrophagen	65

5.2.4. Polysaccharid- und Protein-Biofilme inhibieren die durch <i>S. epidermidis</i> stimulierte IL-1 β -Expression in J774A.1.-Makrophagen	66
5.2.5. Polysaccharid- und Protein-abhängige <i>S. epidermidis</i> -Biofilme interferieren mit der Zytokin-Produktion in J774.A.1.-Makrophagen	67
5.2.6. Der <i>S. epidermidis</i> -Biofilm in seiner Gesamtheit, nicht aber die Expression interzellulärer Adhäsine, ist mit der Inhibition der Makrophagen-Aktivierung assoziiert	70
5.2.7. Biofilmbildende <i>S. epidermidis</i> -Stämme induzieren in J774A.1.-Makrophagen eine verminderte Antwort auf LPS	75
6. Diskussion	77
7. Abkürzungsverzeichnis	86
8. Referenzen	89
9. Danksagung	105

1. Zusammenfassung

Das Koagulase-negative, grampositive Bakterium *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) stellt einen wesentlichen Bestandteil der kommensalen Flora der Haut und der Schleimhäute des Menschen dar. Trotz seiner geringen Pathogenität ist *S. epidermidis* die häufigste Ursache der nosokomialen Sepsis und von Infektionen, die im Zusammenhang mit Fremdkörper-implantaten entstehen. Für die Pathogenese von *S. epidermidis* wird die Fähigkeit, auf Polymerimplantaten adhärierende Biofilme zu bilden, als wesentlich angesehen. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass *S. epidermidis* durch die Biofilmbildung vor der Phagozytose geschützt ist. Dem interzellulären Polysaccharid-Adhäsin (PIA) wurde bisher eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der *S. epidermidis*-Immunevasion zugeschrieben. Neben PIA agieren auch das Extrazelluläre-matrixbindende Protein (Embp) und das Akkumulations-assoziierte Protein (Aap) als interzelluläre Adhäsine, durch die eine PIA-unabhängige Biofilmmakkumulation stattfinden kann. Ziel dieser Arbeit war es, strukturelle Merkmale der PIA-, Embp- und Aap-vermittelten Biofilme zu typisieren und ihren spezifischen Einfluss auf die Immunevasion bei J774A.1.-Makrophagen durch die Verwendung von genetisch charakterisierten *S. epidermidis*-Stämmen und den dazugehörigen isogenen Mutanten zu identifizieren.

Während PIA eine extrazelluläre Matrix bildet, die aus vielen Fasern besteht, konnten bei Embp- und Aap-vermittelten Biofilmen keine höher organisierten Matrixstrukturen festgestellt werden. Trotz der strukturellen Unterschiede waren die verschiedenen *S. epidermidis*-Biofilme alle mit einer ähnlichen Effizienz vor der Phagozytose durch J774A.1.-Makrophagen geschützt. Die reduzierte Aufnahme war mit einer signifikant reduzierten Nukleärer Faktor (NF)- κ B-Aktivierung und Interleukin (IL)-1 β -Produktion der Makrophagen assoziiert. Dass eine verminderte Aktivierung der mit biofilmbildenden *S. epidermidis*-infizierten Makrophagen stattfindet, wurde zusätzlich durch die reduzierte Produktion der Chemokine Makrophagen-Inflammatorisches Protein (MIP)-1 α , MIP-1 γ und Makrophagen-Chemoattraktives Protein (MCP)-1 unterstützt. Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass Protein-abhängige *S. epidermidis*-Biofilme gleichermaßen vor dem Immunsystem geschützt sind wie Polysaccharid-abhängige Biofilme. Eine Inhibition der Expression von MIP-1 α , MIP-1 γ und MCP-1 führt weiterhin zu der Annahme, dass *S. epidermidis* mit der chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut zum Ort der Infektion interferieren kann.

Durch die Beobachtung, dass der Kontakt mit biofilmbildenden *S. epidermidis* bei J774A.1.-Makrophagen eine Unempfindlichkeit gegenüber Lipopolysaccharid (LPS) induzierte, konnte

belegt werden, dass tatsächlich eine Wechselwirkung zwischen Staphylokokken und der Aktivierung von Makrophagen stattfindet.

Die in der vorliegenden Arbeit erbrachten Ergebnisse zeigen nicht nur, dass *S. epidermidis* durch Protein-abhängige Biofilme ähnlich effektiv vor der Phagozytose durch J774A.1-Makrophagen geschützt ist, wie durch Polysaccharid-abhängige Biofilme, sondern auch, dass spezifische Ereignisse während der Interaktion zwischen *S. epidermidis* und Makrophagen stattfinden, die mit der Phagozytenaktivierung interferieren.

Die Eliminierung von *S. epidermidis* durch das Immunsystem wird durch die Eigenschaft der Biofilmbildung verfehlt. Da dieses Bakterium Biofilme nicht nur durch ein, sondern durch mehrere voneinander unabhängige interzelluläre Adhäsine bilden kann, müsste der Fokus in zukünftigen experimentellen Untersuchungen auf die detaillierte Aufklärung der anti-inflammatorischen Mechanismen, die *S. epidermidis*-Biofilme auslösen, gesetzt werden. Weiterführend könnte diese Aufklärung wichtige Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien, die sich gegen eine *S. epidermidis*-Infektion richten, liefern.

2. Einleitung

2.1. Staphylokokken

Staphylokokken wurden erstmals vor über 125 Jahren von dem schottischen Chirurg Sir Alexander Ogston (1844-1929), Professor der Chirurgie in Aberdeen, als eine Gruppe von Mikrokokken, die entzündliche Gewebseinschmelzungen mit der folgenden Bildung eines Abszesses hervorrufen können, beschrieben (1,2).

Ogston war nicht der erste, der Eiter mikroskopisch analysierte und diesen mit Mikrokokken (aus dem Griechischem (*gr.*) abgeleitet kokkos= Beere) assoziierte, denn solche in kettenartiger Form wurden bereits als *Streptococci* bestimmt (Billroth 1874). Diese traten aber in gebündelter Form auf und wurden 1883 schließlich als *Staphylococci* (*gr.* staphyle= Traube) bezeichnet (3).

2.1.1. Systematische Stellung der Staphylokokken im Reich der Prokaryota

Staphylokokken lassen sich systematisch in die Domäne der *Bacteria* und in den Stamm der grampositiven Bakterien (*Firmicutes*) eingliedern. Sie sind fakultativ anaerob und besitzen ein Chromosom mit niedrigem GC-Gehalt. Daher sind sie der Klasse der *Bacilli* zuzuordnen. Weiterhin werden Staphylokokken der Ordnung der *Bacillales* und zusammen mit den Gattungen *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus* und *Salinicoccus* der Familie der *Staphylococcaceae* zugeteilt (4).

Mittlerweile sind 41 Arten entdeckt worden, von denen ein Großteil beim Menschen vorkommt (4). Die beiden bekanntesten Vertreter der Gattung wurden 1884 von Anton Rosenbach isoliert. Er benannte sie nach der Pigmentierung ihrer Kolonien: *Staphylococcus aureus*, abgeleitet von dem lateinischen Wort für Gold, und *Staphylococcus albus* für Weiß. Heute wird dieser aufgrund seines Habitats als *S. epidermidis* bezeichnet.

2.1.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) kann bei 20 % der Bevölkerung auf Haut und Nasenschleimhäuten nachgewiesen werden. Zudem sind weitere 60 % transiente Träger (5). Der Organismus ist in der Lage, superfizielle Hautinfektionen wie Abszesse und Impetigo auszulösen. Weitere gravierende invasive Infektionen sind septische Arthritis, Osteomyelitis und Endokarditis (6). Die Behandlung mit Antibiotika erweist sich als zunehmend schwerer, da immer mehr Stämme Resistenzen gegenüber multiplen Antibiotika entwickeln. Bekannt sind diese hauptsächlich als Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) (7) und Vancomycin-

resistente *S. aureus* (VRSA) (8,9). Die Pathogenität dieses Erregers ist auf seine zahlreichen Virulenzfaktoren zurückzuführen. Beispiele sind der membranständige *Clumping factor*, das Protein A oder extrazelluläre Produkte wie die Staphylokokken-Enterotoxine und das Toxin-Schock-Syndrom-Toxin-1 (6). Eine Besonderheit ist die Bildung von freier Koagulase. Diagnostisch ist die Koagulasebildung das Hauptmerkmal für die Speziesbestimmung von *S. aureus* (10).

2.1.3. *S. epidermidis* und Fremdkörper-assoziierte Infektionen

S. epidermidis gehört zu den Koagulase-negativen Staphylokokken (CoNS; *coagulase negative staphylococci*) und wird der kommensalen Flora der Haut und Schleimhäute des Menschen und anderen Säugetieren zugeordnet (11). Hierbei ist er der vorherrschende Keim der Axillae und Nase (12,13). Analysen des *S. epidermidis* Genoms ergaben, dass die Art eine Vielzahl von Genen besitzt, welche für Proteine kodieren, die an Schutzmechanismen vor den rauen Bedingungen in ihrem natürlichen Habitat beteiligt sind (13). So besitzt dieses Bakterium acht Ionen/Protonen-Austauscher und sechs Transportsysteme für Osmoprotektanten, um mit den extremen Salzkonzentrationen und dem osmotischen Druck zurechtzukommen. Zudem wird ihm eine probiotische Funktion zugeschrieben, indem es die Besiedlung von bestimmten Pathogenen, wie zum Beispiel *S. aureus*, verhindert.

Im Vergleich zu *S. aureus* produziert *S. epidermidis* keine aggressiven Virulenzdeterminanten.

S. epidermidis wurde somit lange Zeit nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt, da man den Erreger als apathogenes Hautbakterium betrachtete, das mit seinem Wirt in einem rein symbiontischen Verhältnis lebt.

Heute ist *S. epidermidis* jedoch als wichtiges opportunistisches Pathogen zu sehen. Unter den CoNS verursacht er die höchste Anzahl an Infektionen (14,15). Insbesondere repräsentiert *S. epidermidis* die Hauptursache nosokomialer fremdkörper-assoziiierter Infektionen. Bei diesen Fremdkörpern handelt es sich um medizinische Instrumente wie zum Beispiel künstliche Herzklappen, Herzschrittmacher, zentrale Venenkatheter, Hüft- und Knieprothesen als auch künstliche Brustimplantate (15). Diese Infektionen resultieren in der Regel aus der Kontamination der Bakterien von der Haut des Patienten während einer Operation, in der ein medizinisches Instrument insertiert wird. Die Anzahl der Infektionen ist in den letzten Jahren erheblich gestiegen (16,17).

Hierbei korreliert der Anstieg mit dem erhöhten Einsatz dieser Instrumente. Allein in Deutschland treten bis zu 100.000 dieser Infektionen pro Jahr auf.

Eine erschwerende Tatsache ist, dass die Behandlung einer *S. epidermidis*-Infektion mit Komplikationen verbunden ist. Viele Stämme besitzen spezifische antibiotische Resistenzgene. Zusätzlich hat *S. epidermidis* die Fähigkeit, Biofilme zu bilden, die eine intrinsische Resistenz gegenüber Antibiotika verfügen (18). Beispiele hierfür sind *S. epidermidis*-Stämme, die gegenüber Methicillin (MRSE; *methicillin-resistant S. epidermidis*) und Oxacillin resistent sind. Die Resistenz gegenüber Methicillin wird durch das *mecA*-Gen kodiert, welches über *mec1* und *mecR1* reguliert wird. Um die Bakterien zu zerstören, bindet Methicillin Penicillin-Bindeproteine (PBP, *penicillin-binding proteins*), um sie zu deaktivieren. Diese Proteine sind an dem Zusammenbau der Zellwand von Mikroorganismen beteiligt und deren Deaktivierung führt zur Abtötung der Bakterien. Die Resistenz beruht nun darauf, dass über *mecA* ein zusätzliches PBP, PBP2a, exprimiert wird, welches nicht an Methicillin bindet (19).

Die Konsequenz der problematischen Antibiotikatherapie ist fast ausnahmslos die chirurgische Entfernung und Ersetzung des jeweiligen medizinischen Apparates. Ist dies nicht die geeignete Option, so wird dem Patienten eine periodische Antibiotikatherapie über einen Zeitraum von mehreren Jahren vorgeschlagen (20,21). Dies bedeutet, dass es nicht nur zu medizinischen Spät komplikationen kommt, sondern auch zu ökonomischen: beispielsweise belaufen sich die Kosten allein für katheterassoziierte Blutstrominfektionen auf 2 Milliarden US\$ pro Jahr in den Vereinigten Staaten (15,22,23).

2.2. Biofilme

Biofilme sind definiert als multizelluläre, oberflächengebundene Anhäufungen von Mikroorganismen, die von einer polymeren, hydrierten Matrix umgeben sind (24).

Sie repräsentieren eine signifikante und bisher unvollständig verstandene Form des bakteriellen und archaealen Wachstums. Die Biofilmbildung erscheint zum ersten Mal vor 3,25 Milliarden Jahren als dokumentierter fossiler Fund aus hydrothermalen Umgebungen (25,26).

Ähnliche Biofilmstrukturen erscheinen auch heute in modernen hydrothermalen Umgebungen wie z.B. in heißen Quellen („*hot springs*“) oder in rauchenden Schloten in der Tiefsee („*Black Smokers*“) (27,28). Im Kontext der Evolution und Adaption ist es naheliegend, dass die Biofilmbildung eine Anpassung an die rauen Bedingungen der Frühzeit der erdgeschichtlichen Entwicklung ist (extreme Temperaturen, pH und ultraviolettes Licht). Dadurch konnten komplexe Interaktionen zwischen einzelnen Zellen vereinfacht werden, was für die Entwicklung von Signaltransduktionswegen und chemotaktischen Bewegungen

ausreichte (29). So zeigen zum Beispiel bakterielle Zellen, die sich in unterschiedlichen Regionen des Biofilms befinden, auch unterschiedliche Muster in der Genexpression (30).

Für pathogene und opportunistische Bakterien stellt die Fähigkeit, Biofilme zu bilden, ebenso eine geschützte Form von Wachstum dar, welches das Überleben in einem fremden Organismus gewährleistet (24,31). In der Regel verlaufen diese Infektionen chronisch.

Neben Staphylokokken sind einige weitere Gattungen bekannt, die durch ihre Fähigkeit der Biofilmbildung, Infektionen auslösen können. Diese stehen meist im Zusammenhang mit Schleimhaut-assoziierten Geweben, wie zum Beispiel dem respiratorischen, oralen oder urogenitalen Epithel. Mikroskopische Analysen von Sputum oder Lungenbiopsien von Patienten, die von der genetisch bedingten autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung Zystische Fibrose (CF; *cystic fibrosis*) betroffen sind, ergeben, dass der opportunistische Erreger *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm-Strukturen in der CF-Lunge bildet, um eine chronische Infektion zu etablieren (32-34). *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* und *Streptococcus pneumoniae* gehören zur Gruppe der Bakterien, die eine chronische *Otitis media* verursachen können (35). Viele *in vitro*- und *in vivo*- Versuche haben gezeigt, dass diese Bakterien in der Lage sind, Biofilme zu bilden und somit zu persistieren (36-41).

Auch Parodontalerkrankungen, zum Beispiel Gingivitis, werden durch bakterielle Biofilme, die auf den Zähnen angrenzend zum Zahnfleisch akkumulieren, verursacht. Beteiligte Pathogene sind unter anderem *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, und *Treponema denticola* (42).

2.3. Biofilmbildung bei *S. epidermidis*

Die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* handelt sich in drei Phasen ab:

1. Anheftung
2. Akkumulation, Reifung zu einem differenzierten Biofilm
3. Freisetzung und Verbreitung planktonischer Zellen vom Biofilm

Im Folgenden sollen diese einzelnen Phasen und die daran beteiligten Faktoren im Detail beschrieben werden (Abb. 1).

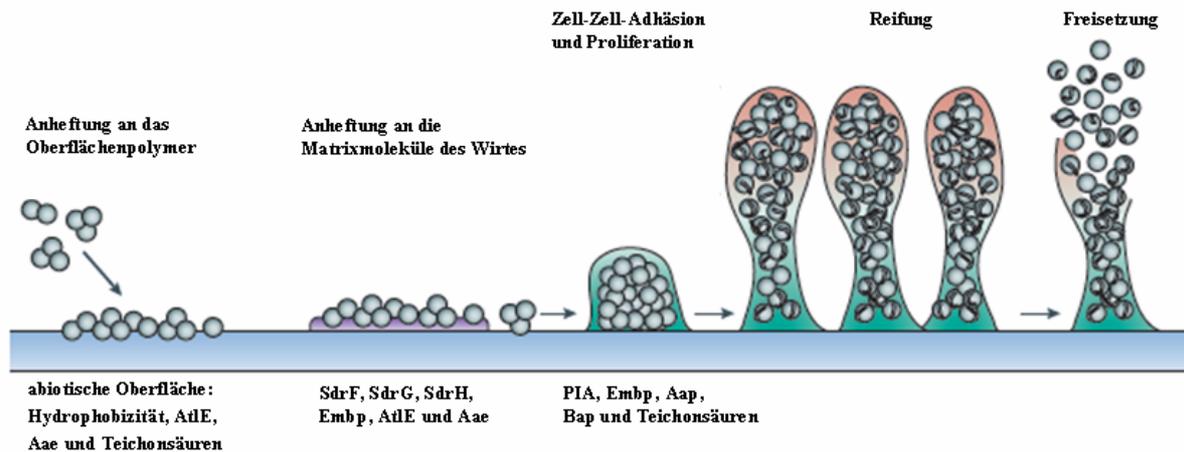


Abb. 1: Biofilmbildung bei *S. epidermidis*. Die Anheftung an unbeschichtetes Material hängt hauptsächlich von der Hydrophobizität der Zelloberfläche ab, während die Adhäsion an Wirtsmatrixmoleküle, die die medizinischen Fremdkörper bedecken, über bestimmte bakterielle Oberflächenproteine vermittelt wird. Nach der Adhäsion an die Oberfläche kommt es über Exopolysaccharide, wie zum Beispiel PIA, und spezifischen Proteinen wie Aap, Embp und Bap sowie zu einem kleinen Teil über akzessorische Makromoleküle (zum Beispiel Teichonsäuren) zur interzellulären Aggregation und im Anschluss zur Reifung zu einem differenzierten Biofilm. Der letzte Schritt beinhaltet die Freisetzung planktonischer Bakterien oder kleinerer Zellaggregate. Verändert nach (43).

2.3.1. Anheftung

Die Biofilmbildung beginnt mit einer initialen Adhäsion von Zellen an eine Oberfläche. Die Adhäsion an abiotische Oberflächen (zum Beispiel an Polyethylen) geschieht hauptsächlich über die Hydrophobizität der bakteriellen Zelloberfläche (44). Diese Hydrophobizität ist durch bestimmte Proteine wie zum Beispiel das bifunktionale Adhäsins und Autolysin (Atl) AtlE (45) und das Biofilm-assoziierte Protein (Bap; *biofilm associated protein*) (46) gegeben. In *in vivo* werden diese abiotischen Oberflächen (wie zum Beispiel die der künstlich eingesetzten medizinischen Instrumente) schnell mit Matrixmolekülen des Wirtes bedeckt. Um mit diesen zu interagieren, besitzt *S. epidermidis* die sogenannten "Mikrobielle-Oberflächenkomponenten-die-adhäsive-Matrixmoleküle-erkennen" (MSCRAMMs, *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Diese sind entweder über das Enzym SortaseA (47) an die bakterielle Zelloberfläche oder über nicht-kovalente Bindungen an Oberflächenpolymere wie Teichonsäuren gebunden (48). An Kollagen und Fibronectin kann *S. epidermidis* über seine kovalent-gebundenen Proteine SdrG (Serin-Aspartat-Family-Protein G, bekannt auch als Fbe (*fibronectin binding protein*; Fibronectin bindendes Protein) und SdrF binden (49,50). Die nicht-kovalent gebundenen Autolysine AtlE und Aae können auch mit Kollagen und Fibronectin sowie mit Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin

interagieren. Die Interaktion mit Kollagen und Fibronectin hat sich allerdings als weniger spezifisch gezeigt (45,51).

2.3.2. Akkumulation

Nach der initialen Adhäsion prägen sich Biofilme weiter durch interzelluläre Aggregation aus, welche durch verschiedene Makromoleküle vermittelt werden kann. Hauptsächlich beinhalten diese Exopolysaccharide und Proteine. Zusätzlich können auch Teichonsäuren und extrazelluläre Desoxyribonukleinsäuren (DNS) aus lysierten Zellen akzessorische Funktionen in der Phase der Aggregation aufweisen (52).

2.3.2.1. Das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA; *polysaccharide intercellular adhesin*)

PIA wird von vielen *S. epidermidis*-Stämmen produziert. Hierbei handelt es sich um ein Poly-N-Acetylglukosamin (PNAG)-Homopolymer, das sich von anderen Polymeren wie zum Beispiel Chitin durch seine β -1,6-Verknüpfung unterscheidet (53) (Abb. 2A).

Neben *S. epidermidis* wird es auch von anderen Mikroorganismen wie *S. aureus* (54) *Yersinia pestis* und *Escherichia coli* generiert (55,56). PIA lässt sich in zwei Polysaccharidisformen aufreinen: PIA I und PIA II (53). PIA I besteht aus 130 Resten und annähernd 20 % der N-Acetylglukosamin-Reste sind deacetyliert, was für die funktionale Aktivität entscheidend ist (57). PIA II gleicht strukturell PIA I, aber es enthält einen geringeren Anteil an deacetylierten N-Acetylglukosaminresten, dazu Phosphate und veresterte Succinate.

Die Synthese und Deacetylierung von PIA erfolgt durch die Genprodukte des *ica* (interzelluläre Adhäsion; *intercellulare adhesion*) *AIBC*-Lokus (Abb. 2B).

Dieser ist Teil des *ica*-Operons, welches zusätzlich das regulatorische Element *icaR* enthält (58,59).

IcaA, C und D sind in der bakteriellen Membran lokalisiert (Abb. 2C). IcaA enthält vier Transmembranhelices und besitzt eine N-Acetylglukosamin-Transferase-Aktivität mit UDP-N-Acetylglukosamin als Substrat. IcaA allein zeigt jedoch nur eine geringe Transferase-Aktivität. Wird es zusammen mit IcaD co-exprimiert, so steigt die Transferase-Aktivität um das 20-fache. Zusammen mit IcaD, ein Chaperon, welches für die korrekte Faltung und Insertion in die Membran von IcaA verantwortlich ist, produziert IcaA somit eine Kette von aktiviertem N-Acetylglukosamin-Monomeren. Die Funktion von IcaC ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Jedoch erreichen N-Acetylglukosamin-Oligomere, die durch IcaAD produziert worden sind, nur eine Länge von 20 Resten. Werden die *icaAD*-Gene aber mit

icaC co-exprimiert, entstehen längere Oligomerketten, die mit einem spezifischen PIA-Antiserum reagieren, wohingegen kürzere oligomerische N-Acetylglucosamine keine Reaktion mit diesem eingehen können. Zudem führt die Inaktivierung dieses Transmembranproteins zu einem kompletten Ausfall des biofilmpositiven Phänotyps (58). Derzeit wird spekuliert, dass IcaC bei der Translokation des Polysaccharids durch die zytoplasmatische Membran eine Rolle spielen könnte (59) (Abb. 2C). Nach dem Transport entfernt IcaB, eine Deacetylase, die auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, einige der N-Acetylgruppen, um dem Polymer einen kationischen Charakter zu verleihen, der für die Anheftung an eine Oberfläche und verschiedene Funktionen in der Biofilmbildung essentiell ist (57).

Die *ica*-Gene wurden durch die Isolierung und Analyse von biofilmmnegativen Transposon-Insertionsmutanten von *S. epidermidis* O47 identifiziert (60).

Dies wurde durch eine weitere Arbeit mit dem Stamm *S. epidermidis* 1457 unterstützt. Auch hier wurden Tn917-Transposonmutanten mit einem biofilmmnegativen Phänotyp charakterisiert.

Eine für diese Arbeit wichtige Mutante, 1457-M10, zeigt beispielsweise eine Inaktivierung von IcaA durch Insertionen im *icaA*-Gen. Diese Insertionen führen zum vollständigen Ausfall der PIA-Synthese (61). Die Mutante hat somit die Fähigkeit zur primären Adhäsion behalten, kann jedoch nicht zu einem vollständigen Biofilm akkumulieren.

Die Produktion von PIA wird durch viele globale Regulatoren beeinflusst (62-67). Bisher ist jedoch noch nicht vollständig verstanden, welche Umweltsignale einen Einfluss auf die PIA-Expression haben. Aber die Komplexität dieser Regulation zeigt einen Hinweis auf die Wichtigkeit von PIA in Bezug auf die Pathophysiologie von *S. epidermidis*.

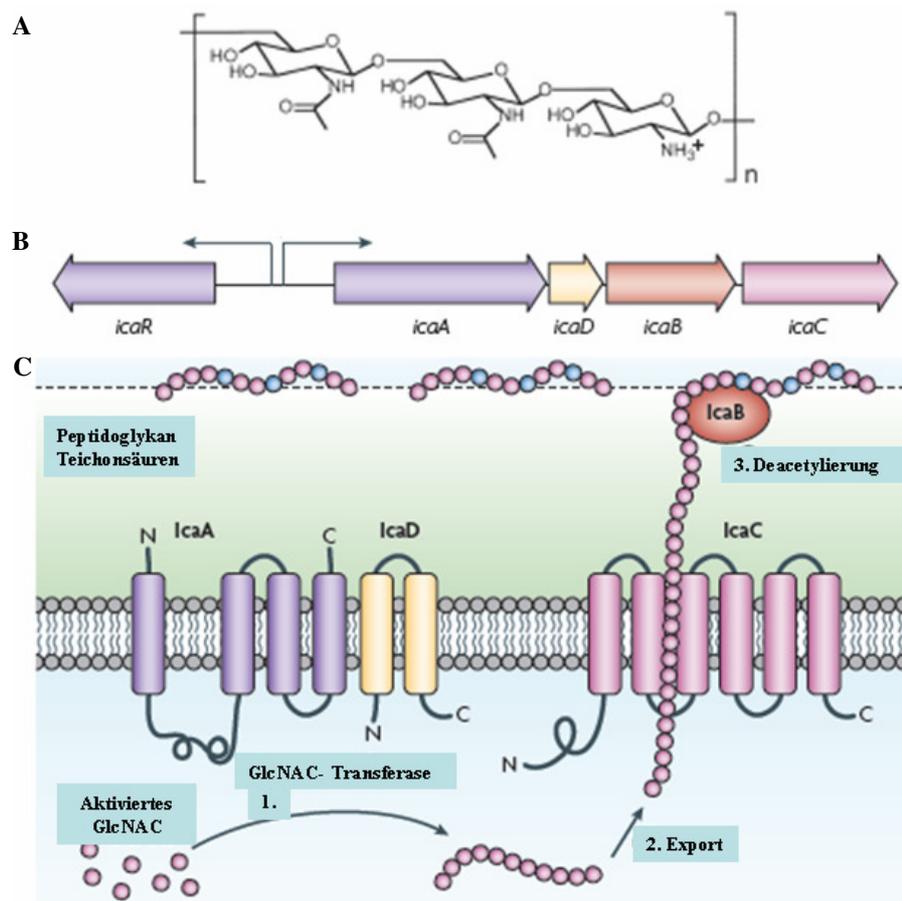


Abb. 2: Das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin (PIA). **A.** Struktur des PIA. Das Polysaccharid ist ein lineares Homoglykan bestehend aus β -1,6-verknüpften N-Acetylglucosaminresten; 20 % dieser Reste sind deacetyliert und demnach positiv geladen. Verändert nach (53). **B.** Die Synthese und Deacetylierung von PIA wird durch den *ica*- Genlokus kontrolliert. Dieser enthält das *icaADBC*- Operon und das *icaR*- Gen, welches für ein regulatorisches Protein kodiert. Die Expression des *icaADBC*-Operon wird entweder direkt am *icaA*-Promotor oder durch die Expression von *icaR* reguliert. Beide werden wiederum durch eine Reihe globaler regulatorischer Proteine (zum Beispiel SigB, SarA, LuxS) kontrolliert. **C.** PIA wird durch die membranintegrierte N-Acetyl-Glucosamin-Transferase IcaA synthetisiert. Zur Aktivierung benötigt diese das akzessorische Membranprotein IcaD (Schritt 1). Die wachsende Polysaccharidkette wird wahrscheinlich durch das Membranprotein IcaC exportiert. (Schritt 2). IcaB, eine Deacetylase, die an der Zelloberfläche lokalisiert ist, entfernt einige der N-Acetylgruppen, um dem Polymer einen kationischen Charakter zu verleihen, der für die Anheftung an Oberflächen von essentieller Bedeutung ist. Verändert nach (43).

2.3.2.2. Das Akkumulations-assoziierte Protein (Aap; *accumulation-associated protein*)

Vor nicht langer Zeit wurde erkannt, dass PIA nicht in allen *S. epidermidis*- Stämmen für die Biofilmbildung von Bedeutung ist: Stämme, denen die *ica*-Gene fehlen, sind auch dazu befähigt, Biofilme zu bilden (68). Einige Stämme, die in einer klinischen Studie von Infektionen an Gelenkendoprothesen isoliert wurden, wiesen einen biofilmpositiven, aber *ica*-

negativen Phänotyp auf (69). *S. epidermidis* RP62A ist beispielsweise ein Stamm, der Biofilme über ein bestimmtes Oberflächenprotein, das *accumulation-associated protein* (Aap), bildet. Entdeckt wurde dieses durch die Erstellung einer Mutante (M7) mithilfe einer Mitomycin-Mutagenese. Diese Mutante wies zwar die Fähigkeit zur Adhäsion auf, zeigte aber eine Defizienz bezüglich der Akkumulation auf Oberflächen wie Glas oder Polystyren. Der Unterschied zum Wildtyp lag im Fehlen eines Proteins. Nach Aufreinigung und Herstellung eines Antikörpers gegen dieses 140 kD-Protein stellte sich heraus, dass dieses nur in extrazellulären Produkten der Bakterien vorkommt (70). Zuerst wurde angenommen, dass Aap als Zellwandrezeptor für PIA fungiert (71). Dann konnte aber mithilfe des klinisch signifikanten Stammes *S. epidermidis* 5179 gezeigt werden, dass Aap die interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung in einem vollständig Polysaccharid-unabhängigen Hintergrund vermitteln kann (72) (Abb. 3). Dieser Stamm, der aus einer ventrikuloatrialen Shuntinfektion isoliert worden ist, trägt eine Insertion des aktiven genetischen mobilen Elements IS257, das zur Unterbrechung der *icaADBC*-Transkription führt. Dies resultiert in einem PIA- und biofilmbildungsnegativen Phänotyp. Da aber bekannt ist, dass die Staphylokokken, die derartige Infektionen auslösen, nur durch Biofilmbildung persistieren können, kam man schnell zu der Annahme, dass es in diesem und in anderen Stämmen PIA-unabhängige Faktoren und Mechanismen geben muss, die eine Biofilmbildung vermitteln. Die Anreicherung des Stammes *S. epidermidis* 5179 über mehrere Passagen führte tatsächlich zu einem biofilmpositiven Phänotypen, bezeichnet als 5179-R1. Bezüglich der primären Anheftung von *S. epidermidis* 5179 und 5179-R1 konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die Revertante bildete aber im Gegensatz zu *S. epidermidis* 5179 mikroskopisch und makroskopisch sichtbare Zellverklumpungen. Trotzdem trug sie immer noch das IS257-Element im *icaA*-Gen wie der parentale Stamm. Durch eine Perjodat-Oxidation konnte die Beteiligung eines alternativen Polysaccharides ausgeschlossen werden. Dass es sich bei dem Stamm *S. epidermidis* 5179-R1 um proteinabhängige Strukturen handelt, die Biofilmbildung vermitteln, fand man durch die Behandlung mit Proteinase K heraus. Hierbei kam es zur vollständigen Zerstörung des Biofilms, während die Biofilme PIA-abhängiger Stämme, wie *Staphylococcus epidermidis* 1457, intakt blieben. Nach Aufreinigung und Massenspektrometrie konnte festgestellt werden, dass es sich auch bei diesem Stamm um das Adhäsionsmolekül Aap handelt.

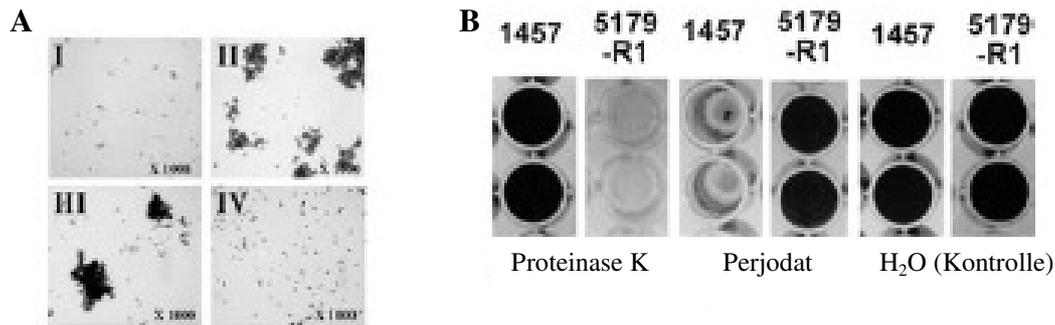


Abb. 3: *S. epidermidis* 5179-R1 bildet Protein-abhängige Biofilme. **A.** Gram-Färbung von (I) dem planktonischen, biofilmbnegativen Stamm *S. epidermidis* 5179 und (II) von der biofilmpositiven Revertante 5179-R1. *S. epidermidis* 5179-R1 nach Behandlung mit Peridat (III) und Proteinase K (IV). **B.** Nach Zugabe von Peridat wird der Biofilm des PIA-abhängigen Stammes *S. epidermidis* 1457 vollständig zerlegt und ist in Gegenwart von Proteinase K resistent. Im Kontrast dazu bleibt der Biofilm des Stammes *Staphylococcus* 5179-R1 bei einer Behandlung mit Peridat stabil, zerfällt aber durch die Aktivität der Proteinase K. Diese Versuche führten zu dem Resultat, dass die Biofilmbildung in *S. epidermidis* 5179 Polysaccharid-unabhängig und Protein-abhängig reguliert ist. Verändert nach (72).

Die Wichtigkeit der *aap*-kodierenden Gene wurde in einer Studie von Araujo *et al.* im Jahr 2006 gezeigt, in der 82% der Methicillin-resistenten *S. epidermidis*-Isolate das *aap*-Gen besitzen (73).

Aap ist ein Zellwand-verankertes Protein, das durch die im Biofilm gebundenen Zellen ebenso in extrazelluläre Flüssigkeiten abgegeben werden kann (74). Wie andere Zellwand-verankerte Proteine ist Aap in verschiedene, distinkte Domänen eingeteilt (75) (Abb. 4):

1. in ein N-terminales Exportsignal
2. in eine N-terminale Domäne A, die aus 16 Aminosäure-Wiederholungseinheiten besteht
3. in eine α/β -Region
4. in eine Domäne B aus 13 Wiederholungseinheiten, bestehend aus 128 Aminosäuren (G5-Domänen)
5. in 19 Prolin-reiche Tandemrepeats bestehend aus 6 Aminosäuren
6. in eine Sortase- Erkennungssequenz, LPXTG, die als grampositiver Zellwandanker dient
7. in eine hydrophobe Transmembranregion
8. in einem positiv geladenen zytoplasmatischem Ende am C- Terminus

Die Wiederholungseinheiten innerhalb der Domäne B wurden vor kurzem als G5- Domänen (benannt nach der Präsenz konservierter Glycin-Reste) definiert. Diese Domänen kommen häufig in Oberflächenproteinen von grampositiven Bakterien, Zn^{2+} -Metalloproteasen und in

anderen bakteriellen Virulenzfaktoren vor (76). Kürzlich wurde mittels Ultrazentrifugation und Zirkulardichroismus festgestellt, dass auch die G5-Domänen in Aap Zink-abhängige Adhäsionsmoleküle sind, die den Cadherin-Domänen der Säugetiere analog sind. Die G5-Domäne dimerisiert in Anwesenheit von Zn^{2+} und baut 2-3 Zn^{2+} -Ionen in die Mitte des Dimers ein. Beieinanderliegende G5-Domänen assoziieren dabei in modularer Art und Weise. Daher wird gegenwärtig spekuliert, dass es sich bezüglich der G5-basierenden interzellulären Adhäsion um einen Zink-Zipper-Mechanismus handeln könnte. Mithilfe eines Zn^{2+} -Chelations kann die Biofilm-Bildung in *S. epidermidis* spezifisch inhibiert werden (77).

