

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Virologie und Hygiene
des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf
Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher**

Bedeutung verschiedener Virulenzfaktoren

von Staphylokokken im

***Caenorhabditis elegans* Modell**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
der medizinische Fakultät der Universität Hamburg**

vorgelegt von

Anne Kuhn

aus Kiel

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am 28.06.2011.

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Johannes Knobloch

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. Paul-Michael Kaulfers

Prüfungsausschuss: 3. Gutachterin: PD Dr. Johanna Brandner

In Liebe ist diese Arbeit
meinen Eltern, Drago und
meinen Schwestern Undine und Sarah gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Staphylokokken	6
1.1.1	Allgemeines über den Genus <i>Staphylococcus</i>	6
1.1.2	Biofilmbildung	8
1.1.2.1	Die primäre Adhäsion der Biofilmbildung.....	10
1.1.2.2	Die akkumulative Phase der Biofilmbildung	11
1.1.3	Regulation der Biofilmbildung.....	14
1.1.4	Regulation von Virulenzfaktoren bei Staphylokokken	15
1.1.4.1	Das σ^B -System.....	15
1.1.4.2	Das <i>agr</i> - System (accessory gene regulator).....	17
1.2	Caenorhabditis elegans	18
1.2.1	Vorkommen, Anatomie und Physiologie	18
1.2.2	Fortpflanzung und Entwicklung.....	19
1.2.3	<i>C. elegans</i> als Nematoden-Bakterien-Pathogenitätsmodell	20
1.3	Zielsetzung.....	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Bakterien	22
2.1.2	<i>C. elegans</i>	24
2.1.3	Geräte	24
2.1.4	Gebrauchsmaterialien.....	24
2.1.5	Puffer, Lösungen und Nährmedien	25
2.1.5.1	Für die Manipulation der Bakterienstämme.....	25
2.1.5.2	Für die Manipulation von <i>C. elegans</i>	25
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Bakterien	27
2.2.1.1	Bakterienkulturen für die verschiedenen Versuchsreihen.....	27
2.2.1.2	Bakterienkultur als Nahrungsquelle für <i>C. elegans</i>	27
2.2.2	Arbeitsweisen mit <i>C. elegans</i>	28
2.2.2.1	Kulturerhaltung von <i>C. elegans</i>	28
2.2.2.2	Wurmübertragung	28
2.2.2.3	Eiergewinnung zur Synchronisierung einer <i>C. elegans</i> Population.....	29
2.2.2.4	Verbesserte Kultivierung von grampositiven Keimen.....	29
2.2.3	Bestimmung der Sterbekinetik von <i>C. elegans</i>	30
2.2.4	Statistische Auswertung der Ergebnisse	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Optimierung der Methode	31
Frühe Kultivierung grampositiver Bakterien und Spülen der <i>C. elegans</i> vor		
Überimpfung		31
Erhitzen der <i>E. coli</i> OP 50 Suspension		31
Antibiotika mit gramnegativem Wirkspektrum		32
3.2	Pathogenitätsbestimmung unterschiedlicher Bakterienstämme	33
3.2.1	Pathogenität von <i>S. epidermidis</i> Wildtypstämmen für <i>C. elegans</i>	33
3.2.2	Pathogenität von PIA (polysaccharide intercellular adhesin).....	34
3.2.3	Bedeutung globaler Regulatoren in der Sterbekinetik von <i>C. elegans</i>	35
3.2.3.1	Der alternative Sigmafaktor B.....	36
3.2.3.2	Das <i>agr</i> -System (accessory gene regulator).....	37
3.2.3.3	Deletionsmutanten <i>sigBagr</i> und <i>rsbUVWagr</i>	38

3.2.4	Pathogenität diverser <i>S. aureus</i> -Stämme für <i>C. elegans</i>	39
4	Diskussion	40
5	Zusammenfassung	48
6	Literaturverzeichnis	49
7	Danksagung	60
8	Abkürzungsverzeichnis	61
9	Erklärung	63

1 Einleitung

1.1 *Staphylokokken*

1.1.1 Allgemeines über den Genus *Staphylococcus*

Die Bezeichnung Staphylokokken ist die eingedeutschte Form des latinisierten Singulars *Staphylococcus*, der wiederum selbst aus dem Griechischen abgeleitet ist. Es handelt sich hierbei um ein zusammengesetztes Wort aus den beiden griechischen Worten staphylé („die Weintraube“) und kókkos („das Kügelchen“). Übersetzen könnte man also *Staphylococcus* in „die Traubenkugel“. Dieser Name wurde aufgrund der charakteristischen Morphologie der Bakterien gewählt. Staphylokokken sind kugelige bis ovale Gebilde, die sich traubenförmig anordnen. Ihr Durchmesser beträgt 0,5 bis 1,5µm. Sie sind unbeweglich, grampositiv, normalerweise nicht bekapselt und bilden keine Sporen. Bis auf *S. saccharolyticus* und *S. aureus* subsp. *anaerobius* sind sie katalasepositiv und fakultativ anaerob. Im Jahre 1884 gelang es erstmals Ottmar Rosenbach mit Hilfe der Mikroskopie und neuen festen Nährböden Staphylokokken und Streptokokken, die auch Robert Koch schon gesehen und gezeichnet hatte, in Reinkultur zu züchten. Das Genus *Staphylococcus* gehörte ehemals zur Familie der *Micrococcaceae*, wird aber in der neuen Auflage des Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, 2. Edition, zur Familie der *Staphylococcaceae* gezählt (Kloos, 1986; Kloos, 1997 Garrity, 2001). Bisher werden mehr als 40 Spezies der Gattung *Staphylococcus* unterschieden. Um sie zu differenzieren, werden verschiedene Kriterien berücksichtigt: Physiologie, Morphologie der Bakterienkolonie, spezifische Enzymausstattung und die chemotaxonomische Zellwandzusammensetzung (Kloos und Bannermann, 1994; Schumacher-Perdreau et al., 1983). Durch den Nachweis der Prothrombin-aktivierenden Koagulase werden die Staphylokokken in koagulasepositive und -negative Spezies aufgeteilt. Die Koagulase führt über eine Konformationsänderung zu einer Aktivierung von Thrombin, das dann zu einer Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin führt. Der koagulase-positive *S. aureus* erlangt also unter anderem durch die Koagulase sein pathologisches Potenzial: das in den Organismus eingedrungene Bakterium bildet mit ihrer Hilfe Fibrinpolymere, die es wie ein Schutzschild umhüllen (Sperber und Tantini, 1975). Im klinischen Alltag, wo ein schneller Nachweis bevorzugt ist, wird diese Differenzierung mittels Clumpingfaktor durchgeführt. Der Clumpingfaktor ist ein zellwandständiges Protein von *S. aureus*, welches an Fibrinogen bindet und innerhalb von

Sekunden zur Zellverklumpung im Plasma führt (Zajdel et al., 1973). Die Spezies *S. aureus* erhielt diesen Speziesnamen wegen der weiß bis goldgelben Färbung der Bakterienkolonien (lat.: aureus: golden). Diese farbgebenden Pigmente gehören zur Familie der Karotinoide und implizieren einen gewissen Schutz vor Oxidation durch UV-Strahlen (Schlegel, 1992). Das humanpathogene Potential des koagulase-positiven *S. aureus* ist schon seit längerem bekannt (Kayser et al., 1998). Die Synthese multipler Toxine und Enzyme (Proteasen, Hämolytine, Toxic Shock Syndrom Toxin-1, Plasmakoagulasen, Lipasen und Enterotoxinen) ermöglichen *S. aureus* eine relativ hohe Virulenz. Dabei ist die Summe dieser biologischen Aktivitäten für die Virulenz einzelner *S. aureus*-Stämme determinierend und nicht etwa ein einzelner dieser Faktoren. (Bergdoll, 1983; Humphreys et al., 1989). Die Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus* können in drei Hauptgruppen eingeteilt werden: die Zellossoziierten Produkte (z. B. Adhäsine: MSCRAMM, Kapselpolysaccharide) welche die Bindung an den Wirtsorganismus vermitteln und bei der Überwindung der Abwehrmechanismen intervenieren, die sezernierten Exoproteine (z. B. Zytolytine: α -Hämolytin, Panton-Valentine Leukozidin) und extrazelluläre Proteasen (z. B. V8 Proteasen) welche bei der Bekämpfung der Wirtsabwehr eine Rolle spielen und die Gewebsinvasion und Nahrungszufuhr erleichtern. Das Panton-Valentine Leukozidin (PVL) ist ein porenbildendes Toxin. Es wird durch die Gene *lukFlukS* kodiert, ist auf einem Phagen lokalisiert und kann somit zwischen verschiedenen *S. aureus*-Stämmen übertragen werden. *S. aureus*-Stämme mit PVL sind virulenter als solche ohne. PVL bindet hochspezifisch an die Zellwand von polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen und lysiert sie. Die hämolytische Wirkung ist im Vergleich mit den eng verwandten Hämolytinen von *S. aureus* gering (Linde et al., 2005; Robert Koch Institut, 2009b). Außerdem gibt es die regulatorischen Genloci (z. B. *agr*) welche in komplexer Weise als Antwort auf Umwelteinflüsse (z. B. Bakteriendichte, Osmolarität, Sauerstoffdruck und pH-Wert) die Expression der Pathogenitätsfaktoren regulieren (Novick, 2000). *S. aureus* besitzt ein großes Potential zur Resistenzbildung. Schon kurz nach der klinischen Einführung von Penicillin beobachtete man erste *S. aureus* Resistenzen durch Bindung von β -Lactamasen. Sie spalten den β -Lactam-Ring vom Penicillin. Daraufhin wurden β -Lactam stabile Antibiotika synthetisiert, z. B. Methicillin. Aber auch hier entwickelten sich Resistenzen. Schon 1960 wurde der erste Methicillin-resistente *S. aureus*-Stamm (MRSA) identifiziert. *S. aureus* bildet vier verschiedene in der Zellwandsynthese intervenierende Enzyme: Penicillin-bindende-Proteine (PBP 1-4). MRSA-Stämme hingegen bilden ein weiteres Penicillin-bindendes-Protein (PBP 2a), mit einer stark verminderten Affinität zu Beta-Laktam-Antibiotika. Das Gen *mecA* kodiert für die β -Laktam-Resistenz. Es wird oft gemeinsam mit anderen Resistenzgenen erworben, die zusammen auf

einer Staphylokokken-Genkassette (SCC*mec*) liegen. Hierdurch erklärt sich die häufig vorkommende Multiresistenz der MRSA-Stämme. Es werden die im Krankenhaus erworbenen HA-MRSA (hospital-acquired-MRSA) von den außerhalb der Krankenhäuser erworbenen: CA-MRSA (community-acquired MRSA) unterschieden. Das Resistenzspektrum von CA-MRSA ist in der Regel schmäler als das von HA-MRSA und sie charakterisieren sich durch das häufige Vorhandensein, der im Vergleich zu HA-MRSA kleineren SCC*mec-IV*-Einheit, sowie der Fähigkeit, den Pathogenitätsfaktor PVL zu produzieren (Barber 1947, Barber 1961, North und Christie 1946, Robert Koch Institut, 2009b). Koagulase negative Staphylokokken (KNS) hingegen bilden als residente oder temporär residente Flora auf der menschlichen Epidermis eine Gruppe mit geringerem pathogenen Potential (Rupp und Archer, 1994; Kloos und Bannerman, 1994). Sie besiedeln bevorzugt die Ausgänge von Schweißdrüsen, Haartalgdrüsen und den Nasenschleimhäuten, außerdem die Schleimhäute von Körperöffnungen mit einer Dichte von 10^4 - 10^6 CFU/cm² (Nobel und Naidoo, 1986; Nobel 1997). Staphylokokken zählen zu den Hauptregern von nosokomialen Infektionen. Dies ist auch durch ihre hohe Antibiotikaresistenz bedingt. Die im Jahre 2007 für die Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. durchgeführte Studie „Empfindlichkeitsprüfungen und Resistenz“ von M. Kresken und seiner Arbeitsgruppe belegte bei 20,7 % der *S. aureus*-Stämme eine Methicillin (Oxacillin)-Resistenz (MRSA) und sogar bei 73,8 % der *S. epidermidis*-Stämme eine Resistenz gegen Methicillin. Der Anteil der Methicillin (Oxacillin)-resistenten Stämme bei *Staphylococcus haemolyticus* und *Staphylococcus hominis* betrug 89,0 % bzw. 71,4 % (Kresken et al., 2007).

1.1.2 Biofilmbildung

Das Phänomen der Biofilmbildung durch *S. epidermidis*, heute bekannt als wichtigster Pathogenitätsfaktor bei fremdkörperassoziierten Infektionen wurde erstmals in einem Bericht von R. Bayston und S. R. Penny im Jahr 1972 erwähnt. Nachdem man das pathogene Potential von koagulasenegativen Staphylokokken entdeckt hatte, suchte man nun nach deren Ursachen. Bayston und Penny beobachteten bei Kindern mit Liquorshuntinfektionen, dass koagulasenegative Staphylokokken *in vitro*, wie auch *in vivo*, einen mukoiden Film auf den Shunts bildeten. Diesen adhären Film brachten sie mit den Liquorshuntinfektionen in Verbindung (Bayston und Penny, 1972). Aber erst Jahre später wurde diese Biofilmbildung intensiv erforscht. Erstmals 1982 beschrieb G. D. Christensen mit seiner Arbeitsgruppe einen Zusammenhang zwischen diesem Phänomen der Biofilmbildung, der bakteriellen Besiedlung

von Fremdkörperoberflächen und einer daraus resultierenden Infektion. Aufnahmen von infizierten Venenkathetern mit dem Rasterelektronenmikroskop zeigten einen adhärenen Biofilm aus mehreren Zellschichten von *S. epidermidis*, eingebettet in eine Exopolysaccharidschicht, welche als Glycocalyx bezeichnet wird (Christensen et al., 1982; Franson et al., 1984; Costerton et al., 1987). Heute ist es eine Tatsache, dass die Fähigkeit von *S. epidermidis* zur Biofilmbildung einen wichtigen Pathogenitätsfaktor darstellt. KNS haben also in den letzten Jahrzehnten eine wichtige Bedeutung als Erreger von nosokomialen Infektionen erlangt. Obwohl *S. epidermidis* weniger Toxine und extrazelluläre Pathogenitätsfaktoren als *S. aureus* besitzt, ist er durch seine Biofilmsynthese in der Lage eine Vielzahl von lokalen Infektionen, Bakteriämien und Septikämien zu verursachen, welche dann auch zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität führen können. Auch durch eine vermehrte Implantation medizinischer Fremdkörper in den humanen Organismus, wie z. B. künstliche Herzklappen, Gelenkprothesen oder Venenkathetern ist die Anzahl der durch KNS verursachten Infektionen angestiegen. Eine Therapie ist häufig nur durch die Entfernung des Fremdmaterials möglich (Boyce, 1997; Götz und Peters, 2000; Jarvis und Martone, 1992; Kloos und Bannerman, 1994; Richards et al., 2000; Rupp und Archer, 1994; Vacheethasaneet et al., 1998).

Der Prozess der Biofilmbildung (Abbildung 1-1) und somit der Kolonialisierung von Polymeroberflächen erfolgt im Wesentlichen in zwei Phasen (Mack et al., 2002). Im ersten Schritt erfolgt die primäre Adhäsion von einzelnen Bakterien an die Polymeroberfläche. In der darauf folgenden Phase proliferieren und akkumulieren die Bakterien in vielen Zellschichten und produzieren einen Biofilm, der die Zellen umhüllt. Die Mehrzahl der Zellen besitzt somit keinen direkten Kontakt mehr zur Polymeroberfläche (Peters et al. 1981; Franson et al. 1984).

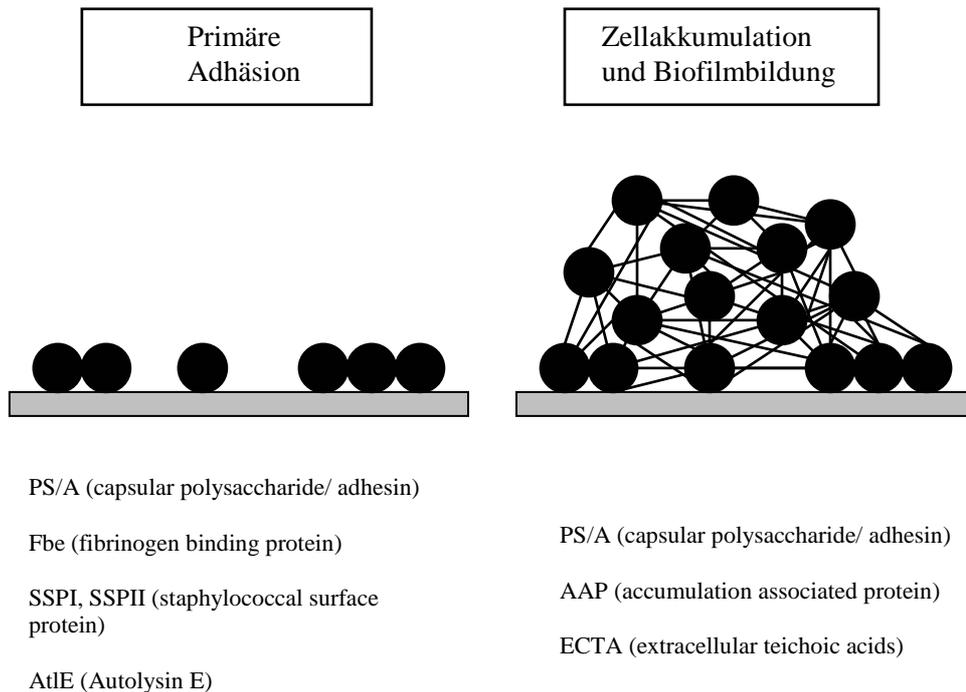


Abbildung 1-1: Die zwei Phasen der Biofilmbildung und der intervenierenden Faktoren bei *S. epidermidis*. In der ersten Phase findet die Adhäsion der einzelnen Zellen an die Polymeroberfläche statt. In der zweiten Phase proliferieren und akkumulieren die Zellen und bilden einen mehrschichtigen Biofilm. Die Mehrzahl der Zellen hat somit keinen Kontakt mehr zur Polymeroberfläche.

1.1.2.1 Die primäre Adhäsion der Biofilmbildung

Die primäre Bindung von *S. epidermidis* an Polymeroberflächen ist ein sehr komplexer Vorgang, abhängig von der Beschaffenheit der Polymeroberfläche und auch der bakteriellen Zelloberfläche. Hier spielen Oberflächenhydrophobizität, Ladung der Zelle und auch Zellwand-assoziierte Proteine eine wichtige Rolle (Ludwicka et al. 1984; Fleer und Verhoef, 1989).

Positiv wird die primäre Adhäsion durch die Matrixproteine Fibronectin, Fibrinogen und die Anwesenheit von Thrombozyten beeinflusst (Vaudaux et al. 1989; Wang et al., 1993) negativ durch die Präsenz von Plasma, Serum oder Albumin (Pascual et al. 1986; Espersen et al. 1990). Einige der Faktoren von *S. epidermidis*, die in der primären Adhäsion eine wichtige Rolle spielen, konnten in den letzten Jahren identifiziert werden (Abbildung 1.1). Ein spezifischer Faktor, der in der primären Adhäsion an Silastic-Katheter eine Rolle spielt (Muller et al., 1993a), nicht aber in der an Polyethylen (Higashi et al., 1998), ist das Kapsuläre

Polysaccharid/Adhäsins PS/A (capsular polysaccharide/adhesin). Es wurde aus dem biofilm-positiven Stamm *S. epidermidis* RP 62A isoliert (Tojo et al., 1988). Trotzdem scheint die Bedeutung dieses Adhäsins in der Biofilmbildung eingeschränkt zu sein, da die Hälfte aller PS/A positiven Zellen einen biofilm-negativen Phänotyp aufweist (Muller et al., 1993b). Es mussten also weitere Faktoren für die Biofilmbildung identifiziert werden.

Auf eine Beteiligung von Proteinstrukturen weist hin, dass Proteasen die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* an Polymeroberflächen inhibieren (Hogt et al., 1986; Pascual et al., 1986). Es konnte ein Protein isoliert werden, welches in der Lage ist, Fibrinogen zu binden. Dabei handelt es sich um das Fbe (fibrinogen binding Protein). Eine gewisse Homologie mit dem Clumpingfaktor von *S. aureus* ist beschrieben (Nilsson et al., 1998). Experimentell konnte die Beteiligung an der primären Bindung belegt werden. Außerdem wurden eine charakteristische Transmembranregion und ein für oberflächenassoziierte Proteine typisches LPXTG-Motiv nachgewiesen (Pei et al., 1999). Die Adhäsion von *S. epidermidis* an periphervenöse Katheter konnte durch Fbe-Antikörper gehemmt werden (Pei und Flock, 2001). Trotzdem weisen viele *S. epidermidis*-Stämme eine schwache Bindung an Fibrinogen-beschichtete Polymere auf, was auf eine sehr variable Expression dieses Proteins schließen lässt (Nilsson et al., 1998; Galdbart et al., 2000). Weitere, in die primäre Adhäsion implizierte Proteine sind die Zellwandproteine SSPI (staphylococcal surface protein) und sein Degradationsprodukt SSPII. Gegen diese Proteine gerichtete spezifische Antikörper konnten die Adhäsion von *S. epidermidis* 354 an Polystyrolkugeln inhibieren (Götz, 2002; Heilmann et al., 1997; Timmermann et al., 1991; Veenstra et al., 1996). Außerdem wurde noch das Autolysin AtlE mit seinem kodierenden Genlokus durch Transposonmutagenese identifiziert. Es ist an der Bindung an unbeschichteten Oberflächen beteiligt. AtlE-Mutanten können nicht mehr an Oberflächen binden, was durch die veränderte Hydrophobizität erklärt werden kann. Es gibt außerdem Hinweise auf eine Adhäsion von Autolysin AtlE an Zelloberflächen von Wirtszellen (Heilmann et al., 1996a; Heilmann et al., 1997; Takano et al., 2000).

1.1.2.2 Die akkumulative Phase der Biofilmbildung

Die zweite Phase der Biofilmbildung ist durch eine Akkumulation der Zellen und der mehrschichtigen Biofilmproduktion charakterisiert (Abbildung 1-1). Hier sind spezifische Adhäsine notwendig, die die Bindung der zahlreichen Zellen garantieren. Mit einem spezifischen Antiserum, welches gegen den biofilm-positiven Stamm *S. epidermidis* 1457 gerichtet ist, gelang es D. Mack und seinen Mitarbeitern das interzelluläre Polysaccharid-

Adhäsins PIA (polysaccharide intercellular adhesin) zu identifizieren (Mack et al., 1992). Durch Transposonmutagenese konnten sie anhand der biofilm-negativen *S. epidermidis* 1457 M10 und 1457 M11, welche als Klasse I Mutanten bezeichnet werden, die Funktion von PIA als interzellulären Bindungsmediator bestätigen, denn Klasse I Mutanten haben nicht die Fähigkeit Zellen zu akkumulieren und Aggregate zu bilden (Mack et al., 1994). Mittels Gelfiltration und Anionenaustauschchromatographie wurde gezeigt, dass PIA aus 2 Polysacchariden besteht. PIA I setzt sich aus ungefähr 130 β -(1,6)-gebundenen 2-Desoxy-2-Amino-D-Glucopyranosylresten zusammen, die zu 80 % N-acetyliert sind. PIA II enthält eine PIA I analoge Struktur, hat aber weniger N-acetylierte Glucosaminreste und enthält Phosphat und Succinat. Somit erklärt sich sein leicht anionischer Charakter (Mack et al., 1996a; Mack et al. 1996b). Bezüglich der Biofilmbildung konnte eine Korrelation zwischen der Quantität von produziertem PIA und Biofilm beobachtet werden. Beide verhalten sich proportional (Mack et al., 1996b). Darüber hinaus wurde eine weitere Funktion von PIA beschrieben. Als essentieller Faktor ist es in die Hämagglutination von Erythrozyten impliziert. Hier konnte sowohl eine lineare Beziehung zwischen Biofilmexpression und Hämagglutination beobachtet werden, als auch zwischen der Menge von synthetisiertem PIA und Hämagglutinationstitern (Fey et al., 1999; Mack et al., 1999; Rupp und Archer, 1992). Das interzelluläre Polysaccharid Adhäsins PIA wird im Genlokus *icaADBC* (intercellular adhesion) kodiert. Das Operon setzt sich aus den 4 Genen *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* zusammen und hat eine Größe von 3,4 kb. Diese Gene sind in übereinstimmender Transkriptionsrichtung organisiert (Abbildung 1-2). Das negativ regulatorische Gen *icaR* ist dem Operon vorgelagert und wird entgegengesetzt transkribiert. Es handelt sich somit um einen Repressor, der die Transkription von *icaADBC* inhibiert. *IcaR* selber wird durch weitere Faktoren reguliert. NaCl hat eine inhibierende Wirkung. *IcaA* kodiert für ein Transmembranprotein, welches eine Homologie zu N-acetyl-glucosaminyl-transferasen besitzt (412 Aminosäuren), *icaC* kodiert für ein hydrophobes integrales Transmembranprotein (355 Aminosäuren) und *icaB* für ein sekretiertes Protein, das Poly-N-Acetylglucosamin deacetyliert. Seine Funktion beschränkt sich aber nicht auf das Mitwirken an der Biofilmsynthese, sondern verhindert außerdem die Phagozytose durch neutrophile Zellen und spielt auch bei der Wirtskolonisierung eine Rolle. Strukturell überlappt *icaD* teilweise *icaA* und *icaB*. Funktionell ist ein Zusammenspiel aller vier Gene notwendig, denn für sich allein hat *IcaA* nur eine geringe N-acetyl-glucosaminyl-Transferaseaktivität. Bei einer gemeinsamen Expression von *icaA* und *icaD* entstehen N-acetyl-glucosamin-Oligomere mit einer Länge von 20 Sacchariden. Erst die Koexpression von *icaA*, *icaD* und *icaB* garantiert die Synthese von

Oligomeren ausreichender Länge, die für eine adäquate Funktion von PIA unentbehrlich sind (Conlon et al., 2002; Gerke et al., 1998; Heilmann et al., 1996a, b; Vuong et al., 2004a, b).

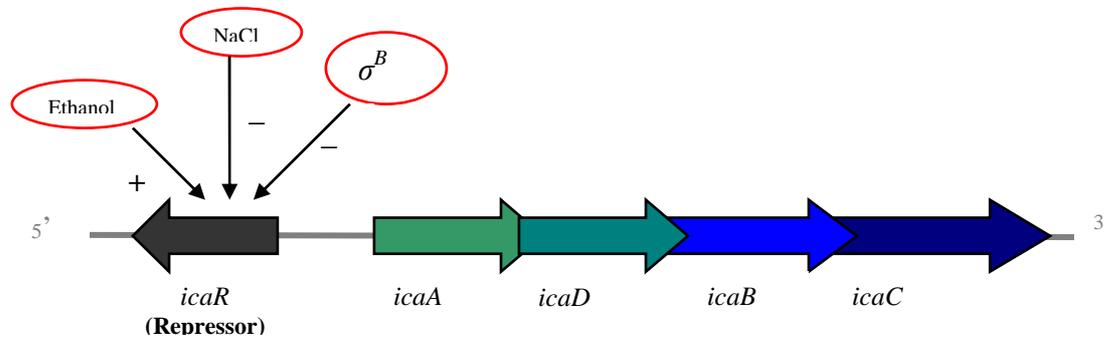


Abbildung 1-2: Struktur und Regulation des *icaADBC* Genlokus

Ein weiteres, vermutlich an der Zellakkumulation beteiligtes Protein ist das AAP (accumulation associated protein). Es wurde anhand der biofilm-negativen Mutante M7 beschrieben, welche durch Mitomycin-induzierte Mutagenese des biofilm-positiven Stammes *S. epidermidis* RP62A entstanden und durch den Verlust eines 140 kDa großen Proteins (AAP) charakterisiert worden war. Die Mutante M7 war zwar noch zur primären Bindung an Polymeroberflächen in der Lage, konnte aber keine Zellakkumulation mehr durchführen. AAP ist ein Exoprotein, welches zwar nicht bei allen biofilm-positiven Stämmen vorkommt, aber dessen Vorkommen mit einer erhöhten Biofilmproduktion gekoppelt ist (Hussain et al., 1997; Schumacher-Perdreau et al., 1994). Später konnte beobachtet werden, dass das AAP an der Bildung eines PIA-unabhängigen Biofilms beteiligt ist. Bei der bislang ermittelten Größe von 140kD handelt es sich um ein Abbauprodukt des initial 220 kD großen AAP, welches die proteinogene Akkumulation der Bakterien vermittelt. Diese Proteolyse wird erstaunlicherweise nicht nur von bakteriellen Proteasen, sondern auch von Wirtsproteasen durchgeführt (Rhode et al., 2005). Als weiterer Bestandteil der Biofilmmatrix wurde EC TA (extracellular teichoic acids) identifiziert. Das jeweilige Verhältnis von EC TA und PIA im Biofilm wird durch die Wachstumsphase und die Wachstumsbedingungen beeinflusst (Sadovskaya et al., 2005).

1.1.3 Regulation der Biofilmbildung

Die Biofilmbildung von Staphylokokken unterliegt einer Vielzahl von regulatorischen Faktoren. Mittlerweile sind einige externe Regulatoren bekannt, die die Biofilmbildung beeinflussen. Eine positive Regulation der Biofilmbildung von *S. epidermidis* wird durch hohe Konzentrationen Natriumchlorid und hohe Temperaturen erreicht, aber auch Eisenmangel und ein vermindertes Sauerstoffangebot stimulieren die Biofilmsynthese (Cramton et al., 2001; Deighton und Borland, 1993; Knobloch et al., 2001; Rachid et al., 2000). Auch ein Nährmedium, angereichert mit Glucosamin oder N-acetyl-D-glucosamin induziert eine Biofilmproduktion (Kiel, 2002; Knobloch et al., 2003; Krokotsch 1998). Bei Inaktivierung bestimmter Genloki durch Transposonmutagenese mittels Tn917 in *S. epidermidis* 1457 konnten biofilm-negative Mutanten erzeugt werden. Es handelt sich hierbei um eine Transkriptionshemmung des *icaADBC* Operons, welches für die PIA-Synthese von essentieller Bedeutung ist. Diese biofilm-negativen Stämme und Mutanten mit verminderter Biofilmsynthese werden in verschiedene Klassen eingeteilt.