Aap kann in zwei verschiedenen Formen auf der Zelloberfläche vorkommen: entweder in voller Länge (220 kD) oder in verkürzter Form (140 kD). Die verkürzte Form von Aap besteht hauptsächlich aus der repetitiven B-Domäne und vermittelt Biofilmbildung in einer PIA-unabhängigen Weise. Die N-terminale Domäne ist für die Festlegung der aggregativen Eigenschaften von Aap verantwortlich: mit aufgereinigter Domäne B ist es möglich, die Biofilmbildung zu inhibieren, mit aufgereinigter Domäne A gelingt dies jedoch nicht. In der gleichen Arbeit wurde illustriert, dass die Verkürzung von Aap für die Biofilmbildung sogar notwendig ist, da die Expression der verkürzten Isoform in dem biofilmbildungsfähigen *S. epidermidis*-Stamm 1585 zu einer Biofilmbildung führt. Eine Expression des vollständigen Proteins in 1585 resultiert jedoch in einem verbleibenden biofilmbildungsfähigen Phänotyp (72). Diese Ergebnisse liefern Beweise dafür, dass die Domäne A des Proteins nicht in der Biofilmbildung involviert ist und dass sich die Biofilmbildung nur dann ereignet, wenn Aap in verkürzter Form durch die Abtrennung von Domäne A vorliegt. Durch die Zugabe eines breitspektrum-Protease-Inhibitors, α -2-Makroglobulin, kommt es zur Inhibition der Biofilmbildung, was darauf schließen lässt, dass Aap proteolytisch gespalten werden muss, um seine adhäsive Funktion zu erhalten (72).

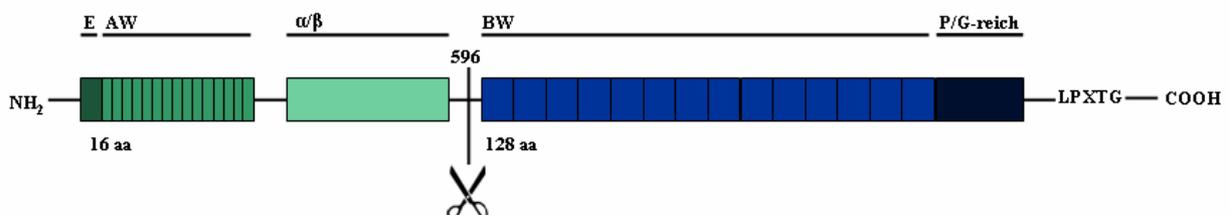


Abb. 4: Schematische Präsentation von Aap. Das Protein besteht aus einem N-terminalen Exportsignal (E), einer N-terminalen Domäne aus den Wiederholungseinheiten A (AW), einer globulären α/β -Region, einer Domäne aus den Wiederholungseinheiten B (BW), einer kollagen-ähnlichen, Prolin/Glycin-reichen Domäne (P/G-reich) und einem C-terminalen LPXTG-Motiv, das einen Zellwandanker enthält. Die Stelle der Proteolyse (AS 596) ist mit einer Schere gekennzeichnet. Verändert nach (72) und (77).

2.3.2.3. Das Extrazelluläre-matrixbindende Protein (Embp; *extracellular matrix binding protein*)

Ein zweites Zelloberflächenprotein, das Embp, spielt ebenso eine wichtige Rolle in proteinvermittelter PIA-unabhängiger Biofilmbildung in *S. epidermidis*. Der Stamm 1585 wurde aus einer Portinfektion isoliert. Durch Anreicherung dieses Stammes entsteht ähnlich wie bei *S. epidermidis* 5179 eine biofilmbildende Revertante, 1585v, die im Gegensatz zu ihrem parentalen Stamm Zellaggregate bildet, welche aus der Expression interzellulärer adhäsiver Zelloberflächeneigenschaften resultiert (78). Um zu beweisen, ob es sich bei den adhäsiven Oberflächenmolekülen um Polysaccharide oder Proteine handelt, wurde der Biofilm dieses Stammes im Vergleich zum Polysaccharid-abhängigen Stamm einmal mit DispersinB, eine glykosidische Hydrolase, die die Hydrolyse spezifisch von β -1,6-verknüpften Poly-N-Acetyl-Glukosamin katalysiert (79), und einmal mit Proteinase K behandelt (Abb. 5). Der Stamm *S. epidermidis* 1585v zeigte im Vergleich zu *S. epidermidis* 1457 keinen Effekt, wurde aber durch die Proteinase K vollständig abgebaut. Um etwas über die Mechanismen, die in der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1585v involviert sind, herauszufinden, konnten Rohde *et al.* mittels einer Tn917-Mutagenese zwei Mutanten selektieren, die in ihrer Fähigkeit, Biofilme zu bilden, inhibiert (Transduktante 135) beziehungsweise beeinträchtigt (Transduktante 84) waren. Die entsprechende Transposon-Insertion wurde mithilfe einer Phagentransduktion wieder zurück in den Stamm *S. epidermidis* 1585v transduziert und die Transduktanten M84 und M135 zeigten den gleichen biofilmbildenden Phänotypen. Da keine signifikanten Unterschiede zwischen *S. epidermidis* 1585v und M135 bezüglich der primären Adhäsion festzustellen waren, konnte darauf geschlossen werden, dass der biofilmbildende Phänotyp der Mutanten aus der direkten oder indirekten insertionalen Inaktivierung der Strukturen, die an der interzellulären Adhäsion beteiligt sind, resultiert. Durch die Amplifikation und die folgende Sequenzierung der chromosomalen Sequenzen, welche die Tn917-Insertion flankieren, konnte die Lokalisierung der Transposoninsertionen in *S. epidermidis* 1585-M84 und 1585-M135 auffindig gemacht werden. Durch einen Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit einer Datenbank konnte festgestellt werden, dass die Transposon-flankierenden Sequenzen der Mutanten mit Sequenzen übereinstimmen, die sich innerhalb eines einzelnen 30612 bp offenen Leserahmens von *S. epidermidis* RP62A befinden. Diese kodieren für das 1MDa Embp.

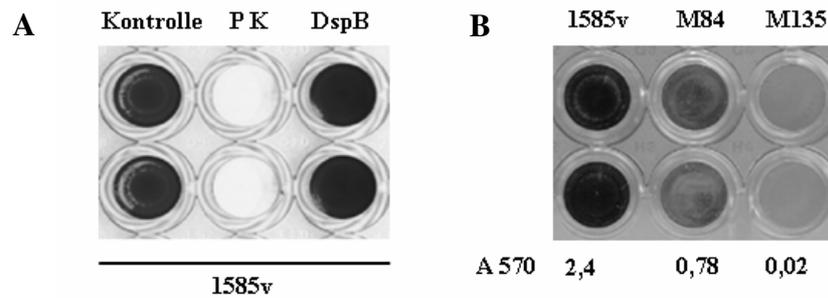


Abb. 5: Analyse der Biofilmbildung in *S. epidermidis* 1585v und den Mutanten M84 und M135. **A.** *S. epidermidis* 1585v bildet Protein-abhängige Biofilme: durch die Behandlung mit DspB bleibt der Biofilm intakt, während er durch die Aktivität von Proteinase K degradiert wird. **B.** Darstellung der Biofilmphänotypen: *Staphylococcus epidermidis* 1585v weist eine intakte Biofilmbildung auf, während die Mutanten M84 und M135 einen beeinträchtigten beziehungsweise einen negativen Biofilmphänotyp zeigen.

Embp ist in folgende Domänen eingeteilt (Abb. 6):

1. ein N-terminales Exportsignal, YSIRK
1. 59 FIVAR (*found in various architectures*) Domänen
2. 38 GA (*protein G-related albumin binding*) Domänen
3. 4 Domänen unbekannter Funktion 1542 (DUF1542, *domain of unknown function 1542*)
4. eine C-terminale Transportdomäne

Embp besitzt eine N-terminale YSIRK-Domäne. Das YSIRK-Motiv wird in die Gruppe der Signalpeptide eingeordnet. Götz und Rosenstein bemerkten die Anwesenheit eines Signalpeptid-Motivs das erste Mal in staphylokokkalen Lipasen (80). Allerdings fehlt dem Protein ein LPXTG-Motiv, was zu der Annahme führt, dass Embp über eine nicht-kovalente Bindung in die Zellwand integriert wird.

Der größte Teil des Embps besteht aus FIVAR- und GA-Domänen. Über deren Funktion ist bisweilen nur wenig bekannt. Da der FIVAR-Domäne Aminosäurereste fehlen, die einer katalytischen Aktivität zuzuordnen sind, ist es naheliegend, dass es sich hierbei um eine Bindungsdomäne handelt. Williams *et al.* konnten zeigen, dass dieses eine Bindung mit Fibronectin eingehen kann (81). Dies könnte dem Protein eine wichtige Bedeutung in der primären Adhäsion zukommen lassen. Weiterhin wird angenommen, dass N-Acetylglukosamin ein möglicher Ligand sein könnte. FIVAR-Domänen sind hierbei in dem Zellwand-assoziierten FmtB-Protein in *S. aureus* (82) und in der Gellan-Lyase GL1 in *Bacillus sp.* vorzufinden (83). Über GA-Module ist bekannt, dass sie mit humanem Serumalbumin (HSA) interagieren. Eine Vielzahl von grampositiven, humanpathogenen Bakterien

exprimieren Zelloberflächenproteine, die eine Bindung mit HSA mit einer hohen Spezifität und Affinität eingehen (48). Das bekannteste ist das Protein G der Gruppe C und G Streptokokken sowie das Protein PAB von *Fingoldia magna*. *Fingoldia magna* ist ein Teil der normalen humanen Flora, aber die Stämme, die das Protein PAB exprimieren, wurden aus Patienten mit suppurativen Infektionen isoliert. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass eine Interaktion zwischen der bakteriellen Zelloberfläche und HSA zu einem höheren bakteriellen pathogenen Potential führen könnte (84). Kürzlich wurde die Kristallstruktur von FIVAR-GA-Wiederholungseinheiten des *S. aureus* Embp-homologen Ebh entschlüsselt (85). Hier wurde vorgeschlagen, dass jede FIVAR-GA-Wiederholungseinheit aus zwei distinkten dreifachen Helixbündeln besteht, die entlang der Achse des Moleküls miteinander verbunden sind. Dies resultiert in einer stäbchenförmigen Struktur mit einer Länge von 320 nm. Da angenommen werden kann, dass Embp eine ähnliche Struktur wie Ebh aufweist, könnte man darauf schließen, dass durch Embp eine komplexe, multidimensionale Biofilmarchitektur gebildet werden kann. Desweiteren könnten auch die DUF1542- und die Transmembranregion wichtige Funktionen bezüglich der adhäsiven Eigenschaften von Embp erfüllen. Das Motiv DUF ist beispielsweise in vielen bakteriellen Glykosyltransferasen vorzufinden. Kürzlich wurde entdeckt, dass das DUF1975-Motiv für die Glykosylierung und Biogenese eines Streptokokken-Adhäsins, Fap1, wichtig ist (86).

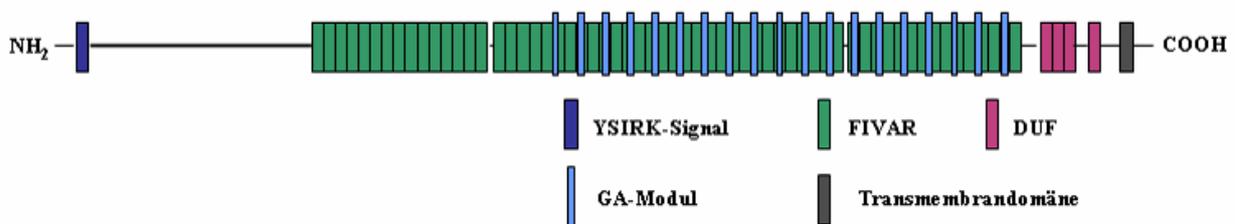


Abb. 6: Schematische Präsentation von Embp. Das Protein besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid YSIRK, 59 FIVAR-Domänen, 38 GA-Domänen, 4 DUF1542-Domänen und einer C-terminalen Transportdomäne. Verändert nach (78).

2.3.3. Freisetzung und Verbreitung planktonischer Zellen aus dem Biofilm

In diesem Schritt lösen sich einzelne bakterielle Zellen aus der äußeren Schicht des Biofilms und kolonisieren entferntere Bereiche über erneute Biofilmbildung. Im Vergleich zur interzellulären Aggregation ist die Strukturierung und Freisetzung planktonischer Bakterien aus einem Biofilm in *S. epidermidis* bisher wenig verstanden. Bekannt ist, dass die

Freisetzung über das *Quorum-Sensing*-System *agr* (*accessory gene regulator*) kontrolliert wird. Biofilme, die eine Inhibition des *agr*-Systems aufweisen, sind wesentlich dicker, da der Prozess der Freisetzung gestört ist (87). Zwei Freisetzungsmechanismen wurden bisher vorgeschlagen. Der erste beinhaltet eine enzymatische Degradierung der Biofilm-Exopolymere und die Lösung nicht-kovalenter Interaktionen durch Detergent-ähnliche Moleküle. Die enzymatische Degradierung durch Serin-Proteasen von Proteinfaktoren des *agr*-Systems konnte bisher in *S. aureus* (88), nicht aber in *S. epidermidis* gezeigt werden. Jedoch produziert *S. epidermidis* eine Reihe von Exoproteasen mit geringer Substratspezifität, die möglicherweise Zelloberflächenproteine zerlegen könnten (89,90). Im Vergleich zu vielen anderen Bakterien, die Enzyme für die Hydrolyse von Poly-N-Acetyl-Glukosamine besitzen (91), ist bei *S. epidermidis* noch keines gefunden worden, das der Degradierung seines Exopolysaccharides/PIA dienen könnte. Hier kämen alternativ die Detergent-ähnlichen Moleküle in Frage, die nicht-kovalente Bindungen wie die zwischen dem kationischen PIA und anionischen Oberflächenmolekülen oder zwischen hydrophoben Regionen auf der bakteriellen Zelloberfläche, lösen. Solche Funktionen sind für die amphipathischen Phenol-löslichen Moduline (zum Beispiel das *S. epidermidis* δ -Toxin) vorgeschlagen worden (92). Diese sind zudem strikt über das *agr*-System reguliert (93).

2.4. Das Immunsystem- ein Überblick

Schädigende Einflüsse von außen (zum Beispiel Bakterien und andere Erreger) oder innen (zum Beispiel entartete Zellen) werden mit dem Immunsystem konfrontiert. Bei Vertebraten setzt sich das Immunsystem aus zwei Komponenten zusammen, dem angeborenen, unspezifischen und dem erworbenen, spezifischen Immunsystem. Beide Komponenten bilden zusammen einen sich ergänzenden Abwehrmechanismus gegen Fremdstoffe, unterscheiden sich aber vor allem hinsichtlich ihrer Aktivierungszeit und ihrer Lernfähigkeit. Eine erfolgreiche Immunantwort basiert auf der Interaktion von angeborenen und erworbenen Effektormechanismen (94).

Die angeborene Abwehr richtet sich zunächst unspezifisch gegen den eindringenden pathogenen Erreger. Die ersten Barrieren für diesen sind die Epithelien, die die Adhäsion der Erreger verhindern und antimikrobielle Enzyme und Peptide sezernieren. Auch der Säuremantel der Haut gehört zur ersten Barriere. Pathogenen, denen es gelungen ist, diese Barrieren zu überwinden, werden mit der nun aktivierten angeborenen Immunität konfrontiert. Hiermit soll zunächst verhindert werden, dass ein Infektionsherd entsteht. Bestimmte molekulare Strukturmuster (PAMP; *pathogen-associated molecular patterns*) des

Erregers werden mithilfe von Mustererkennungsrezeptoren, den sogenannten *pattern recognition receptors* (PRR) erkannt. Diese werden auf vielen Effektorzellen des Immunsystems exprimiert. Zu den wichtigsten gehören die professionellen antigen-präsentierenden Zellen (APZ): Makrophagen und dendritische Zellen. Die Effektorfunktionen werden sofort nach Erkennung und vor der Proliferation ausgeführt. Die PRR werden nach ihrer Funktion in drei Gruppen eingeteilt: solche die 1. in die Sekretion, 2. in die Endozytose und 3. in die Signaltransduktion involviert sind. Sekretierte PRR funktionieren als Opsonine. Diese binden an mikrobielle Zellwände und markieren sie für die Erkennung durch Phagozyten und das Komplementsystem. Der am besten charakterisierte Rezeptor ist das Mannan-bindende Lektin (95,96). Dieser bindet an mikrobielle Kohlenstoffe, um den Lektinweg der Komplementaktivierung einzuleiten. Endozytische PRR befinden sich auf der Zelloberfläche von Phagozyten. Nach Erkennung eines PAMP auf einer mikrobiellen Zelle vermitteln diese Rezeptoren die Aufnahme und Einschleusung des Pathogens in lysosomale Abbauege. Die bakteriellen Proteine werden prozessiert und durch Haupthistokompatibilitäts-komplexe (MHC; *major histocompatibility complex*) auf der Zelloberfläche des Makrophagen präsentiert. Ein Beispiel für einen endozytischen PRR ist der Makrophagen-Mannose-Rezeptor. Dieser erkennt spezifisch Kohlenstoffe mit einer großen Anzahl an Mannoseresten, die charakteristisch für Mikroorganismen sind, und vermittelt so die Phagozytose durch Makrophagen (96). Signaltransduktionsrezeptoren erkennen PAMP und aktivieren Signaltransduktionswege, die die Expression einer Reihe von Genen bezüglich der Immunantwort induzieren. Hierzu gehören zum Beispiel inflammatorische Zytokine. Eine Hauptrolle spielen hier auch die so genannten Toll-like-Rezeptoren (TLR), die in einem eigenen Kapitel aufgeführt werden.

Oft ist die angeborene Immunantwort für die Abwehr eines Pathogenen nicht ausreichend. Sie ist aber die Basis für das Auslösen der erworbenen Immunantwort, die durch die angeborene Immunantwort kontrolliert wird (97,98). Die erworbene Immunantwort wird nach ein paar Tagen aktiviert und beruht auf der Fähigkeit von Immunzellen, Antigene zu erkennen und gegen diese eine spezifische Immunreaktion auszulösen. Die zelluläre Grundlage für das adaptive Immunsystem bilden B- und T-Lymphozyten. Durch klonale Selektion (99) werden Lymphozyten generiert, welche Antigenrezeptoren einer definierten Spezifität für ein Epitop tragen. Nach Kontakt mit dem Antigen durch antigenpräsentierende Zellen (APZ) folgt eine Aktivierung spezifischer Effektormechanismen. B-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche Immunglobulinmoleküle als Antigenrezeptoren (B-Zellenrezeptoren) und sezernieren nach ihrer Aktivierung die Immunglobuline als lösliche Antikörper, die eine Bekämpfung von

Krankheitserregern in den extrazellulären Bereichen des Körpers ermöglichen. Sie vermitteln die humorale Immunität. T-Zellen hingegen vermitteln die zelluläre Immunität. Sie verfügen über Rezeptoren, die Peptidfragmente intrazellulärer Erreger erkennen. Diese Fragmente gelangen mithilfe der Glykoproteine des MHC an die Zelloberfläche. T-Zellen werden in zwei Subpopulationen eingeteilt: CD4⁺-T-Zellen aktivieren vor allem Makrophagen und B-Zellen; CD8⁺-zytotoxische Lymphozyten töten Zielzellen direkt ab. Wenn das Antigen nicht mehr vorhanden ist, durchlaufen die meisten antigenspezifischen Zellen, die bei der klonalen Expansion entstanden sind, eine Apoptose. Einige Zellen überleben jedoch und bilden die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses, das eine schnellere und wirksamere Reaktion auf eine erneute Infektion mit demselben Erreger ermöglicht und zu einer andauernden Immunität führt.

2.5. Toll-Like Rezeptoren

Einer der Mechanismen, mit dem das angeborene Immunsystem die Invasion von pathogenen Mikroorganismen erkennt, wird über die TLRs vermittelt. Diese erkennen bestimmte PAMP, die in mikrobiellen Komponenten enthalten sind. Die Stimulierung der verschiedenen TLRs induziert distinkte Genexpressionsmuster, die nicht nur die angeborene Immunität aktiviert, sondern auch die Entwicklung der antigenspezifischen Immunität einleitet. TLRs gehören einer Familie von evolutionär konservierten Rezeptoren an. Die Entdeckung dieser begann mit der Identifikation von Toll, einem Rezeptor, der von Insekten exprimiert wird und für die Etablierung der dorsoventralen Polarität von essentieller Bedeutung ist (100). Bisher wurden 11 Mitglieder der TLR-Familie in der Klasse der *Mammalia* identifiziert (Tab.1). TLRs sind TypI integrale Membranproteine mit einer extrazellulären Region, die Leucin-reiche Motive enthält. In ihrem zytoplasmatischen Ende besitzen sie die so genannte Toll/II-1R (TIR)-Domäne, eine Region bestehend aus 200 konservierten Aminosäureresten. Nach Ligandenbindung werden über TIR-TIR-Domänenwechselwirkungen die TLR-abhängigen Signale ins Zellinnere weitergeleitet. Die von den TLRs initiierten Signalkaskaden lassen sich primär in zwei Signalwege einteilen. Der erste Signalweg endet in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (101) und der zweite in der Aktivierung der MAPK-(*mitogen-activated protein kinases*)-Signaltransduktionswege.

Rezeptor	Ligand	Ursprung des Liganden	Referenz
TLR1	Triacyllipopeptide	Bakterien und Mykobakterien	(102)
	Lösliche Faktoren	<i>Neisseria meningitis</i>	(103)
TLR2	Lipoprotein/Lipopeptide	Verschiedene Pathogene	(104)
	Peptidoglykan	Grampositive Bakterien	(105,106)
	Lipoteichonsäure	Grampositive Bakterien	(106)
	Phenol-lösliches Modulin	<i>S. epidermidis</i>	(107)
	Zyimosan	Pilze	(108)
TLR3	<i>dsRNA</i>	Viren	(109)
TLR4	Lipopolysaccharid (LPS)	Gram-negative Bakterien	(110)
	Hüll- und Fusionsproteine	Viren	(111,112)
TLR5	Flagellin	Bakterien	(113)
TLR6	Diacyl-Lipopeptide	Mycoplasma	(114)
	Lipoteichonsäure	Grampositive Bakterien	(106)
TLR7/TLR8	Imidazoquinolin	synthetische Komponenten	(115)
	<i>ssRNA</i>	Viren	(116)
TLR9	CpG-DNS	Bakterien und Viren	(117)
TLR10	nicht identifiziert	nicht identifiziert	-
TLR11	nicht identifiziert	uropathogene Bakterien	(118)

Tab.1: TLRs der Klasse *Mammalia*. Die Tabelle führt einige Beispiele der TLRs, ihre entsprechenden Liganden und deren Ursprung auf. Verändert nach (119).

2.5.1. TLR2 und TLR4-vermittelte NF- κ B- und MAPK-Aktivierung

TLR2 und TLR4 sind in der Erkennung verschiedener bakterieller Zellwandkomponenten impliziert. Über TLR4 erfolgt die Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS). Über TLR2 wird zum Beispiel Peptidoglykan erkannt sowie Lipoteichonsäuren grampositiver Bakterien und das synthetische Lipoprotein Pam3-Cys. Die Erkennung von LPS setzt die Anwesenheit der akzessorischen Proteine LBP (*LPS-binding protein*), CD14 und MD-2 voraus (120,121). LBP ist ein lösliches Serumprotein aus der Gruppe der Akute-Phase-Proteine. Dieses erkennt und bindet LPS. Es entsteht LPS/LBP-Komplex, welcher eine Interaktion mit dem Glykoprotein CD14, ein Co-Rezeptor für TLR4, eingeht (122,123). Zusätzlich ist das Glykoprotein MD-2 mit der extrazellulären Domäne des TLR4 assoziiert, das die Sensitivität von TLR4 für LPS erhöht (124). Die Erkennung eines TLR2-Agonisten wie zum Beispiel Pam3-Cys setzt im Vergleich nur die Anwesenheit des Co-Rezeptors CD14 voraus. Werden die TLR2- und TLR4-Agonisten auf den entsprechenden Rezeptorkomplex übertragen, kommt es zur Aktivierung des TLR2 beziehungsweise des TLR4 (Abb. 7). Es kommt zur Konformationsänderung der intrazellulären TIR-Domäne mit nachfolgender Rekrutierung und Assoziation einer Reihe verschiedener Adaptormoleküle (125). MyD88 besitzt eine N-terminale Todesdomäne (DD; *death domain*), über die eine Interaktion mit IL-1-Rezeptor-

assoziierten Kinasen (IRAK) in einem Multiproteinkomplex stattfindet. In diesem wird IRAK1 phosphoryliert und aktiviert, welche ihrerseits dann von MyD88 dissoziiert und TRAF6 (*TNF receptor-associated factor-6*) aktiviert. Die phosphorylierte IRAK1 und TRAF6 bilden anschließend einen Komplex mit TAK1 (*transforming-growth-factor- β -activated kinase*), TAB1 (TAK1-binding protein 1) und TAB2 an der Plasmamembran, wodurch die Phosphorylierung von TAB2 und TAK1 eingeleitet wird.

IRAK1 wird an der Plasmamembran degradiert und der verbleibende Komplex wird in das Zytosol transloziert, wo sich dieser mit Ubiquitinligasen verbindet. Dies führt zu einer Ubiquitinierung von TRAF6, der eine Aktivierung von TAK1 induziert. TAK1 wiederum phosphoryliert und den IKK-Komplex (*inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase complex*), der aus IKK- α , IKK- β und IKK γ besteht. Durch diesen wird I κ B phosphoryliert, welches mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B assoziiert vorliegt. Die Phosphorylierung führt zur Degradation von I κ B und dem Freisetzen von NF- κ B.

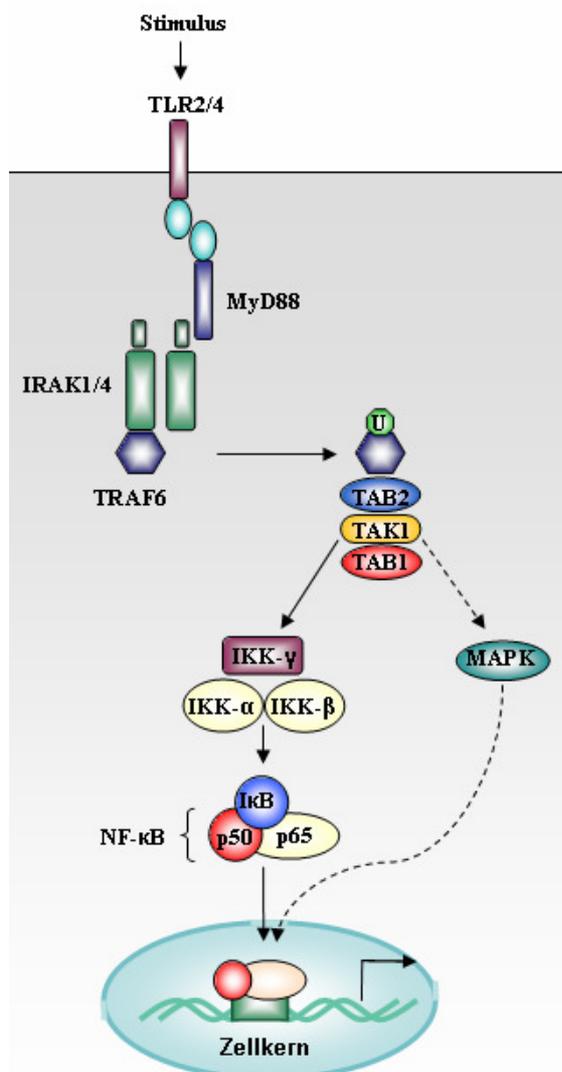


Abb. 7: Schematische Darstellung der TLR-Signaltransduktionskaskade. Nach Stimulation mit PAMP vermitteln die TLR-Rezeptoren über ihre Adaptormoleküle und einem gemeinsamen Aktivator-komplex, bestehend aus TAK1, TRAF6, TAB1, TAB2 und IRAK-Molekülen, die Aktivierung der NF- κ B- und MAPK- Signaltransduktion. U= Ubiquitinierungsligasen UEV1A (Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 Variante 1) und UBC13 (Ubiquitinkonjugierendes Enzym 13). Verändert nach (119).

NF- κ B ist ein Dimer, bestehend aus den Untereinheiten p50 und p65, das nun im aktiven Zustand in den Zellkern transloziert und dort die Expression verschiedener proinflammatorischer Mediatoren initiiert (126,127). Da NF- κ B in die Kontrolle einer großen Zahl von Genen, die an einer Entzündungsreaktion beteiligt sind, involviert ist, nimmt dieser Faktor eine zentrale Rolle in der inflammatorischen Antwort auf eine Infektion ein.

Die über MyD88 vermittelten Aktivierungskaskaden werden von allen TLRs mit Ausnahme von TLR3 genutzt. TLR2 und TLR4 gehen für die Aktivierung von NF- κ B zudem eine Interaktion mit dem Adaptermolekül TIRAP/Mal (*TIR-domain-containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like*) ein, welches mit MyD88 kooperiert (119,128). Durch Stimulierung von TLR4 und TLR3 kann NF- κ B darüber hinaus MyD88-unabhängig aktiviert werden. Dies geschieht über ein drittes TIR-Domänen enthaltendes Adaptormolekül TRIF (*TIR-domain-containing adaptor inducing Interferon- β*) (129). Als Antwort auf TLR3- und TLR4-Liganden zeigten TRIF-defiziente Mäuse eine beeinträchtigte Aktivierung des Faktors IRF3 (*Interferon-regulatory factor-3*) und eine geminderte Expression von Interferon-induzierten Genen (130). Auch TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) ist ein Adaptormolekül. Dieses ist speziell in der Aktivierung von MyD88-unabhängigen/TRIF-abhängigen Signaltransduktionswegen über TLR4 involviert (131).

Ein weiterer Signalweg, der von TAK1 ausgehen kann, resultiert in der Aktivierung von Proteinkinasen der Familie der MAPK (Abb. 8). MAPK sind evolutionär konservierte Enzyme, die auf chemischen und physikalischen Stress antworten und dadurch Zellüberleben und Anpassung kontrollieren (132). So sind sie an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie zum Beispiel Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose beteiligt. Das Kaskadensystem besteht hierbei aus mindestens drei hintereinander geschalteten Proteinkinasen: der MAP-Kinase, einem Aktivator der MAP-Kinase (MAP-Kinase Kinase; MKK, MAPK/ERK Kinase, MEK) und einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK, MKKK, MEK-Kinase), die infolge unterschiedlicher Stimuli aktiviert, d.h. phosphoryliert werden und dann durch Phosphorylierung bestimmter Transkriptionsfaktoren die Transkription einer Vielzahl von Genen regulieren.

MAPK der Klasse der *Mammalia* sind in drei Gruppen eingeteilt: ERK1/2/5 (*extracellular signal-related kinases*), JNK1/2/3 (*jun amino-terminal kinases*) und p38-Proteine. In allen Fällen agieren MAPK im Nukleus und aktivieren Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel die proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren CREB (*cAMP response element binding protein*), Elk-1 und AP-1 (*activator protein-1*).

AP-1 war einer der ersten entdeckten Transkriptionsfaktoren (133), aber seine physiologischen Funktionen sind bisher nicht vollständig entschlüsselt. Infolge einer Phosphorylierung von c-Jun durch JNK kommt es zur erhöhten Aktivität dieses Transkriptionsfaktors (134).

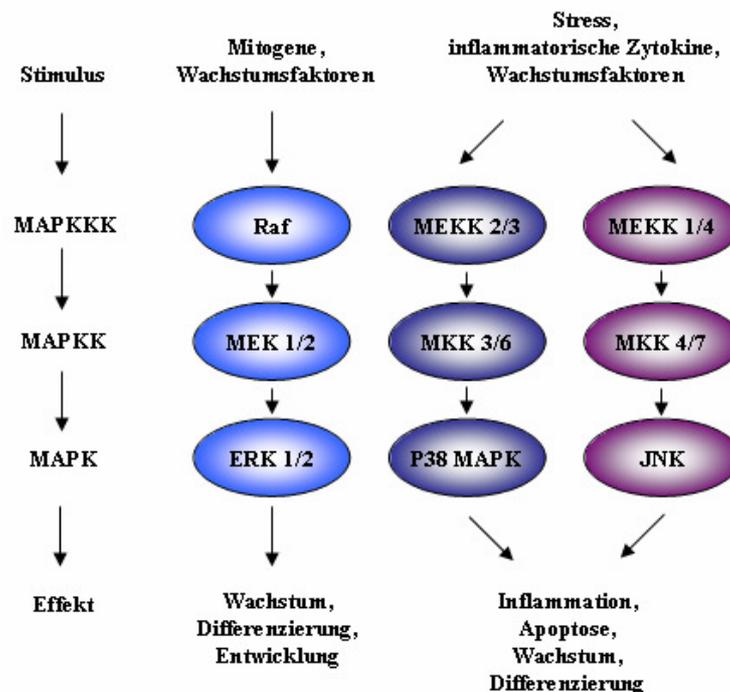


Abb. 8: Aktivierung verschiedener MAP-Kinase Signalkaskaden durch extrazelluläre Stimuli. Die ERK 1/2, p38 und SAPK/JNK Signalkaskaden basieren auf der gleichen Abfolge dreier Kinasen. Eine MAP-Kinase Kinase (MAPKKK) phosphoryliert und aktiviert eine MAP-Kinase Kinase (MAPKK), welche dann ihrerseits eine MAP-Kinase (MAPK) phosphoryliert und aktiviert.

Verändert nach: <http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp>

Zusammengefasst setzen MAPK und NF- κ B extrazelluläre Signale zu zellulären Antworten um. Sie regulieren die Transkription von Genen, die zum Beispiel für Zytokine und Wachstumsfaktoren kodieren.

2.6. Immunmodulatoren der angeborenen Immunantwort

Die Immunantwort wird durch eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren moduliert, die sich hinsichtlich des chemischen Aufbaus und Wirkungsmechanismus unterscheiden.

2.6.1. Zytokine

Zytokine sind Proteine oder Glykoproteine, die als Regulatorstoffe der Entzündung von

verschiedenen Zelltypen produziert und sezerniert werden. Zytokine, die in der angeborenen Immunität beziehungsweise bei der akuten Entzündung von Bedeutung sind, werden hauptsächlich von Makrophagen und Natürlichen Killer (NK)-Zellen produziert (135). Es gibt 18 Zytokine mit dem Namen Interleukin (IL). Andere Zytokine haben ihren Namen über ihre biologische Funktion erhalten wie zum Beispiel Tumornekrose-Faktor (TNF; *tumor necrosis factor*). Einige Zytokine begünstigen die Inflammation („proinflammatorisch“), wobei andere die Aktivität dieser unterdrücken („anti-inflammatorisch“). Zum Beispiel sind IL-4, IL-10 und IL-13 potente Inhibitoren der B-Lymphozyten. Jedoch wirken diese auch gleichermaßen anti-inflammatorisch, indem sie Zytokine wie IL-1 und TNF supprimieren. Genannt werden soll hier eine Auswahl der Mediatoren, die im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung sind.

2.6.1.1. Interleukin-1 beta (IL-1 β)

Die Verbindung der IL-1-Familie zum angeborenen Immunsystem wurde durch die Entdeckung bekannt, dass die zytoplasmatische Domäne des IL-1-Rezeptor-Typs I eine hohe Homologie zu der zytoplasmatischen Domäne der TLRs aufweist (119). Somit sind fundamentale inflammatorische Antworten wie die Induktion der Cyclooxygenase Typ 2 (COX-2; *cyclooxygenase type 2*), die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen und die Synthese von Stickstoffoxid ununterscheidbare Antworten von IL-1- und TLR-Liganden. Beide Familien haben einen nichtspezifischen Einfluß auf die Antigen-Erkennung und Lymphozytenfunktionen. IL-1 β ist das am besten untersuchte Mitglied der IL-1-Familie, da es unter anderem eine Rolle in autoimmunologischen Krankheiten spielt. Bei seiner Synthese entsteht zunächst Pro-IL-1 β , von dem dann IL-1 β durch das *IL-converting-enzyme* (ICE) abgespalten wird (136,137). IL-1 β wird hauptsächlich von Monozyten beziehungsweise Makrophagen gebildet. Daneben sind auch neutrophile Granulozyten, Fibroblasten, Gefäßendothelzellen und Keratinozyten in der Lage, IL-1 β zu produzieren. IL-1 β induziert die Expression von Phospholipase A, COX-2 und der induzierbare Stickstoffoxid-Synthase (iNOS; *inducible nitric oxid synthase*). Dadurch kommt es zur Produktion von Prostaglandin-E₂ (PGE₂), dem Plättchen-aktivierenden Faktor und Stickstoffmonoxid. Als Ergebnis entwickelt sich Fieber, Vasodilatation und Hypotonie. Eine weitere wichtige proinflammatorische Eigenschaft ist die Fähigkeit, die Expression von Adhäsionsmolekülen wie Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 auf mesenchymalen und Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 auf endothelialen Zellen zu erhöhen. Zusammen mit der Induktion von Chemokinen unterstützen diese Eigenschaften die Infiltration von inflammatorischen und immunkompetenten Zellen aus der Zirkulation in den extravaskulären Raum und von dort in

das umliegende Gewebe. Desweiteren induziert IL-1 β die Produktion beziehungsweise Freisetzung von weiteren Entzündungsmediatoren

2.6.1.2. Interleukin-1 α (IL-1 α)

Auch IL-1 α liegt zunächst als Vorläufermolekül vor und wird durch die Calcium-aktivierte Cystein-Protease Calpain in das reife Molekül gespalten. Anders als bei IL-1 β kann aber auch schon das Vorläufermolekül bestimmte Funktionen erfüllen. Diese ist an der Regulation der normalen zellulären Differenzierung beteiligt, insbesondere von Epithel- und ektormalen Zellen (138). Desweiteren teilt IL-1 α einige Funktionen mit IL-1 β . So wirkt es z.B. ebenso als Co-Stimulator von T-Zellfunktionen und hat einen Einfluß auf die IL-6-Konzentration (139).