Die Klasse I Mutanten mit Transposoninsertionen im *ica*-Operon, zu denen auch der (bereits erwähnte) *S. epidermidis* 1457 M10 zählt, sind immer biofilm- und PIA-negativ, aber in ihrer primären Adhäsion nicht beeinträchtigt. Die Klasse II enthält die Mutante M12, die ebenfalls biofilm- und PIA-negativ ist. Charakteristisch ist ihre graue Koloniemorphologie, die es erlaubt, sie von den weißen Wildtypkolonien abzugrenzen. Der Klasse III werden die *S. epidermidis* Mutanten M15 und M19 zugeordnet. Hier handelt es sich um eine Transposoninsertion in den positiven Regulator *rsbU* von *sigB* (ausführlichere Erläuterung im Abschnitt 1.1.4. Regulation von Virulenzfaktoren bei Staphylokokken). Auch sie zeigen eine gräuliche Farbe der Kolonien und auch ihre Kapazität zur Biofilmsynthese ist stark eingeschränkt. Bei der Mutante M17, die der Klasse IV zugerechnet wird, konnte ein variabler Expressionsphänotyp beobachtet werden. Im TSB-Medium der Firma Oxoid war M17 biofilm-negativ, während sie im TSB der Firma BBL einen biofilm-positiven Phänotyp hatte (Mack et al., 2000b). Da es möglich ist, durch Expression des *icaADBC* Operons in *trans* in den Mutanten der Klasse II-IV eine Rekonstitution der Biofilmbildung und PIA-Synthese zu erreichen, ist ein regulativer Einfluß der durch Tn917 inaktivierten Genloki auf Transkriptionsebene sehr wahrscheinlich (Mack et al., 2000b).

1.1.4 Regulation von Virulenzfaktoren bei Staphylokokken

1.1.4.1 Das σ^B -System

Die Virulenzfaktoren von Staphylokokken werden auf genetischer Ebene unter anderem von den Regulatorgenen σ^B -System und agr-System (accessory gene regulator) moduliert. Sigmafaktoren sind alternative Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression von Bakterien regulieren. Der Sigmafaktor σ^B kontrolliert die Transkription von über 100 Genabschnitten, deren Produkte als „general stress proteins“ oder „heat specific stress proteins“ bezeichnet werden und eine wesentliche Rolle in der Virulenz dieser Bakterienstämme spielen (Hecker und Volker, 1998). Er wird in der stationären Phase, aber auch unter Stressbedingungen wie osmotischem Schock oder in Gegenwart von Ethanol induziert. Außerdem werden unter anderem die Expression vom Clumping-Faktor, der Koagulase, Hämolytinen und die Biofilmbildung durch σ^B kontrolliert (Knobloch et al., 2001; Rachid et al., 2000). Es handelt sich bei Sigmafaktoren um Untereinheiten der DNA-Polymerase. Sie binden spezifisch die RNA-Polymerase und erlauben dann durch spezifische Erkennung des Promotors die selektive Transkription bestimmter Genabschnitte. Eine katalytische Funktion wird ihnen nicht zugesprochen. Die Sigmafaktoren ermöglichen den Bakterien die Transkription verschiedener unabhängig kodierender DNA-Abschnitte, die jeweils für den Sigmafaktor spezifische Promotorelemente enthalten. Es werden alternative Sigmafaktoren, die die stationäre Phase modulieren, von den vegetativen differenziert, welche die Genexpression in der exponentiellen Phase regulieren (Finlay und Falkow, 1997; Helmann und Chamberlin, 1988). Zum ersten Mal wurde der σ^B bei *Bacillus subtilis* beschrieben (Völker et al., 1994; Wu et al., 1996). Dann auch bei *S. aureus* (Hecker und Engelmann, 2000; Kullik und Giachino, 1997; Wu et al., 1996) und schließlich auch bei *S. epidermidis* (Knobloch et al., 2001). Strukturell besteht das σ^B -System von *S. aureus* und *S. epidermidis* (Abbildung 1-3) aus 4 ORFs (open-reading-frames) mit großer Homologie zu dem Operon in *B. subtilis* (Völker et al., 1994; Wu et al., 1996). Während das *sigB*-Operon bei *B. subtilis* aus 8 Genen besteht, konnten bei *S. aureus* und *S. epidermidis* nur 4 identifiziert werden: *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* und *sigB*. Es wurden ein σ^B -abhängiger Promotor und ein σ^A -abhängiger Promotor nachgewiesen (Knobloch et al., 2001; Wu et al., 1996).

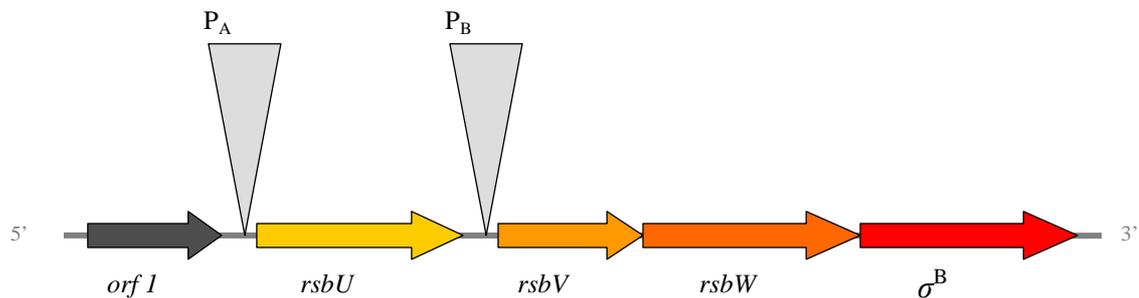


Abbildung 1-3: Das *sigB*-Operon von *S. epidermidis*. Offene Leseraster werden durch Pfeile dargestellt. Die beiden Dreiecke schematisieren die Promotoren (P_A σ^A -abhängig, P_B σ^B -abhängig).

Die Regulation durch das *sigB*-Operon verläuft wie folgt (Abbildung 1-4). Da die Funktion bei den Bakterien *B. subtilis* und *S. aureus* am besten erforscht ist, soll sie anhand dieser Bakterien erläutert werden. Die Genexpression wird durch das äußere Milieu und das Nährstoffangebot beeinflusst. *RsbW* kodiert für ein Protein, welches in der exponentiellen Phase mit σ^B eine Bindung eingeht und damit dessen Funktion inhibiert. Es handelt sich also um einen Anti- σ^B -Faktor (Miyazaki et al., 1999). *RsbV* ist ein Anti-anti- σ^B -Faktor, der mit σ^B um die Bindung an *RsbW* konkurriert. In der stationären Wachstumsphase, oder bei Nährstoffmangel dephosphoryliert *RsbV* und bildet mit *RsbW* einen Komplex. Somit wird σ^B von *RsbW* befreit und aktiviert die Transkription der σ^B -abhängigen Gene. Während der exponentiellen Phase und der *RsbW*- σ^B -Komplexbildung wird *RsbV* von *RsbW* mittels ATP als Phosphatdonor phosphoryliert und somit inaktiviert (Dufour und Haldenwang, 1994; Yang et al., 1996). Während *RsbW* ein Anti- σ^B -Faktor und sein Antagonist *RsbV* ein Anti-anti- σ^B -Faktor ist, handelt es sich bei *RsbU* um einen positiven Kontrollfaktor der σ^B -Aktivität (Giachino et al., 2001). Bei *B. subtilis* und *S. aureus* wurde beobachtet, dass im Stresszustand eine funktionsfähige *RsbU*-Phosphatase Voraussetzung für eine komplette σ^B -Aktivität ist (Kullik et al., 1998; Völker et al., 1995a, b).

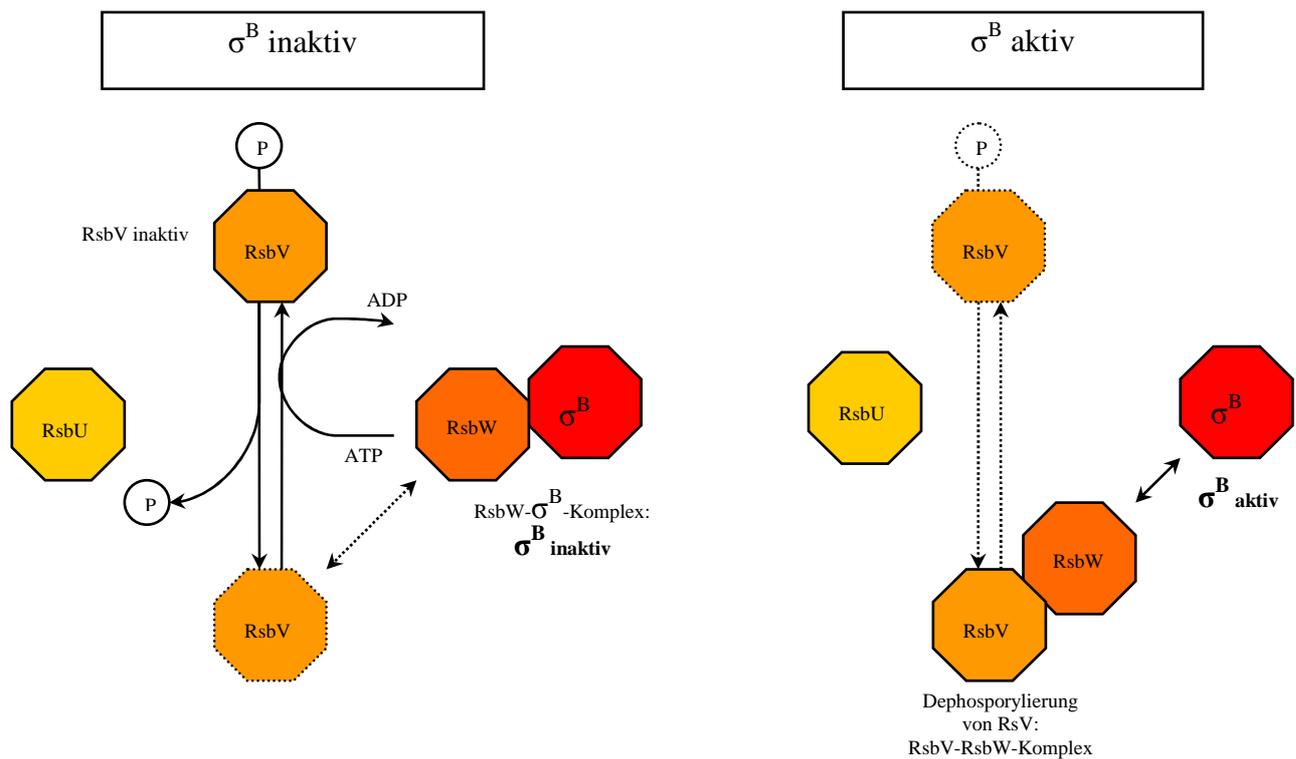


Abbildung 1-4: Aktivierung und Deaktivierung von σ^B . Deaktivierung von σ^B durch Bindung an RsbW
 RsbV konkurriert mit σ^B um die Bindung an RsbW. Bei Dephosphorylierung von RsbV, bildet es mit RsbW einen Komplex, somit wird σ^B aktiviert. RsbU ist ein positiver Kontrollfaktor der σ^B -Aktivität.

1.1.4.2 Das *agr*- System (accessory gene regulator)

Das *agr*-System ist ein wichtiges System, welches das Quorum sensing der Bakteriengemeinschaft, durch die Regulation diverser Staphylokokken-Virulenzfaktoren moduliert. Fünf Gene beinhaltet das *agr*-System. Sie regulieren die Expression von zellwandständigen und extrazellulären Proteinen (Arvidson und Tegmark, 2001; Kornblum et al., 1990; Cheung et al., 1992; Wolz et al., 1996). Die Aktivierung des *agr*-Systems geschieht während der Transition von der exponentiellen Wachstumsphase in die stationäre Phase (Ji et al., 1997; Otto et al., 1998). Die Regulation durch die Transkripte des *agr*-Systems wirkt negativ auf die Bildung von Zelloberflächenproteinen (z. B. Fibronectinbindendes Protein, Koagulase) und positiv auf die Synthese von diversen Exoproteinen ein (z. B. Toxic Shock Syndrome Toxin 1) (Janzon und Arvidson, 1990; Kornblum et al., 1990). Außerdem wurde bei *S. aureus* eine Inhibierung der Biofilmbildung auf Polystyren beobachtet (Vuong et al., 2000b) und eine verminderte Adhärenz an Fibrinogen (Shenkman et al., 2001). Später wurde entdeckt, dass die Funktion des *agr*-Systems bei *S. epidermidis* mit der bei *S. aureus*

vergleichbar ist (Vuong et al., 2000a). Bezüglich der negativen Regulierung der Biofilmbildung durch das *agr*-System bei *S. epidermidis* konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt via Autolysin AtlE und δ -Toxin (einem Detergens-ähnlichen Peptid) gesteuert wird (Vuong et al., 2003). Bei *S. aureus* initiieren die beiden Promotoren P2 und P3 die Transkription des *agr*-Genabschnittes, welcher aus zwei divergenten Einheiten besteht. RNAII und RNAIII sind die synthetisierten Transkripte (Janzon und Arvidson, 1990; Morfeld et al., 1995; Novick et al., 1993). Dabei ist die RNAIII, das die Proteinsynthese regulierende Effektorprotein, während RNAII für die vier Proteine AgrA, AgrC, AgrB und AgrD kodiert, welche selbst eine modulierende Funktion auf RNAIII haben. AgrB und AgrD induzieren die Aktivierung von AgrC, welches mit AgrA als Zwei-Komponenten-Transduktionssystem fungiert (Ji et al., 1995; Ji et al., 1997). Bei *S. epidermidis* wurde ein vergleichbares *agr*-System mit ähnlicher Struktur und Funktion identifiziert (Otto et al., 1998).

1.2 *Caenorhabditis elegans*

1.2.1 Vorkommen, Anatomie und Physiologie

Die nicht human-pathogene Spezies *Caenorhabditis elegans* gehört zu den Nematoden, deren Körperbau einfach strukturiert ist: von zylindrisch runder bis fadenförmiger Morphologie und unsegmentiert, was zu der deutschen Bezeichnung „Faden- bzw. Rundwürmer“ führte. *C. elegans* wurde erstmals in den 1960er Jahren von dem britischen Biologen und Nobelpreisträger S. Brenner als Modellsystem in die biologische Grundlagenforschung eingeführt (Brenner 1974). Es handelt sich hierbei um einen sich selbst befruchtenden Hermaphroditen, der mit relativ wenig Aufwand auf Agarplatten angezüchtet werden kann. Seine geringe Größe, seine anspruchslose Kultivierung, einfache Manipulation und hohe Vermehrungsrate sind Gründe dafür, dass aus ihm in den letzten Jahrzehnten ein beliebter Modellorganismus in der wissenschaftlichen Forschung geworden ist. Mehr als 40 %, der durch das *C. elegans* Genom kodierten Proteine besitzen signifikante Übereinstimmungen mit jenen durch das humane Genom kodierten Proteinen (The *C. elegans* sequencing consortium, 1998). Daher eignet sich *C. elegans* auch als Modell für infektionsbiologische Studien, die auf den Säugetierwirt übertragen werden können (Mahajan-Miklos et al., 2000). Natürlicherweise lebt der Fadenwurm *C. elegans* im feuchten Erdboden in gemäßigten Klimazonen und ist daher geographisch weit verbreitet. Für Wachstum und Reproduktion benötigt er ein feuchtes Milieu, Sauerstoff und als Nahrung dienen ihm Mikroorganismen wie die dort vorkommenden Bakterien (Schierenberg und Cassada, 1986). Der ausgewachsene *C. elegans* erreicht eine

Größe von ca. 1 mm. Es gibt Hermaphroditen (XX) und außerdem auch die männliche Gattung (X0). Sie sind aber äußerlich erst ab einem gewissen Entwicklungsstadium zu differenzieren, da sie sich morphologisch bis auf den Reproduktionstrakt nicht durch große Auffälligkeiten unterscheiden. Die adulten Hermaphroditen bestehen aus 959, die Männchen aus 1031 somatischen Zellen (Wood, 1988). Das Nervensystem ist eher unkompliziert: der Hermaphrodit hat 302 Neurone, während das männliche Geschlecht 381 aufweist (Rand and Nonet, 1997). Insgesamt umfasst das Genom $9,7 \times 10^7$ Basenpaare und besitzt über 19 000 proteinkodierende Gene, die 1998 vollständig sequenziert wurden (The *C. elegans* sequencing consortium, 1998). Diese Daten wurden inzwischen in der WormBase Datenbank zusammengefasst und mit neuen Ergebnissen vervollständigt und aktualisiert (<http://www.wormbase.org/>). Die Wurmoberfläche ist von der mehrschichtigen Kutikula bedeckt, die von der Hypodermis sezerniert wird, welche die Körperhöhle von *C. elegans* bedeckt (Kramer, 1997). Der Darmtrakt beginnt mit der Mundhöhle in der Kopfregion und endet ventral in der Schwanzregion. Die inneren Organe bestehen vorwiegend aus Verdauungs- und Reproduktionstrakt. Die Flüssigkeitsansammlung in der Leibeshöhle (Pseudocoelom) baut einen Turgordruck gegen die starre Aussenhülle auf (Hydroskelett), die als Widerlager für die Längsmuskulatur dient. Der Fadenwurm *C. elegans* kann sich durch eine Welle von abwechselnden Kontraktionen der Bauch- und Rückenmuskulatur vor und rückwärts bewegen. Vier Bänder aus Myozyten, ausgehend von der Hypodermis, erzeugen entlang des Wurmes subdorsal bzw. ventral verlaufend, diese Kontraktionen. Dieser Bewegungsablauf wird durch eine sinusoidale Welle produziert, die den gesamten Körper durchwandert. In einem trockenen Medium, wie zum Beispiel der Agarplatte, liegen die *C. elegans* aber auf der Seite, man sieht daher nur teilweise den ventralen und dorsalen Teil (Lewis und Fleming, 1995).

1.2.2 Fortpflanzung und Entwicklung

Der gemeine Hermaphrodit produziert Spermatozyten und Oozyten. Bei der Selbstbefruchtung entstehen um die 280 Nachkommen, die aber vorzugsweise selbst auch Hermaphroditen sind. Bei der Paarung des männlichen *C. elegans* mit dem Hermaphroditen dagegen, kommt es zu bis zu 1000 Nachfahren, die aber zu gleichen Teilen Hermaphroditen und die männliche Gattung repräsentieren. Der gesamte Lebenszyklus des *C. elegans* ist mit durchschnittlich drei Tagen bei 25°C eher kurz und umfasst die Zeitspanne von der Befruchtung der Eizelle bis zum Moment des Eintritts in die reproduktionsfähige Phase. Nach fünf Tagen legt der Nematode keine Eier mehr. Seine Lebenserwartung liegt bei 17,7- 19,9

Tagen bei einer Temperatur von 20°C. Es gibt vier Entwicklungsstadien, die mit den Buchstaben L1-L4 (L für larvae) betitelt werden. Bis zum Zustand L4 verändern sich Größe und Form trotz multipler interner Zellteilungen nicht merklich. Erste Merkmale, die es erlauben, den Hermaphroditen vom männlichen Nematoden zu differenzieren, erscheinen in L3: die Schwanzregion des Männchen ist stärker geschwollen. Im Stadium L4 ist der Hermaphrodit größer, die Vulva bildet sich im Mittelbauch und der Schwanz behält seine peitschenartige Morphologie, während der maskuline *C. elegans* mehr und mehr eine knollige Schwellung des Schwanzes aufweist. Adult sammeln sich Eier im vorderen und hinteren Uterusanteil des Hermaphroditen. Die Vulva ist jetzt gut abgrenzbar und die Eingeweide erscheinen dunkel. Auffällig sind am Männchen die reduziertere Größe, die glatte Oberfläche und der fächerförmige Fortpflanzungsstrahl am Schwanz und physiologisch ist ein höheres Aktivitätsniveau zu beobachten (Lewis und Fleming, 1995).

1.2.3 *C. elegans* als Nematoden-Bakterien-Pathogenitätsmodell

Das Nematoden-Bakterien-Modell zur Analyse der Pathogenität von diversen bakteriellen Virulenzfaktoren auf den Wirtsorganismus wurde erstmals im Jahr 1999 von Frederick M. Ausubel vorgestellt. Hierbei handelte er sich um das Pathogenitätsmodell *C. elegans*-*Pseudomonas aeruginosa*. Untersucht wurde das klinische Isolat *Pseudomonas aeruginosa* PA14, welches bislang durch seine synthetisierten Virulenzfaktoren sowohl im Mausmodell, als auch im Pflanzenmodell *Arabidopsis thaliana* eine hohe Pathogenität aufwies. Auch in Versuchen mit *C. elegans* konnte eine letale Wirkung beobachtet werden. Abhängig vom Pathogen und von der Zusammensetzung des Milieus konnten fünf Arten des Wurmsterbens beschrieben werden: die Infektion mit (intestinaler) Kolonisation (durch die meisten humanpathogenen Bakterien), die persistierende Infektion (*S. enterica*, *E. faecalis*), die Invasion (natürliche *C. elegans* Pathogene wie z. B. *Streptomyces albireticuli*), die Biofilmbildung (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) und die toxininduzierte (*P. aeruginosa*). Dabei konnte noch in das „slow killing“ (langames Wurmsterben, bedingt durch eine Infektion) und „fast killing“ (schnelles Wurmsterben, ausgelöst durch die Freisetzung von Toxinen) unterteilt werden (Sifri et al., 2005). Die somit ähnliche pathogene Wirkung von einigen bakteriellen Virulenzfaktoren im Nematoden- und Mausmodell erlaubt daher möglicherweise im *C. elegans*-Modell die Detektion von Pathogenitätsmechanismen, die auch für den Säugetierwirt von Bedeutung sein könnten. Eine erste Testung im Wurmmodell könnte daher aus ethischen, praktischen und finanziellen Gründen von Vorteil sein.

Limitierende Faktoren des Nematoden-Bakterien-Modells sind Variationen und Charakteristika des Kulturmediums, welche die Sterbekinetik von *C. elegans* aber auch die Expression der Virulenzfaktoren beeinflussen, die begrenzte Anzahl von Bakterien, die eine letale Wirkung auf *C. elegans* ausübt und ein fehlendes adaptatives Immunsystem des Wirtsorganismus *C. elegans*, welches Angriffsziel einiger Virulenzfaktoren darstellt (Alegado et al., 2003; Finlay, 1999). Tatsächlich nutzt *C. elegans* in dem Prozess der bakteriellen Ingestion primär die mechanische Zerkleinerungsfunktion seines pharyngealen Mahlapparates. In zweiter Instanz wird dann ca. alle 45 s (Sekunden) durch eine rhythmisch peristaltische Kontraktion der Intestinaltrakt durch Defäkation gesäubert. Außerdem sind die relativ immobilen Zoelomozyten im Pseudocoelom beobachtet worden. Sie endozytieren kontinuierlich Flüssigkeit aus der Körperhöhle. Allerdings ist von keiner Phagozytose von mikrobiologischen Organismen durch diese Zoelomozyten berichtet worden. In der Abwehr von Mikroorganismen durch *C. elegans* sind drei Signalwege erforscht, deren Gegenpart auch in Säugetieren existiert: ein p38-like MAPK-Signalweg, ein TGF- β Signalweg und ein IGF-1 Signalweg. Sie sind in multiple Immunantworten, wie Apoptose, Lysozymproduktion oder Synthese von antimikrobiellen Peptiden impliziert (Sifri et al., 2005). Die Virulenzbestimmung von verschiedenen Bakterienstämmen (Mutant versus Wildtyp oder Mutant) anhand des Nematodenmodells *C. elegans* wird somit schon seit einigen Jahren (1999) erforscht. Eine wichtige Voraussetzung ist dabei ein die Mortalität des Nematoden beeinflussender Effekt durch die verschiedenen Bakterienstämme. Besonders gramnegative aber auch grampositive Bakterienstämme und deren Mutanten, sowie Pilze sind mit diesem Modell erforscht worden, wie z. B. *Pseudomonas aeruginosa* (Mahajan-Miklos et al., 1999; Tan et al., 1999b), *Enterococcus faecalis* (Garsin et al., 2001; Sifri et al., 2002), *Staphylococcus aureus* (Garsin et al., 2001; Sifri et al., 2003), *Cryptococcus neoformans* (Mylonakis et al., 2002), *Staphylococcus epidermidis* (Begun et al., 2007).

1.3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich das *C. elegans*-Modell zur Erforschung der Bedeutung verschiedener Virulenzfaktoren von Staphylokokken eignet. Zunächst soll das optimale *C. elegans*-Staphylokokken-Pathogenitätsmodell etabliert werden. Anhand dessen sollen dann bereits identifizierte humanpathogene Virulenzfaktoren von *S. epidermidis* getestet werden. Voraussetzung hierfür ist der Einsatz von *S. epidermidis* Transposonmutanten und Deletionsmutanten mit unterschiedlich ausgeprägter Virulenz.

Untersucht werden sollen Biofilmsynthese, Expression von Proteasen, Lipasen und δ -Toxin. Des Weiteren sollen klinische *S. aureus*-Isolate mit erhöhter Expression spezieller Virulenzfaktoren (PIA-überproduzierend, PVL-positiv) im *C. elegans*-Pathogenitätsmodell getestet werden. Zusammenfassend soll untersucht werden, ob es sich bei dem *C. elegans*-Staphylokokken-Pathogenitätsmodell um ein Basismodell zur Erforschung der charakteristischen Virulenzfaktoren von *S. epidermidis* und *S. aureus* handelt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterien

Tabelle 2.1-1 *Staphylococcus epidermidis*-Stämme, die in der Arbeit verwendet wurden

Stamm	Bemerkung	Referenz
<i>S. epidermidis</i> Wildtypstämme		
<i>S. epidermidis</i> 1457	Stark biofilm-positives Isolat von einem infizierten zentralvenösen Katheter	(Mack et al., 1996a), (Mack et al., 1992)
<i>S. epidermidis</i> 1057	Biofilm-positives Isolat von einem infizierten zentralvenösen Katheter	(Nedelmann et al., 1998)
<i>S. epidermidis</i> 9142	Biofilm-positives Isolat von einem infizierten zentralvenösen Katheter	(Mack et al., 1999)
<i>S. epidermidis</i> Transposonmutante		
1457-M10	Transposonmutante mit Insertion von Tn917 in <i>icaA</i>	(Mack et al., 1999)
1057-M10	Transduktante von 1457-M10 in <i>S. epidermidis</i> 1057	(Mack et al., 2002)
9142-M10	Transduktante von 1457-M10 in <i>S. epidermidis</i> 9142	(Mack et al., 1999)
<i>S. epidermidis</i> Deletionsmutante (homologer Genaustausch)		
1457sigB	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion	(Knobloch et al.,

	des Gens <i>sigB</i>	2004)
1057 <i>sigB</i>	Transduktante von 1457 <i>sigB</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057	
1457 <i>rsbUVW</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion der Gene <i>rsbU</i> , <i>rsbV</i> und <i>rsbW</i>	(Knobloch et al., 2004)
1057 <i>rsbUVW</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbUVW</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057	
1457 <i>agr</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion des <i>agr</i> Operons	(Vuong et al., 2004)
1057 <i>agr</i>	<i>S. epidermidis</i> 1057 mit Deletion des <i>agr</i> Operons	
1457 <i>agr sigB</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion des <i>agr</i> Operons und des Gens <i>sigB</i>	(Vuong et al., 2004)
1057 <i>agr sigB</i>	<i>S. epidermidis</i> 1057 mit Deletion des <i>agr</i> Operons und des Gens <i>sigB</i>	
1457 <i>agr rsbUVW</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion des <i>agr</i> Operons und der Gene <i>rsbU</i> , <i>rsbV</i> und <i>rsbW</i>	
1057 <i>agr rsbUVW</i>	Transduktante von 1457 <i>agr</i> <i>rsbUVW</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057	

Tabelle 2.1-2 *Staphylococcus aureus*- Stämme, die in der Arbeit verwendet wurden

Stamm	Bemerkung	Referenz
<i>S. aureus</i>		
CF 2	Klinisches Lungenisolat eines an Cystischer Fibrose erkrankten Patienten, PIA überproduzierend	Med. Mikrobiologie Universitätsklinikum Münster/PD Dr. B. Kahl
CF 146	Klinisches Lungenisolat eines an Cystischer Fibrose erkrankten Patienten, PIA überproduzierend	Med. Mikrobiologie Universitätsklinikum Münster/PD Dr. B. Kahl
CF 230	Klinisches Lungenisolat eines an Cystischer Fibrose erkrankten Patienten	Med. Mikrobiologie Universitätsklinikum Münster/PD Dr. B. Kahl
CA 10	Klinisches Wundisolat, Community acquired	diese Studie

	MRSA, PVL positiv	
CA 32	Klinisches Isolat, Community acquired	diese Studie
	MRSA, PVL positiv	
ATCC 49775	MSSA, PVL positiv	ATCC (<i>American Tissue Culture Collection</i> : www.atcc.org/)

Tabelle 2.1-4 Escherichia Coli-Stamm, der in der Arbeit verwendet wurde

Stamm	Bemerkung	Referenz
Escherichia coli OP 50	Uracil auxotroph. Limitiertes Wachstum auf NGM	CGC (Caenorhabditis Genetics Center), University of Minnesota, St. Paul

2.1.2 *C. elegans*

Es wurde ausschließlich mit dem Stamm *C. elegans Bristol N2* aus dem CGC (Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota, St. Paul, U.S.A.) gearbeitet.

2.1.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Mikroskop 47 50 22	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Sicherheitswerkbank Klasse 2, NU 440-300E	Nuaire, Plymouth, USA
Brutschrank 5050E	Heraeus-Christ, Osterode, Deutschland
Brutschrank 2771	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Megafuge 3.0 R Kühlzentrifuge	Heraeus-Christ, Osterode, Deutschland
Schüttelinkubator	New Brunswick scientific Co., New Brunswick, USA
Schüttelwasserbad GFL 1083	AD Krauth, Hamburg, Deutschland
Eppendorfschüttler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Feinwaage 2432	Leitz, Wetzlar, Deutschland

2.1.4 Gebrauchsmaterialien

Material	Hersteller
----------	------------

Petrischalen, 92 x 16 mm	Nerbe, Winsen/Luhe, Deutschland
Petrischalen, 35 x 10 mm	Becton Dickinson, Cockeysville, Md, USA
PP-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
PS-Röhrchen, 12 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

2.1.5 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Die folgenden Angaben zu den verschiedenen Puffern und Lösungen sind auf jeweils 100 ml berechnet und es wurde voll entionisiertes Wasser benutzt. Die Chemikalien sind analysenreine Substanzen von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Alle benutzten Gerätschaften waren standardgemäß autoklaviert.

2.1.5.1 Für die Manipulation der Bakterienstämme

Nährmedien:

- Columbia Agar with sheep blood plus
- TSB-BBL: Trypticase Soy Broth (BBL)
- LB: Luria-Bertani Brühe

Diese Nährmedien stammen von den Firmen Becton Dickinson (Cockeysville, Md, USA), Oxoid (Basingstoke, England) und J.T. Backer (Deventer, Holland).