2.6.1.3. Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 wird traditionell als Aktivator der „Akute-Phase-Antwort“ und als Stimulierungsfaktor für Lymphozyten gesehen (140). Es wird hauptsächlich von Makrophagen, Granulozyten, B- und T-Lymphozyten sowie Gefäßendothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten gebildet. Diese Zellen setzen IL-6 nach Kontakt mit einem Pathogen oder anderen Zytokinen wie zum Beispiel IL-1 β frei. Die Wirkung von IL-6 wird über den IL-6-Rezeptor vermittelt, der sich an der Membran vieler Leukozyten und anderer Zielzellen (z.B. Hepatozyten) befindet.

2.6.1.4. Interleukin-8 (IL-8)

IL-8 oder CXCL8 ist ein Chemokin. Chemokine sind eine Gruppe von Zytokinen, die eine Hauptrolle in der selektiven Rekrutierung von Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten zum Ort der Entzündung spielen und induzieren Chemotaxis über G-Protein gekoppelte Rezeptoren. IL-8 löst in Phagozyten zudem die Aktivierung der NADPH-Oxidase aus, die zur Bildung von Superoxid und Wasserstoffperoxid führt. Monozyten und Makrophagen produzieren IL-8 durch die Stimulierung mit IL-1 α , IL-1 β , TNF α und Endotoxinen (141).

2.6.1.5. Monozyten-Chemoattraktives Protein 1 (MCP-1; *monocyte chemoattractant Protein 1*)

MCP-1 oder CCL2 gehört zu der C-C-Chemokin-Familie. Es ist einer der Schlüsselchemokine, das die Migration und Infiltration von Monozyten, T-Lymphozyten und NK-Zellen reguliert. Es wird von vielen Zelltypen produziert. Beispiele hierfür sind Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen und Astrozyten. Monozyten und Makrophagen

sind jedoch die Hauptproduzenten von MCP-1. MCP-1 wird als Interventionspunkt für die Behandlung vieler Krankheiten gesehen (142).

2.6.1.6. Makrophagen-Inflammatorisches Protein-1 α (MIP-1 α ; *Macrophage inflammatory protein-1 α*)

MIP-1 α verfügt über die biologische Aktivität, Neutrophile und Makrophagen zur Infektionsstelle zu rekrutieren. Zudem aktiviert es neutrophile Zellen zur Bildung von Wasserstoffperoxid (143). Es gehört wie MCP-1 zur Familie der C-C-Chemokine.

2.6.1.7. Makrophagen-Inflammatorisches Protein-1 γ (MIP-1 γ ; *Macrophage inflammatory protein-1 γ*)

MIP- γ gehört wie MIP-1 α und MCP-1 ebenso zu der Familie der C-C-Chemokine. Es induziert die Chemotaxis von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen und Monozyten *in vitro* (144). MIP- γ -RNA wird in allen Geweben außer im Gehirn der Maus exprimiert (145).

2.6.1.8. Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)

TNF α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das entweder Membran-gebunden oder als sekretierter Ligand durch aktivierte Makrophagen und Lymphozyten exprimiert wird. Die aktive Form ist ein Homotrimer, während Monomere nicht aktiv sind. Viele der TNF-induzierten zellulären Antworten werden über einen von zwei bekannten TNF-Rezeptoren ausgeführt: TNFR1 (p60) und TNFR2 (p80). Abhängig vom zellulären Kontext kann es entweder einen NF κ B-vermittelten proinflammatorischen Weg induzieren oder eine apoptotische Antwort. Hierbei ist ein ausgeprägter Synergismus bezüglich einer Stimulierung der Produktion von Prostaglandin und anderer Zytokine zwischen TNF α und IL-1 dokumentiert. Darüber hinaus übt TNF α auch eine zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen aus, woraufhin dieses Zytokin seinen Namen erhalten hat (135,146).

2.6.1.9. RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*)

RANTES oder CCL5 ist ein Chemoattraktant für CD4⁺- und neutrophile Zellen. Es wird von verschiedenen Zelltypen wie CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, Monozyten und Makrophagen produziert. Ähnlich wie MCP-1 wird RANTES als Interventionspunkt für die Behandlung vieler Krankheiten gesehen. Beispielsweise sind inhibitorische Effekte auf das Humane Immundefizienz-Virus (HIV; *human immunodeficiency virus*) beschrieben worden (147).

2.7. *S. epidermidis*-Biofilmbildung: Bedeutung für Pathogenität und Immunevasion

Pathogene müssen die Wirtsabwehr umgehen, um im menschlichen Körper überleben zu können. So hat *S. epidermidis* zum Beispiel Abwehrmechanismen gegen antimikrobielle Peptide entwickelt, die in seinem natürlichen Habitat, der menschlichen Haut, produziert werden (148). Nachdem er jedoch die epitheliale Barriere seines Wirts überschritten hat, ist er vielen weiteren Mechanismen der Wirtsabwehr ausgesetzt. Das angeborene Immunsystem ist die erste Verteidigungslinie gegen einen eindringenden Mikroorganismus wie *S. epidermidis* und verläuft unspezifisch. Makrophagen und Neutrophile nehmen die Bakterien auf und töten sie mithilfe von reaktiven Sauerstoffspezies und antimikrobiellen Peptiden (149). Dies führt dazu, dass *S. epidermidis* in der Blutbahn in der Regel rasch abgetötet wird.

Bakteriämien, die durch *S. epidermidis* ausgelöst werden, sind vor allem eine Folge von intravaskulären Fremdkörper-assoziierten Infektionen. Die bakterielle Adhärenz an Biomaterialien und die folgende Biofilmbildung sind die entscheidenden Faktoren in der Pathogenese einer *S. epidermidis*-Infektion.

Frühe Untersuchungen von infizierten Venenkathetern mittels Rasterelektronenmikroskopie ergaben, dass *S. epidermidis* Polymeroberflächen in Form von adhärennten Biofilmen aus mehreren Zellschichten besiedeln kann, die von Exopolysacchariden umhüllt sind, welche als Schleim oder Glycocalyx bezeichnet wurden (150,151). Nach diesem Befund wurde versucht, den sich aus epidemiologischen Studien ergebenden Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen einem biofilmbildenden Phänotyp und der Pathogenität von *S. epidermidis* durch tierexperimentelle Untersuchungen zu erhärten.

Als erstes wurden klinische Isolate verglichen, die bezüglich ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung charakterisiert waren. Hierbei wurden neugeborene Mäuse ohne implantierte Fremdkörper als Infektionsmodell verwendet. Für dieses Infektionsmodell wurde ein Gewichtszunahme-Index als Alternative zur Messung der Virulenz von Koagulase-negativen Staphylokokken entwickelt. Danach induzieren Stämme, die aus schwerwiegenden humanen Infektionen isoliert wurden, eine stärkere Inhibition der Gewichtszunahme als solche, die aus milden Infektionen isoliert wurden. Acht von neun *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen, die zu einer starken Gewichtsabnahme führten, waren biofilmbildend. Im Vergleich dazu waren neun *S. epidermidis*-Stämme, die aus milden Infektionen isoliert wurden und nur eine geringe Verminderung der Gewichtszunahme induzierten, biofilmmnegativ (152).

In einer weiteren tierexperimentellen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass verschiedene *S. epidermidis*-Stämme unabhängig von der Biofilmbildung bei einer subkutanen Injektion bei

Mäusen Abszesse verursachen. Jedoch führte die Infektion mit biofilmbildenden *S. epidermidis*-Stämmen signifikant häufiger zu subkutanen Abszessen. Nach 14 Tagen wurden die Erreger eliminiert, während biofilmbildende Stämme über den gesamten Beobachtungszeitraum persistierten (153).

Andere Publikationen berichten jedoch in einem ähnlichen Mausmodell der subkutanen Infektion, dass eine Infektion nur dann herbeigeführt wird, wenn subkutan ein Katheter implantiert wurde (154). Zusätzlich machte diese Gruppe die Beobachtung, dass an den implantierten Kathetern bei biofilmbildenden *S. epidermidis* zwar signifikant höhere Keimzahlen vorkommen, aber durch die Infektionen mit biofilmbildenden Stämmen häufiger Abszesse hervorgerufen wurden.

Klarere Aussagen zur Bedeutung der Biofilmbildung für die Pathogenität von *S. epidermidis* ließen sich erst durch den Vergleich von isogenen, genetisch charakterisierten Mutanten und dem zugehörigen Wildtyp erreichen.

Durch die Gegenüberstellung des biofilmbildenden, PIA-positiven *S. epidermidis* 1457 und seiner isogenen, biofilmbildenden, PIA-negativen Mutante 1457-M10 konnten eindeutig signifikante Unterschiede bezüglich der Pathogenität erkannt werden.

In einem subkutanen Katheterinfektionsmodell der Maus verursachte der Wildtyp *S. epidermidis* 1457 signifikant häufigere Abszesse und wurde signifikant seltener von den Abwehrmechanismen des Wirts vom Infektionsort eliminiert als die isogene, biofilmbildende Mutante 1457-M10 (155). Zudem traten an den mit dem Wildtyp infizierten Kathetern signifikant höhere Keimzahlen auf.

In einem intravasalen Infektionsmodell in der Ratte, bei dem ein Katheter in die *Vena cava superior* eingeführt und dort infiziert wurde, verursachte der biofilmbildende Wildtyp *S. epidermidis* 1457 mit 71 % signifikant häufiger eine Venenkatheterinfektion als die biofilmbildende Mutante 1457-M10 (14 %). Außerdem trat bei den mit dem Wildtyp infizierten Tieren signifikant häufiger eine Bakteriämie auf, die häufiger als bei den mit der isogenen biofilmbildenden Mutante infizierten Tieren zu einer Absiedlung der Erreger auch in anderen Organen führte (156).

Galdbart *et al.* konnten in einer epidemiologischen Studie zeigen, dass die Präsenz der Gene, die für die PIA-Produktion verantwortlich sind, signifikant mit Fremdkörper-assoziierten Infektionen korreliert (157).

Diesen Resultaten zufolge wurde PIA als wesentlicher Faktor in der Pathogenese von Fremdkörper-assoziierten *S. epidermidis*-Infektionen angesehen.

Vuong *et al.* kamen 2004 durch diese Ergebnisse zu der Hypothese, dass PIA in dem Schutz gegenüber Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems involviert ist (158). Cathelicidin/hCAP18 (LL-37), humanes β -Defensin 3 (hBD3) und Dermcidin werden von Hautepithelzellen und Schweißdrüsen sekretiert. Diese Peptide stellen somit die erste Front des angeborenen Immunsystems gegen eine bakterielle Infektion dar. Außerdem sind Cathelicidine und Defensine Teil des Sauerstoff-unabhängigen bakteriziden Mechanismus von polymorphnuklearen neutrophilen Zellen (PMN). Vuong *et al.* fanden heraus, dass diese Peptide bei physiologischer Salzkonzentration und leicht saurem pH gegenüber der PIA-negativen Mutante 1457-M10 eine signifikant höhere bakterizide Aktivität aufwiesen als gegenüber dem PIA-positiven Stamm *S. epidermidis* 1457.

Die gleiche Gruppe kam mittels einer Zweifachfärbung in einer Durchflußzytometrie-Analyse zu dem Ergebnis, dass signifikant weniger Zellen der PIA-negativen Mutante *S. epidermidis* 1457-M10 durch PMNs phagozytiert wurden als der Wildtypstamm 1457. Durch die Lyse der PMNs nach zwei Stunden Infektion, der Ausplattierung auf TSB-Agar und der folgenden Auszählung der Bakterienkolonien konnte festgestellt werden, dass 18 % mehr Zellen der PIA-negativen Mutante *S. epidermidis* 1457-M10 durch die PMNs abgetötet wurden als der PIA-positive Stamm *S. epidermidis* 1457. Dadurch wurde die Hypothese von Vuong *et al.*, dass PIA nicht nur in der Biofilmbildung involviert ist, sondern auch der entscheidende und einzige Virulenzfaktor ist, der *S. epidermidis* vor dem angeborenen Immunsystem schützt, als bestätigt angesehen (158).

Diese Hypothese wurde durch Kristian *et al.* bekräftigt, die einen Einfluss von PIA-produzierende *S. epidermidis* auf das Komplementsystem beobachteten. Im Komplementsystem fungieren die von den Immunzellen sekretierten PRR als Opsonine. Es gibt drei Wege, durch die das Komplementsystem aktiviert wird: 1. über den klassischen Weg, welcher über Antikörper vermittelt wird, 2. den Lektin-Weg, welcher über das Mannose-bindende Lektin aktiviert wird und 3. über den alternativen Weg. Alle drei Wege resultieren in dem Produkt einer als C3-Konvertase bezeichneten Serin-Protease auf der bakteriellen Zelle. Dies führt zur chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten, verstärkter Phagozytose und zur Lyse der Zielzelle. Kristian *et al.* beobachteten die Abtötung von biofilmbildenden *S. epidermidis* 1457 im Vergleich zum planktonisch gewachsenen Wildtypen und zusätzlich ebenfalls zu der biofilmbildenden *ica*-Mutante *S. epidermidis* 1457-M10 durch PMNs. Durch *enzyme-linked immunorbent assay* (ELISA), Durchflußzytometrie und Elektronenmikroskopie konnten sie die C3a-Induktion und Ablagerung von C3b und Immunoglobulin G (IgG) auf den bakteriellen Zellen messen. Die in Biofilm eingebetteten

Wildtyp *S. epidermidis* wurden weniger abgetötet und induzierten mehr C3a als die planktonische Zellen sowie die *ica*⁻-Mutanten. Jedoch war die Ablagerung von C3b und IgG viel geringer im Fall der biofilmpositiven Zellen, dass mit einem biofilm-vermittelten Schutz vor der Phagozytose durch PMNs einhergeht (159).

Desweiteren konnte in einem Nematoden-Infektionsmodell gezeigt werden, dass der Biofilm- und PIA-positive Stamm *S. epidermidis* 1457 auch vor der Immunantwort von *Caenorhabditis elegans* geschützt ist (160). Das kationische PIA schützt die Zellen ebenso vor antimikrobiellen Peptiden mit kationischer und anionischer Ladung, was einen Hinweis darauf gibt, dass dieser Mechanismus nicht ausschließlich durch die elektrostatische Repulsion der antimikrobiellen Peptide vermittelt wird (161).

Francois *et al.* untersuchten die Pathogenitätsunterschiede zwischen dem PIA-positiven Stamm *S. epidermidis* 1457 und dem PIA-negativen *S. epidermidis* M11 in einem Meerschweinchen-Infektionsmodell. Zusätzlich führten sie einen PIA-positiven *S. aureus*-Stamm (SA113) und eine entsprechende PIA-negative *Knock-out*-Mutante (SA113 Δ *ica*) mit. Den Meerschweinchen wurden zuvor spezielle Kammern implantiert, die permeabel für lösliche Stoffe sind und in denen natürliches Gewebe eingebettet ist. In diese Kammern wurden zusätzlich Deckgläser aus Polymethylmethacrylat inseriert und die Staphylokokken subkutan zugeführt. Bakterielle Auszählungen in Abhängigkeit von der Zeit auf den Deckgläsern der PIA-positiven *S. epidermidis* und *S. aureus*-Stämme waren überraschenderweise äquivalent zu denen ihrer PIA-negativen Mutanten. Somit spricht dieses Ergebnis gegen die oben genannte Hypothese von Vuong *et al.*. Die Resultate des Meerschweinchen-Infektionsmodells zeigen keinen signifikanten Einfluss der *ica*-Gene auf die *S. epidermidis*- und *S. aureus*-Virulenz. Hier wurde aber auch diskutiert, dass die PIA-positiven Staphylokokken durch die lokalen Bedingungen in der Kammer die Aktivierung des *ica*-Operons runterreguliert und keinen Biofilm gebildet haben könnten (162).

Klarere Aussagen konnten mit einer Arbeit von Chokr *et al.* erzielt werden. Hier wurde ebenfalls ein Meerschweinchen-Infektionsmodell mit subkutan implantierter Kammer verwendet. Geklärt werden sollte, welchen Einfluss die Parameter Biofilmbildung (B+), Präsenz des *ica*-Lokus (I+) und PIA-Produktion (P+) auf die Virulenz von neun *S. epidermidis*-Stämmen haben. Das Resultat zeigte, dass der B+, I+, P+-Typ hierbei mit der Etablierung einer Infektion *in vivo* korrelierte. Überraschenderweise präsentierte aber auch der gegensätzliche Typ (B-, I-, P-) Infektionsraten von 25-60 %. Andere klinische Isolate mit dem Phänotyp B+, I+, P- lösten keine Infektion in dieser tierexperimentellen Untersuchung aus. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen darauf, dass die Kapazität von *S.*

epidermidis, die Kammer zu besiedeln, nicht abhängig von der Biofilmbildung ist. Gleichzeitig konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Stämme, die *in vitro* den Phänotyp B-, I-, P- präsentieren, *in vivo* einen Biofilm bilden (163).

In diesem Zusammenhang gibt es neue Erkenntnisse, die zeigen dass es auch PIA-unabhängige Mechanismen gibt, die zur Biofilmbildung führen.

Mit der Entdeckung von Aap konnte gezeigt werden, dass dieses Protein PIA als interzelluläres Adhäsion funktionell ersetzen kann (72) und eine wichtige Rolle in der *S. epidermidis*-Biofilmbildung spielt (72,74,164). Daher konnte die Aussage getroffen werden, dass die *S. epidermidis*-Biofilmmakulation ein multifaktorieller Prozess ist, welcher möglicherweise eine Vielzahl an adhäsiven Faktoren enthält. Es ist beispielsweise bekannt, dass die *S. epidermidis*-Biofilmbildung einer Phasenvariation unterliegt, die zu einem spontanen Wechsel zwischen einem biofilmpositiven und einem biofilmnegativen Phänotypen führt. Einige Gruppen konnten bisher zeigen, dass PIA-produzierende *S. epidermidis*-Stämme eine reversible oder irreversible Inaktivierung von *icaADBC* durch übergestellte regulatorische Systeme herbeiführen können (165-167). Conlon *et al.* machten die Entdeckung, dass eine Insertion von IS256 auch außerhalb des *ica*-Lokus die *ica*-Transkription beeinflussen kann. Kam es zu einer Insertion von IS256 in *sarA*, einem globalen Regulator, resultierte dies in einer inhibierten Expression des *ica*-Operons und somit zu einem Wechsel von einem biofilmpositiven zu einem biofilmnegativen Phänotyp (166). Eine weitere Studie zeigte, dass die Inaktivierung von *sarA* durch eine Transposonmutation in dem biofilm- und *ica*-negativen Stamm *S. epidermidis* 1457-M10 zu einem biofilmpositiven Phänotyp führte (Rohde *et al.* nicht publiziert). Auch bei dem ebenso biofilm- und *ica*-negativen sowie *aap*-negativen Isolat *S. epidermidis* 1585 ließ sich eine Phasenvariation feststellen. Wurde dieser Stamm über einen längeren Zeitraum passagiert, konnte ein Wechsel zu einem biofilmpositiven Phänotyp identifiziert werden. Genetische Untersuchungen zeigten, dass die Biofilmbildung hierbei aus einem neuen Mechanismus resultiert, der von der Expression des 1MDa Zelloberflächenprotein Embp abhängt. Auch die Inaktivierung von *sarA* in *S. epidermidis* 1457-M10 führte zur Embp-Expression (78).

Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht PIA allein der essentielle Faktor in der Biofilmbildung in *S. epidermidis* ist. Die Proteine Aap und Embp könnten eine zusätzliche Relevanz für die Pathogenese in Fremdkörper-assoziierten Infektionen haben. Embp und PIA könnten beispielsweise unabhängig voneinander oder parallel als interzelluläre Adhäsine fungieren.

Hat sich eine Infektion durch *S. epidermidis* erst einmal etabliert, so hat *S. epidermidis* neben der Biofilmbildung noch weitere Evasionsmechanismen entwickelt. Beispielsweise produziert

er Exopolymere wie die Poly- γ -Glutaminsäure (PGA; *poly- γ -glutamic acid*) (168). PGA wird durch die Genprodukte des *cap*-Lokus synthetisiert. Es besitzt einen anionischen Charakter und seine Peptidbindung befindet sich zwischen der α -Aminogruppe und γ -Carboxylgruppe der D- oder L-Glutaminsäureseitenkette. Neben *S. epidermidis* wird es primär von *Bacillus anthracis*-Stämmen produziert (169). In *Bacillus anthracis* ist diesem eine Rolle in der Pathogenese zugeordnet worden (170). So ist es auch bei *S. epidermidis* wichtig für die Resistenz gegen neutrophiler Phagozytose und antimikrobielle Peptide. Die Expression der *cap*-Gene ist hierbei während des Biofilmwachstums erhöht (171).

Die Rolle der spezifischen, erworbenen Immunantwort bei der Wirtsantwort auf *S. epidermidis*-Biofilme ist bisher wenig verstanden. Die Tatsache, dass das Immunsystem Schwierigkeiten hat, *S. epidermidis*-Infektionen trotz der Produktion spezifischer Antikörper gegen dessen Proteine zu bewältigen, zeigt dass das erworbene Immunsystem möglicherweise nicht effizient genug gegenüber *S. epidermidis*-Infektionen sein könnte (172).

3. Zielsetzung

S. epidermidis wird als Haupterreger nosokomialer Infektionen angesehen. Die Hauptvirulenzdeterminante dieses Bakteriums ist die Biofilmbildung. Biofilme sind definiert als multizelluläre, oberflächengebundene Anhäufungen von Mikroorganismen, die von einer polymeren, hydrierten Matrix umgeben sind. Sie repräsentieren eine signifikante und bisher unvollständig verstandene Form des bakteriellen und archaealen Wachstums. Gegenwärtige Studien haben gezeigt, dass das Interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA) maßgeblich an dem Schutz vor Phagozytose durch neutrophile Zellen, vor dem Komplementsystem, Immunglobulinen und antimikrobiellen Peptiden beteiligt ist.

Kürzlich wurde gezeigt, dass die interzelluläre Aggregation auch durch Proteine wie das Akkumulations-assoziierte Protein (Aap) und das Extrazelluläre-matrixbindende Protein (Embp) vermittelt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit standen drei *S. epidermidis*-Stämme zur Verfügung: *S. epidermidis* 1457 (PIA), *S. epidermidis* 5179-R1 (Aap) und *S. epidermidis* 1585v (Embp).

Zunächst sollte die Struktur der Biofilme dieser Stämme mittels spezifischer Antikörper gegen den jeweiligen Stamm und das jeweilige Akkumulationsmolekül ermittelt und charakterisiert werden. Die zentrale Frage dieser Untersuchung war:

- Gibt es Unterschiede in der Biofilmstruktur zwischen Protein-assoziierten und Polysaccharid-abhängigen *S. epidermidis*-Stämmen?

Zudem sollte untersucht werden, welche Ereignisse stattfinden, wenn die jeweiligen Stämme mit den Zellen der angeborenen Immunität in Kontakt treten. Die wesentlichen Fragen in diesem Kontext waren:

- Können Protein-abhängige *S. epidermidis*-Stämme der Phagozytose durch murine Makrophagen (J774A.1.) gleichermaßen entgehen wie Polysaccharid-abhängige *S. epidermidis*-Stämme?
- Hat *S. epidermidis* einen Einfluss auf die Signaltransduktion der Makrophagen?
- Interferiert *S. epidermidis* mit der Zytokinexpression der Makrophagen?

Die an *S. epidermidis* vorgenommenen Untersuchungen sollen hiermit ein verbessertes Verständnis der komplexen, zellulären und immunmodulatorischen Prozesse zwischen Bakterien und Immunzellen des Wirts erzielen.

4. Materialien und Methoden

4.1. Geräte

4.1.1. Laborgeräte

Gerät	Anbieter
Blotmodul	Invitrogen, Karlsruhe
Elektrophorese-/Agarosegelkammer	MWG-Biotech, Ebersberg
Elektrophorese-/SDS-PAGE-Kammer	Invitrogen, Karlsruhe
Fluorometer / Luminometer (Tecan Infinite M200)	Tecan, Crailsheim
Gefrierschränke -20 °C	Liebherr, Biberach an der Riss
Gefrierschrank -80 °C	Kryotek, Hamburg
Inkubatoren	Heraeus, Tuttingen
Kippschüttler	GFL, Burgwedel
Kühlschränke	Liebherr, Biberach an der Riss
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Netzgeräte (Invitrogen Power Ease 500, Consort E425)	Invitrogen, Karlsruhe Bachofer, Reutlingen
pH-Meter	Mettler-Toledo, Giessen
Photometer (SmartSpec 3000)	BioRad, München
Pipetten	Gilson, Den Haag, Niederlande
Pipettus (Accu-Jet Pro)	Brand, Wertheim
Pinzette	Hartenstein, Würzburg
Sonifizierer	Branson, Danbury, USA
Scanner	Canon, Amsterdam, Niederlande
Sterile Werkbänke	Thermo Scientific
Thermoschüttler (Thermomixer 5436, Certomar BS-1)	Eppendorf, Hamburg Sartorius, Göttingen
Tischzentrifugen (Centrifuge 5417R, Centrifuge 5415D)	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	BioRad, München
UV-Dokumentationsstation	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Vortexer	IKA-Labortechnik, Staufen
Waagen	Kern& Sohn GmbH, Balingen

	Mettler-Toledo
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugen (Centrifuge 5810R)	Eppendorf, Hamburg

4.1.2. Mikroskope

Für die Aufnahmen der konfokalen Fluoreszenzbilder wurden zwei verschiedene Mikroskope verwendet:

1. Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Oberkochen)

Objektive	Plan-Neofluar 10x/0,3 Plan-Neofluar 20x/0,5 Plan-Apo 63x/1,4 Öl
Konfokale Einheit	Spinning Disk CSU22 (Yokogawa, Japan)
Kamera	Digitale Kamera EM-CCD C9100-02 (Hamamatsu, Japan)
Laser	Cobolt Calypso CW 491nm, Cobolt Jive 561nm (Cobolt, Stockholm, Schweden)
Emissionsfilter	ET 525/50 (grün), ET 620/60 (rot) (Chroma Technology, Rockingham, USA)
UV-Lampe	X-cite-Serie mit Hg-Lampe (EXFO, Toronto, Canada)
Software	Volocity 4.3 (Improvision, Coventry, Gross-Britannien)

2. Leica DM IRE2 (Leica, Wetzlar)

Objektive	Plan-Apo 63x/1,3 Wasser Plan-Apo 63x/1,4 Öl
Konfokale Einheit	Leica TCS SP2 AOBS Konfokaler Punkt-Scanner
Laser	Ar, Ar/Kr (488nm, 514nm), HeNe (543nm, 594nm, 633nm)
Software	Leica TCS-Software (Leica, Wetzlar)

Für alle weiteren Aufnahmen wurde folgendes Mikroskop verwendet:

Zeiss Axioplan (Carl Zeiss, Oberkochen)

Objektiv	Plan-Neofluar 100x/1,3 Öl
Software	Spotsoftware (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA)

4.2. Glas- und Plastikwaren

Artikel	Anbieter
Deckgläser	Assistent, Karl-Hecht AG, Sondheim
Gewebekulturplatten (6-well, 12-well, 96-well)	Nunc/Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Kanülen	Braun Melsungen
Krykonserven	Mast Diagnostika, Reinfeld
Messzylinder	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Assistent, Karl-Hecht AG, Sondheim
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Nunc/Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Plastikpipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
Quarzküvette (Schichtdicke 10 mm, Zentrum 8,5 mm)	Hellma, Müllheim
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun, Melsungen
Schottflaschen	Hassa Laborbedarf, Hamburg
Spezial-Petrischalen und Achtkammer- Objektträger zum Mikroskopieren	Ibidi, München
Sterilfilter	Sarstedt, Nürnberg
Zählkammer	Assistent, Karl-Hecht AG, Sondheim
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg

4.3. Kulturmedien und Zusätze

Medium/Zusatz	Anbieter
RPMI 1640-Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FBS; <i>fetal bovine serum</i>)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
<i>Trypticase Soya Broth</i> (TSB)	Becton Dickinson, Heidelberg
Luria Bertani-Medium (LB)	Becton Dickinson, Heidelberg
Columbia-Blutagar	Becton Dickinson, Heidelberg

4.3.1. Kulturmedien Makrophagen

Hierfür wurde das RPMI-Medium verwendet. Folgende Reagenzien wurden pro 500 ml Medium hinzugefügt:

10 % [v/v]	FBS
2 mM	Glutamin
100 μ M	Penicillin-Streptomycin

Während der Methode der Transfektion wurde FBS weggelassen, während das Medium bei Infektionsversuchen kein Penicillin-Streptomycin enthält.

4.3.2. Kulturmedien Bakterien

Staphylokokken: TSB-Medium

E.coli: LB-Medium

4.4. Chemikalien

Chemikalie	Anbieter
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma-Aldrich, München
DNS-Marker (λ DNA-HindIII/ Φ X-HaeIII)	Finnzymes, Espoo, Finnland
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Immersionsöl	Carl Zeiss, Oberkochen
KCl	Merck, Darmstadt

KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Medion Diagnostics, Dürdingen
LPS (<i>E.coli</i>)	Fluka/Sigma-Aldrich, München
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Merck, Darmstadt
Mowiol	Calbiochem/Merck, Darmstadt
NaCl	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe
Pam-3-Cys	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Protein-Marker (PageRuler)	Fermentas, St. Leon-Rot
Triton X100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Tween20	Merck, Darmstadt

4.5. Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Blockpuffer (Immunfluoreszenz)	10 % FBS in PBS
Detergenzlösung (Immunfluoreszenz)	0,1 % Triton X100 in PBS
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS) 10x	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ Auf 800 ml H ₂ O dd, pH 7,4
PBS-T	PBS plus 0,05% Tween 20
Puffer zur Verdünnung von Antikörperlösungen (Immunfluoreszenz)	1,5 % FBS in PBS
NuPAGE MES SDS-Puffer (SDS-PAGE)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE LDS-Puffer (SDS-PAGE)	Invitrogen, Karlsruhe
Transferpuffer Westernblot	25 ml NuPAGE Transferpuffer 20x 50 ml Methanol

	auf 500 ml H ₂ O auffüllen
Tris-Borat-EDTA	0,89 M Tris Base
	0,89 M Borsäure
	20 mM Na ₂ EDTA*2H ₂ O
Trypanblau-Lösung	2 mg Trypanblau, 100 ml PBS

4.6. Kits

Kit	Anbieter
ECL Western blotting detection reagents	GE Healthcare, München
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
FuGene HD Transfection Reagent	Roche, Mannheim
LIVE/DEAD Cell Viability-Kit	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe
Luciferase Reporter Gene Assay	Roche, Mannheim
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane	Sigma-Aldrich, München
QIAprep spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Mouse IL-1-beta ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience, San Diego, USA
RayBio Mouse Inflammation Antibody Array	RayBiotech, Norcross, USA

4.7. Antikörper und Farbstoffe

Antikörper/Farbstoff	Anbieter
AlexaFluor 488 goat anti rabbit	Invitrogen, Karlsruhe
AlexaFluor 568 goat anti rabbit	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-rabbit IgG, horseradish-peroxidase linked	Dianova, Hamburg
Cy5 goat anti rabbit	Invitrogen, Karlsruhe
Anti- <i>S. epidermidis</i> rabbit	UKE, Hamburg
Fluorescent Wheat Germ Agglutinin	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe

4.8. Bakterienstämme

Stamm	Relevante Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> TOP10	zur Klonierung von Vektoren bestimmt	(173)
<i>S. epidermidis</i> 1457	Blutkulturisolat (UKE), biofilmpositiv, <i>ica</i> -positiv	(174)
<i>S. epidermidis</i> 1457-M10	Tn917-Insertion in <i>icaA</i> , biofilmbnegativ	(61)
<i>S. epidermidis</i> 1585v	isoliert aus einer Portinfektion, <i>ica</i> -negativ, biofilmpositiv, <i>embp</i> -positiv	(78)
<i>S. epidermidis</i> M135	<i>ica</i> -negativ, biofilmbnegativ, Tn917-Insertion in <i>embp</i>	(78)
<i>S. epidermidis</i> 5179	isoliert aus einer ventriculoatrialen Shuntinfektion, <i>ica</i> -negativ, biofilmbnegativ, <i>aap</i> -positiv, keine proteolytische Prozessierung von Aap	(72)
<i>S. epidermidis</i> 5179-R1	<i>ica</i> -negativ, biofilmpositiv, <i>aap</i> -positiv, Aap liegt in proteolytisch prozessierter Form vor	(72)
<i>S. epidermidis</i> Newman	isoliert aus einer Osteomyelitis	(175)

4.9. Zelllinie

verwendete Zellen	Beschreibung
J774A.1.	Immortalisierte murine monozytische Makrophagen

4.10. Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenzen
pELAM-luc, Vektor pGL2	AMP ^R , <i>endothelial leukocyte adhesion molecule</i> (ELAM)-1-NFκB-Luciferase, synthetische <i>Firefly</i> -Luciferase mit NFκB-Promotor	Promega, (Madison, USA)

pAP1-luc	AMP ^R , synthetische <i>Firefly</i> -Luciferase mit AP1-Promotor	Stratagene
pGL2-Control Vector	AMP ^R , SV40-Promotor und Enhancer-Sequenzen, die in einer starken Luciferase-Expression resultieren	Promega, (Madison, USA)
pmaxGFP	KAN ^R , Kontrollvektor für Transfektionen, kodiert für GFP des Kopepoden <i>Pontellina plumata</i> , SV40-Promotor	Amaya/Lonza, Köln

4.11. Molekularbiologische Methoden

4.11.1. Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNS bis 10 µg erfolgte aus 2 ml einer Bakterienübernachtskultur in LB-Medium unter Verwendung des QIAprep Spin MiniPrep Kits (Qiagen). Zur Aufreinigung größerer Plasmidmengen bis 500 µg aus 150 ml Bakterienkultur wurde das EndoFree Plasmid Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Beim Prinzip der Aufreinigung macht man sich das unterschiedliche Verhalten von chromosomaler und Plasmid-DNS zu Nutze. Beide denaturieren im alkalischen Milieu. Während sich Plasmid-DNS durch Neutralisieren wieder renaturieren und lösen lässt, verbleibt die chromosomale DNS im denaturierten Zustand.

4.11.2. Konzentrationsbestimmung von DNS

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde DNS 1:20 verdünnt, in Quarzküvetten pipettiert und die Absorption bei 260 nm ($A_{260\text{nm}}$) bestimmt. Als Nullwert wurde Elutionspuffer des zur DNS-Gewinnung verwendeten Kits gesetzt. Die Berechnungen der DNS-Konzentration erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Eine Absorption von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNS. Um die Reinheit zu bestimmen, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm ($A_{280\text{nm}}$) ermittelt. Das Verhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ liegt für eine reine DNS-Präparation bei 1,8.