2.1.5.2 Für die Manipulation von *C. elegans*

- M9 Puffer:
 - 3,0 g KH_2PO_4
 - 6,0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 5,0 g NaCl

nach dem Autoklavieren Zugabe von
1 ml 0,1 M MgSO_4

- Bleaching-Lösung
 - 12 % NaOCl
 - 2 M NaOH

Antibiotika-Stammlösungen:

Aztreonam	10,0 mg/ml
Gentamicin	40,0 mg/ml
Polymixin B sulfate	20,0 mg/ml

Die Endkonzentration aller Antibiotika beträgt im NGM- und TSB-Agar jeweils 20,0 µg/ml.

Flüssigkultur:

Für einen Tube :	5 ml Basalmedium
	1 ml Hämoglobin
	250 µl Aztreonam à 10,0 mg/ml

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterien

2.2.1.1 Bakterienkulturen für die verschiedenen Versuchsreihen

Die Bakterienkulturen wurden mit Hilfe des Dreiösenausstrichs auf Columbia Blutagarplatten ausgestrichen und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Mit sterilen Plastikimpfösen wurde jeweils eine einzeln stehende Bakterienkolonie von der vorliegenden Columbia-Agarplatte entnommen und in 3 ml TSB-BBL verrührt. Dann wurde diese Bakterienvorkultur für 18 Stunden im Schüttler bei 37°C inkubiert. Die so erhaltene Bakteriensuspension war nun bereit für die Versuchsreihen zur Sterbekinetik von *C. elegans*.

2.2.1.2 Bakterienkultur als Nahrungsquelle für *C. elegans*

Als Nahrungsquelle für *C. elegans* wurde der Bakterienstamm OP 50 der Gattung *E. coli* benutzt. Um eine ideale OP 50 Suspension als Nahrungsquelle für die Würmer zu erhalten wurde folgendermaßen verfahren. Mit einer sterilen Plastikimpföse wurde eine einzelne *E. coli* OP 50 Kolonie in 50 ml LB-Medium suspendiert und dann bei 37°C für 18 Stunden in den Schüttelinkubator gestellt. Versuchsweise wurde dieselbige Bakteriensuspension bei 95°C für 10 min erhitzt, um das Wachstum der *E. coli* OP 50 Kolonien zu reduzieren.

2.2.2 Arbeitsweisen mit *C. elegans*

2.2.2.1 Kulturerhaltung von *C. elegans*

Für eine ideale Entwicklung und ein schnelles Wachstum benötigen *C. elegans* als Nahrungsquelle den Bakterienstamm *E. coli OP 50* und als Trockenkultur NGM-Agarplatten. Die NGM-Agarplatten mit den *C. elegans* wurden mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei 20°C in den Brutschrank gestellt. Für die Flüssigkultur konnten die Würmer auch in 5 ml Basalmedium, Hämoglobin und 0,250 ml Aztreonam gegen werden, um dann auf dem Schüttler oder im Brutschrank bei 20°C gelagert zu werden. Vorzugsweise sollten die Würmer dunkel gelagert werden. Daher wurde die Flüssigkultur mit Aluminiumfilm umwickelt und auch die Agarplatten mit den *C. elegans* nicht für längere Zeit als notwendig im Lichtstrahl des Mikroskops stehen gelassen.

2.2.2.2 Wurmübertragung

Mit Hilfe einer Wimper

Da der ausgewachsene *C. elegans* nur eine durchschnittliche Größe von 1mm erreicht, kann man ihn mit bloßem Auge zwar erkennen, aber nicht sachgemäß manipulieren. Die folgende Manipulation wurde also unter dem Mikroskop durchgeführt. Mit einer leicht geschwungenen Augenwimper, die mit Sekundenkleber an einer Pipettenspitze befestigt worden war, wurde der Wurm von der Agarplatte gelöst, indem die Wimper ungefähr in einem Winkel von 90° unter den Wurm geschoben wurde. Danach wurde er mit einer leichten Gleitbewegung auf der Wimper hochgehoben und so auf seinen Zielplatz gesetzt.

Mit Hilfe eines Agarblockes

Es wurde eine NGM-Platte mit *C. elegans* im Stadium L3 ausgewählt. Auf der Sicherheitswerkbank wurde mit einem sterilen Skalpell ein 2 x 2 cm großer Agarblock mit möglichst vielen Würmern aus dieser ausgewählten Platte ausgeschnitten und auf eine mit *OP 50* als Nahrungsquelle beimpften, neue NGM-Agarplatte, übertragen. Dabei war zu beachten, dass der Block mit der Oberseite nach unten auf die neue Platte deponiert wurde.

2.2.2.3 Eiergewinnung zur Synchronisierung einer *C. elegans* Population

Methode 1:

Um eine synchrone Population von *C. elegans* zu erhalten, wurde das Verfahren der Eiergewinnung genutzt. Eine NGM-Agarplatte, die *C. elegans* mit graviden Hermaphroditen bzw. Eiern enthielt, wurde mit 5 ml M9 Puffer gespült. Die Flüssigkeit wurde mehrmals über die Agarplatte pipettiert, um so viele gravide *C. elegans* und Eier wie möglich von der Platte zu lösen. Diese Spüllösung wurde dann zusammen mit 2 ml Bleaching-Lösung in einem 15 ml Falcontube gut gemischt. Diese Mischung wurde alle 2 min für mehrere Sekunden geschüttelt, um zu garantieren, dass sich die Würmer aller Stadien zersetzten. Um die Lösung von restlichen Zellbestandteilen zu trennen, wurde sie dann ein erstes Mal 3 min bei $943 \times g$ in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig bis auf 0,1 ml abpipettiert. Dann wurden nochmals 5 ml M9 Puffer zu den so erhaltenen Eiern hinzugegeben und die gesamte Mischung noch einmal bei $943 \times g$ für 3 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand von neuem bis auf 0,1 ml abpipettiert worden war, konnten die so erhaltenen gereinigten Wurmeier problemlos auf eine NGM-Agarplatte pipettiert werden. Auf diese NGM-Agarplatte waren vorher 0,5 ml *E. coli OP 50* als Nahrungsquelle gegeben worden und für 45 min auf einer Sicherheitswerkbank zum Antrocknen gestellt worden. Die NGM-Agarplatten mit den Eiern wurden dann mit Haftfilm verschlossen und bis zum Erreichen des gewünschten Larvenstadiums bei 20°C in den Brutschrank gestellt.

Methode 2:

Auf eine NGM-Agarplatte wurden 0,5 ml *E. coli OP 50* als Nahrungsquelle pipettiert und diese Platte für 45 min zum Trocknen auf einer Sicherheitswerkbank gestellt. Anschließend wurde ein 0,05 ml großer Tropfen Bleaching-Lösung auf ein Areal dieser NGM-Platte gegeben, in dem sich kein *E. coli* befand, um das Penetrieren der Bleaching-Lösung in den Bereich des *OP 50* Teppichs zu verhindern. Innerhalb von wenigen Minuten wurden dann mit Hilfe einer Wimper, die in einer Pipettenspitze mit Sekundenkleber befestigt worden war, 10 gravide Würmer in diesen noch feuchten Tropfen übertragen, um deren Zersetzung zu gewährleisten. Auf diese Weise blieben nur die Eier erhalten.

2.2.2.4 Verbesserte Kultivierung von grampositiven Keimen

Um ein Überwachsen der grampositiven Bakterienkulturen durch den gramnegativen Keim *E. coli OP 50* in den Versuchsreihen zu verhindern, wurden folgende Antibiotika genutzt:

Aztreonam und Gentamicin. Die Endkonzentration der jeweiligen Antibiotika-Stammlösung im NGM- oder TSB-Agar betrug 20 µg/ml. Die gereinigten Wurmeier wurden auf eine mit Gentamicin angereicherte NGM-Agarplatte pipettiert. Auf diese NGM-G-Agarplatte waren vorher 0,5 ml *E. coli OP 50* als Nahrungsquelle gegeben worden und für 45 min auf eine Sicherheitswerkbank zum Antrocknen gestellt worden. Die verschiedenen zu testenden grampositive Bakterienstämme wurden dagegen auf einem mit Aztreonam angereicherten TSB-Agar kultiviert.

2.2.3 Bestimmung der Sterbekinetik von *C. elegans*

Die Bestimmung der Sterbekinetik von *C. elegans* erfolgte auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 35 x 10 mm der Firma Becton Dickinson, die TSB-Agar mit dem Antibiotikazusatz Aztreonam enthielten. Die jeweilige Kontrollreihe mit *OP 50* wurde ohne Antibiotika durchgeführt. Zu Versuchsbeginn wurden auf der Sicherheitswerkbank je 0,150 ml der gewünschten Bakteriensuspension auf die TSB-Agarplatten mit Antibiotikazusatz pipettiert. Nach einer Trockenzeit von 60 min konnten dann jeweils 10 *C. elegans* des gewünschten Stadiums mit der Wimper-Methode auf die so vorbereiteten TSB-Aztreonam-Agarplatten übertragen werden. Dieser Moment wurde dann als Zeitpunkt 0 bezeichnet. Es wurde dann jeweils alle 24 Stunden unter dem Lichtmikroskop die Anzahl der so verbleibenden *C. elegans* bestimmt. Diese Zeitpunkte wurden mit 1, 2, 3, etc. bezeichnet.

2.2.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde die Vierfeldertafel bzw. (der Chi-Quadrat-Vierfeldertest) benutzt. Dabei handelt es sich um ein relativ einfaches statistisches Testverfahren. In eine Kontingenztafel wird die Unabhängigkeit zweier qualitativer Merkmale verglichen. Man prüft, ob tatsächliche und theoretische Häufigkeiten von Ereignissen in Einklang zu bringen sind. Es wird also geprüft, ob ihre Differenz wesentlich oder zufällig ist und somit die Signifikanz des Tests bestimmt. Als Signifikanzniveau, d.h. obere Grenze für die Irrtumswahrscheinlichkeit wird $p \leq 0,05$ festgelegt. Bei $p \leq 0,01$ ist von einer hohen Signifikanz auszugehen. Für die Berechnung wurde die virtuelle Vierfeldertafel-Analyse des Institutes für Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover genutzt (<http://www.mh-hannover.de/institute/biometrie/JUMBO/bio/vierf.html>).

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Methode

Sämtliche Arbeitsmethoden zur Wurmeiergewinnung, Kultivierung und Kulturerhaltung der *C. elegans* Populationen wurden aus *Basic Culture Methods* von J. A. Lewis und J. T. Fleming. übernommen. Im Laufe der ersten Versuchsreihen stellten sich Schwierigkeiten ein. Bei den zu testenden Bakterienstämmen handelte es sich um grampositive Bakterien. Im Gegensatz dazu wurden als Nahrungsmedium für *C. elegans* die gramnegativen Enterobacteriaceae *E. coli OP 50* genutzt. In den ersten Versuchsreihen wurde beobachtet, dass auf den kleinen TSB-Agarplatten mit konfluentem grampositiven Bakterienrasen eine Überwucherung durch *E. coli OP 50* stattfand. In diesen gramnegativen Arealen waren gehäuft *C. elegans* anzutreffen. Die für dieses Ereignis verantwortlichen Mechanismen mussten zunächst im Rahmen des Versuchs identifiziert werden, um sie entsprechend modifizieren zu können. Dabei stellte sich heraus, dass der Transfer von *E. coli OP 50* auf die 35 x 10 mm großen Petrischalen zweifelsfrei bei der Übertragung von *C. elegans* auf die TSB-Agarplatte erfolgte, weil die *C. elegans* Populationen vorher mit *E. coli OP 50* kultiviert worden waren. In mehreren Ansätzen wurde nun versucht mit verschiedenen Modifikationen der Methode diese Beeinträchtigungen erfolgreich zu verhindern.

Frühe Kultivierung grampositiver Bakterien und Spülen der *C. elegans* vor Überimpfung

Zunächst wurde der Effekt der Generationszeit von grampositiven und gramnegativen Bakterien neutralisiert. Statt der gleichzeitigen Kultivierung von grampositiven Bakterien und dem Übersetzen von mit *E. coli OP 50* kontaminierten *C. elegans*, wurde nun mehr der grampositive Bakterienteppich auf den TSB-Agarplatten vorher angesetzt. Außerdem wurden die mit *E. coli OP 50* aufgezogenen und somit auch oberflächlich kontaminierten *C. elegans* mit 5 ml M9-Puffer auf ihrer NGM-Agarplatte gespült und auf eine weitere NGM-Agarplatte ohne *E. coli* übertragen. Diese beiden Ansätze führten zwar zu einer späteren, aber trotzdem doch relevanten Kontamination mit *E. coli OP 50*. Nach diesem ersten nicht sehr erfolgreichen Versuch mussten nun andere Ansätze ausprobiert werden.

Erhitzen der *E. coli OP 50* Suspension

Bei diesem zweiten Ansatz wurde von der Überlegung ausgegangen, dass ein erhitzter und somit abgetöteter *E. coli OP 50* zu keiner Kontaminierung des grampositiven Bakterienrasens

fähig sei. Es musste nun also anhand einer Versuchsreihe geklärt werden, ob eine abgetötete *E. coli OP 50* Suspension für die Kultivierung von *C. elegans* ausreichend sei. In einem dreitägigen Versuch wurden auf die jeweils mit erhitzten und nicht erhitzten *E. coli OP 50* beimpften NGM-Agarplatten eine gleiche Quantität von *C. elegans* Wurmeiern gegeben. Nach drei Tagen wurde die Anzahl der *C. elegans* verglichen. Die Population von *C. elegans*, die auf dem erhitzten OP 50 kultiviert worden war, war um mehr als ein Drittel kleiner, als die Population auf der NGM-Agarplatte mit nicht erhitztem OP 50. Ein soweit eingeschränktes Wachstum von *C. elegans* ist suboptimal und konnte für die weiteren Versuchsreihen zur Bestimmung der Sterbekinetik von *C. elegans* nicht genutzt werden.

Antibiotika mit gramnegativem Wirkspektrum

Der letzte Ansatz beruhte auf der selektiv gramnegativen Bakterizidie einiger Antibiotika.

Folgende Antibiotika wurden daher für den Versuch genutzt:

- Aztreonam aus der Gruppe der Monobaktame (ein auf gramnegative Erreger hochwirksames β -Laktamantibiotikum)
- Gentamicin aus der Gruppe der Aminoglycoside (Breitspektrumantibiotikum mit besonderer Wirksamkeit auf gramnegative Stäbchen)
- Polymyxin B (hohe Wirksamkeit auf gramnegative Erreger)

Für diese Versuchsreihe wurden Agarplatten mit eben genannten Antibiotika gegossen und dann jeweils mit nicht erhitztem *E. coli OP 50* beimpft. Des Weiteren wurden die gleichen Proben ein zweites Mal, wie beschrieben, angelegt und dann jeweils die gleiche Quantität von *C. elegans* Wurmeiern dazugegeben. Nun wurden jeweils die Wachstumsrate von *E. coli* und *C. elegans* bestimmt. Hierbei wurde nun beobachtet, dass die Wachstumsrate von *E. coli OP 50* in den ersten zwei Tagen durch Aztreonam reduziert, aber die *C. elegans* Entwicklung keineswegs beeinträchtigt war. In dem Versuch mit Gentamicin war die Wachstumsrate von *E. coli* signifikant eingeschränkt, während das Wachstum von *C. elegans* nicht eingeschränkt war. Eine Kombination dieser beiden Antibiotika hemmte sowohl signifikant die Wachstumsrate der *E. coli*, als auch geringfügig die, der *C. elegans* Population. Mit Polymyxin B hingegen wurde ein am ersten Tag vermindertes Wachstum von *E. coli* beobachtet, welches jedoch am zweiten nicht mehr signifikant zu sein schien. Die Entwicklung von *C. elegans* war jedoch durch Polymyxin B wesentlich vermindert.

Durch diese Versuchsreihen konnte nun eine erfolgreiche Änderung der initialen Methoden veranlasst werden. Die Optimierung und somit Etablierung einer feststehenden Methode

bestand nun in folgender Versuchskonstellation: Die Kultivierung der *C. elegans* Wurmeier erfolgte auf einem mit 20 µg/ml Gentamicin angereicherten NGM-Agar, um das Wachstum von *E. coli* OP 50 zu reduzieren. Die Bestimmung der Sterbekinetik von *C. elegans* erfolgte auf den 35 x 10 mm großen mit 20 µg/ml Aztreonam angereicherten TSB-Agarplatten, um die Wachstumsrate von *E. coli* OP 50 einzuschränken, aber gleichzeitig die von *C. elegans* nicht zu beeinflussen. Die folgenden Versuchsreihen wurden ausnahmslos mit der vorher beschriebenen optimierten Methode durchgeführt. Dabei wurden jeweils drei Versuchsreihen à 10 Würmer durchgeführt. Der Kontrollversuch erfolgte stets mit *E. coli* OP 50. Variable waren jeweils die zu testenden Bakterienstämme. Die Ergebnisse wurden addiert und graphisch dargestellt.

3.2 Pathogenitätsbestimmung unterschiedlicher Bakterienstämme

3.2.1 Pathogenität von *S. epidermidis* Wildtypstämmen für *C. elegans*

Wildtyp *S. epidermidis* versus *E. coli* OP 50

Im ersten Versuch wurde untersucht, wie sich die Sterbekinetik von *C. elegans* durch die biofilm-positiven Wildtypstämme *S. epidermidis* 1457, 1057 und 9142 als Nahrungsquelle darstellt (Abbildung 3-1). Alle drei Stämme sind biofilm-positive klinische Isolate von Zentralen Venenkathetern. Bei *S. epidermidis* 1457 handelt es sich um einen stark biofilmbildenden Stamm.

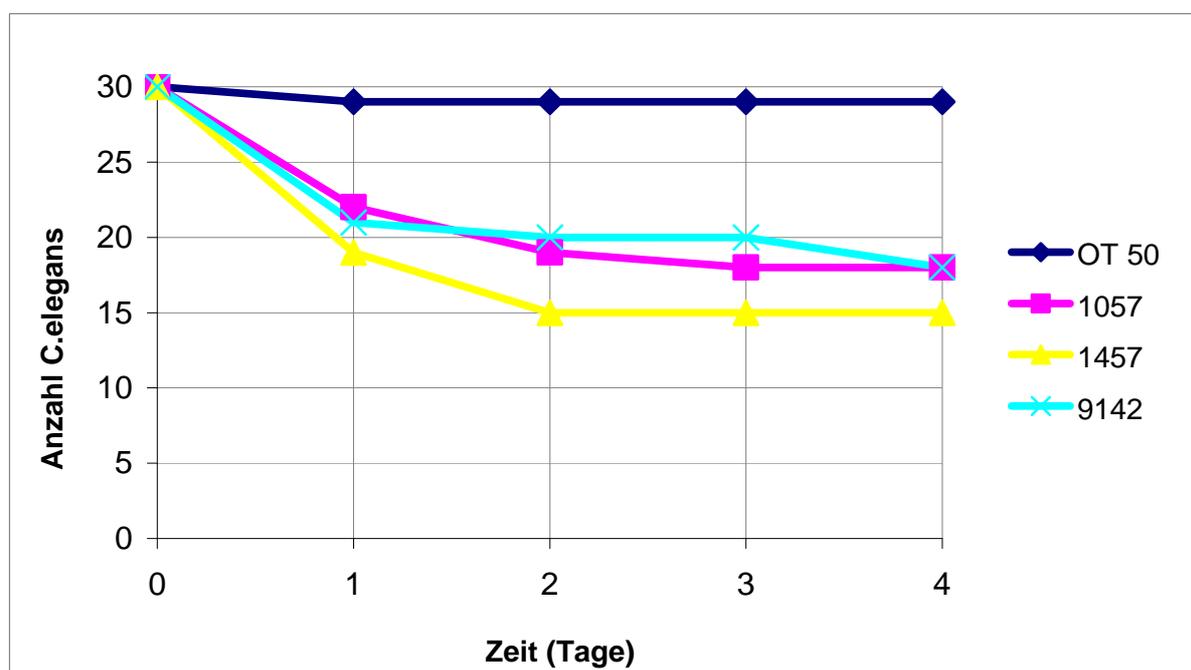


Abbildung 3-1: Sterbekinetik von *C. elegans* auf den *S. epidermidis* Wildtypstämmen 1057, 1457 und 9142 unter Standardbedingungen mit *E. coli* OP 50 als Negativkontrolle. Dargestellt ist die Anzahl der jeweils noch lebenden *C. elegans*. Der Versuch wurde in 3 unabhängigen Experimenten à 10 Würmern durchgeführt.

Es zeigte sich in den ersten 4 Tagen eine statistisch signifikant erhöhte Sterberate von *C. elegans* durch die drei *S. epidermidis*-Stämme 1457, 1057 und 9142 im Vergleich zur Kontrollgruppe mit *E. coli* OP 50 (*S. epidermidis* 1457: $p < 0,01$ nach 2 Tagen; *S. epidermidis* 1057: $p < 0,01$ nach 3 Tagen; *S. epidermidis* 9142: $p < 0,01$ nach 4 Tagen). Ein signifikanter Unterschied zwischen den *S. epidermidis*-Stämmen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Es konnte also in diesem Tiermodell anhand des Nematoden *C. elegans* gezeigt werden, dass eine erhöhte Pathogenität der Wildtypstämme *S. epidermidis* 1457, 1057 und 9142 zum signifikant erhöhten Wurmsterben führt.

3.2.2 Pathogenität von PIA (polysaccharide intercellular adhesin)

***S. epidermidis* Wildtypstämme versus M10 Transposonmutante**

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Biofilmbildung eine Bedeutung in der Pathogenität von *S. epidermidis* auf *C. elegans* hat. Dafür wurden die *icaADBC* inaktivierten Transposonmutanten gewählt. Es handelt sich somit um PIA negative Mutanten (Klasse I Mutanten), welche nicht mehr fähig sind, einen Biofilm zu akkumulieren oder größere Zellaggregate zu bilden. Es wurden also die *S. epidermidis* Wildtypstämme 1457, 1057 und 9142 im Vergleich mit den Transposonmutanten 1457-M10, 1057-M10 und 9142-M10 getestet (Abbildung 3-2).

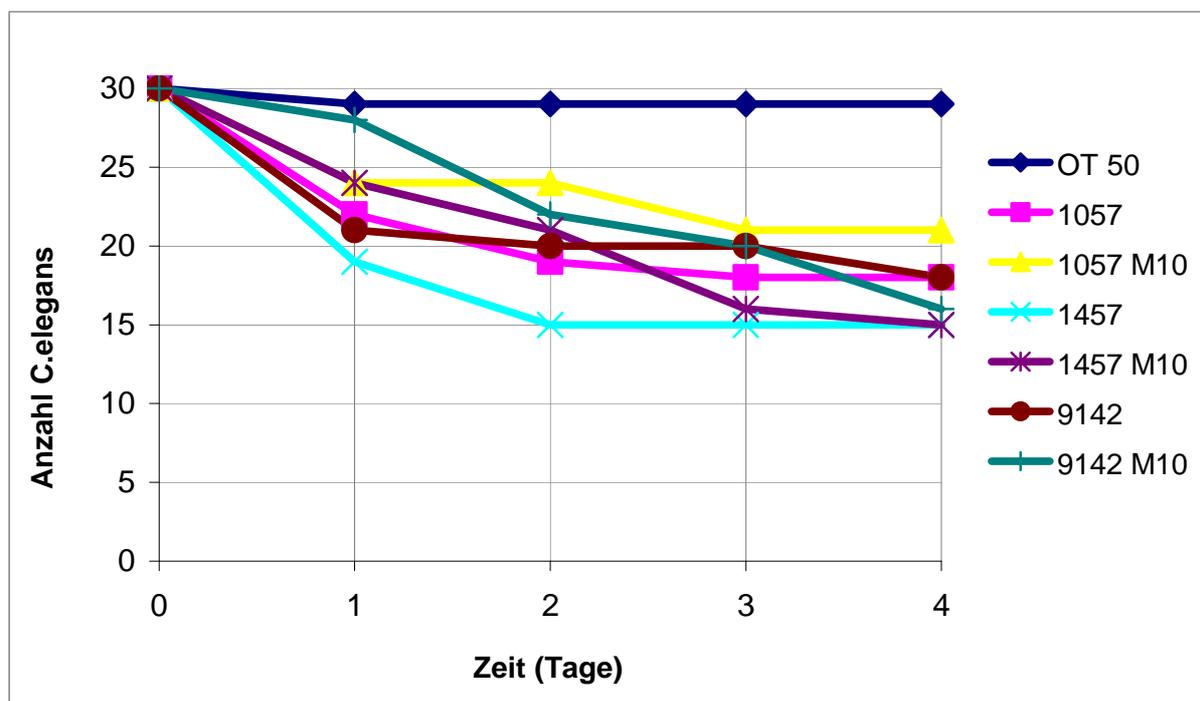


Abbildung 3-2: Unter Standardbedingungen untersuchte Sterbekinetik von *C. elegans* auf den *S. epidermidis* Wildtypstämmen 1457, 1057 und 9142 im Vergleich zu den Transposonmutanten 1457-M10, 1057-M10 und 9142-M10 mit *E. coli* OP 50 als Negativkontrolle. Der Versuch wurde in 3 unabhängigen Experimenten à 10 Würmern durchgeführt.

Während in der Sterbekinetik von *C. elegans* kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den *S. epidermidis* Wildtypstämmen 1457 und 1057 und den Transposonmutanten 1457-M10 und 1057-M10 dargestellt werden konnte, (*S. epidermidis* 1457 versus 1457-M10: $p > 0,05$; *S. epidermidis* 1057 versus 1057-M10: $p > 0,05$) verhielt es sich in dem Vergleich *S. epidermidis* 9142 versus 9142-M10 anders. Hier war ein statistisch geringes signifikantes Absterben mit 9142-M10 zu beobachten (*S. epidermidis* 9142 versus 9142-M10: $p < 0,05$ nach 1 Tag).

3.2.3 Bedeutung globaler Regulatoren in der Sterbekinetik von *C. elegans*

Einige Regulatorgene, wie *sigB*- und *agr*-Systeme sind für die Regulation von Virulenzfaktoren bei Staphylokokken bedeutsam. In den folgenden Versuchsreihen wurde ihr Einfluß auf die Sterbekinetik von *C. elegans* untersucht.

3.2.3.1 Der alternative Sigmafaktor B

S. epidermidis Wildtypstämme versus Deletionsmutante *sigB* und *rsbUVW*

Diese Versuchsreihe sollte zeigen, ob eine Deletion der Gene *sigB* und *rsbUVW*, welche eine regulatorische Funktion auf die *sigB* Aktivität haben, eine verminderte Sterbekinetik von *C. elegans* zur Folge haben. Es wurden die *S. epidermidis* Wildtypstämme 1457 und 1057 im Vergleich mit den Deletionsmutanten 1457*sigB*, 1057*sigB*, 1457*rsbUVW* und 1057*rsbUVW* getestet (Abbildung 3-3). Die *sigB*-Deletionsmutante zeichnet sich durch eine verminderte Biofilmsynthese aus. Durch einen positiven Regulationsmechanismus von *agr* ist aber die Virulenzfaktorsynthese erhöht. Im Gegenteil dazu ist die *rsbUVW*-Deletionsmutante stark biofilmpositiv bei verminderter Virulenzfaktorproduktion.

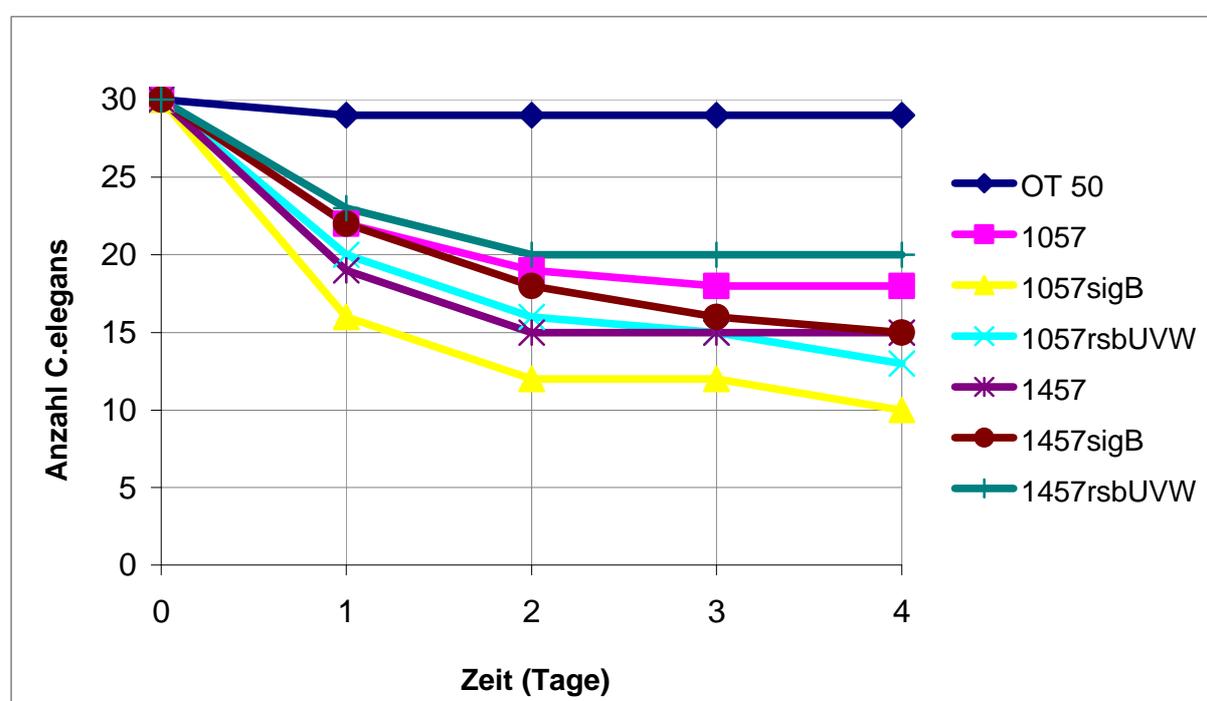


Abbildung 3-3: Unter Standardbedingungen untersuchte Sterbekinetik von *C. elegans* auf den *S. epidermidis* Wildtypstämmen 1457 und 1057 im Vergleich zu den Deletionsmutanten 1457*sigB*, 1057*sigB*, 1457*rsbUVW* und 1057*rsbUVW* mit *E. coli* OP 50 als Negativkontrolle. Der Versuch wurde in 3 unabhängigen Experimenten à 10 Würmern durchgeführt.

Es konnte weder eine statistisch signifikante Differenz in der Sterbekinetik von *C. elegans* im Vergleich von *S. epidermidis* 1457 mit 1457*sigB* ($p > 0,05$) und 1457*rsbUVW* ($p > 0,05$) ermittelt werden, noch im Vergleich von *S. epidermidis* 1057 mit 1057*sigB* ($p > 0,05$) und 1057*rsbUVW* ($p > 0,05$).