4.11.3. Analytische Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um ein DNS-Trennungsverfahren nach der molekularen Masse. Nukleinsäuren sind innerhalb eines großen pH-Bereiches negativ

geladen. Die Ladungsträger sind dabei die negativ geladenen Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrates. In einem elektrischen Feld wandern Nukleinsäuren daher in Richtung Anode. Als Trägermaterial wurde Agarose verwendet. In einem Gel ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Molekülgröße. Beeinflusst wird diese auch durch die Konzentration der Agarose, der angelegten Spannung und Art des Laufpuffers. Kleine Fragmente wandern daher schneller durch das Gel als große Fragmente. Je nach Größe der zu trennenden DNS-Fragmente enthalten die Gele zwischen 0,3 % Agarose (für DNS-Fragmente bis 30 kb) und 3% Agarose (für DNS-Fragmente bis 100 bp). Für die analytische Gelelektrophorese wurde ein Tris-Borat/EDTA-(1x TBE)-Laufpuffer verwendet. Zusätzlich wurden die DNS-Proben mit 6x-Ladungspuffer versetzt. Um später die molekularen Massen zu bestimmen, wurde ein DNS-Marker auf das Gel aufgetragen (λ DNA-HindIII/ Φ X-HaeIII, Finnzymes, Espoo, Finnland). Die Anfärbung der DNS im Gel erfolgte durch Ethidiumbromid in einem Bad bei einer Konzentration von 1mg/ml. Ethidiumbromid ist ein extrinsisches Fluorophor, welches mit seinen aromatischen und heteroaromatischen Ringen mit den Basen der Nukleinsäuren interagiert. Durch Anregung mit UV-Licht emittiert der Farbstoff bei 590 nm und die DNS-Banden können somit sichtbar gemacht werden.

4.11.4. DNS-Restriktion

Die Restriktionsanalyse wird zur Charakterisierung, Identifizierung und Isolierung doppelsträngiger DNA eingesetzt und beruht auf der Fähigkeit von bakteriellen Restriktionsenzymen, die Phosphodiesterbindungen dieser DNA an spezifischen Erkennungsstellen zu binden und zu spalten. Gereinigte Plasmide wurden jeweils in 20 μ l-Reaktionsansätzen mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Die Durchführung erfolgte im Puffer des Herstellers und je nach Restriktionsenzym in An- oder Abwesenheit von 1 mg/ml BSA (NEB) für eine Stunde im Wasserbad bei 37 °C.

4.12. Mikrobiologische Methoden

4.12.1. Kultivierung der Staphylokokken

Die für die Untersuchungen ausgewählten *S. epidermidis*- und *S. aureus*-Stämme wurden auf Blutagarplatten bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Für Standard Wachstumsexperimente wurden die entsprechenden Stämme aerob in einer Schüttelkultur in TSB in sterilen Glasgefäßen kultiviert. Der verwendete Stamm wurde dazu aus einer Übernachtskultur im Schüttelkolben angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm angezogen.

4.12.2. Lagerung und Stammerhaltung der Staphylokokken

Agarplatten mit Bakterienkolonien wurden in Aufbewahrungssystemen bei 4 °C für maximal vier Wochen gelagert. Die langfristige Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C in kommerziell erworbenen Kryokonserven, die Nährmedium enthalten, dem 20 % Glycerin zugesetzt ist.

4.12.3. Biofilmbildung

Die Untersuchungen zur Biofilmbildung verschiedener *S. epidermidis*-Stämme wurden in 6-*well*-Platten (60 µm) in TSB-Medium durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien einer Übernachtschüttelkultur entnommen und 1:10 verdünnt. Die Inkubation in den 6-*well*-Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

4.12.4. Biofilmadhärenztest

Die Adhärenz an polymeren Oberflächen und Akkumulationsvorgänge wurden in regelmäßigen Abständen bei biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen getestet. Diese Methode ist nach einem quantitativen Modell nach Christensen *et al.* abgeleitet (176). Dabei wurde die optische Dichte von mit Kristallviolett gefärbten bakteriellen Filmen, die am Grund von Plastikschaalen adhären, gemessen. Die optische Dichte korreliert hierbei mit dem Gewicht des adhären Biofilms. Diese muss mindestens einem Wert von $r = 0,906$ entsprechen, um einen Stamm als biofilmpositiv bewerten zu können. Die Messung stimmt ebenso mit der visuellen Abschätzung überein. Zur Vorbereitung wurde eine 96-*well*-Platte mit einer 1:10-Verdünnung aus einer Übernachtskultur in TSB-Medium angeimpft. Nach einem Tag Inkubation bei 37 °C wurde das Medium abgegossen und zwei-dreimal mit 200 µl PBS pro *well* gewaschen. Anschließend wurden die Kulturen getrocknet, mit 50 µl Kristallviolett pro *well* für fünf Minuten gefärbt und mit Wasser ausgewaschen. Nach erneutem Trocknen wurde die Absorption mit dem Multidetektor Tecan infinite 200 bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm gemessen.

4.12.5. Sonifizierung der Staphylokokken

Die Staphylokokken wurden wie unter Abschnitt 4.12.3. beschrieben, kultiviert. Im Anschluss wurden diese dreimal in PBS gewaschen, von den Zellkulturplatten abgeschabt und in sterile 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Sonifizierung erfolgte jeweils dreimal bei einer Amplitude von 30 %.

4.13. Zellbiologische Methoden

4.13.1. Kultivierung von J774.A.1-Makrophagen

Die hier verwendeten murinen Zellen wurden in dem Grundmedium RPMI 1640 mit den Zusätzen von 10 % FBS, Glukose und Penicillin-Streptomycin bei 37°C und 5 % CO₂-gesättigter Atmosphäre inkubiert. Zum Passagieren wurden die adhärennten Zellen mit einem Zellschaber von der Petrischale entfernt und verdünnt wieder in eine neue Petrischale ausgesät.

4.13.2. Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte in einem direkten Verfahren mittels einer Neubauer-Zählkammer. Diese enthält zwei Zählfelder mit je neun Großquadraten. Von einem Zählfeld wurden vier Eckquadrate mikroskopisch ausgezählt, die wiederum aus 16 Kleinquadraten bestehen. Die absolute Zellzahl lässt sich aus [(Zellzahl pro vier Quadrate)*(Volumen)*(Verdünnungsfaktor)*(Volumen)*(Kammerfaktor)] ermitteln. Der Kammerfaktor dieser Zählkammer beträgt 10⁴. Um tote von vitalen Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen mit einer Trypanblaulösung in einem Verhältnis von 1:10 versetzt. Trypanblau liegt in einem physiologischen pH-Bereich als Anion vor und kann leicht an Proteine binden. Die intakte Membran lebender Zellen verhindert die Diffusion des Farbstoffes in die Zelle. Sie bleiben im mikroskopischen Bild hell, während der in die toten Zellen diffundierte Farbstoff durch die Bindung an Zellproteine akumuliert und diese Zellen blau färbt.

4.13.3. Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff wurden 1x10⁷ Zellen für 10 min bei 1100 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 1,5 ml Einfriermedium (10 % DMSO in FBS) resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Zum Auftauen wurden die Kryokonserven aus dem -80 °C-Gefrierschrank direkt in einem 37 °C-warmen Wasserbad aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden dann in 10 ml warmes Kulturmedium gegeben und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, in Kulturmedium resuspendiert und in Petrischalen überführt.

4.13.4. Transfektion von J774.A.1-Makrophagen

Zur Transfektion des jeweiligen gewünschten Vektors wurden 5x10⁵ Zellen pro Vertiefung einer 6-well-Schale ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gegen serumfreies

Medium ausgetauscht. Anschließend wurden die Zellen mit dem *FuGene*-Transfektionssystem nach Herstellerprotokoll transfiziert. Das optimale Verhältnis des *FuGene*-Reagent zur DNS betrug 4:2. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Transfektion wurden J774.A.1-Makrophagen in einer Extra-Probe mit einem Vektor transfiziert, der für das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) kodiert.

4.13.5. Infektion der J774.A.1-Makrophagen mit Staphylokokken

Die Übernachtskulturen der Staphylokokken in den 6-*well*-Gefäßen (siehe Abschnitt 4.12.3.) wurden 3x bei 2000 rpm abzentrifugiert und mit Zellkulturmedium (Streptomycin-Penicillin-frei) gewaschen. Anschließend wurden die Makrophagen jeweils aus einem 6-*well* zu dem jeweiligem gewünschten Staphylokokken-Stamm gegeben. Die Länge der Infektion war vom jeweiligen Versuch abhängig.

4.13.6. Stimulation der J774.A.1-Makrophagen

Der Einsatz der Stimulatoren LPS oder Pam3Cys betrug in jedem Versuch 500 ng/ml.

4.13.7. Lyse der J774.A.1-Makrophagen

Für verschiedene Untersuchungen wurden die Zellen aufgeschlossen. Der hierbei verwendete Lysepuffer der Firma Roche wurde mit einem Volumen von 150 µl pro *well* eingesetzt. War der jeweiligen Probe ein biofilmpositiver *S. epidermidis*-Stamm zugesetzt, wurde dieser mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Mikrotiterplatte entfernt.

4.13.8. Luciferase-Report

Der Luciferase-Reporter-Versuch wird für die quantitative Messung der Expression der Firefly-Luciferase in eukaryotischen Zellen, die mit einem Vektor transfiziert wurden, der für die *Firefly-Photinus pyralis*-Luciferase kodiert, eingesetzt. Mittels der *Firefly*-Luciferase kann eine bestimmte Promotoraktivität gemessen werden.

Die Expression des Reportergens in den verwendeten Plasmiden wird durch einen synthetischen Promotor kontrolliert, der direkte Wiederholungseinheiten der Transkriptionserkennungs-Sequenzen für die Bindungsstellen des jeweiligen Transkriptionsfaktors enthält. Folglich kann die Aktivierung des Transkriptionsfaktors über die Expressionsstufe des Reporters verfolgt werden. Die *Firefly*-Luciferase von *Photinus pyralis* katalysiert hierbei die Adenosin-Triphosphat-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin und produziert dann eine Lichtemission bei einer Wellenlänge von 562 nm (Abb. 9).

Die Kinetik dieser Lichtemission ist durch einen sehr kurzen Blitz charakterisiert. Um die Lumineszenz zu messen, wurde ein Injektor verwendet, welcher in dem Multidetektor Tecan infinite 200 integriert ist. Vor der Messung wurden die Lysate mittels einer Tischzentrifuge bei 14000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl der Proben in spezielle Lumineszenz-Mikrotiterplatten (Brand) überführt. Die Menge des Substrats betrug 100 µl. Ausgewertet wurde mithilfe der Software Prism von GraphPad.

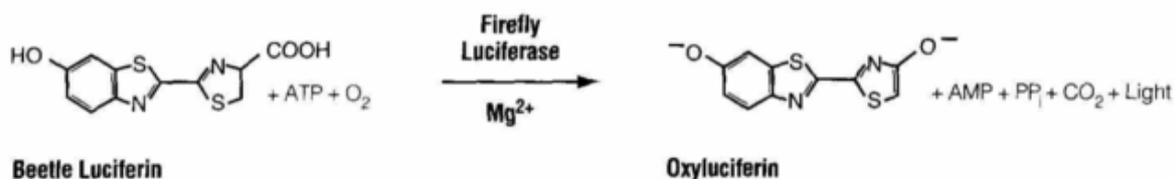


Abb. 9: Reaktionsgleichungen der Substratumsetzungen von Luciferin zu Oxyluciferin katalysiert durch die Firefly-Luciferase. Aus Technical Manual 040, Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega Corporation.

4.13.9. Fixierung mit Paraformaldehyd

Auf Deckgläsern ausgesäte Zellen wurden in frisch angesetzten 3,7 % [v/v] Paraformaldehyd in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Verwendet wurde diese Methode für die Innen- und Aussen-Färbungen.

4.13.10. Fixierung mit Aceton

Bakterielle Zellen, die auf Objektträgern ausgesät wurden, wurden mit eiskaltem Aceton bei -20°C für fünf Minuten fixiert.

4.13.11. Permeabilisierung mit TritonX100

Zum Aufschluss der Zellen wurde 0,1 %-iges Triton X100 in PBS verwendet. Die Inkubation betrug 10 Minuten bei 4°C.

4.13.12. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung von Zellen, die auf Deckgläsern aus Glas ausgesät wurde, wurde in Mikrotiterplatten mit 12 Kammern durchgeführt. Die Kammern wurden durch Zugabe eines in Wasser getränkten Tuches feucht gehalten. Ein Übertritt von Flüssigkeit wurde mit der Umrandung einer Fettlösung (PapPen) gewährleistet. Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit 1 % BSA in PBS für 20 min geblockt und dann mit dem primären Antikörper für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach drei

Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläser getrocknet und mit Mowiol eingedeckelt. Zur Fixierung wurden diese auf einem Objektträger mit Nagellack umrandet.

4.13.13. Innen- und Aussenfärbung (Zweifachfärbung)

Die Innen- und Aussenfärbung (177) hat zum Ziel, zwischen extrazellulären und intrazellulären (aufgenommenen) Bakterien zu unterscheiden. Sie basiert auf der Tatsache, dass Zellmembranen für Antikörper nach der Fixierung mit Paraformaldehyd nicht permeabel sind, wohl aber nach der Behandlung mit Triton X100. Daher wurden die extrazellulären Bakterien vor der Permeabilisierung mit dem jeweiligen primären und sekundären Antikörper gefärbt und die intrazellulären Bakterien (zusammen mit den extrazellulären Bakterien) nach der Permeabilisierung mit Triton X100. Dies resultiert darin, dass die aufgenommenen Bakterien einfach und die extrazellulären Bakterien zweifach gefärbt sind. Durch einen Vergleich der Fluoreszenzkanäle kann die Anzahl der extrazellulären und intrazellulären Bakterien bestimmt werden. Um die J774.A.1.-Makrophagen in diesem Versuch sichtbar zu machen, wurden diese vor der vierstündigen Infektion mit einem für GFP-kodierenden Plasmid transfiziert (pmaxGFP, Amaxa). Die mikroskopische Auswertung erfolgte mittels des Leica DM IRE2 (Leica, Wetzlar) und der Leica TCS-Software.

Bearbeitung der Immunfluoreszenzfarben:

GFP: von grün zu blau, Cy5: von blau zu grün.

4.13.14. Membranfärbung von J774.A.1-Makrophagen

Um Makrophagen, die mit biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen infiziert wurden, sichtbar zu machen, wurde die Membran dieser mittels des PKH26GL-Kits (Sigma-Aldrich) angefärbt. Dabei handelt es sich um einen fluoreszenten Farbstoff mit langen aliphatischen Enden, der in die Lipidregionen der Zellmembran inkorporiert wird.

Hierbei wurden die Zellen vor der Infektion nach den Angaben Herstellers angefärbt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mittels des Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Oberkochen).

4.13.15. Mikroskopieren lebender Zellen (*Live-cell imaging*)

Hierzu wurden die J774A.1.-Makrophagen mittels des PKH26GL-Kits (Sigma-Aldrich) angefärbt und nach einer Stunde während des Mikroskopierens in eine Mikroskopkammer (37°C, 5% CO₂) in spezielle 35 mm-Petrischalen mit einem extra dünnen Boden (Ibidi,

München) gegeben. In einem Infektionsversuch waren in diesen bereits ein bestimmter *Staphylococcus epidermidis*-Stamm enthalten.

4.13.16. Immunfluoreszenzfärbung zur Charakterisierung von Biofilmstrukturen

Über a) indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Hierbei erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung wie unter Punkt 4.13.12. beschrieben. Hierzu wurden aber spezielle Objektträger mit acht Kammern (Ibidi, München) verwendet. Diese waren im Vergleich zu der Verwendung von Deckgläsern aus zwei Gründen vorteilhaft: 1. Die Biofilmstruktur konnte erhalten bleiben, 2. die Strukturen mehrerer Proben konnten in einem Versuch durchgeführt werden.

Über b) Weizenkeimagglutinin-Färbung

Der Stamm *S. epidermidis* 1457 bildet einen Polysaccharid-abhängigen Biofilm (siehe Abschnitt 3.2.1.). Daher ist es möglich seine Biofilmstrukturen mit einer Färbung durch Weizenkeimagglutinin sichtbar zu machen. Dabei handelt es sich um ein Lektin, das sich spezifisch an endständige N-Acetylglukosamin-Reste anlagert. Hier wurde Weizenkeimagglutinin verwendet, das an das Alexa Fluor Fluorophor (488 und 568) gekoppelt ist. Übernachtskulturen von Staphylokokken wurden per 1:10-Verdünnung in spezielle 35 mm Petrischalen mit einem extra dünnen Boden (Ibidi, München) gegeben und einen weiteren Tag in diesen in TSB-Medium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien dreimal in PBS gewaschen und für 15 min in 10 µg/ml Weizenkeimagglutinin in PBS inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die mikroskopische Aufnahme mit dem Zeiss Axiovert 200M-Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen).

4.14. Proteinchemische Methoden

4.14.1 ELISA (enzyme-linked-immunoabsorbent-assay)

Bei der Methode des ELISAs wird ein Antigen, also ein Makromolekül (zum Beispiel ein Protein) oder ein niedermolekularer Analyt (zum Beispiel ein Peptid) mit Hilfe eines für das Antigen spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Hierbei wird grundsätzlich ein Trägermaterial als feste Matrix, zum Beispiel eine Mikrotiterplatte, genutzt.

Bei dem hier verwendeten Sandwich-Enzymimmunoassay bindet zunächst in einer ersten Reaktionsphase das Antigenmolekül an die oberflächenfixierten Antikörpermoleküle. Ungebundene Antigenmoleküle werden anschließend mit der freien Phase entfernt. Werden nun enzymmarkierte Antikörpermoleküle gegen das Antigen zugegeben, so binden sie an die

zugänglichen Determinanten des bereits oberflächenfixierten Antigens. Mit geeigneten Waschschritten werden überschüssige markierte Antikörpermoleküle quantitativ entfernt. Anschließend erfolgt der Nachweis der gebundenen Enzymaktivität mit einer chromogenen Nachweisreaktion. Hier ist das Messsignal der Antigenkonzentration direkt proportional. In diesem ELISA wurde als Tracer das Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*=HRP) verwendet.

In diesem Versuch sollte die Anwesenheit von IL-1 β quantitativ in J774.A.1.-Makrophagen nachgewiesen werden, die zuvor mit *S. epidermidis*-Stämmen infiziert wurden, nachgewiesen werden. Die Dauer Infektion betrug 4 Stunden. Nach der Infektion wurden die Zellen lysiert. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Mouse IL-1-beta ELISA Ready-SET-Go! eBioscience, San Diego, USA). Zur Detektion diente der Multidetektor Tecan infinite 200.

4.14.2. Natriumdodecylsulfat (SDS; *sodium dodecylsulfate*)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Grundprinzip dieser Gelelektrophorese ist die Auftrennung eines Gemisches verschiedener Proteine in einem von außen angelegten elektrischen Feld. Bei einem definierten pH-Wert haben die Proteine eine individuelle resultierende Ladung entsprechend der Summe aller negativen und positiven Ladungen des jeweiligen Moleküls. Nach Anlegen einer Spannung wandern alle Komponenten der Mischung mit einer Nettoladung in Richtung des zu ihnen gegensätzlich geladenen Pols, abhängig vom Betrag ihrer Nettoladung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Um Diffusion zu vermeiden, wird eine feste Trägermatrix, das Polyacrylamidgel, verwendet. Dieses wird aus einer Acrylamid-Lösung hergestellt, die zwischen zwei Glasplatten gegossen wird und dort nach Zugabe eines Radikalstarters polymerisiert. Diese Radikalkettenreaktion führt zu langen Makromolekülen. Da der Acrylamidlösung etwas Bisacrylamid beigemischt ist, werden diese Ketten dreidimensional vernetzt, und die Lösung erstarrt zu einem Gel mit Poren definierter Größe. Wegen der Poren tritt ein Siebeffekt ein. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bleiben die Proteine vollständig und meist irreversibel denaturiert. Als Detergenz bildet SDS um jedes Proteinmolekül eine Micelle negativer Außenladung und zerstört die Überstrukturen des Proteins. Zusätzlich wird zur reduktiven Spaltung etwaiger Disulfidbrücken 2-Mercaptoethanol zugesetzt. Somit ist die Gelelektrophorese nur noch abhängig von der Größe der Proteine und folglich wandern größere Proteine langsamer als kleine.

Im Rahmen der Arbeit wurde hier anstellen von SDS N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz (LDS) verwendet. Die Proben wurden mit diesem in Form eines 4-fach-Puffers versetzt und bei 80°C für 10 min denaturiert. Danach wurden sie auf das Gel aufgetragen. Die Stromstärke betrug 30 mA. Zur Größenabschätzung der Proteine wurden Molekulargewichtsstandards mitgeführt.

4.14.3. Zytokin-Array

Ziel dieser Methode ist die simultane Detektion der Expressionsstufen mehrerer Zytokine. Mithilfe dieses Kits (Raybiotech, Norcross, USA) ist es möglich, 40 Zytokine der Maus (Tab.2) in einem einzigen Experiment zu erfassen. Das Prinzip dieser Methode ähnelt dem des ELISAs. Die Antikörper der Zytokine sind auf einer Membran auf bestimmten Plätzen fixiert (Abb. 10). Nach Blockieren unspezifischer Bindungsstellen binden die Antikörpermoleküle in einer ersten Reaktionsphase an die oberflächenfixierten Antikörpermoleküle. Ungebundene Antigenmoleküle werden anschließend mit der freien Phase entfernt. Nach Zugabe eines Gemisches von Biotin-markierten Antikörpern, binden diese an die zugänglichen Determinanten das jeweilige oberflächenfixierte Antigen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden werden mit Waschschrinen überschüssige markierte Antikörpermoleküle entfernt und markiertes Streptavidin hinzugegeben. Nach einer erneuten Inkubationszeit und entsprechenden Waschschrinen erfolgt wie beim ELISA der Nachweis der gebundenen Enzymaktivität in einer chromogenen Nachweisreaktion. Der genaue Versuchsablauf wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS	POS	NEG	NEG	Blank	BLC	CD30L	Eotaxin	Eotaxin-2	Fas Ligand	Fractalkine	GCSF
2	POS	POS	NEG	NEG	Blank	BLC	CD30L	Eotaxin	Eotaxin-2	Fas Ligand	Fractalkine	GCSF
3	GM-CSF	IFN γ	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p40p70	IL-12p70
4	GM-CSF	IFN γ	IL-1 α	IL-1 β	IL-12	IL-3	IL-4	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p40p70	IL-12p70
5	IL-13	IL-17	I-TAC	KC	Leptin	LIX	Lymphotactin	MCP-1	MCSF	MIG	MIP-1 α	MIP-1 β
6	IL-13	IL-17	I-TAC	KC	Leptin	LIX	Lymphotactin	MCP-1	MCSF	MIG	MIP-1 α	MIP-1 β
7	RANTES	SDF-1	TCA-3	TECK	TIMP-1	TIMP-2	TNF- α	sTNF RI	sTNF RII	Blank	Blank	POS
8	RANTES	SDF-1	TCA-3	TECK	TIMP-1	TIMP-2	TNF- α	sTNF RI	sTNF RII	Blank	Blank	POS

Tab. 2: Tabellarische Darstellung der Membran mit den jeweiligen oberflächenfixierten Antikörpern der Zytokine. Verändert nach RayBiotech 2007.

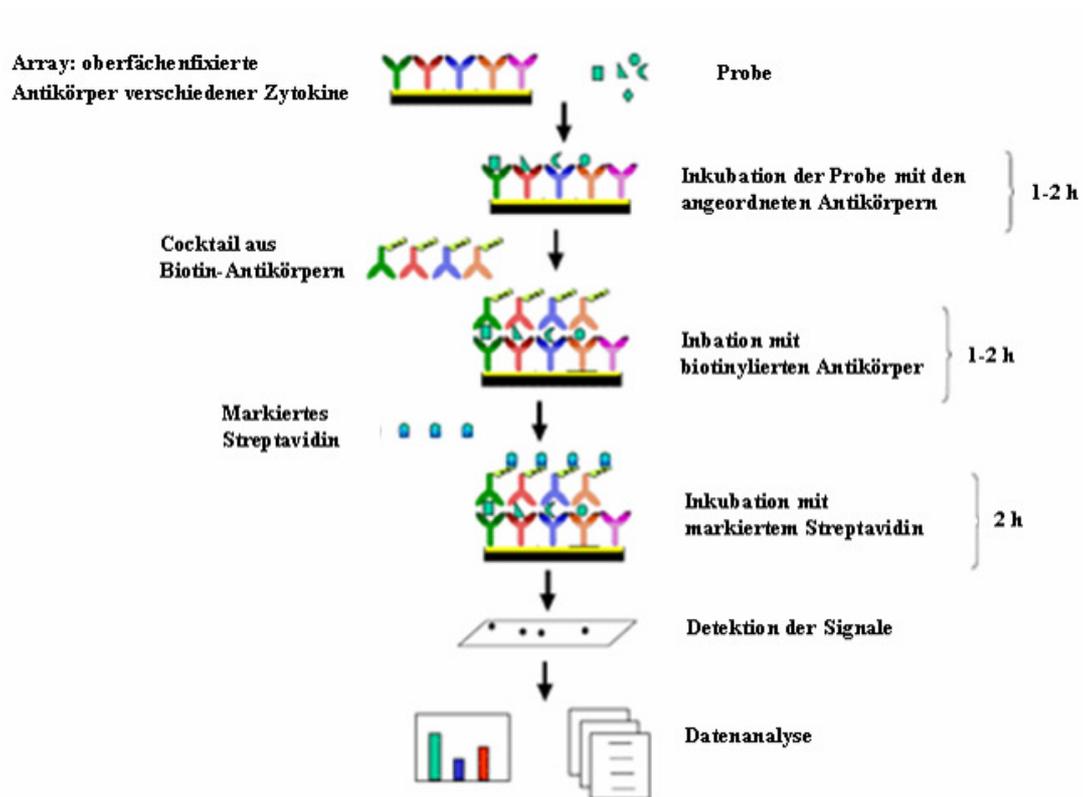


Abb. 10: Schematische Darstellung der Experimentdurchführung eines Zytokin-Arrays. Verändert nach RayBiotech 2007.

5. Ergebnisse

5.1. Struktur PIA-, Aap- und Embp-vermittelter *S. epidermidis*-Biofilme

5.1.1. Polysaccharid-abhängige Biofilme zeigen makroskopische Unterschiede zu Protein-abhängigen Biofilmen

Ziel dieses Versuches war es, die Strukturen der Biofilme verschiedener *S. epidermidis*-Stämme zu charakterisieren. Hierbei sollte herausgefunden werden, ob es Unterschiede zwischen dem Polysaccharid-abhängigen Biofilmbildner *S. epidermidis* 1457 und den Protein-abhängigen Biofilmbildnern *S. epidermidis* 1585v und *S. epidermidis* 5179-R1 gibt. Bisher wurden die Stämme bereits im Rahmen eines Biofilmadhärenztests in einem 96-well-Format getestet. Dabei wurde festgestellt, dass alle drei Stämme einen stark biofilmpositiven Phänotyp aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst gezeigt werden, ob die verschiedenen Stämme bereits makroskopisch Unterschiede aufweisen. Die Bakterien wurden hierfür in speziellen Objektträgern mit acht Kammern kultiviert und es wurden Aufnahmen mittels einer einfachen Digitalkamera erstellt. Es konnte gezeigt werden, dass sich der Biofilm des PIA-positiven *S. epidermidis* 1457 deutlich von den Biofilmen der Stämme *S. epidermidis* 1585v und *Staphylococcus epidermidis* 5179-R1 unterscheidet.

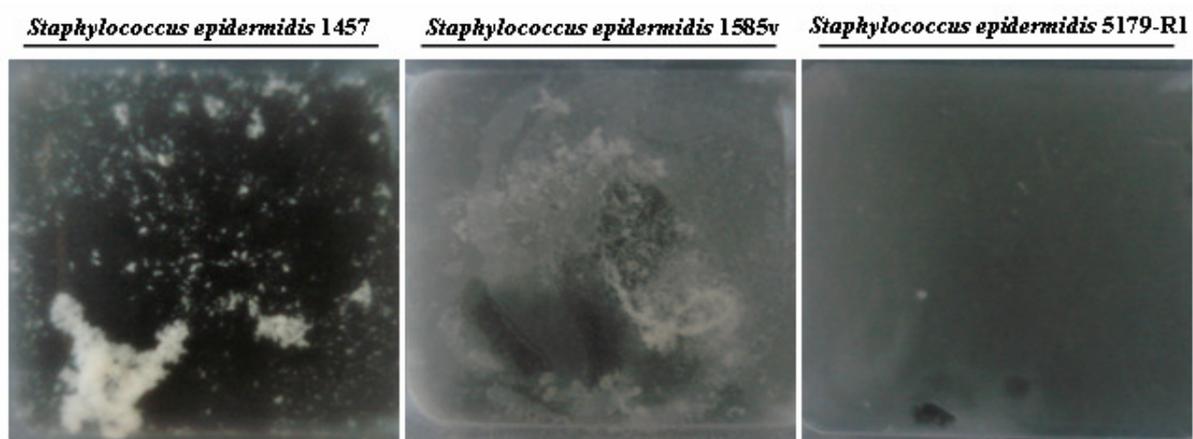


Abb. 11: Makroskopische Darstellung des Polysaccharid- und der Protein-abhängigen *S. epidermidis*-Biofilme. Die Bakterien wurden in 8-Kammer-Objektträger kultiviert und mit einer Digitalkamera (Sony, Tokio, Japan) fotografiert. Ein Bild repräsentiert eine Kammer mit der Länge von 1 cm.

Er bildet makroskopisch sichtbare dicke Zellaggregate, während die Biofilme der beiden anderen Stämme eher flach erscheinen. *S. epidermidis* 1457 bildet zudem einen sehr klebrigen und sehr stabilen Biofilm. Die Biofilme von *S. epidermidis* 1585v und *S. epidermidis* 5179-R1 bestehen hingegen aus lockeren und nicht-klebrigen Zellverbänden (Abb. 11).

5.1.2. Polysaccharid-abhängige Biofilme weisen kompaktere und widerstandsfähigere Strukturen im Vergleich zu Protein-abhängigen Biofilmen auf

Um die Architektur der Biofilmstrukturen der *S. epidermidis*-Stämme genauer zu analysieren und zu vergleichen, wurden mikroskopische Aufnahmen mittels des konfokalen Zeiss Axiovert 200M-Mikroskops (Carl Zeiss, Oberkochen) bei einer 100-fachen Vergrößerung erstellt. Die Bakterien wurden hierzu mit einem polyklonalen anti-*S. epidermidis*-Antiserum und einem sekundären Alexa488-Antikörper markiert. Die Bakterien wurden hierzu mit einem polyklonalen anti-*S. epidermidis*-Antiserum und einem sekundären Alexa488-Antikörper markiert.

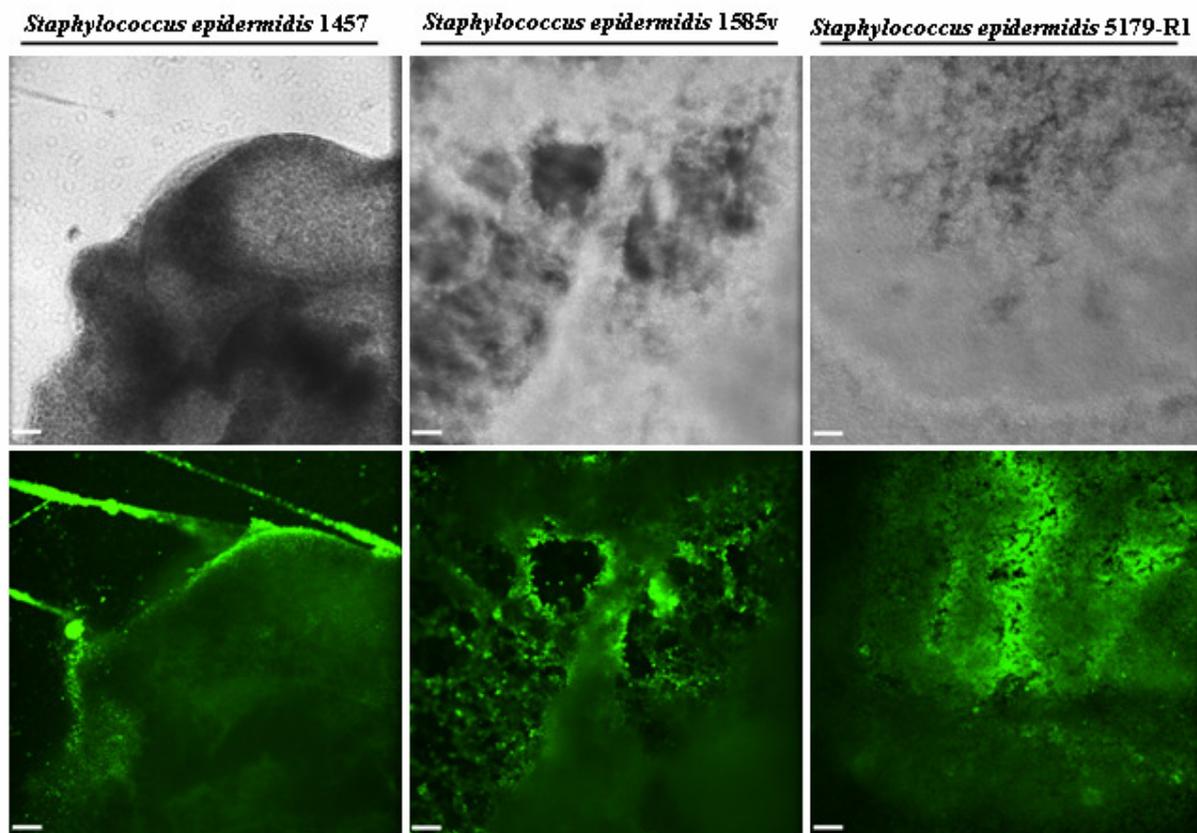


Abb. 12: Konfokale Fluoreszenzbilder der *S. epidermidis*-Biofilme bei einer 100-fachen Vergrößerung. Die Bakterien wurden in 8-Kammer-Objektträgern kultiviert und anschließend mit einem anti-*S. epidermidis*-Antiserum und einem sekundären Alexa488-Antikörper markiert. Obere Reihe: Durchlicht, untere Reihe: grüner Fluoreszenzkanal. Die Balken repräsentieren eine Länge von 50 µm.

Hier wird deutlich, dass die Biofilmaggregate von *S. epidermidis* 1457, die bereits makroskopisch sichtbar waren, sehr kompakte Strukturen darstellen, die zusätzlich einige fadenförmige Formationen enthalten. Im Vergleich dazu weisen die Stämme *S. epidermidis* 1585v und R1-179 ebenso ausgeprägte, kohäsive Strukturen auf. Jedoch sind diese Formationen weniger kompakt und beweglicher. Dies ließ sich auch sehr gut bei der praktischen Arbeit feststellen. Bei einem einfachen Pipettieren sind sie weniger widerstandsfähig und leichter zu lösen als der Biofilm von *S. epidermidis* 1457. Die Unterschiede zwischen den Biofilmstrukturen der Protein-abhängigen Biofilmbildner untereinander erscheinen bei dieser Vergrößerung eher gering.

5.1.3. Nachweis von PIA, Embp und Aap in Biofilmen

Um zu ergründen, ob sich die verschiedenen *S. epidermidis*-Stämme weiter differenzieren lassen, wurden sie mit einem *S. epidermidis*-spezifischem Antiserum und einem sekundären AlexaFluor488-Antikörper markiert und mittels konfokaler Mikroskopie und dreidimensionaler Darstellung bei einer 630-fachen Vergrößerung analysiert. Jedoch zeigten sich bei dieser Vergrößerung keine Verschiedenheiten zwischen den *S. epidermidis*-Zellen, die PIA, Aap oder Embp exprimieren (Abb. 13).

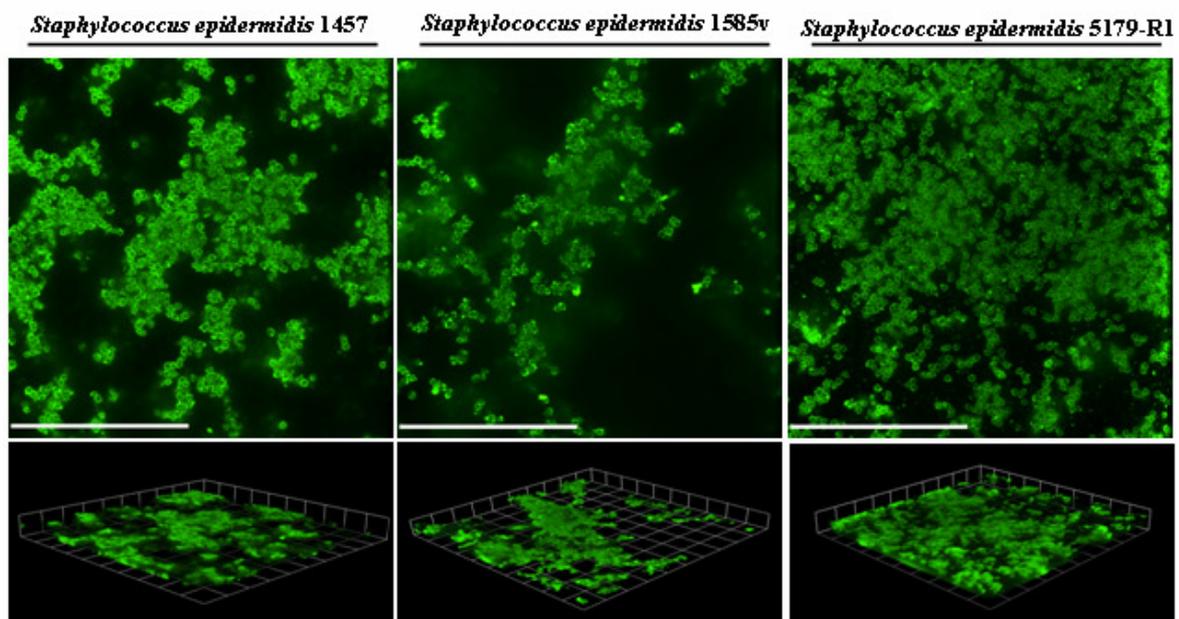


Abb. 13: Konfokale Fluoreszenzbilder der verschiedenen *S. epidermidis*-Biofilme bei einer 630-fachen Vergrößerung. Die Bakterien wurden in einem 8-Kammer-Objektträger kultiviert und mit einem anti-*S. epidermidis*-Antiserum und einem sekundären AlexaFluor488-Antikörper markiert. Die Balken repräsentieren eine Größe von 50 µm. Eine Einheit in der dreidimensionalen Darstellung repräsentiert 11,7 µm.