3.2.3.2 Das *agr*-System (accessory gene regulator)

S. epidermidis Wildtypstämme versus Deletionsmutante *agr*

In dieser Versuchsreihe wurde bestimmt, ob die Sterbekinetik von *C. elegans* durch die *S. epidermidis* Mutante mit Deletion des Gens *agr* erhöht war. Bei *agr* handelt es sich um ein Gen, welches die Expression zahlreicher Staphylokokken-Virulenzfaktoren kontrolliert. Anzumerken ist hier auch die negative Regulierung der Biofilmbildung. Die *agr*-Deletionsmutante ist durch eine vermehrte Biofilmbildung und stark verringerte Expression von Virulenzfaktoren charakterisiert. Untersucht wurden die *S. epidermidis* Wildtypstämme 1457 und 1057 im Vergleich zu den Deletionsmutanten 1457*agr* und 1057*agr* (Abbildung 3-4).

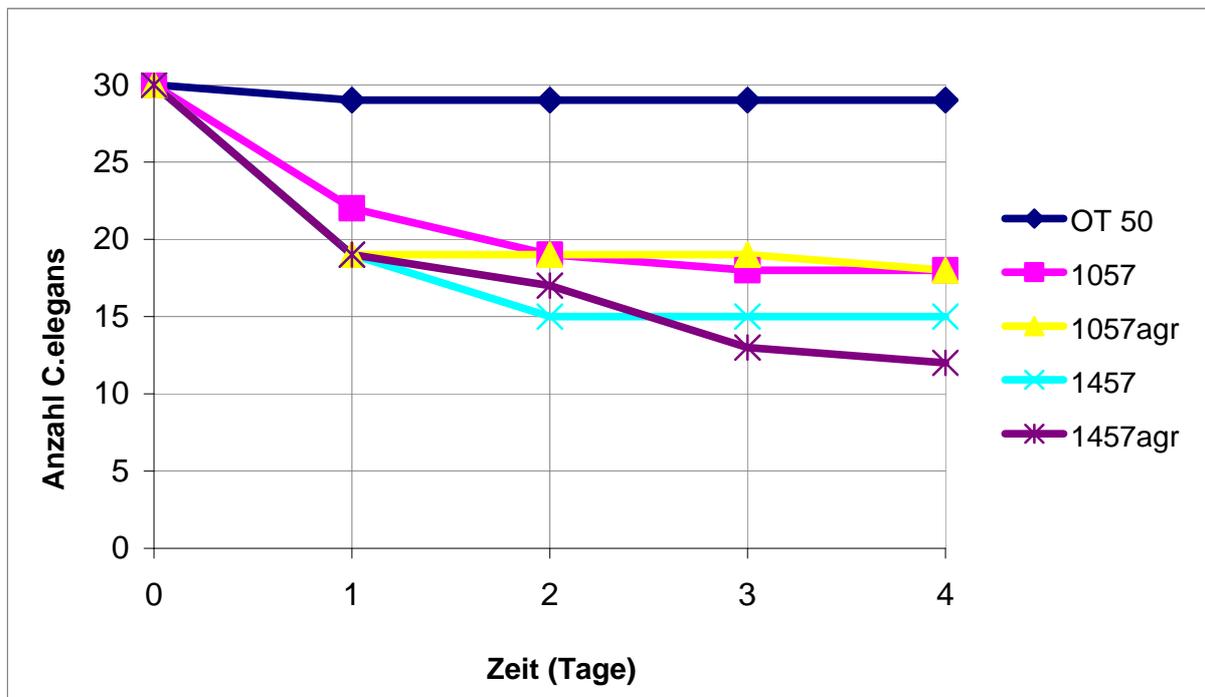


Abbildung 3-4: Unter Standardbedingungen untersuchte Sterbekinetik von *C. elegans* auf den *S. epidermidis* Wildtypstämmen 1457 und 1057 im Vergleich zu den Deletionsmutanten 1457*agr* und 1057*agr* mit *E. coli* OP 50 als Negativkontrolle. Der Versuch wurde in 3 unabhängigen Experimenten à 10 Würmern durchgeführt.

Auch in diesem Versuch zeigte sich keine statistisch signifikante Differenz in der Sterbekinetik der *C. elegans* Population und den Deletionsmutanten (*S. epidermidis* 1457 versus 1457*agr*: $p > 0,05$; *S. epidermidis* 1057 versus 1057*agr*: $p > 0,05$).

3.2.3.3 Deletionsmutanten *sigBagr* und *rsbUVWagr*

S. epidermidis Wildtypstämme versus Deletionsmutante *sigBagr* und *rsbUVWagr*

In diesem letzten Versuch mit dem Bakterienstamm *S. epidermidis* wurde die Sterbekinetik von *C. elegans* mit den Deletionsmutanten *sigBagr* und *rsbUVWagr* untersucht. Es handelt sich hierbei um Bakterienstämme, die jeweils die (in 3.2.3.1 und 3.2.3.2 beschriebenen) beiden Charakteristika der Deletionsmutante *agr* und *sigB* bzw. *rsbUVW* in sich vereinen. Es sollte so verifiziert werden, ob mit dieser Variante einer in der Virulenzfaktorsynthese stark eingeschränkten, aber hochgradig biofilm-positiven Mutante (*rsbUVWagr*) eine unterschiedliche Sterbekinetik von *C. elegans* beobachtet werden konnte. Bei der Deletionsmutanten *sigBagr* sind sowohl Virulenzfaktorproduktion als auch Biofilmsynthese vermindert. Untersucht wurden die *S. epidermidis* Wildtypstämme 1457 und 1057 im Vergleich zu den Deletionsmutanten 1457 *sigBagr* und 1457 *rsbUVWagr* sowie 1057 *sigBagr* und 1057 *rsbUVWagr* (Abbildung 3-5).

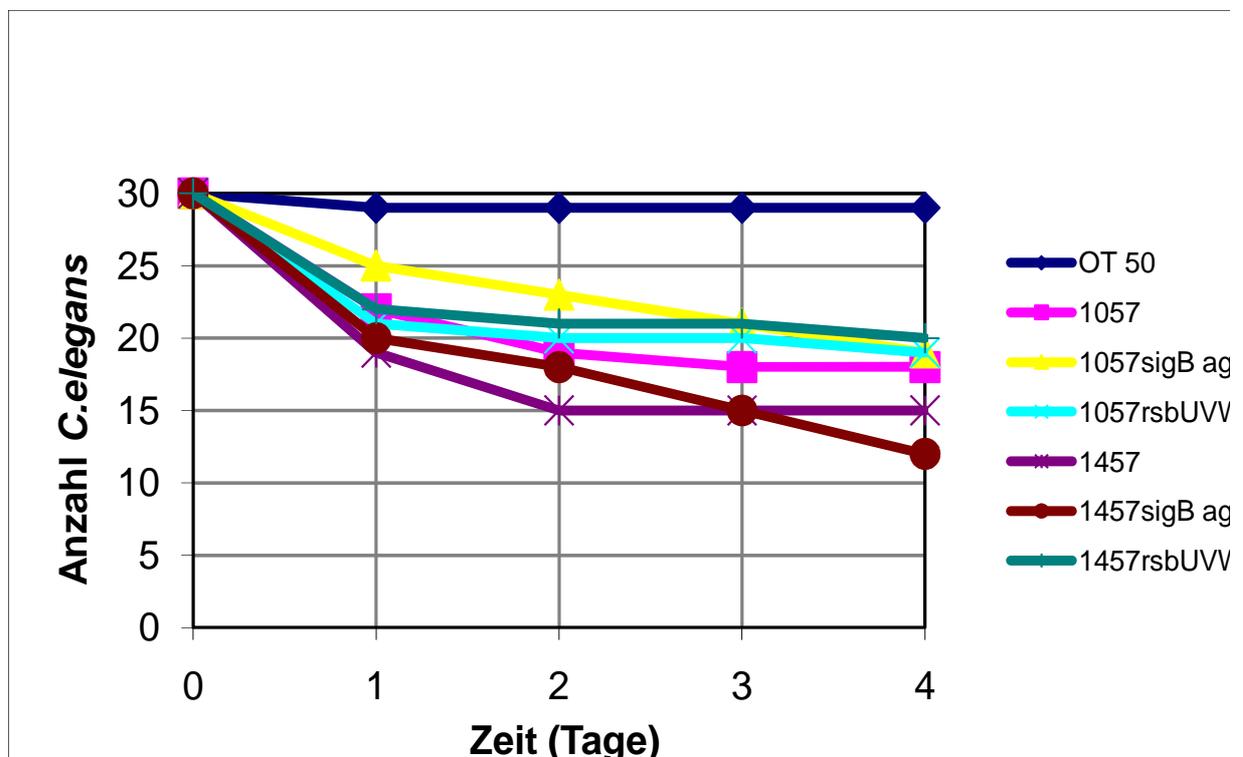


Abbildung 3-5: Unter Standardbedingungen untersuchte Sterbekinetik von *C. elegans* auf den *S. epidermidis* Wildtypstämmen 1457 und 1057 im Vergleich zu den Deletionsmutanten 1457 *sigBagr*, 1057 *sigBagr*, 1457 *rsbUVWagr* und 1057 *rsbUVWagr* mit *E. coli* OP 50 als Negativkontrolle. Der Versuch wurde in 3 unabhängigen Experimenten à 10 Würmern durchgeführt.

Auch dieser Versuch zeigte kein statistisch signifikant höheres Absterben der *C. elegans* Population auf den Deletionsmutanten (*S. epidermidis* 1457 versus 1457 *sigBagr*: $p > 0,05$; *S. epidermidis* 1457 versus 1457 *rsbUVWagr*: $p > 0,05$; *S. epidermidis* 1057 versus 1057 *sigBagr*: $p > 0,05$; *S. epidermidis* 1057 versus 1057 *rsbUVWagr*: $p > 0,05$).

3.2.4 Pathogenität diverser *S. aureus*-Stämme für *C. elegans*

S. aureus versus *E. coli* OP 50

Im folgenden Versuch wurde die Pathogenität diverser *S. aureus*-Stämme für *C. elegans* unter den bereits bekannten Versuchsbedingungen untersucht. Neben der Negativkontrolle mit *E. coli* wurden folgende *S. aureus*-Stämme genutzt: der *S. aureus* Referenzstamm ATCC 49775 (American Tissue Culture Collection), die klinischen Isolate CF 2, CF 146 (beide sind PIA überproduzierend) und CF 230 von an Cystischer Fibrose erkrankten Patienten und ferner die klinischen Wundisolate CA 10 und CA 32, zwei PVL-positive community acquired MRSA Stämme.

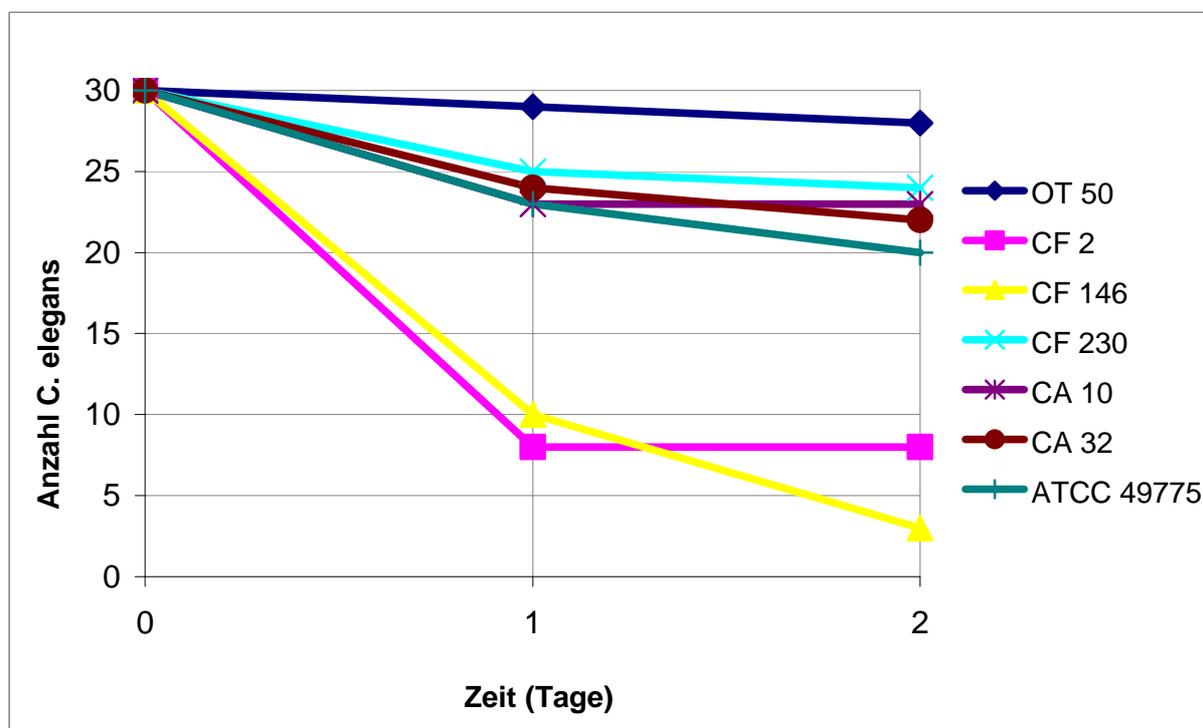


Abbildung 3-6: Unter Standardbedingungen untersuchte Sterbekinetik von *C. elegans* an den *S. aureus*-Stämmen CF 2, CF 146, CF 230, CA 10, CA 32, ATCC 49775 im Vergleich mit *E. coli* OP 50. Der Versuch wurde in 3 unabhängigen Experimenten à 10 Würmern durchgeführt.

Es konnte anhand der Ergebnisse eindeutig gezeigt werden, dass eine statistisch signifikant erhöhte Sterberate von *C. elegans* mit den *S. aureus*-Stämmen CF 2 ($p < 0,01$ nach 1 Tag), CF 146 ($p < 0,01$ nach 2 Tagen) und ATCC 49775 ($p < 0,05$ nach 2 Tagen) im Vergleich zu *E. coli OP 50* zu beobachten war. Bei den Stämmen *S. aureus* CF 230, CA 10 und CA 32 konnte keine signifikant erhöhte Sterbekinetik von *C. elegans* im Vergleich mit *E. coli OP 50* festgestellt werden (*S. aureus* CF 230 versus *E. coli OP 50*: $p > 0,05$; *S. aureus* CA 10 versus *E. coli OP 50*: $p > 0,05$; *S. aureus* CA 32 versus *E. coli OP 50*: $p > 0,05$).