Als jedoch die N-Acetylglucosaminreste des PIA des Stammes *S. epidermidis* 1457 zusätzlich mittels Weizenkeimagglutinin markiert wurden und spezifische Antikörper zur Darstellung von Aap und Embp verwendet wurden, zeigten sich signifikante strukturelle Unterschiede zwischen den Biofilmen. Es konnte gezeigt werden, dass der Stamm *S. epidermidis* 1457 ein Netzwerk aus PIA bildet. Zudem kommt es in Form von dichten Aggregaten im Interzellularraum vor.

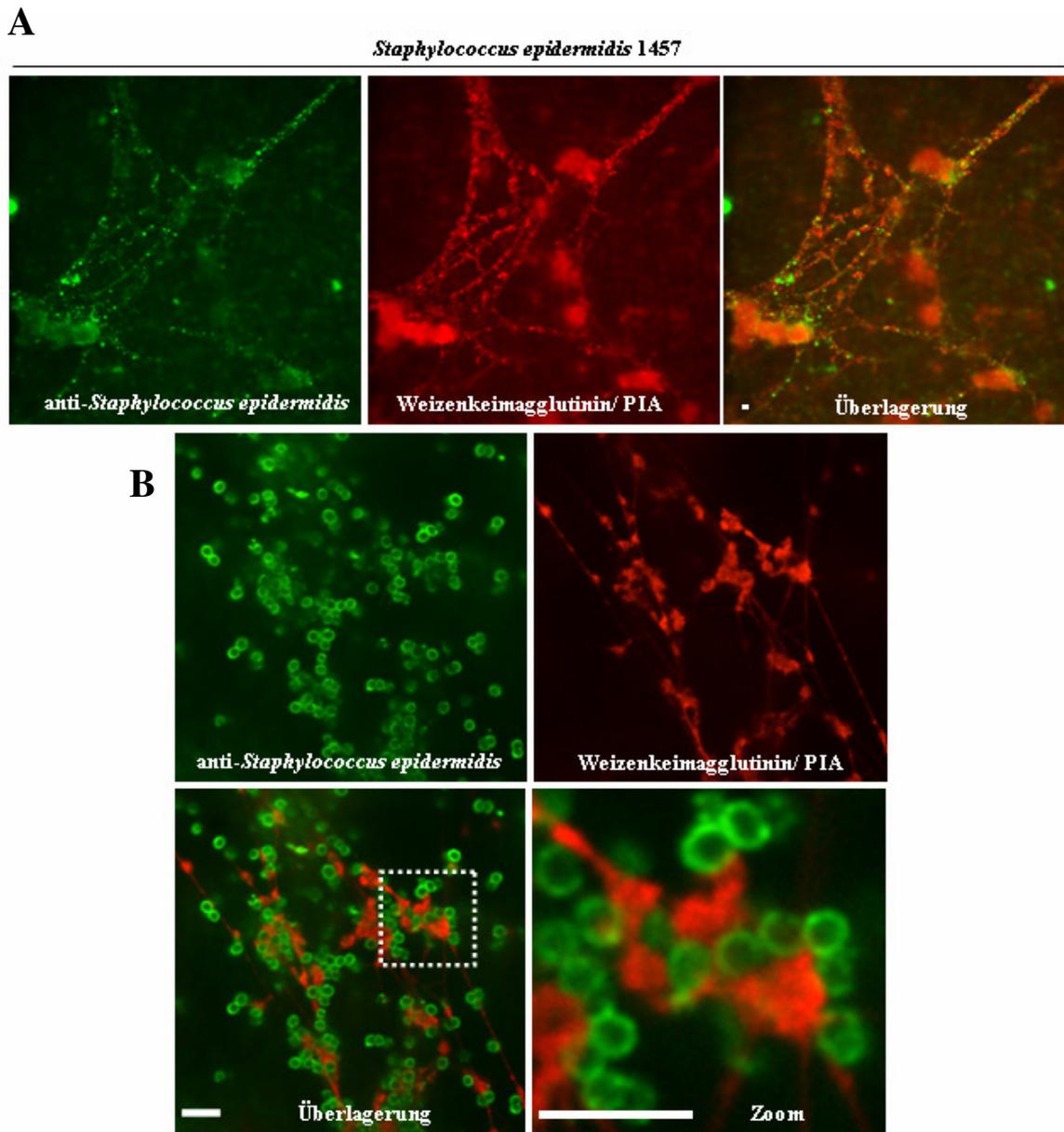


Abb. 14: Interzelluläre Lokalisation von PIA in *S. epidermidis* 1457 und Bildung von Netzstrukturen. Die Bakterien wurden in 35 mm Petrischalen kultiviert. Die Färbung erfolgte mittels eines anti-*S. epidermidis*-Antiserums und eines sekundären AlexaFluor488-Antikörpers. Weizenkeimagglutinin, gekoppelt an einem Alexa568-Fluorophor, wurde für die Markierung von PIA verwendet. **A.** 200-fache Vergrößerung. **B.** 630-fache Vergrößerung. Die Balken repräsentieren 6 μm .

Bei *S. epidermidis* 1585v befindet sich Embp auf der Zelloberfläche der Bakterien und ebenso in Form von Zellaggregaten im Interzellularraum (Abb. 15). Somit konnte gezeigt werden, dass dieses Molekül zum einen direkt mit der bakteriellen Zellwand assoziiert ist und zum anderen Matrixstrukturen, in welche die Bakterienzellen eingebettet sind, die in der Biofilmbildung involviert sind, bildet.

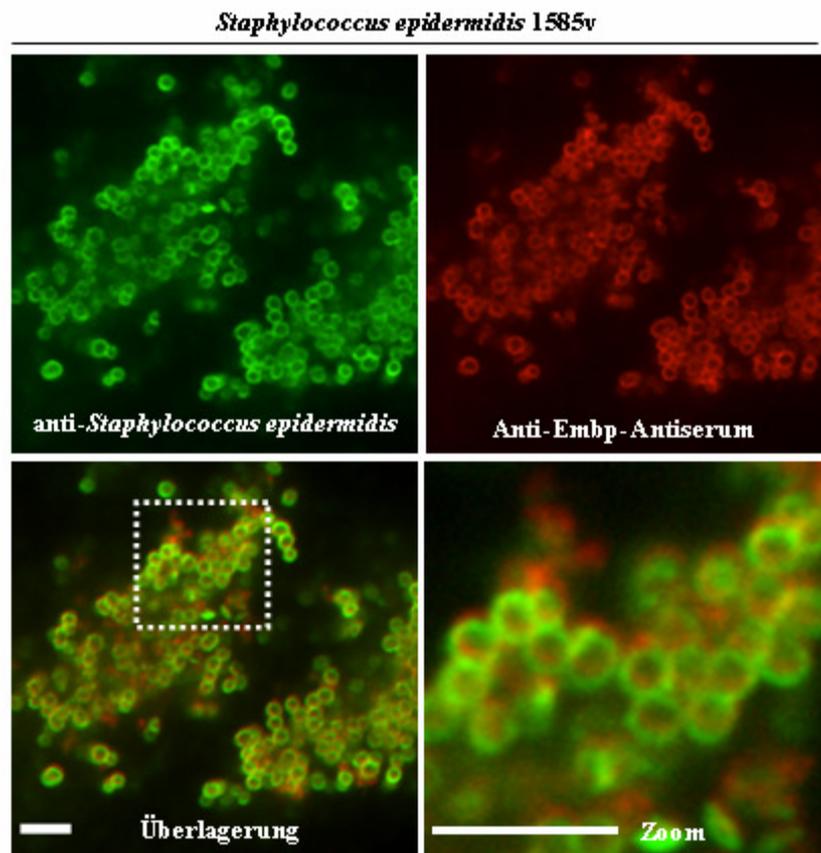


Abb. 15: Lokalisation von Embp in *S. epidermidis* 1585v. Nach Kultivierung der Bakterien in 35 mm-Petrischalen, erfolgte zusätzlich zu der Markierung mit einem anti-*S. epidermidis*-Antiserum und einem AlexaFluor488-Antikörper (grüne Fluoreszenz) eine Färbung mit einem Antiserum gegen Embp und einem sekundären AlexaFluor568-Antikörper (rote Fluoreszenz). Die Balken repräsentieren 6 μm .

Bei *S. epidermidis* 5179-R1-Biofilmen war das Akkumulationsprotein Aap ausschließlich auf der Zelloberfläche lokalisiert. Hier konnten keine Aap-Strukturen im Interzellularraum nachgewiesen werden (Abb. 16).

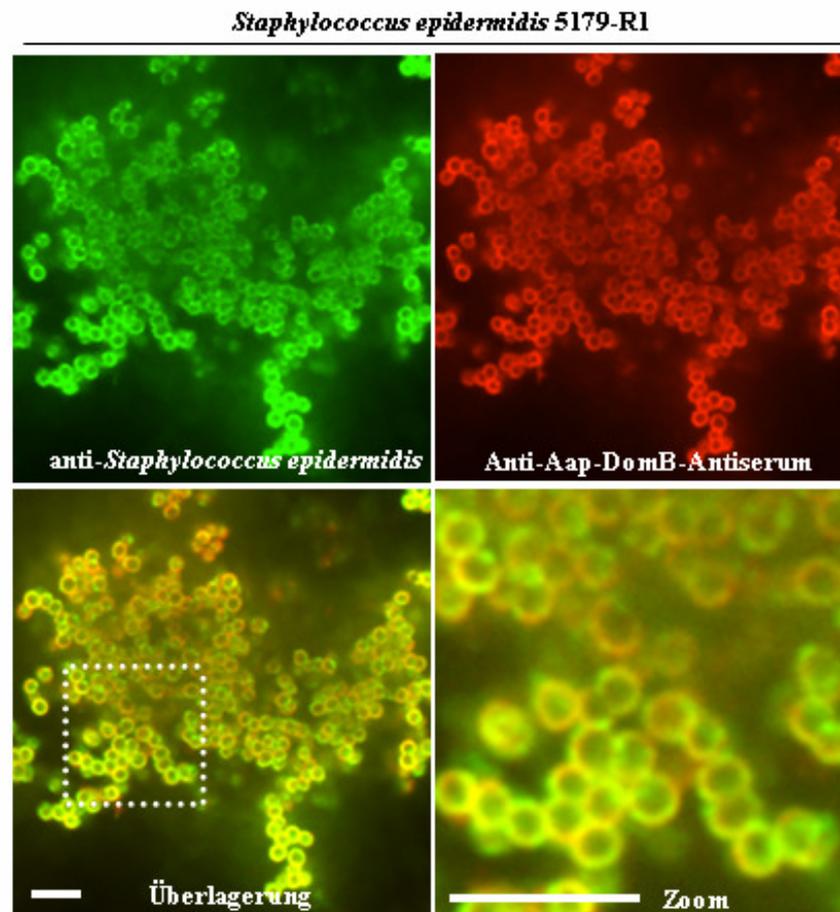


Abb. 16: Lokalisation von Aap in *S. epidermidis* 5179-R1. Nach Kultivierung der Bakterien in 35 mm-Petrischalen, erfolgte zusätzlich nach der Markierung mit einem anti-*S. epidermidis*-Antiserum und einem AlexaFluor488-Antikörper (grüne Fluoreszenz) eine Färbung mit einem Antiserum gegen Aap-Domäne B und einem sekundären AlexaFluor568-Antikörper (rote Fluoreszenz). Die Balken repräsentieren 6 μm .

5.2. Interaktion zwischen *S. epidermidis*-Biofilmen und J774A.1-Makrophagen

5.2.1. Protein-abhängige Biofilme sind gleichermaßen vor der Phagozytose durch J774A.1-Makrophagen geschützt wie Polysaccharid-abhängige Biofilme

Die unterschiedlichen Strukturmerkmale der PIA-, Embp- und Aap-vermittelten Biofilme führen zu der Frage, ob diese einen Einfluss auf die Empfindlichkeit der biofilmbildenden Bakterien gegenüber Phagozytose haben.

Zunächst aber sollte veranschaulicht werden, dass die J774A.1-Makrophagen nicht nur auf dem Biofilm abgelagert sind, sondern auch in diesem integriert sind. Hierzu wurde die Membran der Makrophagen mittels eines fluoreszenten Farbstoffes angefärbt. Zugleich

erfolgte eine Weizenkeimagglutinin-Färbung des biofilmpositiven *S. epidermidis* 1457. Abbildung 17 zeigt die mikroskopischen dreidimensionalen Aufnahmen bei einer 100-fachen Vergrößerung (Zeiss Axiovert 200M) vier Stunden nach Infektion. Mithilfe dieser Methode konnte eindeutig bewiesen werden, dass die Makrophagen in jeder Ebene mit dem Biofilm in Kontakt treten. Die Pfeile in den Abbildungen zeigen, dass sich diese zu einem Teil in dem Biofilm selbst lokalisiert sind.

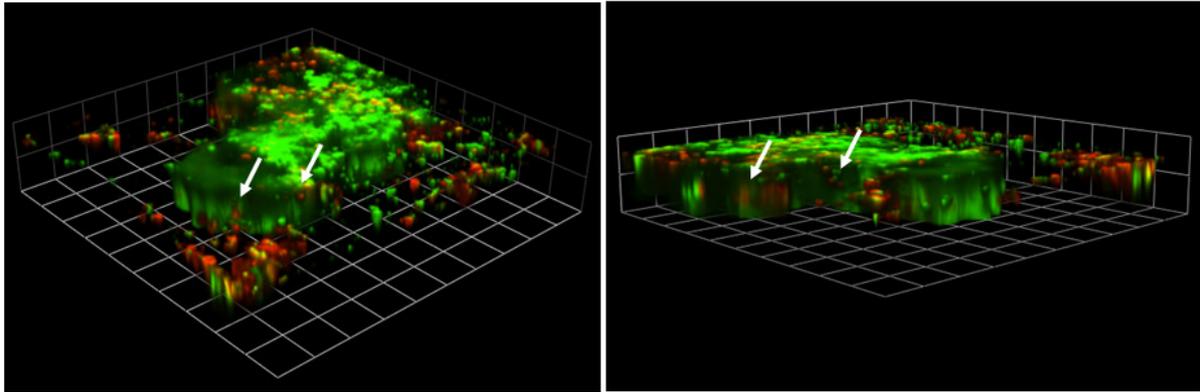


Abb. 17: Die J774A.1.-Makrophagen treten in jeder Ebene mit dem Biofilm in Kontakt. Als Modellbeispiel wurden die J774A.1.-Makrophagen mit dem biofilmpositiven Stamm *S. epidermidis* 1457 für vier Stunden infiziert. Vor der Infektion wurden die Makrophagen mit einem Membran-Fluoreszenzfarbstoff (rote Fluoreszenz) markiert und die Staphylokokken mit Weizenkeimagglutinin (grüne Fluoreszenz) gefärbt. Die Pfeile zeigen auf Makrophagen, die in dem Biofilm integriert sind. 1 Einheit= 73,9 µm.

Zur Testung der Empfindlichkeit der biofilmbildenden *S. epidermidis*-Stämme 1457, 1585v und 5179-R1 gegenüber Phagozytose wurden diese in 6-well-Platten kultiviert. Die J774.A.1. wurden auf speziellen Deckgläsern ebenso in 6-well-Platten ausgesät und am folgenden Tag mit pmaxGFP transfiziert. Nach einer vierstündigen Infektion und Fixierung der Zellen erfolgte eine Innen- und Außen-Färbung (siehe Abschnitt 4.13.13). Zur Kontrolle dienten die entsprechenden biofilmnegativen Stämme *S. epidermidis* 1457-M10 (PIA-negativ), M135 (Embp-negativ) und 5179 (Aap-negativ). Mittels der konfokalen Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Makrophagen direkt mit den biofilmpositiven und biofilmnegativen Bakterien in Kontakt standen (Abb. 18 und 19). Zu einem Großteil waren sie vollständig von den Bakterien umgeben.

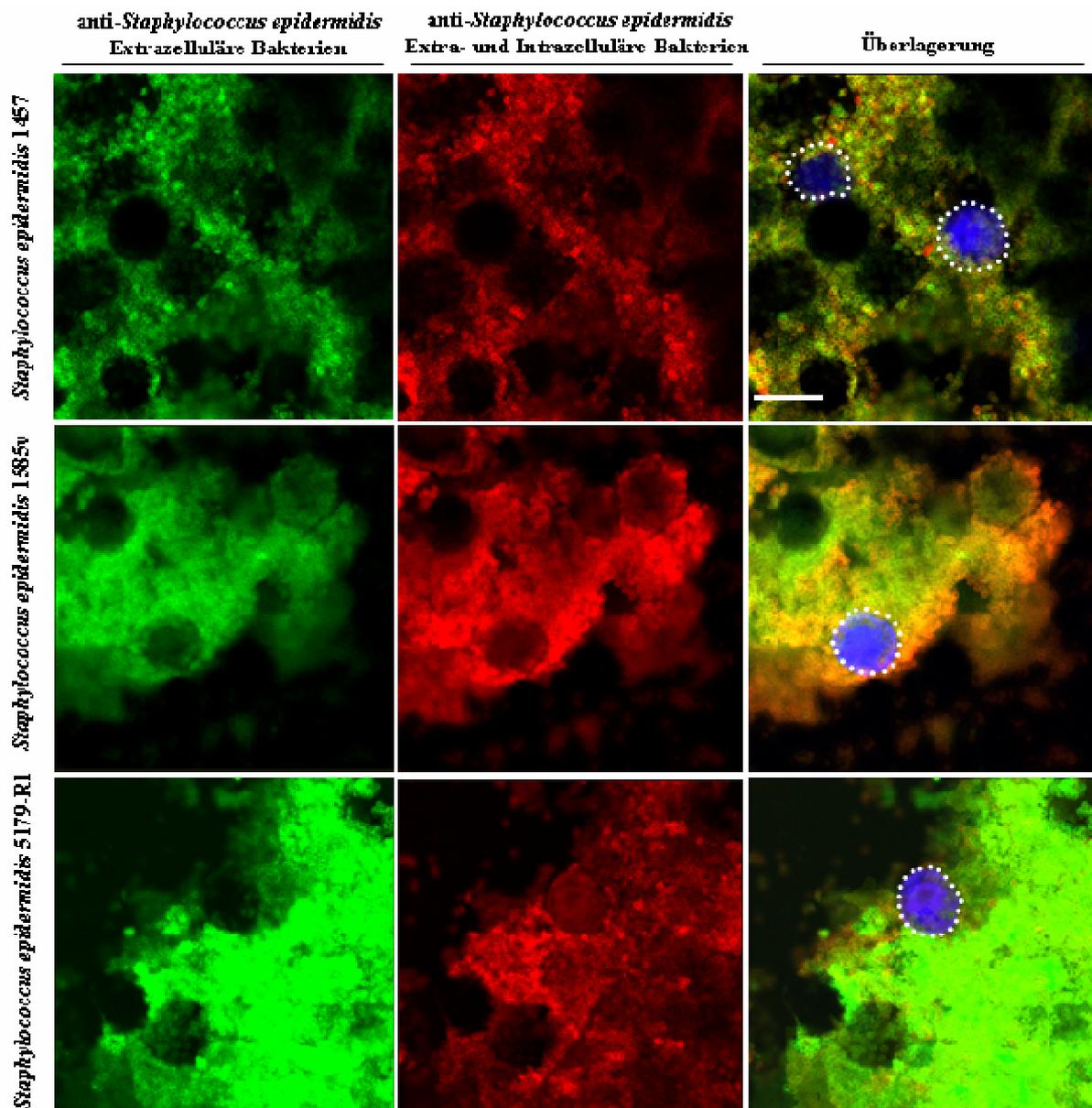


Abb. 18: Die Protein-abhängigen Biofilme von *S. epidermidis* 1585v und 5179-R1 sind im gleichen Maße vor der Phagozytose durch J774A.1.-Makrophagen geschützt wie der Polysaccharid-abhängige Biofilm von *S. epidermidis* 1457. Die Makrophagen wurden mit pmaxGFP (blau) transfiziert. Die Transfektionsrate lag im Durchschnitt bei 20%. Nach einer Infektionszeit von vier Stunden wurden die Bakterien mit einem anti-*S. epidermidis*-Antiserum und mit einem Cy5-markiertem IgG-Antikörper (grün) gefärbt. Nach Detergenzbehandlung erfolgte eine erneute Färbung der Bakterien mit anti-*S. epidermidis*-Antiserum und einem sekundären AlexaFluor568-Antikörper (rot). Die Innen- und Außen-Färbung identifiziert phagozytierte Bakterien (rot) und extrazelluläre Bakterien (rot-grün überlagert). Die gepunkteten Linien zeigen die Zellgrenzen der Makrophagen an. Der Balken repräsentiert 12 μm .

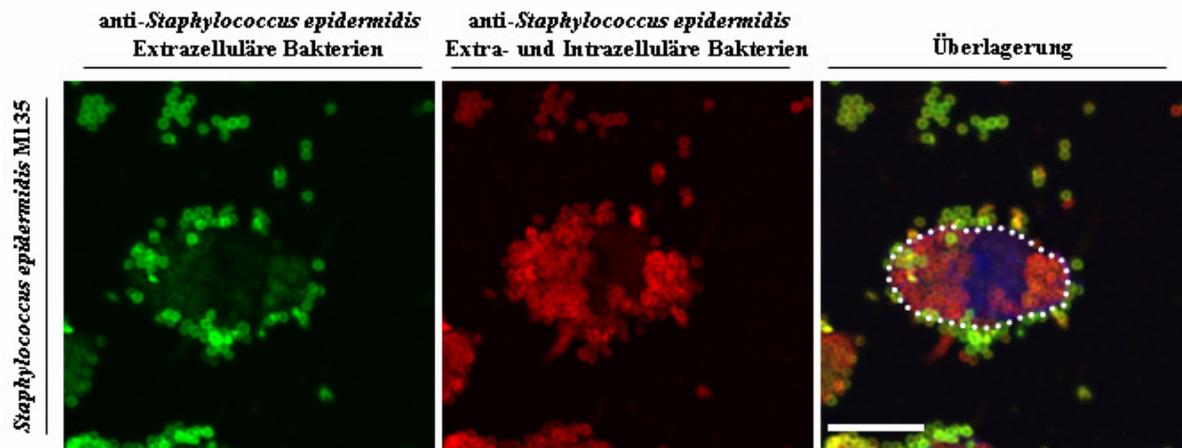


Abb. 19: Biofilmnegative *S. epidermidis*-Stämme werden von J774A.1-Makrophagen phagozytiert. Durchgeführt wurde dieser Versuch mit den Kontrollstämmen *S. epidermidis* 1457-M10, M135 und 5179. Dargestellt ist beispielhaft der Stamm *S. epidermidis* M135. Die Makrophagen wurden mit pmaxGFP (blau) transfiziert. Die Transfektionsrate lag im Durchschnitt bei 20%. Nach einer Infektionszeit von vier Stunden wurden die Bakterien mit einem anti-*S. epidermidis*-Antiserum und mit einem Cy5-markiertem IgG-Antikörper (grün) gefärbt. Nach Detergenzbehandlung erfolgte eine erneute Färbung der Bakterien mit anti-*S. epidermidis*-Antiserum und einem sekundären AlexaFluor568-Antikörper (rot). Die Innen- und Außen-Färbung erlaubt die Differenzierung von phagozytierten Bakterien (rot) und extrazellulären Bakterien (rot-grün überlagert). Die gepunkteten Linien zeigen die Zellgrenzen der Makrophagen an. Der Balken repräsentiert 12 μm .

Die Auszählung der intrazellulären Bakterien (rote Fluoreszenz) und extrazellulären Bakterien (grüne und rote Fluoreszenz überlagert) des Stammes *S. epidermidis* 1457 ergab, dass zehnmal mehr Zellen des biofilmnegativen *S. epidermidis* 1457-M10 aufgenommen wurden, als Zellen des biofilmpositiven Stammes *S. epidermidis* 1457 (Abb. 20). Ähnlich waren auch signifikant mehr der biofilmnegativen *S. epidermidis* M135 und 5179 im Vergleich zu den entsprechenden biofilmpositiven Stämmen *S. epidermidis* 1585v und 5179-R1 innerhalb der J774A.1-Makrophagen lokalisiert. Es lässt sich zusammenfassen, dass *S. epidermidis* durch die Biofilmbildung vor der Phagozytose durch J774A.1-Makrophagen geschützt ist. Durch die Quantifizierung der Innen- und Außen-Färbung konnte gezeigt werden, dass die Protein-abhängigen Biofilme von *S. epidermidis* 1585v und 5179-R1 ebenso eine Resistenz gegenüber der Phagozytose durch J774A.1-Makrophagen aufweisen wie der Polysaccharid-abhängige Biofilm von *S. epidermidis* 1457.

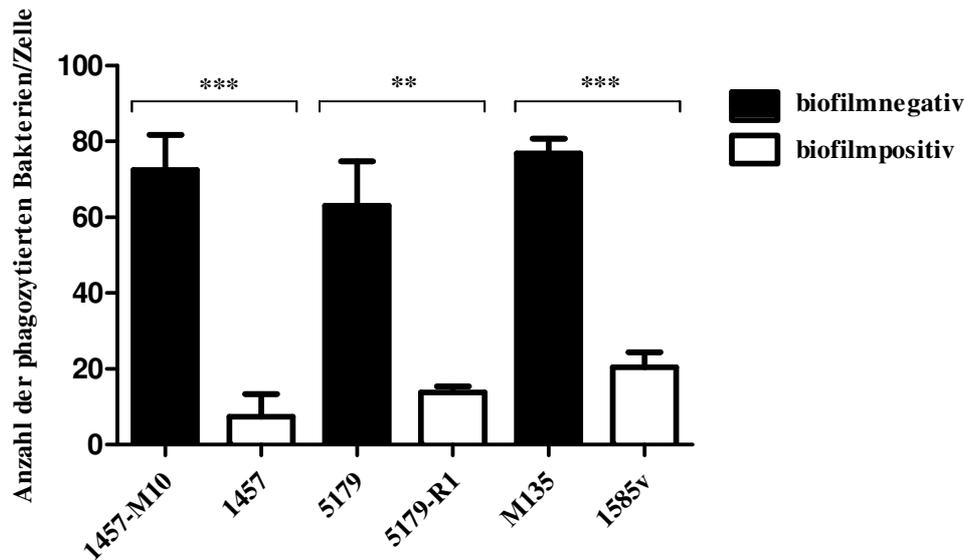


Abb. 20: Die Anzahl phagozytierter bakterieller Zellen der planktonischen, biofilmbesitz negativen *S. epidermidis*-Stämmen ist im Vergleich zu der Anzahl an phagozytierten biofilmbesitz positiven Stämmen **signifikant höher**. Statistische Analyse phagozytierter *S. epidermidis*-Stämme durch J774A.1.-Makrophagen. J774A.1.-Makrophagen wurden über einen Zeitraum von vier Stunden jeweils mit den verschiedenen *S. epidermidis*-Stämmen infiziert. Die Phagozytose wurde durch eine Immunfluoreszenzfärbung quantifiziert, die zwischen intrazellulären und extrazellulären Bakterien unterscheidet. Die Werte ergeben sich aus den Mittelwerten von drei verschiedenen Experimenten (\pm Standardabweichung). Signifikanzniveau: 0,05 (ANOVA *one way*).

Eine mögliche Ursache für die beobachteten Unterschiede könnte sein, dass der Kontakt zwischen den Makrophagen und den biofilmbesitz positiven *S. epidermidis*-Stämmen zum Zelltod der Makrophagen führt, während Makrophagen nach Kontakt mit biofilmbesitz negativen *S. epidermidis*-Stämmen vital bleiben. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Makrophagen jeweils mit den verschiedenen *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen infiziert und anschließend mit Trypanblau gefärbt und ausgezählt (Abb. 21). Mithilfe dieser Methode konnte nachgewiesen werden, dass der prozentuale Anteil an toten Zellen in Proben infizierter Makrophagen den Anteil der toten Zellen in Proben mit unbehandelten Zellen nicht übersteigt. So konnte errechnet werden, dass durchschnittlich 86,28 % der infizierten und nicht- infizierten Makrophagen vital waren.

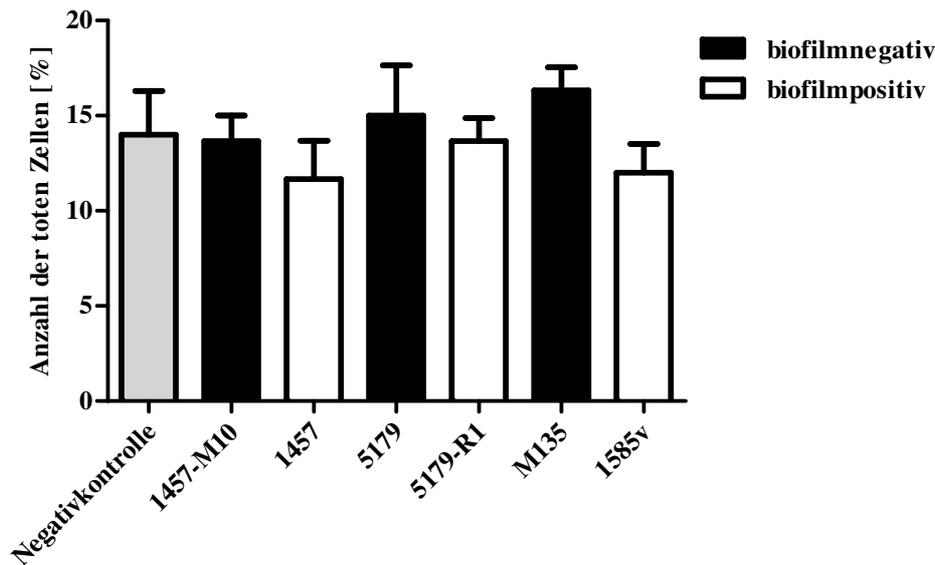


Abb. 21: Die Vitalität der J774A.1-Makrophagen bleibt durch eine Infektion mit *S. epidermidis* nach einer Dauer von vier Stunden unbeeinflusst. J774A.1. Makrophagen wurden für vier Stunden mit den verschiedenen *S. epidermidis*-Stämmen infiziert. Eine Makrophagen-Probe blieb unbehandelt (Negativkontrolle). Anschließend wurden die Makrophagen mit Trypanblau gefärbt und ausgezählt. Die Werte ergeben sich aus den Mittelwerten von drei verschiedenen Experimenten (\pm Standardabweichung). Mithilfe des one way ANOVA-Tests wurde keine Signifikanz festgestellt. Signifikanzniveau: 0,05.

5.2.2. Polysaccharid- und Protein-abhängige *S. epidermidis*-Biofilme hemmen die NF- κ B-Aktivierung in J774A.1-Makrophagen

NF- κ B ist von großer Bedeutung für die Regulation der Immunantwort. Die Aktivierung dieses Faktors gilt als kritisch für die Entstehung einer Entzündung. Mittels eines Luciferase-Reports sollte festgestellt werden, ob biofilmbildende Bakterien nach einer Infektion einen Einfluss auf die NF- κ B-Aktivierung in J774A.1-Makrophagen haben.

Zur Bestimmung der Infektionsdauer wurde die NF- κ B-Aktivität zuvor in zeitabhängigen Versuchen gemessen. J774A.1-Makrophagen wurden mit dem pELAM-NF- κ B-Luciferase-Konstrukt transfiziert und zunächst mit LPS oder Pam3-Cys stimuliert. Die Messung der NF- κ B-Aktivität erfolgte nach 1, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden. Durch die Aktivitätsmessung nach einem Zeitraum von vier, sechs und acht Stunden mit Pam3Cys oder LPS als Positivkontrolle, konnte eine starke NF- κ B-Aktivierung bestimmt werden. Es zeigen sich hierbei signifikante Unterschiede zur NF- κ B-Aktivierung in unbehandelten Makrophagen (Negativkontrolle) (Abb. 22).

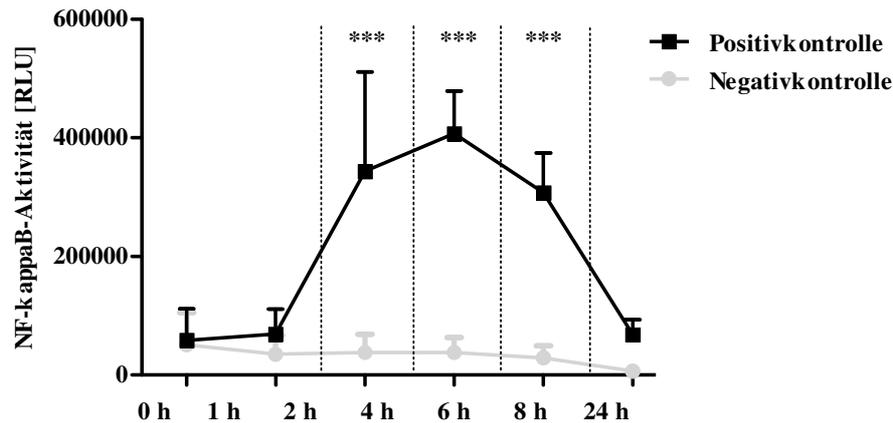


Abb. 22: Bestimmung der Infektionsdauer. J774.A.1.-Makrophagen wurden mit dem pELAM-NF- κ B-Luciferase-Konstrukt transfiziert und mit LPS für 1, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden stimuliert (Positivkontrolle). Die NF- κ B-Aktivierung der Makrophagen wurde mithilfe eines Luciferase-Reports gemessen. Die Expression des Reportergens ist durch einen synthetischen Promotor kontrolliert, der direkte Wiederholungseinheiten der Transkriptionserkennungssequenzen für die Bindungsstellen des NF- κ B enthält. Somit konnte die Aktivierung von NF- κ B auf der Expressionsstufe des Reporters verfolgt werden. Negativkontrolle: unbehandelte J774A.1.-Makrophagen, die mit pELAM-NF- κ B-Luciferase transfiziert wurden. Die Werte ergeben sich aus den Mittelwerten von vier verschiedenen Experimenten (\pm Standardabweichung). Signifikanzen sind mit * gekennzeichnet. Signifikanzniveau: 0,05 (ANOVA *one way*).

Wurden die Makrophagen über den gleichen Zeitraum mit den biofilmnegativen Stamm *S. epidermidis* 1457-M10 infiziert, konnte ebenfalls ein Anstieg der NF- κ B-Aktivität detektiert werden. Dieser war jedoch im Vergleich zur Stimulierung mit LPS um 65 % geringer (Abb. 23). Erfolgte die Infektion der Makrophagen jedoch mit dem PIA-positiven, biofilmbildenden Stamm *S. epidermidis* 1457, konnte gezeigt werden, dass die NF- κ B-Aktivität im Vergleich zur Stimulierung mit LPS um 95 % und im Vergleich zur Infektion mit dem Stamm *S. epidermidis* 1457-M10 um 30 % geringer war. Bei der Messung der NF- κ B-Aktivität von unbehandelten Makrophagen (Negativkontrolle) ergab sich ein Unterschied von nur 1%.

Dieses Resultat gibt einen Hinweis dafür, dass Makrophagen durch die Infektion mit PIA-negativen, biofilmnegativen *S. epidermidis*-Stämmen aktiviert werden können, nicht aber durch die Infektion mit PIA- und biofilmpositiven, *S. epidermidis*-Stämmen.

Um eine Antwort darauf geben zu können, ob die Protein-abhängigen Biofilme von *S. epidermidis* 1585v und 5179-R1 ähnliche Effekte bewirken, wurde bei diesen ebenso die NF- κ B-Aktivität der Makrophagen nach einer Infektion gemessen. Makrophagen, die mit dem Aap-positiven *S. epidermidis*-Stamm 5179-R1 infiziert wurden, lösten eine signifikant geringere NF- κ B-Aktivität in Makrophagen aus als die Aap-negative Mutante 5179

(Differenz 37 %). Eine ähnliche Differenz ergab sich bezüglich der Infektion von Makrophagen mit dem Embp-positiven Stamm *S. epidermidis* 1585v und der Embp-negativen Mutante M135 (Differenz 34 %).

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass J774A.1.-Makrophagen durch die Infektion mit biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen unabhängig von der Art des Biofilmadhäsins eine signifikant schwächere NF- κ B-Aktivierung erkennen lassen als J774A.1.-Makrophagen, die mit biofilmnegativen *S. epidermidis*-Stämmen infiziert wurden.

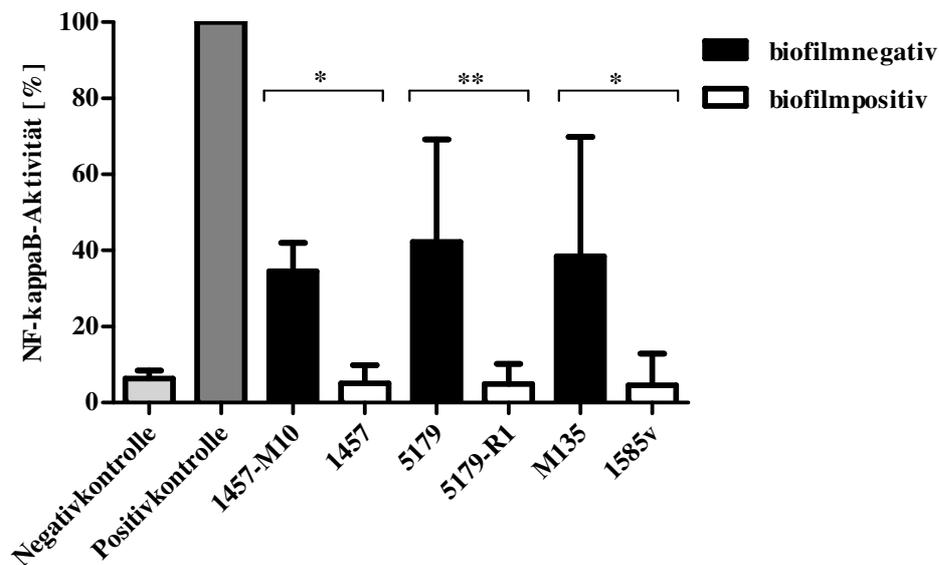


Abb. 23: Polysaccharid- und Protein-abhängige *S. epidermidis*-Biofilme hemmen die NF- κ B-Aktivierung in J774A.1.-Makrophagen. Nach Transfektion der J774A.1.-Makrophagen mit pELAM-NF- κ B-Luciferase wurden diese über einen Zeitraum von vier Stunden mit den verschiedenen *S. epidermidis*-Stämmen infiziert. Die NF- κ B-Aktivierung der Makrophagen wurde mithilfe eines Luciferase-Reports gemessen. Negativkontrolle: nicht-infizierte J774A.1.-Makrophagen, die mit pELAM-NF- κ B-Luciferase transfiziert wurden. Positivkontrolle: nicht-infizierte J774A.1.-Makrophagen, die mit pELAM-NF- κ B-Luciferase transfiziert und zusätzlich über den Infektionszeitraum mit LPS stimuliert wurden. Die Werte ergeben sich aus den Mittelwerten von vier verschiedenen Experimenten (\pm Standardabweichung). Signifikanzen sind mit * gekennzeichnet. Signifikanzniveau: 0,05 (ANOVA *one way*).

Die Biofilme der Staphylokokken stellen fest zusammenhängende Strukturen dar. Zudem ist der Polysaccharid-assoziierte Biofilm sehr klebrig. Daher musste in einem weiteren Experiment sichergestellt werden, dass die Makrophagen unabhängig vom eingesetzten *S. epidermidis*-Stamm gleichermaßen gut lysiert wurden. Hierfür wurden die Makrophagen mit dem Konstrukt pGL2-Control-Vektor transfiziert. Dieser enthält das Luciferasegen, welches unter der Kontrolle eines SV40-Promotors steht, woraus eine starke, konstitutive Luciferase-

Expression resultiert. Verglichen wurden die Werte der Expression der Luciferase von Makrophagen die mit biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen und mit den biofilmbnegativen Mutanten infiziert wurden.

Das Ergebnis zeigt, dass die vollständige Anzahl der Makrophagen nicht extrahiert wurde (Abb. 24). Dennoch wurden gleichermaßen viel Makrophagen, die mit biofilmpositiven Staphylokokken infiziert wurden, extrahiert, wie solche, die mit biofilmbnegativen Staphylokokken in Kontakt gebracht wurden.

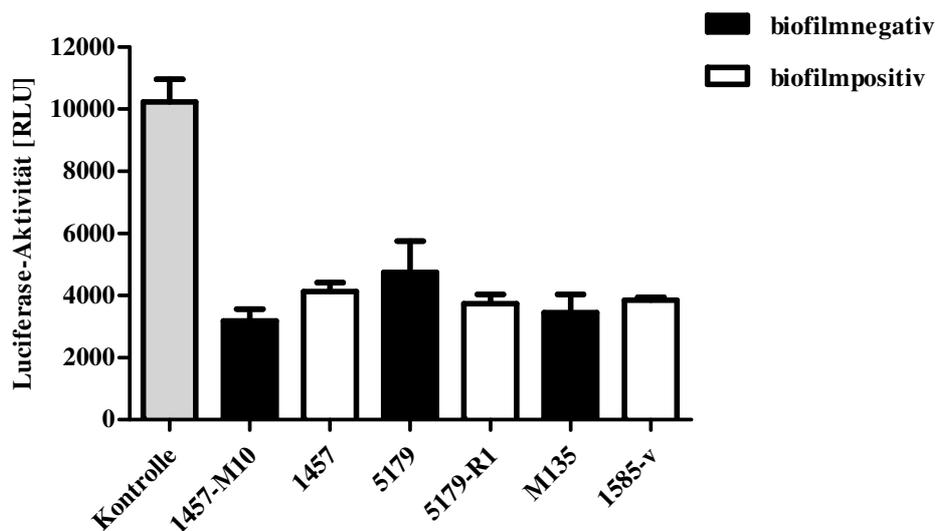


Abb. 24: Graphische Darstellung der Extraktionskontrollen. J774A.1.-Makrophagen wurden mit dem pGL2-*Control*-Vektor transfiziert und im Anschluss für vier Stunden mit den verschiedenen *S. epidermidis*-Stämmen infiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde mithilfe eines Luciferase-Reports gemessen. Kontrolle: nicht-infizierte J774A.1.-Makrophagen, die mit dem pGL2-*Control*-Vektor transfiziert wurden. Die Werte ergeben sich aus den Mittelwerten von zwei verschiedenen Experimenten (\pm Standardabweichung).

5.2.3. *S. epidermidis* interferiert mit der AP-1-Aktivierung in J774A.1.-Makrophagen

Ap-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der über MAP-Kinasen aktiviert wird und ähnlich wie NF- κ B für die Regulation der Immunantwort wichtig ist. Um zu überprüfen, ob die biofilmbildenden Bakterien nach einer Infektion einen Einfluss auf die AP-1-Aktivierung in J774A.1.-Makrophagen haben, wurde ein weiterer Luciferase-Reporter-Versuch durchgeführt. Hierzu wurden die Makrophagen mit dem pAP-1-Luciferase-Konstrukt transfiziert. Im Anschluss wurden diese mit den verschiedenen *S. epidermidis*-Stämmen infiziert und die Ap-1-Aktivität gemessen.

Das Ergebnis zeigt, dass *S. epidermidis* im Vergleich zu der Positivkontrolle LPS eine stark reduzierte AP-1-Aktivierung in J774A.1.-Makrophagen hervorruft (Abb. 25). Makrophagen,

die mit *S. epidermidis* 1457 infiziert wurden, zeigen eine tendenziell geringere AP-1-Aktivität als Makrophagen, die mit der biofilmmnegativen Transposonmutante 1457-M10 infiziert wurden (Differenz 20 %). Ähnliche Beobachtungen ergaben sich beim Vergleich von Makrophagen, die mit dem *S. epidermidis*-Stamm 5179-R1 und 5179 infiziert wurden (Differenz 16,45 %). Eine Differenz der AP-1-Aktivität von 12,57 % bestand zwischen Makrophagen, die mit *S. epidermidis* 1585v und M135 in Kontakt gebracht wurden. *S. epidermidis* hat somit einen Einfluß auf die AP-1-Aktivierung in Makrophagen nach Infektion. Es besteht zudem ein tendenzieller, nicht aber signifikanter Unterschied zwischen der AP-1-Aktivierung von Makrophagen, die mit biofilmpositiven Stämmen infiziert wurden und der AP-1-Aktivierung von Makrophagen, die mit biofilmmnegativen Stämmen infiziert wurden.

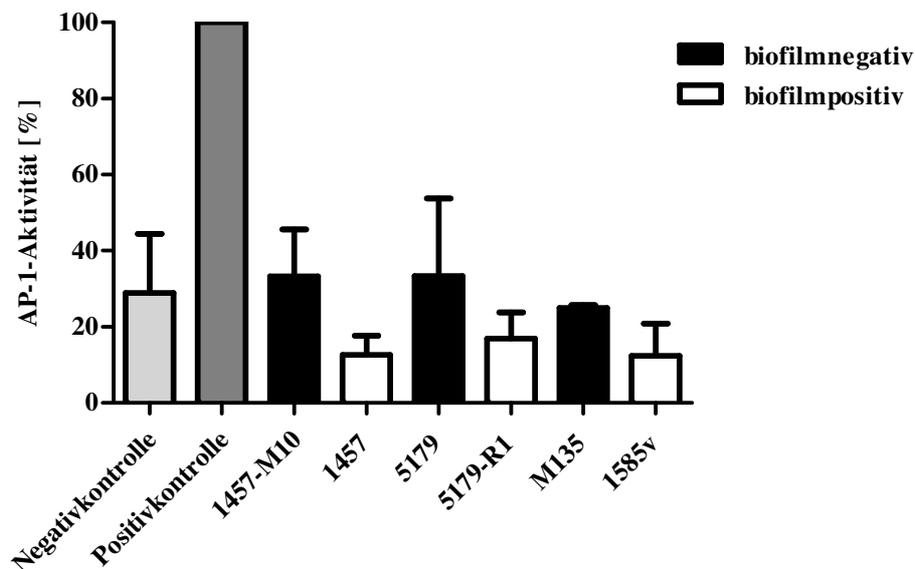


Abb. 25: *S. epidermidis* interferiert mit der AP-1-Aktivierung in J774A.1-Makrophagen. J774A.1-Makrophagen wurden mit pAP-1-luc transfiziert und mit den verschiedenen *S. epidermidis*-Biofilmen über einen Zeitraum von vier Stunden infiziert. Die AP-1-Aktivierung der Makrophagen wurde mithilfe eines Luciferase-Reports gemessen. Negativkontrolle: nicht-infizierte J774A.1-Makrophagen, die mit dem AP-1-luc transfiziert wurden. Positivkontrolle: nicht-infizierte J774A.1-Makrophagen, die mit dem AP-1-luc transfiziert und über den Infektionszeitraum mit LPS stimuliert wurden. Die Werte ergeben sich aus den Mittelwerten von drei verschiedenen Experimenten (\pm Standardabweichung). Signifikanzniveau: 0,05 (ANOVA *one way*).

5.2.4. Polysaccharid- und Protein-Biofilme inhibieren die durch *S. epidermidis* stimulierte IL-1 β -Expression in J774A.1-Makrophagen

Um die Hypothese, dass sich die Makrophagen-Aktivierung nach dem Kontakt mit biofilmpositiven und biofilmmnegativen *S. epidermidis*-Stämmen unterscheidet, zu bestätigen,

Zytokin-Array durchgeführt. Hierbei sollten die Expressionsstufen von 40 Zytokinen und Wachstumsfaktoren simultan in einem Experiment detektiert werden.

Die Makrophagen wurden hierfür genau wie in den vorherigen Experimenten für einen Zeitraum von vier Stunden jeweils mit den verschiedenen Biofilmen von *S. epidermidis* und den entsprechenden biofilmnegativen Stämmen infiziert. Abbildung 27 zeigt die Immunreaktivität der Zytokine und Wachstumsfaktoren aus verschiedenen J774A.1.-Makrophagen-Lysaten. Die identifizierten Punkte auf den Array-Membranen wurden jeweils untereinander verglichen. Die Expressionstufen von MIP-1 α , MIP-1 γ , MCP-1, IL-1 α und RANTES liegen in Makrophagen, die mit LPS (Positivkontrolle) behandelt wurden deutlich erhöht vor im Vergleich zu den unbehandelten Makrophagen (Negativkontrolle).

Die biofilmnegativen *S. epidermidis*-Stämme 5179 und M135 induzierten in Makrophagen im Vergleich zur Negativkontrolle eine ebenso erhöhte Expression des Zytokins MIP- γ . Die Expressionsstufe von MIP- γ in Makrophagen, die mit dem Stamm *S. epidermidis* 1457-M10 infiziert wurden, blieben hingegen im Vergleich zur Negativkontrolle unverändert. Während einer Infektion mit den biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen zeigen die J774A.1.-Makrophagen im Vergleich zur Positivkontrolle eine verminderte Expression dieses Zytokins. Auffällig ist hier, dass die Expression von MIP- γ in *S. epidermidis* 5179-R1 und 1585v-infizierten Makrophagen noch geringer ist als in unbehandelten Makrophagen.

MIP-1 α wird in unbehandelten Makrophagen nur in sehr niedrigen Konzentrationen produziert. Makrophagen, die mit den verschiedenen *S. epidermidis*-Stämmen infiziert wurden, exprimieren dieses Zytokin nicht beziehungsweise scheinen die Expression zu inhibieren. Eine differentielle Expression zwischen Makrophagen, die entweder mit biofilmpositiven oder biofilmnegativen *S. epidermidis*-Stämmen infiziert wurden, ist nicht eindeutig.

Gleiches gilt für MCP-1, welches eines der Schlüsselchemokine ist, das die Migration und Infiltration von Monozyten und Makrophagen reguliert. Auch dieses wird von mit *S. epidermidis* infizierten J774A.1.-Makrophagen nur in sehr geringen Konzentrationen exprimiert. Einen weiteren Einfluss haben die verschiedenen *S. epidermidis*-Stämme auf die IL-1 α - und RANTES-Produktion in J774A.1.-Makrophagen. Im Vergleich zur Positivkontrolle waren hier nur geringe Immunreaktivitäten dieser Zytokine zu identifizieren.

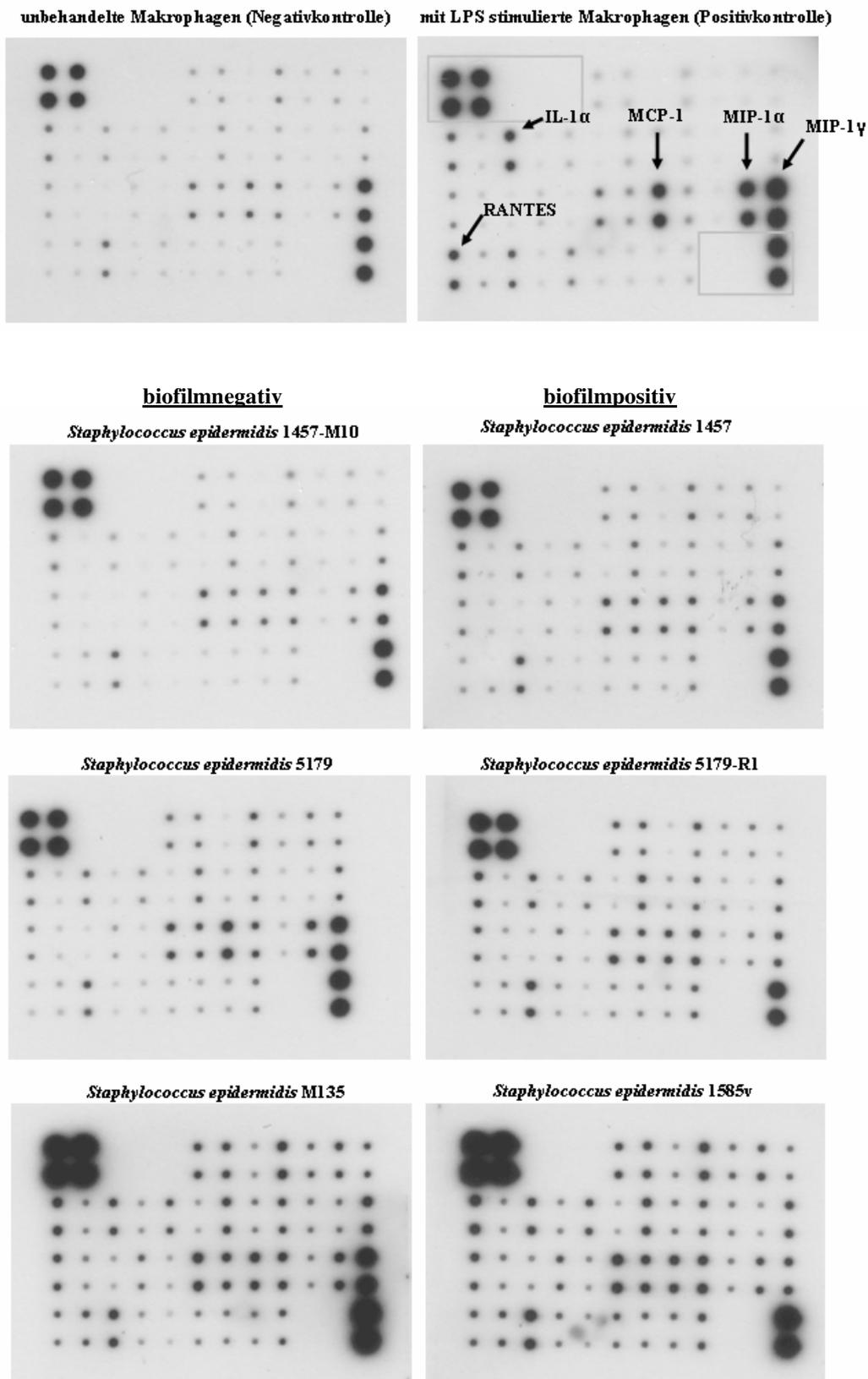


Abb. 27: Polysaccharid- und Protein-abhängige *S. epidermidis*-Biofilme interferieren mit der Zytokin-Produktion in J774.A.1.-Makrophagen J774.A.1.-Makrophagen wurden vier Stunden lang mit den verschiedenen *S. epidermidis*-Stämmen infiziert und anschließend lysiert. Mittels des *Mouse Inflammation Antibody Arrays* (RayBiotech, Norcross, USA) konnten die Expressionsstufen von 40 Zytokinen und Wachstumsfaktoren simultan in einem Experiment detektiert werden. Graue Kästchen: Kontrollen.

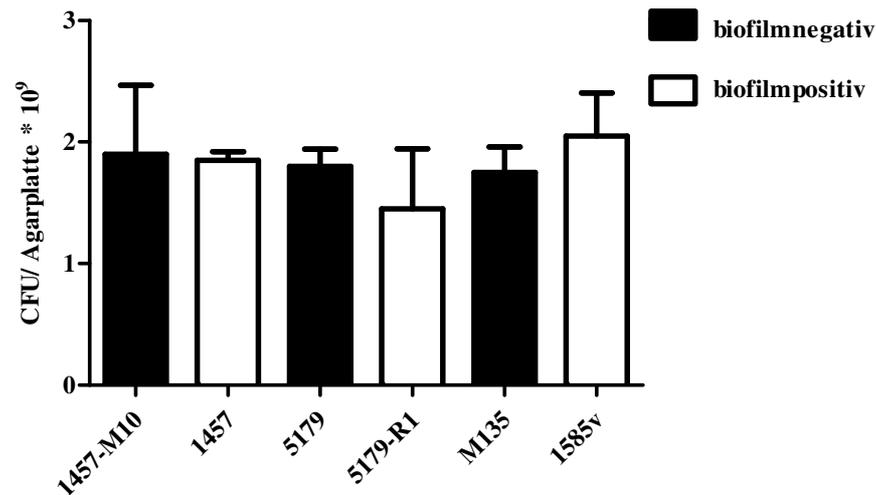


Abb. 28: Auszählung der *S. epidermidis*-Stämme nach einer Sonifizierung. Die Bakterien wurden in 6-well-Schalen kultiviert und anschließend abgeschabt. Die Sonifizierung erfolgte für 3 x 10 Sekunden bei einer Amplitude von 30 %. Die Werte ergeben sich aus den Mittelwerten von zwei verschiedenen Experimenten (\pm Standardabweichung). Signifikanzniveau: 0,05 (ANOVA *one way*).

Die sonifizierten Biofilme wurden im Anschluss mit entsprechenden Antisera gegen jeweils PIA, Aap-Domäne-B und Embp6599 und einem sekundäre AlexaFluor-Antikörper angefärbt (Abb. 29). Das Ergebnis zeigt, dass die bakteriellen Aggregate erfolgreich getrennt wurden. Auf den bakteriellen Zelloberflächen lassen sich die jeweiligen interzellulären Adhäsine nachweisen. Als die Makrophagen in einem weiteren Experiment mit dem pELAM-NF- κ B-Luc-Konstrukt transfiziert wurden, konnte nach einer Infektion mit den sonifizierten biofilmbesetzigten *S. epidermidis*-Stämmen eine hohe Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden, (Abb. 30). Da die interzellulären Adhäsine nach einer Sonifizierung noch auf den bakteriellen Zelloberfläche präsent waren (Abb. 29), deutet dieses Ergebnis auf die Tatsache hin, dass die *S. epidermidis*-Biofilme in ihrer Gesamtheit, nicht aber die Expression interzellulärer Adhäsine, mit der Inhibition der Makrophagen-Aktivierung assoziiert sind.

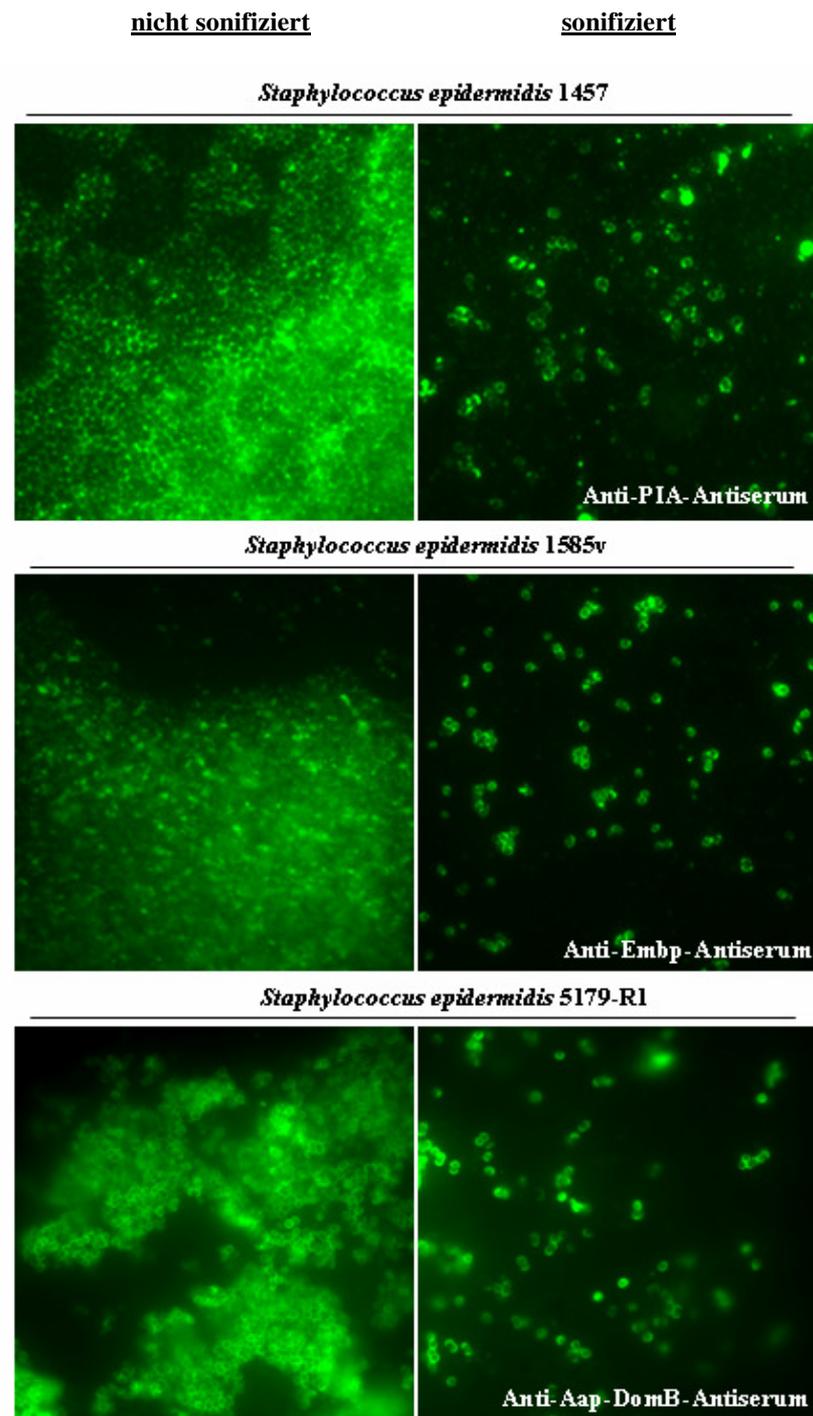


Abb. 29: Die *S. epidermidis*-Adhäsine PIA, Embp und Aap-DomB werden nach einer Sonifizierung auf der bakteriellen Zelloberfläche exprimiert. Die Bakterien wurden in 6-well-Schalen kultiviert. Im Anschluss wurden die Biofilme sonifiziert und dann jeweils gegen PIA, Embp oder Aap-DomB mit spezifischen Antiseren und einem sekundären AlexaFluor488-Antikörper gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit dem Zeiss Axioplan-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen).

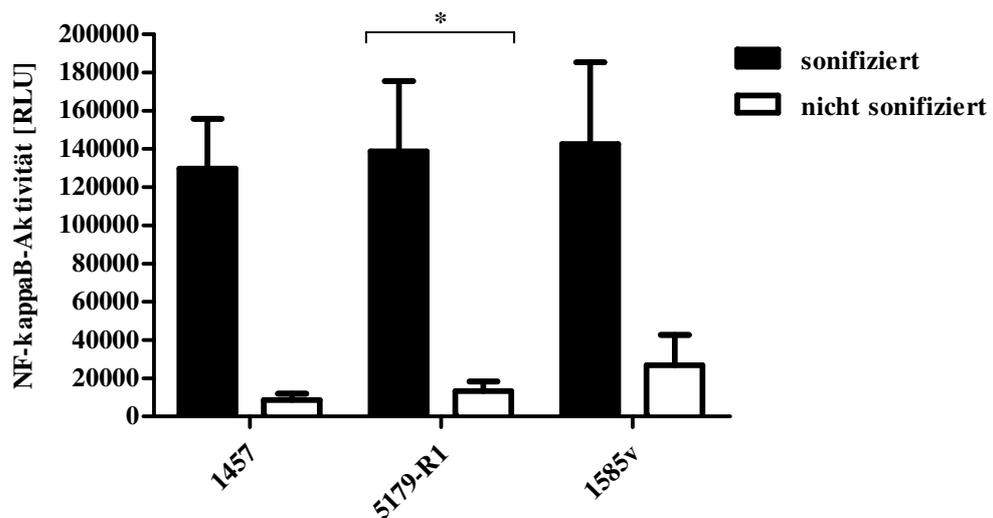


Abb. 30: Der *S. epidermidis*-Biofilm in seiner Gesamtheit, nicht aber die Expression interzellulärer Adhäsine, ist mit der Inhibition der Makrophagen-Aktivierung assoziiert. Mit pELAM-NF- κ B-Luc transfizierte J774.A.1.-Makrophagen wurden mit den intakten biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen und den entsprechenden sonifizierten Stämmen infiziert. Die NF- κ B-Aktivierung der Makrophagen wurde mithilfe eines Luciferase-Reports gemessen. Die Werte ergeben sich aus den Mittelwerten von zwei verschiedenen Experimenten (\pm Standardabweichung). Signifikanzen sind mit * gekennzeichnet. Signifikanzniveau: 0,05 (ANOVA *one way*).

Um diese Aussage zu bekräftigen, wurde untersucht, wie empfindlich die sonifizierten, biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämme gegenüber Phagozytose sind.

Die *S. epidermidis*-Stämme 1457, 1585v und 5179-R1 wurden in 6-well-Platten kultiviert. Die J774.A.1.-Makrophagen wurden auf speziellen Deckgläsern ebenso in 6-well-Platten ausgesät und am folgenden Tag mit pmaxGFP transfiziert. Wie unter Abschnitt 5.2.1. beschrieben, erfolgte nach einer vierstündigen Infektion und Fixierung der Zellen eine Innen- und Außenfärbung. Mithilfe der konfokalen Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass die sonifizierten, biofilmbildenden *S. epidermidis*-Stämme 1457, 1585v und 5179-R1 im Vergleich zu den intakten Biofilmen nicht gleichermaßen vor der Phagozytose durch J774.A.1-Makrophagen geschützt sind (Abb. 31). Bestätigt wird diese Annahme durch die Auszählung der phagozytierten Bakterien (Abb. 32). 4-mal so viele der sonifizierten Zellen des *S. epidermidis* 1457 werden im Vergleich zu den intakten Zellen phagozytiert. Genauso werden 2,5-mal der sonifizierten Zellen des *S. epidermidis* 5179-R1 und 1,7-mal der sonifizierten Zellen des *S. epidermidis* 1585v im Vergleich zu den nicht sonifizierten Zellen phagozytiert.

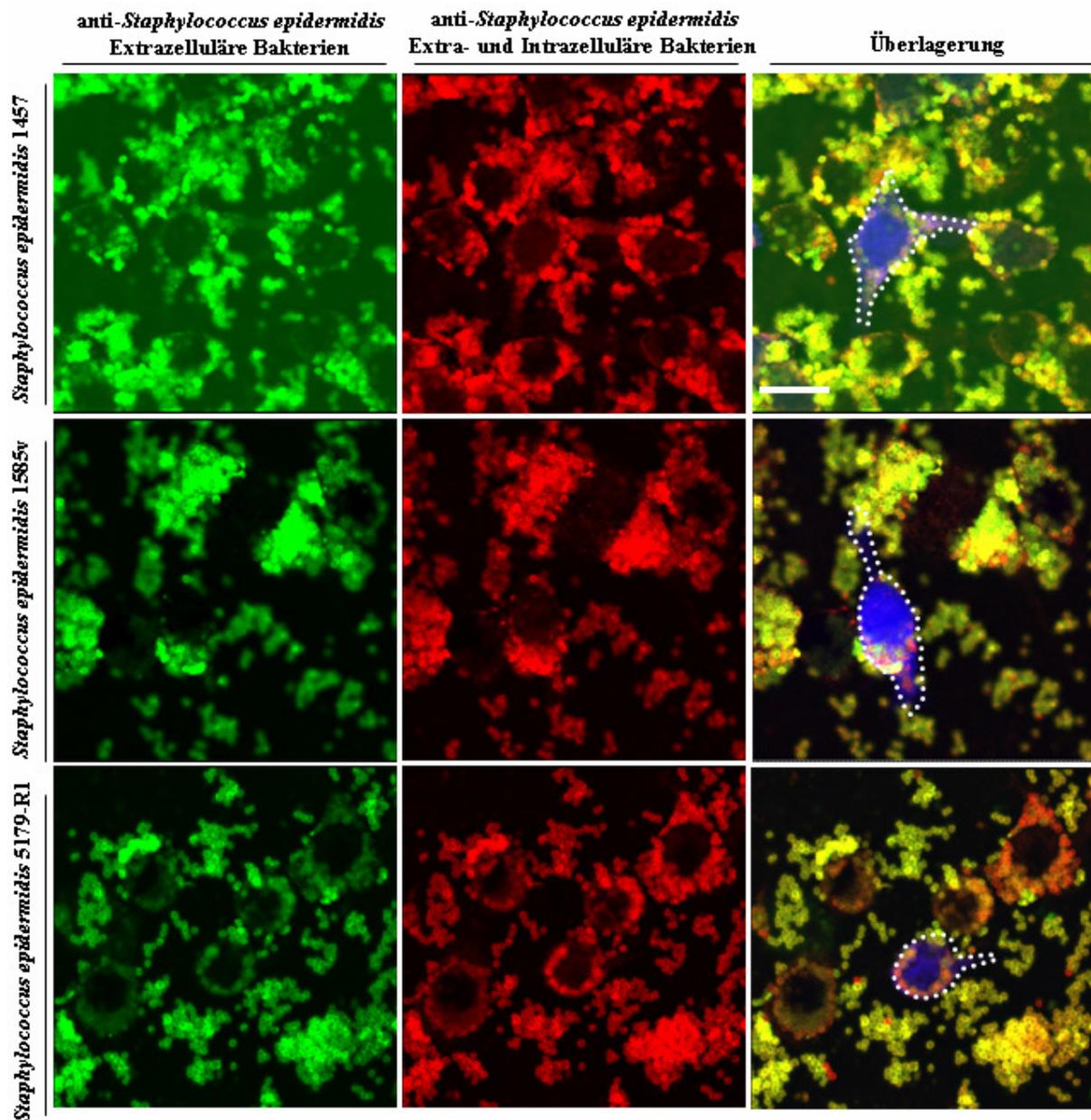


Abb. 31: Die sonifizierten *S. epidermidis*-Stämme 1457, 1585v und 5179-R1 sind nicht vor der Phagozytose durch J774A.1-Makrophagen geschützt. Die Makrophagen wurden mit pmaxGFP transfiziert. Die Transfektionsrate lag im Durchschnitt 20%. Nach einer Infektionszeit von vier Stunden wurden die sonifizierten, biofilmpositiven Bakterien mit einem anti-*S. epidermidis*-Antiserum und mit einem Cy5-markiertem IgG- (grün) sowie einem AlexaFluor568- (rot) markiertem sekundärem Antikörper gefärbt. Die Innen- und Außen-Färbung identifiziert phagozytierte Bakterien (rot) und extrazelluläre Bakterien (rot-grün überlagert). Die gepunkteten Linien zeigen die Zellgrenzen an. Der Balken repräsentiert 12 µm.

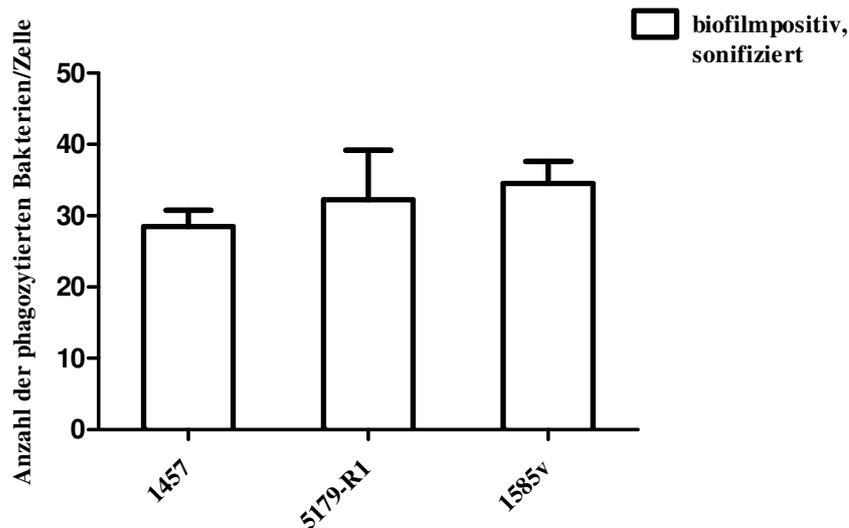


Abb. 32: Die Anzahl phagozytierter bakterieller Zellen der sonifizierten biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämme 1457, 5179-R1 und 1585v ist im Vergleich zu der Anzahl an phagozytierten biofilmpositiven, nicht sonifizierten *S. epidermidis*-Stämmen tendenziell höher. Statistische Analyse phagozytierter *S. epidermidis*-Stämme durch J774A.1.-Makrophagen. J774A.1.-Makrophagen wurden über einen Zeitraum von vier Stunden jeweils mit den verschiedenen, sonifizierten *S. epidermidis*-Stämmen infiziert. Die Phagozytose wurde durch eine Immunfluoreszenzfärbung quantifiziert, die zwischen intrazellulären und extrazellulären Bakterien unterscheidet. Die Werte ergeben sich aus den Mittelwerten von einem Experiment (\pm Standardabweichung).

5.2.7. Biofilmbildende *S. epidermidis*-Stämme induzieren in J774A.1.-Makrophagen eine verminderte Antwort auf LPS

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Makrophagen nach dem Kontakt mit biofilmbildenden *S. epidermidis* eine schwache NF- κ B-Aktivität aufweisen. Um zu testen, ob Makrophagen, die mit *S. epidermidis* infiziert wurden, generell weniger empfindlich gegenüber inflammatorische Stimuli sind, wurden J774A.1.-Makrophagen zunächst für zwei Stunden jeweils mit den verschiedenen *S. epidermidis* infiziert und im Anschluss mit LPS inkubiert. Die NF- κ B-Aktivität, die nach vier Stunden mittels eines Luciferasereports gemessen wurde, war in Makrophagen, die mit den biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen 1457, 5179-R1 und 1585v infiziert wurden, signifikant niedriger im Vergleich zu der NF- κ B-Aktivität in Makrophagen, die mit den entsprechenden biofilmnegativen *S. epidermidis*-Stämmen 1457-M10, 5179 und M135 infiziert wurden (Abb. 33). Die Differenz der NF- κ B-Aktivität zwischen Makrophagen, die mit *S. epidermidis* 1457 und Makrophagen, die mit *S. epidermidis* 1457-M10 infiziert wurden, betrug 38 %. Wurden die Makrophagen mit *S.*

epidermidis 5179 und 5179-R1 infiziert, ergab sich eine Differenz von 78 %, im Falle von *S. epidermidis* M135 und 1585v eine Differenz von 64%.

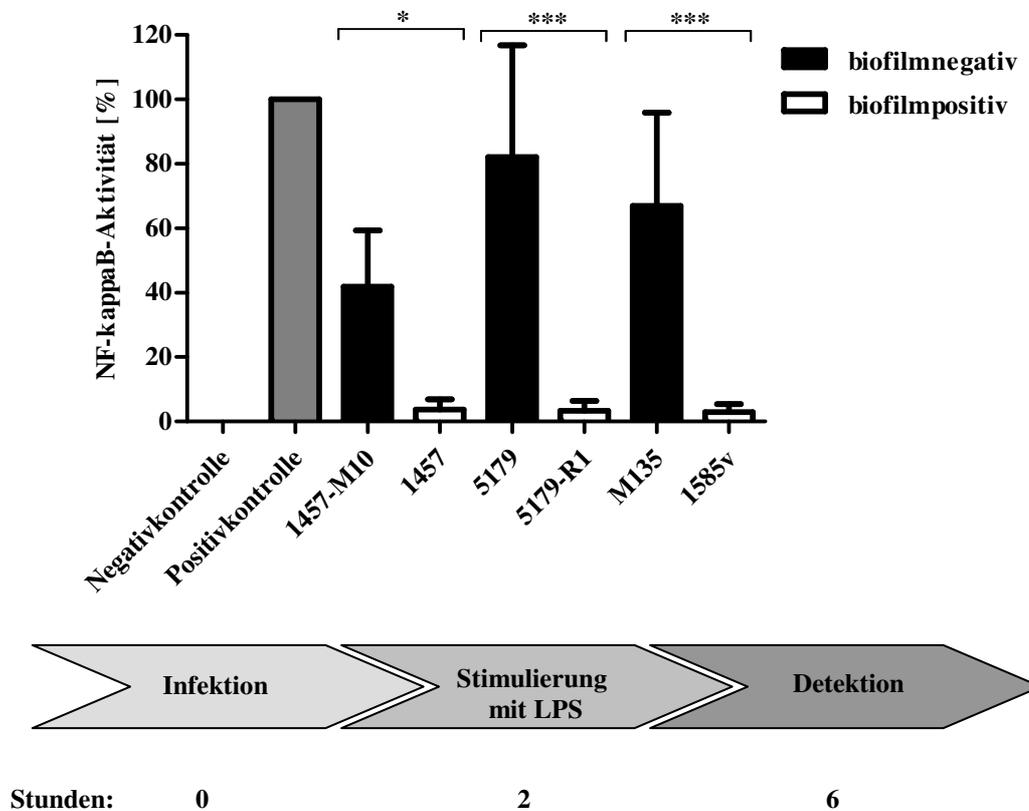


Abb. 33: Biofilmbildende *S. epidermidis*-Stämme induzieren in J774A.1-Makrophagen eine verminderte Antwort auf LPS. Nach Transfektion der J774A.1-Makrophagen mit pELAM-NF- κ B-Luciferase wurden diese mit den verschiedenen *S. epidermidis*-Stämmen infiziert. Nach zwei Stunden Infektionszeit wurde den Proben jeweils 500 ng/ml LPS zugefügt. Nach vier Stunden wurde die NF- κ B-Aktivierung der Makrophagen mithilfe eines Luciferase-Reports gemessen. Negativkontrolle: nicht-infizierte J774A.1-Makrophagen, die mit pELAM-NF- κ B-Luciferase transfiziert wurden. Positivkontrolle: nicht-infizierte J774A.1-Makrophagen, die mit pELAM-NF- κ B-Luciferase transfiziert und zusätzlich über den Infektionszeitraum mit LPS (500 ng/ml) stimuliert wurden. Die Werte ergeben sich aus den Mittelwerten von drei verschiedenen Experimenten (\pm Standardabweichung). Signifikanzen sind mit * gekennzeichnet. Signifikanzniveau: 0,05 (ANOVA one way).

6. Diskussion

S. epidermidis ist einer der häufigsten Ursachen von nosokomialer Sepsis und Infektionen, die im Zusammenhang mit Fremdkörperimplantaten stehen. Für die Pathogenese dieser Infektionen wird die Fähigkeit von *S. epidermidis* als wesentlich angesehen, mehrschichtige, auf Polymerimplantaten adhärierende Biofilme zu bilden. Frühere Studien konnten bereits belegen, dass die Biofilmbildung *S. epidermidis* vor der Phagozytose durch Zellen des angeborenen Immunsystems schützt (178,179). Interzellulären Adhäsinen wird hierbei eine wichtige Rolle im Geschehen der *S. epidermidis* Immunevasion zugeschrieben. Bisher sind das Polysaccharid PIA und die Zelloberflächen-proteine Aap und Embp als voneinander unabhängige interzelluläre Adhäsine, die in der Biofilmbildung involviert sind, identifiziert worden.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen mithilfe konfokaler Mikroskopie zum ersten Mal, dass PIA-, Aap- und Embp-vermittelte *S. epidermidis*-Biofilme unterschiedliche Phänotypen bezüglich der Organisation ihrer interzellulären Adhäsine aufweisen.

PIA bildet eine extrazelluläre Matrix, die aus vielen Fasern besteht, die zusammen ein Netzwerk ergeben. Die Staphylokokken sind hierbei direkt auf und entlang dieser Fasern angeordnet. Die scheinbar starre und kompakte Struktur eines PIA-assoziierten *S. epidermidis*-Biofilms, die bei makroskopischen Untersuchungen beobachtet wurde, erwies sich bei zunehmender mikroskopischer Vergrößerung als dynamisches, ausgedehntes Netzwerk, indem die Staphylokokken integriert sind. Freiräume, die hier bestehen, könnten zum Beispiel als Kanäle für die Nährstoffbeschaffung dienen.

Embp ist auf der bakteriellen Zelloberfläche der Bakterien lokalisiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem zum ersten Mal belegt werden, dass sich Embp ähnlich wie PIA auch im Interzellularraum befindet. Im Vergleich dazu konnte beim Aap-abhängigen biofilmbildenden *S. epidermidis*-Stamm 5179-R1 keine derartige aus Protein bestehende Matrixstruktur gefunden werden. Die Domäne B des Proteins Aap konnte nur auf der Zelloberfläche von *S. epidermidis* 5179-R1 lokalisiert werden. Dies ist Folge der Tatsache, dass Aap im Gegensatz zu Embp kovalent über sein LPXTG-Motiv an die Zelloberfläche gebunden ist. In einer Arbeit von Banner *et al.* konnte gezeigt werden, dass Aap in Form von kurzen Fibrillen ($122 \pm 10,8$ nm lang), die in Büscheln organisiert sind, vorkommt (180). In einigen epidemiologischen Studien konnte festgestellt werden, dass eine signifikante Anzahl an *S. epidermidis*-Isolaten neben *icaADBC* auch *aap* und *embp* besitzen (181-184). In einer Arbeit von Stevens *et al.* wurden beispielsweise 55 verschiedene *S. epidermidis*-Isolate, klassifiziert als Kontaminanten oder Verursacher von Fremdkörper-assoziierten Meningitis-Infektionen,

charakterisiert (184). 78,6 % der Meningitis-Isolate waren *ica*- und *aap*-positiv, wobei 38,5 % der Kontaminanten *ica*- und *aap*-negativ waren. 71,4 % der Meningitis-Isolate und 84,6 % der Kontaminanten produzierten Biofilm. *ica*⁺*aap*⁺-Meningitis-Isolate produzierten zudem mehr Biofilm als *ica*⁺*aap*⁻-Isolate. Im Vergleich dazu erzeugten *ica*⁺*aap*⁻-Isolate nicht mehr Biofilm als *ica*⁻*aap*⁺-Isolate. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass *S. epidermidis*-Biofilme möglicherweise durch die parallele Expression verschiedener interzellulärer adhäsiver Mechanismen *in vivo* gebildet werden. In zukünftigen Arbeiten müsste daher geklärt werden, wie die *S. epidermidis*-Biofilmarchitektur durch die synchrone Präsenz von PIA, Aap und Embp moduliert wird. Weiterhin wäre es von Bedeutung, die Regulationsmechanismen (der Phasenvariationen) zu identifizieren und die spezifischen Funktionsunterschiede beziehungsweise die Vor- und Nachteile der einzelnen Adhäsine zu erkunden. Mithilfe von tierexperimentellen Untersuchungen und weiteren epidemiologischen Studien könnte in Zukunft bestätigt werden, dass PIA tatsächlich nicht der einzige essentielle Faktor für die Biofilmbildung in *S. epidermidis* ist.

Unabhängig von den unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die Biofilmbildung, die durch PIA, Aap und Embp vermittelt wird *S. epidermidis* einen signifikanten Schutz vor der Phagozytose durch J774A.1.-Makrophagen mit ähnlicher Effizienz gewährleistet. Durch bisherige Arbeiten konnte durch Vergleich von *S. epidermidis* 1457 und seiner isogenen PIA-negativen Mutante 1457-M10 in Erfahrung gebracht werden, dass die PIA-Produktion und die damit verbundene Biofilmbildung *S. epidermidis* vor der Phagozytose und Abtötung durch PMNs schützt (161). Weitere Schutzmechanismen, die durch PIA vermittelt werden, beinhalten die verminderte Ablagerung der C3b-Konvertase bezeichneten Serin-Protease des Komplements und Immunoglobulin G (IgG) auf der bakteriellen Zelle sowie die Resistenz gegenüber Defensinpeptiden und Dermcidin (159,161,185). Aber die vorliegende Arbeit zeigt, dass der Schutz vor Phagozytose nicht ausschließlich durch PIA vermittelt wird. Es stellte sich somit die Frage, in wie fern die verschiedenen Biofilmarchitekturen mit den Phagozytenfunktionen interferieren. „Frustrierte Phagozytose“ ist ein Phänomen, bei dem bakterielle Zellcluster trotz der Phagozytenaktivierung aufgrund ihrer Größe nicht mehr von Phagozyten aufgenommen werden können. Die vorliegenden Daten zeigen zwar, dass die Phagozytose biofilmpositiver Staphylokokken gehemmt ist, dennoch konnte keine NF-κB-Aktivierung der Makrophagen beobachtet werden, die mit den verschiedenen biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen infiziert wurden, während sich eine starke NF-κB-Aktivierung in Makrophagen zeigt, die mit den entsprechenden biofilmnegativen Transposonmutanten infiziert wurden. Die

Inhibition der Phagozytose von biofilmpositiven *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen geht somit mit einer verminderten NF- κ B-Aktivierung in J774A.1.-Makrophagen einher. Bestätigt wurde dies durch die Messung der AP-1-Aktivität in Makrophagen. AP-1 ist ähnlich wie NF- κ B ein Aktivierungsmarker der Makrophagen. Wurden diese mit biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen infiziert, zeigten sie eine tendenziell schwächere AP-1-Aktivierung als Makrophagen, die mit biofilmbnegativen *S. epidermidis*-Stämmen infiziert wurden. In diesem Kontext wurden in einer frühen Studie von Riber *et al.* (186) festgestellt, dass PMNs, die mit dem adhärenen *S. epidermidis*-Stamm 14990 infiziert wurden, eine schwächere Aktivierung zeigten als solche, die mit dem planktonischen *S. aureus*-Stamm E2371 infiziert wurden. In einer kürzlich veröffentlichten *ex vivo*-Studie, in der die Zytokinproduktion in neonatalen Vollblut untersucht wurde, zeigte sich eine signifikant geringere IL-6-Produktion im Überstand von Zellkulturen, die mit einem *ica*- und biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stamm infiziert wurden, als im Überstand von Zellkulturen, die mit einem *ica*- und biofilmbnegativen *S. epidermidis*-Stamm infiziert wurden (187). Diese Ergebnisse korrelieren hierbei mit denen aus einer Arbeit von Klingenberg *et al.* (188): biofilmpositive CoNS-Isolate riefen im Vergleich zu biofilmbnegativen CoNS-Stämmen eine signifikant schwächere Antwort des Kapsel-reaktiven Proteins (CRP; *capsule reactive protein*) hervor. Dieses Opsonin gehört zu den Akute-Phase-Proteinen, deren Produktion in der Leber durch IL-6 angeregt wird.

Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass eine schwache Immunstimulierung durch biofilmpositive *S. epidermidis*-Stämme mit einer klinischen Relevanz einhergehen könnte.

Diese Hypothese wurde mit weiteren in dieser Arbeit vorliegenden Daten bekräftigt: J774.A.1.-Makrophagen, die jeweils mit den biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen 1457, 5179-R1 und 1585v infiziert wurden, wiesen eine signifikant schwächere IL-1 β -Produktion auf als solche, die mit den biofilmbnegativen Mutanten in Kontakt gebracht wurden.

MIP-1 α und MCP-1 gehören zu den stärksten chemotaktischen Chemokinen (189). Mittels eines Zytokinarrays konnte gezeigt werden, dass diese beiden Chemokine sowie das MIP-1 α -verwandte Chemokin MIP-1 γ von J774A.1.-Makrophagen, die mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen inkubiert wurden, in tendenziell geringerer Konzentration produziert werden als von denen, die mit den biofilmbnegativen *S. epidermidis*-Stämmen 5179 und M135 infiziert wurden. Eine reduzierte Produktion von IL-1 β , MIP-1 α , MIP-1 γ und MCP-1 in Makrophagen gibt einen Hinweis darauf, dass *S. epidermidis* durch die Biofilmbildung in die Funktion der Immunabwehr eingreift, selektiv Monozyten, Neutrophile und Lymphozyten zum Ort der Entzündung zu rekrutieren.

Die Interferenz mit Mechanismen, welche zu einer Leukozyteninfiltration in infiziertes Gewebe beitragen, ist ein häufig beobachtetes Prinzip pathogener Bakterien.

So ist bekannt, dass *S. aureus* ebenso Mechanismen entwickelt hat, um die Extravasation von Leukozyten zu verhindern. Diese Fähigkeit beruht unter anderem auf der Expression seines extrazellulären Adhäsins Eap (*extracellular adhesion protein*) (190). Eap interagiert spezifisch mit dem interzellulären Adhäsionsmolekül ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*). Dieses ist in niedrigen Konzentrationen in den Membranen von vaskulären Endothelzellen präsent. Durch die Stimulierung von Chemokinen steigen die Konzentrationen stark an. ICAM-1 ist ein Ligand des LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*), einem Rezeptor, der auf Leukozyten exprimiert wird. Durch die Aktivierung des Endothels binden die Leukozyten an dieses über den ICAM-1/LFA-1-Komplex und transmigrieren in das Gewebe (191,192). Durch Bindung des *S. aureus* Eap an ICAM-1 wird die Leukozytenadhäsion an die Endothelzellen inhibiert (193). Ein weiterer Mechanismus, der die Chemotaxis und Aktivierung humaner Leukozyten verhindert, beruht auf der Expression des CHIPS (*chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus*). Normalerweise werden die Peptidfragmente C3a und C5a, die durch die Komplementaktivierung freigesetzt werden, sowie formylierte Peptide, die von den Bakterien sekretiert werden, mit hoher Affinität von spezifischen transmembranen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf der neutrophilen Zelloberfläche erkannt (194). Diese aktivieren dann intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, die ebenso in der Migration von neutrophilen Zellen aus dem Blut zum Entzündungsort resultieren. Der Mechanismus der Inhibition der neutrophilen Chemotaxis besteht nun darin, dass CHIPS beide Rezeptoren, den Formylpeptidrezeptor (FPR; *formyl peptide receptor*) als auch den C5a-Rezeptor binden und somit blockieren (195). Es wird hierbei angenommen, dass Eap und CHIPS parallel agieren. Bei *S. epidermidis* sind bisher keine solcher Adhäsine oder inhibitorischen Proteine identifiziert worden. Dennoch hat dieses Bakterium möglicherweise ein ähnliches Prinzip der Immunmodulation entwickelt. Durch die vorliegenden Daten lässt sich die Hypothese aufstellen, dass *S. epidermidis* durch die Biofilmbildung eine geringe Aktivierung in Makrophagen auslöst. Dies beinhaltet eine verminderte Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1. Anzeichen einer Immunmodulierung lassen sich auch durch die nachgewiesene herabgesetzte Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β sowie essentieller Chemokine wie MCP-1 und MIP-1 α ablesen. Eine denkbare Folge wäre, dass auch *S. epidermidis* die chemotaktische Leukozytenrekrutierung zum Ort der Entzündung inhibiert und somit weitgehendst von der angeborenen Immunität unerkannt bleibt.

In diesem Kontext wäre es von Bedeutung, den Einfluss von *S. epidermidis* auf weitere Faktoren, die an dem Prozess der Extravasation beteiligt sind, zu untersuchen. Mit einem sensitiven Verfahren, wie zum Beispiel dem ELISA, könnte die TNF α -Produktion in mit *S. epidermidis*-infizierten Makrophagen überprüft werden. TNF α ist an der Induktion der Aktivierung von Endothelzellen beteiligt (196).

Denkbar wäre auch eine *in vitro*-Untersuchung chemotaktischer Eigenschaften von beispielsweise Monozyten in Präsenz eines *S. epidermidis*-Biofilms. Hierbei könnte eine sogenannte Boyden-Kammer Verwendung finden. Dieses Zellkulturgefäß besteht aus zwei Abteilungen, die durch eine Membran mit Poren in der Größe von etwa 5 bis 10 μm getrennt sind. Dabei könnte in das eine Kompartiment eine Mischung aus einem Zellkulturmedium mit dem *S. epidermidis*-Biofilm eingebracht werden und in das andere Kompartiment die Monozyten. Durch Diffusion würde sich dann in den Poren der Membran ein Konzentrationsgefälle bilden, dem die Zellen folgen könnten. Nach einer bestimmten Inkubationszeit könnten die Zellen fixiert werden und die Anzahl der Zellen bestimmt werden, welche die Membran passiert haben.

RANTES wurde von Makrophagen, die über einen Zeitraum von vier Stunden mit LPS stimuliert wurden, exprimiert. Makrophagen, die mit den in der Arbeit verwendeten *S. epidermidis*-Stämmen infiziert wurden, zeigen keine Produktion des beta-Chemokins. Hierbei ergaben sich keine Unterschiede zwischen Makrophagen, die mit biofilmpositiven in Kontakt kamen und Makrophagen, die mit biofilmnegativen *S. epidermidis* inkubiert wurden. RANTES ist ein Chemoattraktant für PMNs sowie CD 4⁺-T-Zellen und wird von verschiedenen Zelltypen, darunter CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, Monozyten und Makrophagen, produziert. Da seine Promotoraktivität durch die Co-Expression der p65-Untereinheit von NF- κB und des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β verstärkt wird und die Promotorregion vier NF- κB -Bindungsstellen enthält (147), ergibt sich ein Konflikt bezüglich der Beurteilung dieses Ergebnisses. Da eine Infektion der J774A.1-Makrophagen mit den biofilmnegativen *S. epidermidis*-Stämmen 1457-M10, 5179 und M135 in einer NF- κB -Aktivierung sowie IL-1 β -Produktion resultierte, würde dies mit einer ebenso erhöhten RANTES-Produktion konvergieren. Ob es tatsächlich Unterschiede bezüglich der RANTES-Produktion zwischen Makrophagen, die mit den biofilmnegativen *S. epidermidis* infiziert werden und Makrophagen, die mit biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen in Kontakt treten, müsste durch ein weiteres sensitiveres Untersuchungsverfahren, wie zum Beispiel einem ELISA, getestet werden.

IL-1 α wurde ähnlich wie RANTES von Makrophagen produziert, die mit LPS stimuliert wurden. Makrophagen, die hingegen mit den verschiedenen *S. epidermidis*-Stämmen infiziert wurden, wiesen hingegen geringere Konzentrationen dieses Zytokins auf. Aber auch hier ergaben sich keine Unterschiede zwischen Makrophagen, die mit biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen konfrontiert wurden und Makrophagen, die mit biofilmnegativen infiziert wurden. Durch eine *in vivo*-Studie von Miller *et al.* stellte sich heraus, dass in IL-1 β -defizienten im Vergleich zu IL-1 α -defizienten Mäusen, die mit *S. aureus* infiziert wurden, signifikant weniger neutrophile Zellen zum Ort der Infektionsquelle rekrutiert wurden (197). Die Autoren schlussfolgerten, dass IL-1 α kein essentieller Faktor bei der Phagozytenrekrutierung bei einer *S. aureus*-Infektion sei. Um festzustellen, welche Rolle IL-1 α in der Immunantwort auf eine *S. epidermidis*-Infektion spielt, könnte in Zukunft mithilfe weiterer immunchemischer oder tierexperimenteller Untersuchungen ergründet werden.

Makrophagen erkennen Staphylokokken über ihren TLR2-Rezeptor (119,198). Die Voraussetzung ist der direkte Kontakt zwischen Pathogen und Wirt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst spekuliert, ob die Inhibition der Makrophagenaktivierung beziehungsweise die schwache Immunantwort nach Infektion möglicherweise auf den unzureichenden physikalischen Kontakt zwischen Makrophagen und den bakteriellen Zellen, die in einem Biofilm organisiert sind, begründet ist. Jedoch konnte mittels konfokaler Mikroskopie ermittelt werden, dass die J774A.1.-Makrophagen nach vier Stunden Infektion im Biofilm lokalisiert sind. Dabei sind sie zum Teil vollständig von den Bakterien umgeben. Durch diese Erkenntnis ist es höchst unwahrscheinlich, dass die schwache Immunantwort der Makrophagen auf ein unzulängliches Zusammentreffen zurückzuführen ist. In ähnlicher Weise untersuchten Leid *et al.* die Interaktion von *S. aureus*-Biofilmen und Leukozyten (199). Sie konnten mittels konfokaler Mikroskopie veranschaulichen, dass humane Leukozyten in der Lage sind, Biofilme zu durchdringen. Dieses Resultat korreliert zudem mit der in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtung, dass Biofilme lockere und dynamische Strukturen bilden. Freiräume, die hier bestehen, könnten nicht nur als Kanäle für die Nährstoffbeschaffung dienen, sondern auch die Migration der Makrophagen durch den Biofilm erklären.

Trotzdem können diese Ergebnisse nicht ganz die Eventualität ausschließen, dass mögliche Liganden, die durch TLR2 oder andere PRRs erkannt werden, durch die extrazelluläre Matrix des Biofilms maskiert werden. Um zu testen, ob die Adhäsine PIA, Embp und Aap einen Einfluss auf die Erkennung der Bakterien durch die J774A.1.-Makrophagen haben, wurden die Bakterien in den Biofilmen durch eine milde Sonifizierung vereinzelt. Mittels spezifischer Antikörper gegen die jeweiligen Adhäsine, wurde die Präsenz dieser auf der bakteriellen

Zelloberfläche belegt. Nach Infektion der Makrophagen mit den sonifizierten biofilmpositiven Staphylokokken konnte eine stärkere NF- κ B-Aktivität nachgewiesen werden als in Makrophagen, die mit den entsprechenden Bakterien, die im Biofilm integriert waren, infiziert wurden. Daher ist anzunehmen, dass die Expression der Zelloberflächenadhäsine nicht mit der Signaltransduktion der Makrophagen interferiert. Zusätzlich konnte belegt werden, dass die vereinzelt biofilmpositiven Bakterien trotz der Expression ihrer Adhäsine nicht mehr vor der Phagozytose durch J774A.1.-Makrophagen geschützt sind.

Ein kontroverses Ergebnis ergab sich in einer Arbeit von Stevens *et al.*. Diese Gruppe stellte die Hypothese auf, dass aufgereinigtes PIA IL-8 in humanen Astrozyten (U373 MG) über TLR2 induziert (200). Dagegen sprechen die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse, dass Makrophagen nach Infektion mit biofilmbildenden, PIA-positiven Staphylokokken eine schwache NF- κ B-Aktivität aufweisen. Zudem wird IL-8 durch Stimulierung mit IL-1 β gebildet. Die Produktion von IL-1 β ist in Makrophagen, die mit den biofilmbildenden Staphylokokken in Kontakt kamen, ebenso herabgesetzt.

Als die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivität in Makrophagen zwei Stunden nach Infektion mit den verschiedenen biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen gemessen wurde, stellte sich heraus, dass eine Interaktion von Makrophagen mit biofilmbildenden *S. epidermidis* nicht nur zu einer schwachen Aktivierung, sondern generell zu einer Unempfindlichkeit gegenüber starken proinflammatorischen Mediatoren wie LPS führte. Bisher sind keine ähnlichen Effekte bei Makrophagen während einer bakteriellen Infektion beobachtet worden. LPS-Toleranz ist zum Beispiel bisher als ein adaptiver Mechanismus des Immunsystems angesehen, der das Ausmaß und die Dauer der inflammatorischen Zytokinproduktion während des Verlaufs einer bakteriellen Infektion limitiert, indem es die Re-Aktivierung von Makrophagen durch bakterielle Pathogene und ihre Produkte verhindert (201). Da bei den J774A.1.-Makrophagen aber durch eine Infektion mit biofilmpositiven *S. epidermidis* im Vergleich zu einer Infektion mit biofilmbildenden *S. epidermidis* keine signifikante Aktivierung bei den Makrophagen messbar war, lässt sich das Prinzip der LPS-Toleranz ausschließen. Dennoch ist LPS ein starker proinflammatorischer Mediator. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Wechselwirkung zwischen *S. epidermidis* und der Signaltransduktion von J774A.1.-Makrophagen stattfinden muss und das Bakterium mit dieser interferiert.

Hajishengallis *et al.* berichten beispielsweise über Mechanismen der mikrobiellen Evasion des oralen Pathogens *Porphyromonas gingivalis* gegenüber der TLR-vermittelten Immunität in humanen Monozyten und murinen Makrophagen, die von dem CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) abhängt (202). Das Bakterium induziert über seine

Zelloberflächenfimbrien die Verbindung von TLR2 und CXCR4 in Lipid Rafts und interagiert mit beiden Rezeptoren: die Bindung an CXCR4 induziert die cAMP-abhängige Proteinkinase A, die ihrerseits die TLR2-vermittelten proinflammatorischen und antimikrobiellen Antworten auf das Pathogen inhibiert. Dies ermöglicht *Porphyromonas gingivalis* in seinem Wirt zu persistieren. Dieses Resultat gibt einen Anstoß zu Überlegungen für neue experimentelle Ansätze, die klären könnten, über welche Mechanismen biofilmbildende *S. epidermidis* mit der Makrophagen-Signaltransduktion interferieren könnten.

Die Abbildung 34 zeigt ein Modell der möglichen immunmodulatorischen Mechanismen von *S. epidermidis* in J774A.1.-Makrophagen.

Biofilme schützen *S. epidermidis* unabhängig von der Art des jeweiligen Zelloberflächen-Adhäsins vor der Phagozytose durch Makrophagen. Die Inhibition der Phagozytose geht mit einer reduzierten Makrophagen-Aktivierung einher. Die Aktivität der zentralen, proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 ist in mit biofilmpositiven *S. epidermidis*-infizierten *Makrophagen* stark herabgesetzt. Eine Folge ist die reduzierte Expression von Zytokinen, die maßgeblich an der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut zum Ort der Infektion beteiligt sind. Die Inhibition der Phagozytose und Aktivierung der Makrophagen sowie das daraus resultierende Unvermögen weiterer Immunzellen zum Ort der Infektion zu migrieren, könnten die entscheidenden Faktoren für das bakterielle Überleben im Körper des Wirtes sein. Die Bakterien könnten sich somit lokal ungehindert ausbreiten und eine Bakteriämie auslösen. Bei der schlechten Abwehrlage des Wirtes und konstanter Einschwemmung aus dem Infektionsherd in die Blutbahn würde die Vermehrung der Bakterien begünstigt.

Neben einer gezielten Antibiotikatherapie könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wichtige Ansatzpunkte für die Entwicklung zusätzlicher neuer Strategien, die sich gegen eine *S. epidermidis*-Infektion richten, liefern.

Es konnte gezeigt werden, dass der Schutz von *S. epidermidis* vor dem Immunsystem nicht, wie bisher beschrieben, allein durch PIA gewährleistet ist. Bei der Entwicklung eines möglichen Impfstoffes müsste beachtet werden, dass es sich bei der Biofilmbildung und dem damit verbundenen Schutz vor der Immunabwehr um ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren handelt.

Auch ist in Betracht zu ziehen, mögliche Alternativen zur Antibiotikatherapie zu entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit wurde belegt, dass der *S. epidermidis*-Biofilm in seiner Gesamtheit, nicht aber die Expression interzellulärer Adhäsine, mit der Inhibition der Makrophagen-Aktivierung assoziiert ist. Daher ist es denkbar, Substanzen zu verwenden, die die Struktur

des Biofilms zerlegen. Mittels DispersinB, kann beispielsweise ein Polysaccharid-Biofilm spezifisch durch die Hydrolyse von β -1,6-verknüpften Poly-N-Acetyl-Glukosamin herbeigeführt werden, während Protein-Biofilme durch die Aktivität der Serinprotease Proteinase K zu einzelnen Zellen abgebaut werden (203).

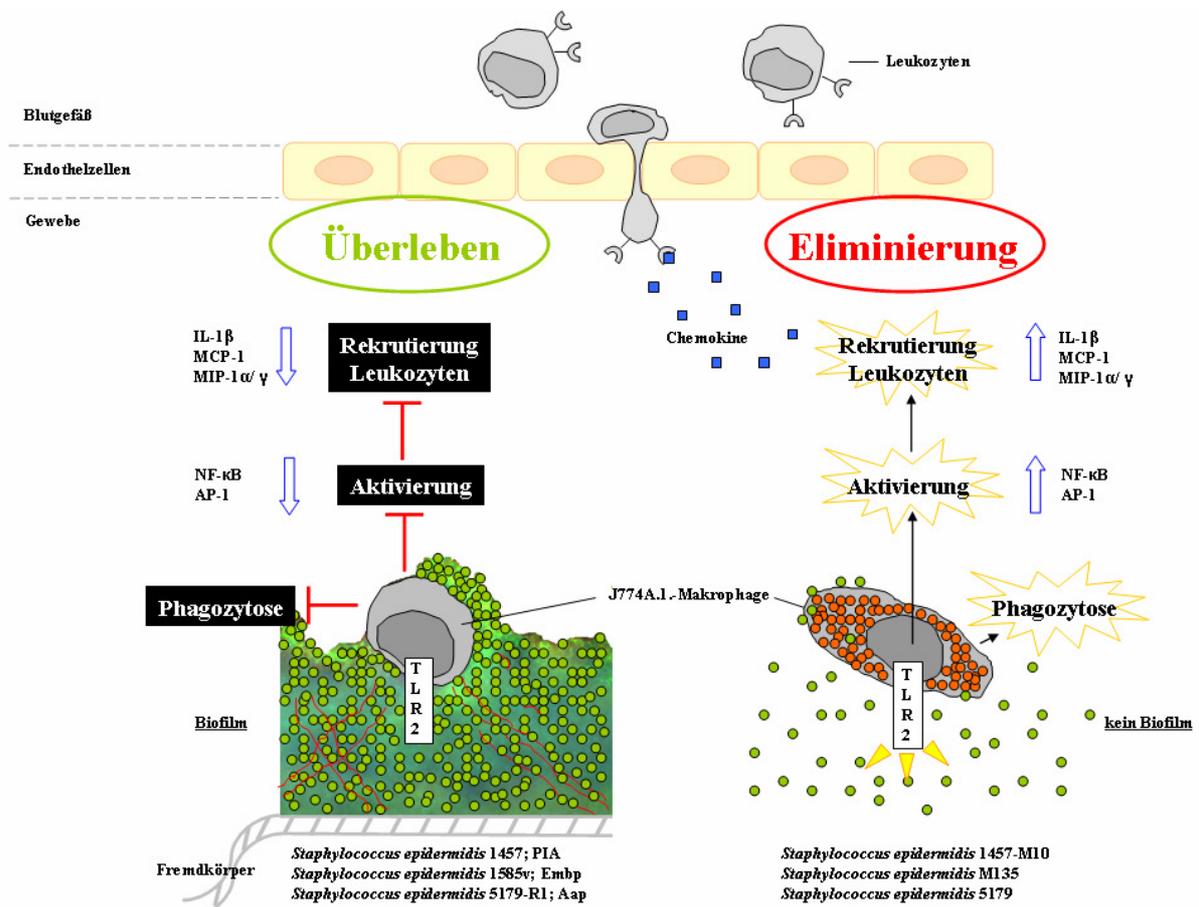


Abb. 34: Modell für die immunmodulatorischen Mechanismen von *S. epidermidis* in J774A.1-Makrophagen. PAMPs biofilmnegativer isogener *S. epidermidis*-Stämme werden über PRRs wie zum Beispiel TLR2 von J774A.1-Makrophagen erkannt. Die dadurch ausgelöste Signaltransduktion resultiert in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 und folgende Expression der Zytokine IL-1 β , MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 γ . Dies veranlasst die Aktivierung der Blutendothelzellen. Über den Prozess der Diapedese migrieren Leukozyten aus dem Blut zum Ort der Infektion, an dem es zur Eliminierung der bakteriellen Zellen kommt. Unabhängig von den unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften ist *S. epidermidis* infolge der Biofilmbildung, die durch PIA, Embp und Aap vermittelt wird, geschützt. Das Bakterium wird dabei nicht phagozytiert und induziert eine stark reduzierte Aktivierung von NF- κ B und AP-1 in J774A.1-Makrophagen. Durch die reduzierte Expression der Zytokine IL-1 β , MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 γ könnte die Aktivierung des Blutendothels gehemmt sein. Die daraus resultierende Inhibition der Wanderung von Leukozyten aus den Blutgefäßen könnte ein entscheidendes Kriterium für die Überlebenstrategie von *S. epidermidis* im Körper des Wirtes sein.

7. Abkürzungsverzeichnis

Aap	Akkumulations-assoziiertes Protein (<i>accumulation associated protein</i>)
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
AP	Aktivator-Protein (<i>activator protein</i>)
APZ	antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure
Atl	Autolysin
Bap	<i>biofilm associated protein</i>
bp	Basenpaar (<i>base pair</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CHIPS	<i>chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus</i>
CRP	<i>capsule reactive protein</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CF	Zystische Fibrose (<i>cystic fibrosis</i>)
CoNS	Koagulase-negative Staphylokokken (<i>coagulase negative staphylococci</i>)
COX-2	Zyklooxygenase Typ 2 (<i>cyclooxygenase type 2</i>)
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DUF	<i>domain of unknown function</i>
Eap	<i>extracellular adhesion protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
Embp	Extrazelluläres-matrixbindendes Protein (<i>extracellular matrix binding protein</i>)
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i>
Fbe	<i>fibronectin binding protein</i>
FBS	Fötale Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FIVAR	<i>found in various architecture</i>
FPR	<i>formyl peptide receptor</i>
G	Guanin

GA	<i>protein G-related albumin binding</i>
GFP	grün-fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
HSA	humanes Serumalbumin
hBD3	humanes β -Defensin 3
Ica	interzelluläre Adhäsion (<i>intercellular adhesion</i>)
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
Ig	Immunoglobulin
I κ B	<i>inhibitor of κB</i>
IKK	I κ B-kinase complex
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickoxid-Synthase (<i>inducible nitric oxid synthase</i>)
IRAK	IL-1-Reptor-assoziierte Kinase
IRF	<i>Interferon-regulatory factor</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LFA	<i>lymphocyte function-associated antigen</i>
LL-37	Cathelicidin/hCAP18
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
M	Mutante
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MEK/MKK	MAPK-Kinase
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSE	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus epidermidis</i>
MSCRAMMs	<i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NK	<i>natural killer (cells)</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBP	<i>penicillin binding protein</i>
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)

PGA	Poly- γ -Glutaminsäure (<i>poly-γ-glutamic acid</i>)
PGE2	Prostaglandin-E2
PIA	interzelluläres Polysaccharid-Adhäsion (<i>polysaccharide intercellular adhesin</i>)
PMN	Polymorphnukleäre neutrophile Leukozyten
PNAG	Poly-N-Acetylglukosamin
PRR	<i>pathogen recognition receptors</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
S.	<i>Staphylococcus</i>
Sdr	<i>serin aspartat family protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TAB	<i>TAK1-binding protein</i>
TAK	<i>transforming-growth-factor-β-activated kinase</i>
TIR	Toll/IL-1-Rezeptordomäne
TIRAP/Mal	<i>TIR domain-containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
Tn	Transposon
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor inducing Interferon-β</i>
TRAF	<i>TNF-receptor-associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TSB	<i>tryptic soy broth</i>
TSST-1	Toxin-Schock-Syndrom-Toxin-1
U	Ubiquitinierungsligase
VRSA	Vancomycin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
W	Wiederholungseinheit (<i>repeat</i>)

8. Referenzen

1. **Ogston, A.** 1880. Ueber Abscesse. Archiv für Klinische Chirurgie **25**:588-600.
2. **Ogston, A.** 1881. Report upon microorganisms in surgical diseases. Br Med J. **1**:369-375.
3. **Ogston, A.** 1883. Micrococcus poisoning. J Anat Physiol. **17**:24-58.
4. **De Vos, P., G. M. Garrity, D. Jones, F. A. Rainy, K. H. Schleifer, and W. B. Whitman.** 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology- The Firmicutes, p. 1-1450.
5. **Peacock, S. J., S. de, I, and F. D. Lowy.** 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? Trends Microbiol. **9**:605-610.
6. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N.Engl.J.Med. **339**:520-532.
7. **Daum, R. S.** 2007. Clinical practice. Skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. N.Engl.J.Med. **357**:380-390.
8. **Hiramatsu, K.** 2001. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. Lancet Infect.Dis. **1**:147-155.
9. **Weigel, L. M., D. B. Clewell, S. R. Gill, N. C. Clark, L. K. McDougal, S. E. Flannagan, J. F. Kolonay, J. Shetty, G. E. Killgore, and F. C. Tenover.** 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science **302**:1569-1571.
10. **Kloos, W. E. and K. H. Schleifer.** 1975. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. J.Clin.Microbiol. **1**:82-88.
11. **Kloos, W. E. and K. H. Schleifer.** 1986. Genus IV. *Staphylococcus*, p. 1013-1035. In H. A. Sneath (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore.
12. **Kloos, W. E. and M. S. Musselwhite.** 1975. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. Appl.Microbiol. **30**:381-385.
13. **Gill, S. R., D. E. Fouts, G. L. Archer, E. F. Mongodin, R. T. Deboy, J. Ravel, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R. J. Dodson, S. C. Daugherty, R. Madupu, S. V. Angiuoli, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I. R. Hance, K. E. Nelson, and C. M. Fraser.** 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. J.Bacteriol. **187**:2426-2438.
14. **Uckay, I., D. Pittet, P. Vaudaux, H. Sax, D. Lew, and F. Waldvogel.** 2009. Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. Ann.Med. **41**:109-119.

15. **Rogers, K. L., P. D. Fey, and M. E. Rupp.** 2009. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect.Dis.Clin.North Am.* **23**:73-98.
16. 2004. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am.J Infect.Control* **32**:470-485.
17. **O'Grady, N. P., M. Alexander, E. P. Dellinger, J. L. Gerberding, S. O. Heard, D. G. Maki, H. Masur, R. D. McCormick, L. A. Mermel, M. L. Pearson, I. I. Raad, A. Randolph, and R. A. Weinstein.** 2002. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm.Rep.* **51**:1-29.
18. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-1322.
19. **Chambers, H. F.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin.Microbiol.Rev.* **10**:781-791.
20. **Costerton, W., R. Veeh, M. Shirliff, M. Pasmore, C. Post, and G. Ehrlich.** 2003. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J.Clin.Invest* **112**:1466-1477.
21. **Rohde, H., D. Mack, M. Christner, C. Burdelski, G. C. Franke, and J. K. Knobloch.** 2006. Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Rev.Med.Microbiol.* **17**:45-54.
22. **Dimick, J. B., R. K. Pelz, R. Consunji, S. M. Swoboda, C. W. Hendrix, and P. A. Lipsett.** 2001. Increased resource use associated with catheter-related bloodstream infection in the surgical intensive care unit. *Arch.Surg.* **136**:229-234.
23. **Rello, J., A. Ochagavia, E. Sabanes, M. Roque, D. Mariscal, E. Reynaga, and J. Valles.** 2000. Evaluation of outcome of intravenous catheter-related infections in critically ill patients. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **162**:1027-1030.
24. **Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, and P. Stoodley.** 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat.Rev.Microbiol.* **2**:95-108.
25. **Westall, F., M. J. De Witt, J. Dann, S. Van der Gaast, C. De Ronde, and Gerneke.D.** 2001. Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa. *Precambrian Research* **106**:93-116.
26. **Rasmussen, B.** 2000. Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit. *Nature* **405**:676-679.
27. **Reysenbach, A. L. and S. L. Cady.** 2001. Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems. *Trends Microbiol.* **9**:79-86.
28. **Taylor, C. D., C. O. Wirsen, and F. Gaill.** 1999. Rapid microbial production of filamentous sulfur mats at hydrothermal vents. *Appl.Environ.Microbiol.* **65**:2253-2255.

29. **Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton.** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu.Rev.Microbiol.* **56**:187-209.
30. **Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial biofilms. *Annu.Rev.Microbiol.* **49**:711-745.
31. **Hall-Stoodley, L. and P. Stoodley.** 2005. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* **13**:7-10.
32. **Koch, C. and N. Hoiby.** 1993. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* **341**:1065-1069.
33. **Martinez-Solano, L., M. D. Macia, A. Fajardo, A. Oliver, and J. L. Martinez.** 2008. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin.Infect.Dis.* **47**:1526-1533.
34. **Yang, L., J. A. Haagensen, L. Jelsbak, H. K. Johansen, C. Sternberg, N. Hoiby, and S. Molin.** 2008. In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *J.Bacteriol.* **190**:2767-2776.
35. **Ubell, M. L., J. E. Kerschner, P. A. Wackym, and A. Burrows.** 2008. MUC2 expression in human middle ear epithelium of patients with *otitis media*. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* **134**:39-44.
36. **Swords, W. E., M. L. Moore, L. Godzicki, G. Bukofzer, M. J. Mitten, and J. VonCannon.** 2004. Sialylation of lipooligosaccharides promotes biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect.Immun.* **72**:106-113.
37. **Allegrucci, M., F. Z. Hu, K. Shen, J. Hayes, G. D. Ehrlich, J. C. Post, and K. Sauer.** 2006. Phenotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development. *J.Bacteriol.* **188**:2325-2335.
38. **Moscoso, M., E. Garcia, and R. Lopez.** 2006. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J.Bacteriol.* **188**:7785-7795.
39. **Pearson, M. M., C. A. Laurence, S. E. Guinn, and E. J. Hansen.** 2006. Biofilm formation by *Moraxella catarrhalis* in vitro: roles of the UspA1 adhesin and the Hag hemagglutinin. *Infect.Immun.* **74**:1588-1596.
40. **Hong, W., B. Pang, S. West-Barnette, and W. E. Swords.** 2007. Phosphorylcholine expression by nontypeable *Haemophilus influenzae* correlates with maturation of biofilm communities in vitro and in vivo. *J.Bacteriol.* **189**:8300-8307.
41. **Luke, N. R., J. A. Jurcisek, L. O. Bakaletz, and A. A. Campagnari.** 2007. Contribution of *Moraxella catarrhalis* type IV pili to nasopharyngeal colonization and biofilm formation. *Infect.Immun.* **75**:5559-5564.
42. **Socransky, S. S., A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith, and R. L. Kent, Jr.** 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J.Clin.Periodontol.* **25**:134-144.
43. **Otto, M.** 2009. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nat.Rev.Microbiol.* **7**:555-567.

44. **Vacheethasanee, K., J. S. Temenoff, J. M. Higashi, A. Gary, J. M. Anderson, R. Bayston, and R. E. Marchant.** 1998. Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. *J.Biomed.Mater.Res.* **42**:425-432.
45. **Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters, and F. Götz.** 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol.Microbiol.* **24**:1013-1024.
46. **Tormo, M. A., E. Knecht, F. Götz, I. Lasa, and J. R. Penades.** 2005. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* **151**:2465-2475.
47. **Mazmanian, S. K., G. Liu, H. Ton-That, and O. Schneewind.** 1999. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* **285**:760-763.
48. **Navarre, W. W. and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **63**:174-229.
49. **Arrecubieta, C., M. H. Lee, A. Macey, T. J. Foster, and F. D. Lowy.** 2007. SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, binds type I collagen. *J.Biol.Chem.* **282**:18767-18776.
50. **Hartford, O., L. O'Brien, K. Schofield, J. Wells, and T. J. Foster.** 2001. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology* **147**:2545-2552.
51. **Heilmann, C., G. Thumm, G. S. Chhatwal, J. Hartleib, A. Uekotter, and G. Peters.** 2003. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **149**:2769-2778.
52. **Gross, M., S. E. Cramton, F. Gotz, and A. Peschel.** 2001. Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. *Infect.Immun.* **69**:3423-3426.
53. **Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, and R. Laufs.** 1996. 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.
54. **Fluckiger, U., M. Ulrich, A. Steinhuber, G. Doring, D. Mack, R. Landmann, C. Goerke, and C. Wolz.** 2005. Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect.Immun.* **73**:1811-1819.
55. **Darby, C., J. W. Hsu, N. Ghori, and S. Falkow.** 2002. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature.* **417**:243-244.
56. **Wang, X., J. F. Preston, III, and T. Romeo.** 2004. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J.Bacteriol.* **186**:2724-2734.

57. **Vuong, C., S. Kocianova, J. M. Voyich, Y. Yao, E. R. Fischer, F. R. DeLeo, and M. Otto.** 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J.Biol.Chem.* **279**:54881-54886.
58. **Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, and F. Götz.** 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol.Microbiol.* **20**:1083-1091.
59. **Gerke, C., A. Kraft, R. Süßmuth, O. Schweitzer, and F. Götz.** 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J.Biol.Chem.* **273**:18586-18593.
60. **Heilmann, C., C. Gerke, F. Perdreau-Remington, and F. Götz.** 1996. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect.Immun.* **64**:277-282.
61. **Mack, D., H. Rohde, S. Dobinsky, J. Riedewald, M. Nedelmann, J. K. M. Knobloch, H.-A. Elsner, and H. H. Feucht.** 2000. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect.Immun.* **68**:3799-3807.
62. **Ziebuhr, W., V. Krimmer, S. Rachid, I. Lossner, F. Götz, and J. Hacker.** 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.
63. **Knobloch, J. K. M., K. Bartscht, A. Sabottke, H. Rohde, H. H. Feucht, and D. Mack.** 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.
64. **Tormo, M. A., M. Marti, J. Valle, A. C. Manna, A. L. Cheung, I. Lasa, and J. R. Penades.** 2005. SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J.Bacteriol.* **187**:2348-2356.
65. **Handke, L. D., S. R. Slater, K. M. Conlon, S. T. O'Donnell, M. E. Olson, K. A. Bryant, M. E. Rupp, J. P. O'Gara, and P. D. Fey.** 2007. SigmaB and SarA independently regulate polysaccharide intercellular adhesin production in *Staphylococcus epidermidis*. *Can.J.Microbiol.* **53**:82-91.
66. **Al Laham, N., H. Rohde, G. Sander, A. Fischer, M. Hussain, C. Heilmann, D. Mack, R. Proctor, G. Peters, K. Becker, and C. von Eiff.** 2007. Augmented expression of polysaccharide intercellular adhesin in a defined *Staphylococcus epidermidis* mutant with small colony variant phenotype. *J.Bacteriol.* **189**:4494-4501.
67. **Xu, L., H. Li, C. Vuong, V. Vadyvaloo, J. Wang, Y. Yao, M. Otto, and Q. Gao.** 2006. Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect.Immun.* **74**:488-496.

68. **Kogan, G., I. Sadovskaya, P. Chaignon, A. Chokr, and S. Jabbouri.** 2006. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol.Lett.* **255**:11-16.
69. Rohde, H., Burandt, E., Horstkotte, M. A., Kalitzky, M., Wurster, S., Scherpe, S., Knobloch, J. K. M., Frommelt, L, Siemssen, N, Kaplan, J. B., and Mack, Dietrich. Polysaccharide intercellular adhesin and protein factors are of differential importance in biofilm formation by *S. epidermidis* and *S. aureus* isolated from prosthetic joint infections. *J.Infect.Dis.* 2005.
Ref Type: In Press
70. **Hussain, M., M. Herrmann, C. von Eiff, F. Perdreau-Remington, and G. Peters.** 1997. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect.Immun.* **65**:519-524.
71. **Mack, D., J. Riedewald, H. Rohde, T. Magnus, H. H. Feucht, H. A. Elsner, R. Laufs, and M. E. Rupp.** 1999. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect.Immun.* **67**:1004-1008.
72. **Rohde, H., C. Burdelski, K. Bartscht, M. Hussain, F. Buck, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, C. Heilmann, M. Herrmann, and D. Mack.** 2005. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol.Microbiol.* **55**:1883-1895.
73. **de Araujo, G. L., L. R. Coelho, C. B. de Carvalho, R. M. Maciel, A. Z. Coronado, R. Rozenbaum, B. T. Ferreira-Carvalho, A. M. Figueiredo, and L. A. Teixeira.** 2006. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. *J.Antimicrob.Chemother.* **57**:855-864.
74. **Sun, D., M. A. Accavitti, and J. D. Bryers.** 2005. Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **12**:93-100.
75. **Bowden, M. G., W. Chen, J. Singvall, Y. Xu, S. J. Peacock, V. Valtulina, P. Speziale, and M. Hook.** 2005. Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.* **151**:1453-1464.
76. **Bateman, A., M. T. Holden, and C. Yeats.** 2005. The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics.* **21**:1301-1303.
77. **Conrady, D. G., C. C. Brescia, K. Horii, A. A. Weiss, D. J. Hassett, and A. B. Herr.** 2008. A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**:19456-19461.
78. **Christner, M., G. Franke, N. Schommer, U. Wendt, K. Wegert, P. Pehle, G. Kroll, C. Schulze, F. Buck, D. Mack, M. Aepfelbacher, and H. Rohde.** 2009. The giant extracellular matrix binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol.Microbiol.*

79. **Kerrigan, J. E., C. Rangunath, L. Kandra, G. Gyemant, A. Liptak, L. Janossy, J. B. Kaplan, and N. Ramasubbu.** 2008. Modeling and biochemical analysis of the activity of antibiofilm agent Dispersin B. *Acta Biol.Hung.* **59**:439-451.
80. **Rosenstein, R. and F. Gotz.** 2000. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie* **82**:1005-1014.
81. **Williams, R. J., B. Henderson, L. J. Sharp, and S. P. Nair.** 2002. Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect.Immun.* **70**:6805-6810.
82. **Komatsuzawa, H., K. Ohta, M. Sugai, T. Fujiwara, P. Glanzmann, B. Berger, and H. Suginaka.** 2000. Tn551-mediated insertional inactivation of the *fmtB* gene encoding a cell wall-associated protein abolishes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J.Antimicrob.Chemother.* **45**:421-431.
83. **Hashimoto, W., H. Nankai, N. Sato, S. Kawai, and K. Murata.** 1999. Characterization of alpha-L-rhamnosidase of *Bacillus sp.* GL1 responsible for the complete depolymerization of gellan. *Arch.Biochem.Biophys.* **368**:56-60.
84. **Lejon, S., I. M. Frick, L. Bjorck, M. Wikstrom, and S. Svensson.** 2004. Crystal structure and biological implications of a bacterial albumin binding module in complex with human serum albumin. *J.Biol.Chem.* **279**:42924-42928.
85. **Tanaka, Y., S. Sakamoto, M. Kuroda, S. Goda, Y. G. Gao, K. Tsumoto, Y. Hiragi, M. Yao, N. Watanabe, T. Ohta, and I. Tanaka.** 2008. A helical string of alternately connected three-helix bundles for the cell wall-associated adhesion protein Ehb from *Staphylococcus aureus*. *Structure.* **16**:488-496.
86. **Li, Y., Y. Chen, X. Huang, M. Zhou, R. Wu, S. Dong, D. G. Pritchard, P. Fives-Taylor, and H. Wu.** 2008. A conserved domain of previously unknown function in Gap1 mediates protein-protein interaction and is required for biogenesis of a serine-rich streptococcal adhesin. *Mol.Microbiol.* **70**:1094-1104.
87. **Vuong, C., S. Kocianova, Y. Yao, A. B. Carmody, and M. Otto.** 2004. Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. *J.Infect.Dis.* **190**:1498-1505.
88. **Boles, B. R. and A. R. Horswill.** 2008. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS.Pathog.* **4**:e1000052.
89. **Dubin, G., D. Chmiel, P. Mak, M. Rakwalska, M. Rzychon, and A. Dubin.** 2001. Molecular cloning and biochemical characterisation of proteases from *Staphylococcus epidermidis*. *Biol.Chem.* **382**:1575-1582.
90. **Ohara-Nemoto, Y., Y. Ikeda, M. Kobayashi, M. Sasaki, S. Tajika, and S. Kimura.** 2002. Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. *Microb.Pathog.* **33**:33-41.
91. **Kaplan, J. B., K. Velliyagounder, C. Rangunath, H. Rohde, D. Mack, J. K. Knobloch, and N. Ramasubbu.** 2004. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J.Bacteriol.* **186**:8213-8220.

92. **Kong, K. F., C. Vuong, and M. Otto.** 2006. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int.J.Med.Microbiol.* **296**:133-139.
93. **Vuong, C., M. Durr, A. B. Carmody, A. Peschel, S. J. Klebanoff, and M. Otto.** 2004. Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. *Cell Microbiol.* **6**:753-759.
94. **Parkin, J. and B. Cohen.** 2001. An overview of the immune system. *Lancet* **357**:1777-1789.
95. **Epstein, J., Q. Eichbaum, S. Sheriff, and R. A. Ezekowitz.** 1996. The collectins in innate immunity. *Curr.Opin.Immunol.* **8**:29-35.
96. **Fraser, I. P., H. Koziel, and R. A. Ezekowitz.** 1998. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin.Immunol.* **10**:363-372.
97. **Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr.** 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr.Opin.Immunol.* **9**:4-9.
98. **Pasare, C. and R. Medzhitov.** 2005. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv.Exp.Med Biol.* **560**:11-18.
99. **Burnet, F. M.** 1962. The immunological significance of the thymus: an extension of the clonal selection theory of immunity. *Australas.Ann.Med* **11**:79-91.
100. **Hashimoto, C., K. L. Hudson, and K. V. Anderson.** 1988. The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**:269-279.
101. **Yamamoto, Y. and R. B. Gaynor.** 2004. I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway. *Trends Biochem.Sci.* **29**:72-79.
102. **Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira.** 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol.* **169**:10-14.
103. **Wyllie, D. H., E. Kiss-Toth, A. Visintin, S. C. Smith, S. Boussouf, D. M. Segal, G. W. Duff, and S. K. Dower.** 2000. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol.* **165**:7125-7132.
104. **Aliprantis, A. O., R. B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, and A. Zychlinsky.** 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* **285**:736-739.
105. **Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira.** 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* **11**:443-451.
106. **Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, and C. J. Kirschning.** 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol.Chem.* **274**:17406-17409.

107. **Hajjar, A. M., D. S. O'Mahony, A. Ozinsky, D. M. Underhill, A. Aderem, S. J. Klebanoff, and C. B. Wilson.** 2001. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol.* **166**:15-19.
108. **Underhill, D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem.** 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**:811-815.
109. **Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell.** 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**:732-738.
110. **Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, H. C. Van, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler.** 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**:2085-2088.
111. **Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg.** 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat.Immunol.* **1**:398-401.
112. **Rassa, J. C., J. L. Meyers, Y. Zhang, R. Kudaravalli, and S. R. Ross.** 2002. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:2281-2286.
113. **Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem.** 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**:1099-1103.
114. **Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira.** 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int.Immunol.* **13**:933-940.
115. **Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira.** 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat.Immunol.* **3**:196-200.
116. **Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and Reis e Sousa.** 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**:1529-1531.
117. **Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira.** 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**:740-745.
118. **Zhang, D., G. Zhang, M. S. Hayden, M. B. Greenblatt, C. Bussey, R. A. Flavell, and S. Ghosh.** 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**:1522-1526.

119. **Akira, S. and K. Takeda.** 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat.Rev.Immunol.* **4**:499-511.
120. **Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto.** 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp.Med* **189**:1777-1782.
121. **Ulevitch, R. J. and P. S. Tobias.** 1999. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr.Opin.Immunol.* **11**:19-22.
122. **Schumann, R. R.** 1992. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Res.Immunol.* **143**:11-15.
123. **Kirschning, C. J., H. Wesche, A. T. Merrill, and M. Rothe.** 1998. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp.Med* **188**:2091-2097.
124. **Nagai, Y., S. Akashi, M. Nagafuku, M. Ogata, Y. Iwakura, S. Akira, T. Kitamura, A. Kosugi, M. Kimoto, and K. Miyake.** 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat.Immunol.* **3**:667-672.
125. **Aderem, A. and R. J. Ulevitch.** 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**:782-787.
126. **Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp.** 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* **16**:225-260.
127. **Karin, M. and Y. Ben-Neriah.** 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu.Rev.Immunol.* **18**:621-663.
128. **Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda, and S. Akira.** 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* **420**:324-329.
129. **Yamamoto, M. and S. Akira.** 2005. TIR domain-containing adaptors regulate TLR signaling pathways. *Adv.Exp.Med Biol.* **560**:1-9.
130. **Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**:640-643.
131. **Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat.Immunol.* **4**:1144-1150.
132. **English, J., G. Pearson, J. Wilsbacher, J. Swantek, M. Karandikar, S. Xu, and M. H. Cobb.** 1999. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp.Cell Res.* **253**:255-270.

133. **Angel, P. and M. Karin.** 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim.Biophys.Acta* **1072**:129-157.
134. **Shaulian, E. and M. Karin.** 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat.Cell Biol.* **4**:E131-E136.
135. **Dinarello, C. A.** 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* **118**:503-508.
136. **Dinarello, C. A.** 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu.Rev.Immunol.* **27**:519-550.
137. **Thornberry, N. A., H. G. Bull, J. R. Calaycay, K. T. Chapman, A. D. Howard, M. J. Kostura, D. K. Miller, S. M. Molineaux, J. R. Weidner, J. Aunins, and .** 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**:768-774.
138. **Maier, J. A., M. Statuto, and G. Ragnotti.** 1994. Endogenous interleukin 1 alpha must be transported to the nucleus to exert its activity in human endothelial cells. *Mol.Cell Biol.* **14**:1845-1851.
139. **Kawaguchi, Y., E. Nishimagi, A. Tochimoto, M. Kawamoto, Y. Katsumata, M. Soejima, T. Kanno, N. Kamatani, and M. Hara.** 2006. Intracellular IL-1alpha-binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1alpha in systemic sclerosis fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**:14501-14506.
140. **Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler.** 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat.Immunol.* **5**:971-974.
141. **Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis.** 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* **307**:97-101.
142. **Deshmane, S. L., S. Kremlev, S. Amini, and B. E. Sawaya.** 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* **29**:313-326.
143. **Kasama, T., R. M. Strieter, T. J. Standiford, M. D. Burdick, and S. L. Kunkel.** 1993. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp.Med* **178**:63-72.
144. **Mohamadzadeh, M., A. N. Poltorak, P. R. Bergstressor, B. Beutler, and A. Takashima.** 1996. Dendritic cells produce macrophage inflammatory protein-1 gamma, a new member of the CC chemokine family. *J Immunol.* **156**:3102-3106.
145. **Poltorak, A. N., F. Bazzoni, I. I. Smirnova, E. Alejos, P. Thompson, G. Luheshi, N. Rothwell, and B. Beutler.** 1995. MIP-1 gamma: molecular cloning, expression, and biological activities of a novel CC chemokine that is constitutively secreted in vivo. *J Inflamm.* **45**:207-219.
146. **Rahman, M. M. and G. McFadden.** 2006. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS.Pathog.* **2**:e4.

147. **Moriuchi, H., M. Moriuchi, and A. S. Fauci.** 1997. Nuclear factor-kappa B potently up-regulates the promoter activity of RANTES, a chemokine that blocks HIV infection. *J Immunol.* **158**:3483-3491.
148. **Carmody, A. B. and M. Otto.** 2004. Specificity grouping of the accessory gene regulator quorum-sensing system of *Staphylococcus epidermidis* is linked to infection. *Arch.Microbiol.* **181**:250-253.
149. **Faurschou, M. and N. Borregaard.** 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes.Infect.* **5**:1317-1327.
150. **Christensen, G. D., W. A. Simpson, A. L. Bisno, and E. H. Beachey.** 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect.Immun.* **37**:318-326.
151. **Peters, G., R. Locci, and G. Pulverer.** 1982. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J.Infect.Dis.* **146**:479-482.
152. **Gunn, B. A.** 1989. Comparative virulence of human isolates of coagulase-negative staphylococci tested in an infant mouse weight retardation model. *J.Clin.Microbiol.* **27**:507-511.
153. **Deighton, M. A., R. Borland, and J. A. Capstick.** 1996. Virulence of *Staphylococcus epidermidis* in a mouse model: significance of extracellular slime. *Epidemiol.Infect.* **117**:267-280.
154. **Patrick, C. C., M. R. Plaunt, S. V. Hetherington, and S. M. May.** 1992. Role of the *Staphylococcus epidermidis* slime layer in experimental tunnel tract infections. *Infect.Immun.* **60**:1363-1367.
155. **Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, K. Bartscht, and D. Mack.** 1999. 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.
156. **Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, and D. Mack.** 1999. 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.
157. **Galdbart, J. O., J. Allignet, H. S. Tung, C. Ryden, and N. El Solh.** 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.
158. **Vuong, C., J. M. Voyich, E. R. Fischer, K. R. Braughton, A. R. Whitney, F. R. DeLeo, and M. Otto.** 2004. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* **6**:269-275.
159. **Kristian, S. A., T. A. Birkenstock, U. Sauder, D. Mack, F. Götz, and R. Landmann.** 2008. Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus*

- epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *J.Infect.Dis.* **197**:1028-1035.
160. **Begun, J., J. M. Gaiani, H. Rohde, D. Mack, S. B. Calderwood, F. M. Ausubel, and C. D. Sifri.** 2007. Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS.Pathog.* **3**:e57.
161. **Vuong, C., J. M. Voyich, E. R. Fischer, K. R. Braughton, A. R. Whitney, F. R. DeLeo, and M. Otto.** 2004. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* **6**:269-275.
162. **Francois, P., P. H. Tu Quoc, C. Bisognano, W. L. Kelley, D. P. Lew, J. Schrenzel, S. E. Cramton, F. Götz, and P. Vaudaux.** 2003. Lack of biofilm contribution to bacterial colonisation in an experimental model of foreign body infection by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **35**:135-140.
163. **Chokr, A., D. Leterme, D. Watier, and S. Jabbouri.** 2007. Neither the presence of *ica* locus, nor in vitro-biofilm formation ability is a crucial parameter for some *Staphylococcus epidermidis* strains to maintain an infection in a guinea pig tissue cage model. *Microb.Pathog.* **42**:94-97.
164. **Petrelli, D., C. Zampaloni, S. D'Ercole, M. Prenna, P. Ballarini, S. Ripa, and L. A. Vitali.** 2006. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **25**:773-781.
165. **Ziebuhr, W., V. Krimmer, S. Rachid, I. Lößner, F. Götz, and J. Hacker.** 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.
166. **Conlon, K. M., H. Humphreys, and J. P. O'Gara.** 2004. Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. *J.Bacteriol.* **186**:6208-6219.
167. **Nuryastuti, T., H. C. van der Mei, H. J. Busscher, R. Kuijter, A. T. Aman, and B. P. Krom.** 2008. *recA* mediated spontaneous deletions of the *icaADBC* operon of clinical *Staphylococcus epidermidis* isolates: a new mechanism of phenotypic variations. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **94**:317-328.
168. **Kocianova, S., C. Vuong, Y. Yao, J. M. Voyich, E. R. Fischer, F. R. DeLeo, and M. Otto.** 2005. Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J.Clin.Invest* **115**:688-694.
169. **Oppermann-Sanio, F. B. and A. Steinbuchel.** 2002. Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. *Naturwissenschaften* **89**:11-22.
170. **Little, S. F. and B. E. Ivins.** 1999. Molecular pathogenesis of *Bacillus anthracis* infection. *Microbes.Infect.* **1**:131-139.

171. **Yao, Y., D. E. Sturdevant, and M. Otto.** 2005. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *J.Infect.Dis.* **191**:289-298.
172. **Pourmand, M. R., S. R. Clarke, R. F. Schuman, J. J. Mond, and S. J. Foster.** 2006. Identification of antigenic components of *Staphylococcus epidermidis* expressed during human infection. *Infect.Immun.* **74**:4644-4654.
173. **Grant, S. G., J. Jessee, F. R. Bloom, and D. Hanahan.** 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**:4645-4649.
174. **Mack, D., N. Siemssen, and R. Laufs.** 1992. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect.Immun.* **60**:2048-2057.
175. **DUTHIE, E. S. and L. L. LORENZ.** 1952. Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. *J Gen.Microbiol.* **6**:95-107.
176. **Christensen, G. D., W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton, and E. H. Beachey.** 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J.Clin.Microbiol.* **22**:996-1006.
177. **Heesemann, J. and R. Laufs.** 1985. Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture. *J.Clin.Microbiol.* **22**:168-175.
178. **Johnson, G. M., D. A. Lee, W. E. Regelman, E. D. Gray, G. Peters, and P. G. Quie.** 1986. Interference with granulocyte function by *Staphylococcus epidermidis* slime. *Infect.Immun.* **54**:13-20.
179. **Heinzelmann, M., D. O. Herzig, B. Swain, M. A. Mercer-Jones, T. M. Bergamini, and H. C. Polk, Jr.** 1997. Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **4**:705-710.
180. **Banner, M. A., J. G. Cunniffe, R. L. Macintosh, T. J. Foster, H. Rohde, D. Mack, E. Hoyes, J. Derrick, M. Upton, and P. S. Handley.** 2007. Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J.Bacteriol.* **189**:2793-2804.
181. **Rohde, H., M. Kalitzky, N. Kroger, S. Scherpe, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, A. R. Zander, and D. Mack.** 2004. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J.Clin.Microbiol.* **42**:5614-5619.
182. **Ohnemus, U., K. Kohrmeyer, P. Houdek, H. Rohde, E. Wladykowski, S. Vidal, M. A. Horstkotte, M. Aepfelbacher, N. Kirschner, M. J. Behne, I. Moll, and J. M. Brandner.** 2007. Regulation of Epidermal Tight-Junctions (TJ) during Infection with Exfoliative Toxin-Negative *Staphylococcus* Strains. *J.Invest Dermatol.* ..

183. **Vandecasteele, S. J., W. E. Peetermans, R. Merckx, B. J. Rijnders, and J. Van Eldere.** 2003. Reliability of the *ica*, *aap* and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. *Clin.Microbiol.Infect.* **9**:114-119.
184. **Stevens, N. T., M. Tharmabala, T. Dillane, C. M. Greene, J. P. O'Gara, and H. Humphreys.** 2008. Biofilm and the role of the *ica* operon and *aap* in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing neurosurgical meningitis. *Clin.Microbiol.Infect.* **14**:719-722.
185. **Lai, Y., A. E. Villaruz, M. Li, D. J. Cha, D. E. Sturdevant, and M. Otto.** 2007. The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol.Microbiol.* **63**:497-506.
186. **Riber, U., F. Espersen, and A. Kharazmi.** 1995. Comparison of adherent and non-adherent staphylococci in the induction of polymorphonuclear leukocyte activation in vitro. *APMIS* **103**:439-446.
187. **Hartel, C., I. Osthues, J. Rupp, B. Haase, K. Roder, W. Gopel, E. Herting, and C. Schultz.** 2008. Characterisation of the host inflammatory response to *Staphylococcus epidermidis* in neonatal whole blood. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed* **93**:F140-F145.
188. **Klingenberg, C., E. Aarag, A. Ronnestad, J. E. Sollid, T. G. Abrahamsen, G. Kjeldsen, and T. Flaegstad.** 2005. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr.Infect.Dis.J* **24**:817-822.
189. **Uguccioni, M., M. D'Apuzzo, M. Loetscher, B. Dewald, and M. Baggiolini.** 1995. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur.J Immunol.* **25**:64-68.
190. **Haggar, A., C. Ehrnfelt, J. Holgersson, and J. I. Flock.** 2004. The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits neutrophil binding to endothelial cells. *Infect.Immun.* **72**:6164-6167.
191. **Imhof, B. A. and M. Urrand-Lions.** 2004. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat.Rev.Immunol.* **4**:432-444.
192. **Muller, W. A.** 2009. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ.Res.* **105**:223-230.
193. **Chavakis, T., M. Hussain, S. M. Kanse, G. Peters, R. G. Bretzel, J. I. Flock, M. Herrmann, and K. T. Preissner.** 2002. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat.Med.* **8**:687-693.
194. **Murdoch, C. and A. Finn.** 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* **95**:3032-3043.
195. **de Haas, C. J., K. E. Veldkamp, A. Peschel, F. Weerkamp, W. J. Van Wamel, E. C. Heezius, M. J. Poppelier, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp.** 2004.

- Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp.Med* **199**:687-695.
196. **Pober, J. S.** 2002. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res.* **4 Suppl 3**:S109-S116.
197. **Miller, L. S., E. M. Pietras, L. H. Uricchio, K. Hirano, S. Rao, H. Lin, R. M. O'Connell, Y. Iwakura, A. L. Cheung, G. Cheng, and R. L. Modlin.** 2007. Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus* *in vivo*. *J Immunol.* **179**:6933-6942.
198. **Schroder, N. W., S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, T. Hartung, U. Zahringer, U. B. Gobel, J. R. Weber, and R. R. Schumann.** 2003. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol.Chem.* **278**:15587-15594.
199. **Leid, J. G., M. E. Shirtliff, J. W. Costerton, and A. P. Stoodley.** 2002. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect.Immun.* **70**:6339-6345.
200. **Stevens, N. T., I. Sadovskaya, S. Jabbouri, T. Sattar, J. P. O'Gara, H. Humphreys, and C. M. Greene.** 2009. *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin induces IL-8 expression in human astrocytes via a mechanism involving TLR2. *Cell Microbiol.* **11**:421-432.
201. **De, N. D., T. Nguyen, J. A. Hamilton, and G. M. Scholz.** 2009. Down-regulation of IRAK-4 is a component of LPS- and CpG DNA-induced tolerance in macrophages. *Cell Signal.* **21**:246-252.
202. **Hajishengallis, G., M. Wang, S. Liang, M. Triantafilou, and K. Triantafilou.** 2008. Pathogen induction of CXCR4/TLR2 cross-talk impairs host defense function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**:13532-13537.
203. **Rohde, H., E. C. Burandt, N. Siemssen, L. Frommelt, C. Burdelski, S. Wurster, S. Scherpe, A. P. Davies, L. G. Harris, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, C. Ragunath, J. B. Kaplan, and D. Mack.** 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials.* **28**:1711-1720.

9. Danksagung

Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. Martin Aepfelbacher und Herrn PD. Dr. Holger Rohde für das Angebot dieses interessanten Themas und die die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Martin Aepfelbacher und Herrn Prof. Wolfgang Streit für die Übernahme des Gutachtens meiner Dissertation am Department Biologie der Universität Hamburg.

Bei Herrn Martin Christner möchte ich mich besonders für seine stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Herrn PD. Dr. Klaus Ruckdeschel, Frau Dr. Nicole Fischer, Frau Dr. Gefion Franke, Herrn Dr. Moritz Henschke und Prof. Dr. Stefan Linder für das Interesse an meiner Arbeit und hilfreiche Ratschläge für methodische Vorgehensweisen.

Jens Baron und Verena Hansen danke ich sehr für das Korrekturlesen.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei allen lieben Leuten des Instituts für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene für das freundschaftliche, kreative, motivierende Arbeitsklima und für die sehr schöne Zeit hier in Hamburg bedanken.

Und natürlich danke ich all meinen Freunden, die immer für mich da sind :).