4 Diskussion

Auch im heutigen Zeitalter der modernen Medizin mit hoch entwickelten diagnostischen und therapeutischen Verfahren stellen bakterielle Infektionen einen wichtigen Anteil der Morbidität und Mortalität dar. In Deutschland werden nosokomiale Infektionen unter anderem statistisch vom Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) des Nationalen Referenzzentrums für Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ) aufgearbeitet. Basierend auf deren Daten und denen des Statistischen Bundesamtes treten in Deutschland mehr als 60.000 nosokomiale Infektionen auf Intensivstationen und ca. 128.000 postoperative Wundinfektionen pro Jahr auf. Auf der Basis von Hochrechnungen kann in Deutschland von insgesamt 500.000 bis 800.000 nosokomialen Infektionen ausgegangen werden (Robert Koch Institut, 2002). Antibiotikaresistente Keime, insbesondere MRSA, spielen hierbei eine herausragende Rolle. Sie sind im Jahr 2008 in deutschen Krankenhäusern folgender klinischer Herkunft: Wundinfektionen (52 %), Beatmungspneumonien (15 %), Bakteriämie/Sepsis (11 %) und Harnwegsinfekte (10 %) (Robert Koch Institut, 2009a). Es ist daher von großer Bedeutung neue Ansatzpunkte in der antibiotischen Therapie zu identifizieren und dieses mit dem geringsten möglichen arbeitstechnischen, materiellen, biologischen, zeitlichen und finanziellen Aufwand. Da Säugetiermodelle zu diesem Zweck in vielerlei Hinsicht aufwendig sind, etablierte F. M. Ausubel zur Erforschung der bakteriellen Einflüsse auf *C. elegans* im Jahr 1999 das Pathogenitätsmodell *C. elegans-Pseudomonas aeruginosa*. Es wurde von C. D. Sifri in den folgenden Jahren weiterentwickelt und für diverse Bakterienstämme zur Erforschung der Interaktionen zwischen bakteriellen Virulenzfaktoren und Wirtsabwehrmechanismen genutzt (Sifri et al., 2005; Tan et al., 1999a). In der vorliegenden Arbeit wurde in Anlehnung an das beschriebene Modell die Pathogenität unterschiedlicher Staphylokokken-Stämme im Pathogenitätsmodell *C. elegans* getestet. Gegenstand dieser Arbeit war die Erforschung der

Bedeutung verschiedener Virulenzfaktoren von *S. epidermidis* und *S. aureus* anhand eines optimierten *C. elegans*-Staphylokokken-Pathogenitätsmodells. Zusammenfassend sollte untersucht werden, ob es sich bei dem *C. elegans*-Pathogenitätsmodell um ein Basismodell zur Erforschung der charakteristischen Virulenzfaktoren von *S. epidermidis* und *S. aureus* handelt. Es wurden bereits identifizierte humanpathogene Virulenzfaktoren von *S. epidermidis* getestet. Dabei wurden insbesondere die Wildtypstämme *S. epidermidis* 1457, 1057 und 9142 im Vergleich mit den Transposonmutanten *S. epidermidis* 1457-M10, 1057-M10, 9142-M10 und den Deletionsmutanten *sigB*, *rsbUVW* und *agr* klinisch getestet. Sie charakterisieren sich durch unterschiedlich ausgeprägte Biofilmsynthese, Expression von Proteasen, Lipasen und δ -Toxin. Des Weiteren sollten klinische *S. aureus*-Isolate mit erhöhter Expression spezieller Virulenzfaktoren (PIA-überproduzierend, PVL-positiv) im *C. elegans*-Pathogenitätsmodell untersucht werden und auch mit ihnen erforscht werden, ob durch diese Faktoren eine erhöhte Sterbekinetik von *C. elegans* detektiert werden kann. Voraussetzung für diese Versuchsreihen war die Annahme, dass die wichtigen offensiven als auch defensiven funktionellen Aspekte der Pathogenese durch Staphylokokken in Säugern, Vertebraten und Invertebraten äquivalent seien, wie von F. Ausubel anhand des *C. elegans*-*P. aeruginosa* Modells für *Pseudomonas aeruginosa* und *C. elegans* postuliert worden war. Dadurch kann mit *C. elegans* ein Modell genutzt werden, welches genetisch gut erforscht ist. Es bestehe so die Möglichkeit auf genetischer Ebene die Interaktionen zwischen Virulenzfaktoren des Pathogens und wirtseigenen Abwehrmechanismen zu erforschen (Tan et al., 1999a). In den vorliegenden Versuchsreihen wurde die Methode des „slow-killing“ gewählt, welche sich über mehrere Tage hinzieht und sich durch einen anderen Mechanismus, als die des „fast-killing“ auszeichnet. Es handelt sich hierbei um einen einer Infektion ähnelnden Prozess, der mit einer Ansammlung von proliferierenden Bakterien im Darmtrakt des Nematoden einhergeht (Tan et al., 1999b).

Vor dem eigentlichen Beginn der Versuchsreihen erfolgte eine Optimierung, der zur Durchführung der Arbeit benötigten Methode. Die in dieser Arbeit genutzten Nährmedien TSB-BBL, Columbia-Blutagar und LB Medium zur Kultivierung der Bakterien entsprechen den Standardkulturbedingungen und sind auch in den Versuchsreihen von C. D. Sifri und D. A. Garsin genutzt worden. In dieser Arbeit wurde explizit auf eine Kultivierung von *E. coli* OP 50, der Nahrungsquelle für *C. elegans*, auf BHI (Brain Heart Infusion) verzichtet. Es war in den Versuchsreihen von D.A. Garsin eine signifikant erhöhte Sterblichkeit von *C. elegans* durch Inokulation von auf BHI kultivierten *E. coli* beobachtet worden. Vielleicht wird durch das reichhaltige BHI Medium eine Expression von Virulenzfaktoren induziert, die für *C. elegans* letal sind (Garsin et al., 2001; Sifri et al., 2003). Die Kultivierung und

Kulturerhaltung von *C. elegans* erfolgte nach den üblichen Standardbedingungen auf NGM-Agar bei ca. 20°C (Brenner, 1974; Lewis und Fleming 1995). Zur Manipulation einzelner *C. elegans* wurde in dieser Arbeit eine spezielle Methode entwickelt. Mit Hilfe einer an einer Pipettenspitze befestigten Augenwimper konnten die Nematoden unter dem Mikroskop mobilisiert und transportiert werden. Dabei war das somit geringe Verletzungsrisiko des Nematoden von besonderem Vorteil. Nach den beschriebenen Methoden wurden die ersten Versuchsreihen durchgeführt. Dabei traten erste Schwierigkeiten auf. Es wurde nach dem Übersetzen von *C. elegans* auf die zu testenden grampositiven Bakterienrasen eine Überwucherung durch den gramnegativen *E. coli* beobachtet. Die daraufhin erfolgte Neutralisierung des Effektes der Generationszeiten von grampositiven und gramnegativen Bakterien durch frühzeitige Kultivierung der grampositiven Bakterien und auch ein Spülen der *C. elegans* führten nicht zum gewünschten Erfolg. Danach wurde die *E. coli* OP 50 Suspension vor dem Überimpfen erhitzt. Da aber dadurch das adäquate Wachstum von *C. elegans* eingeschränkt wurde, konnte diese Methode auch nicht genutzt werden. Der letzte Ansatz beruhte auf der Nutzung selektiv gramnegativer Antibiotika, ohne Beeinflussung der Entwicklung von *C. elegans*. Nach Testung von Aztreonam, Gentamicin und Polymyxin B an *E. coli* und *C. elegans* konnte die optimale Methode etabliert werden. Die Wurmeier von *C. elegans* wurden auf einem mit Gentamicin angereicherten NGM-Agar kultiviert und die Sterbekinetik von *C. elegans* auf einer mit Aztreonam angereicherten TSB-Agarplatten bestimmt. In den Versuchsreihen von C. D. Sifri und D. A. Garsin waren ebenfalls Antibiotika (Ampicillin, Erythromycin, Gentamicin, Tetracyclin und Polymyxin B) zur selektiven Wachstumssuppression genutzt worden (Garsin et al., 2001; Sifri et al., 2003).

Die ersten Versuchsreihen dienten der Beobachtung der Sterbekinetik von *C. elegans* bei Ingestion von *E. coli* OP 50 im Vergleich mit derjenigen bei Ingestion der drei *S. epidermidis*-Stämme 1457, 1057 und 9142. Bei allen drei *S. epidermidis*-Stämmen zeigte sich eine statistisch signifikant erhöhte Sterberate. In der Arbeit von J. Begun (2007) war das pathogene Potential von *S. epidermidis* 9142 auf *C. elegans* getestet worden, die Kontrollgruppe war dabei mit *Bacillus subtilis* erfolgt. Es zeigte sich hier ebenfalls eine signifikant erhöhte Sterberate von *C. elegans*. Anhand von *C. elegans*-Versuchsreihen mit Nahrungszufuhr von durch Erhitzen getötete *S. epidermidis* 9142 konnte demonstriert werden, dass die erhöhte *C. elegans*-Sterbekinetik durch lebende Bakterien impliziert ist. Es handelt sich also bei erhitzten *S. epidermidis* 9142 nicht einfach um eine an Nährstoffen ärmere Nahrungsquelle als *E. coli* OP 50. Mikroskopisch konnte J. Begun die Akkumulation von *S. epidermidis* im Intestinaltrakt des Nematoden beobachten. Nach weiteren Versuchen wurde dann postuliert,

dass es sich um einen Infektionsprozess von *C. elegans* durch *S. epidermidis* 9142 handelt (Begun et al., 2007). Bemerkenswert ist in der vorliegenden Arbeit, dass bei dem stark biofilmpositiven *S. epidermidis* 1457 als erster der Stämme nach 2 Tagen eine signifikant erhöhte Sterberate beobachtet wurde. Möglicherweise ist unter anderem die erhöhte Biofilmproduktion neben den anderen Virulenzfaktoren ein Grund für diese Tatsache. Zur weiteren Überprüfung dieser Hypothese und der Erforschung der intervenierenden Virulenzfaktoren erfolgten weitere Versuchsreihen. Einen Überblick der besonderen Charakteristika der ausgewählten *S. epidermidis*-Stämme gibt die Tabelle 3.2-1.

Tabelle 3.2-1: Charakteristika der getesteten *S. epidermidis*-Stämme bezüglich Biofilmbildung und Virulenzfaktoren (Proteasen, Lipasen, Toxinbildung).

<i>S. epidermidis</i>	Biofilm	Proteasen, Lipasen	δ-Toxin
Wildtyp	+ / +++	+	+
M10 (Δ <i>icaA</i>)	Ø	+	+
Δ <i>sigB</i>	Ø / +	++	++
Δ <i>rsbUVW</i>	+++	Ø / +	Ø / +
Δ <i>agr</i>	++	Ø	Ø
Δ <i>sigB/agr</i>	Ø / +	Ø	Ø
Δ <i>rsbUVW/agr</i>	+++	Ø	Ø

Zum besseren Verständnis der Bedeutung des PIA in der Pathogenität von *S. epidermidis* für *C. elegans* wurden Versuchsreihen mit den *icaADBC* inaktivierten Transposonmutanten *S. epidermidis* 1457-M10, 1057-M10 und 9142-M10 im Vergleich mit dem jeweiligen *S. epidermidis* Wildtypen durchgeführt. Diese M10 Transposonmutanten sind das Ergebnis einer Transposoninsertion Tn917 in den *icaA* Genlokus. Dadurch kann keine PIA-Synthese mehr erfolgen und es besteht eine Biofilmdefizienz. Sie sind daher nicht mehr in der Lage größere Zellaggregate zu bilden oder einen Biofilm zu akkumulieren. Erstaunlicherweise zeigte sich nur bei der Transposonmutante *S. epidermidis* 9142-M10 eine statistisch geringere Sterberate von *C. elegans*, während die der Transposonmutanten 1457-M10 und 1057-M10 sich nicht signifikant von der der Wildtypstämme unterschied. Diese signifikant verminderte Sterberate mit *S. epidermidis* 9142-M10 zeigt sich ebenfalls in den Versuchsreihen von J. Begun und C. D. Sifri (2007). Interessanterweise sind sämtliche Versuchsreihen dieser Arbeit mit diesem einen Bakterienstamm durchgeführt worden. Da sich *S. epidermidis* zwar durch

seine Biofilmsynthese auszeichnet, aber auch über weitere Virulenzfaktoren verfügt, erfolgten weitere Versuchsreihen.

Der erste Ansatz in der Erforschung der Regulation von Virulenzfaktoren und deren Einfluß auf die Sterbekinetik wurde anhand des Sigmafaktors σ^B getestet. Der alternative Sigmafaktor σ^B kontrolliert die Transkription von mehr als 100 Genen, die situationsabhängig exprimiert werden, wenn die Zelle exogenen Stressfaktoren (z. B. Ethanol, NaCl) ausgesetzt wird. Diese Genprodukte werden daher auch als „general stress proteins“ und „heat specific stress proteins“ bezeichnet und spielen daher eine wesentliche Rolle in der Virulenz dieser Bakterienstämme. Wie bereits erwähnt, besteht das *sigB*-Operon bei *S. epidermidis* aus 4 identifizierten Genen: *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* und *sigB* (Knobloch et al., 2001; Vuong et al., 1996). Getestet wurden *S. epidermidis* Wildtypstämme 1457 und 1057 im Vergleich mit den Deletionsmutanten *1457sigB*, *1057sigB* mit verminderter Biofilmsynthese, aber erhöhter Expression von Virulenzfaktoren und mit den stark biofilmpositiven Stämmen *1457rsbUVW* und *1057rsbUVW* bei verminderter Virulenzfaktorsynthese (Tabelle 3.2-1). Dabei ließ sich keine statistisch signifikant verminderte Sterbekinetik der mit Deletionsmutanten ernährten *C. elegans* beobachten, weder bezüglich der Biofilmsynthese (*rsbUVW*>WT>*sigB*), noch bezüglich der Virulenzfaktorsynthese (*sigB*>WT>*rsbUVW*). Diese Ergebnisse standen im Einklang mit den bereits bekannten Säugetierversuchen von M. J. Horsburgh (2002). Hier war in einem Mausmodell die Regulation der Virulenzfaktoren durch *sigB* von *S. aureus* in subkutanen Abszessen erforscht worden (Horsburgh et al., 2002). Die ersten Versuche *in vivo* anhand eines *S. aureus*-*C. elegans* Pathogenitätsmodell zur Demonstration der regulatorischen Funktion von *sigB* auf die Virulenzfaktoren wurden von C.D. Sifri (2003) durchgeführt. Er beobachtete dabei eine nur geringfügig erhöhte Sterbekinetik von *C. elegans* mit den *S. aureus*-Wildtypstämmen im Vergleich zu den genetisch verwandten *sigB*-Deletionsmutanten (Sifri et al., 2003). Es stellt sich daher die Frage in wie weit, die durch *sigB* regulierten humanpathogenen Virulenzfaktoren und Biofilmsynthese von *S. epidermidis* in der Pathogenese von *C. elegans* eine Rolle spielen. Da die *rsbUVW*-Deletionsmutante die höchste Biofilmsynthese, aber die geringste Virulenzfaktorproduktion aufweist und sich die *sigB*-Deletionsmutante (durch positive *agr* Regulation) reziprok proportional verhält, wurden weitere Versuche durchgeführt. Das *agr*-System moduliert durch die Regulation diverser Staphylokokken-Virulenzfaktoren das Quorum Sensing der Bakteriengemeinschaft. Die *agr*-Deletionsmutante ist durch eine stark verminderte Expression von Virulenzfaktoren aber auch vermehrte Synthese von Adhäsionsfaktoren charakterisiert. In den Versuchsreihen Wildtyp *S. epidermidis* 1457 und 1057 versus Deletionsmutante *S. epidermidis* *1457agr* und *1057agr* zeigten sich keine statistisch

signifikanten Veränderungen in der Sterblichkeit von *C. elegans*. Interessant ist hier der Bezug auf die Ergebnisse von D.A. Garsin und C.D. Sifri (Garsin et al., 2001; Sifri et al., 2002). Hier wurden anhand des *C. elegans-Enterococcus faecalis* Pathogenitätsmodell und den *Enterococcus faecalis fsr* Deletionsmutanten signifikante Differenzen in der Mortalität von *C. elegans* beschrieben. Der *fsr* Lokus von *E. faecalis*, ist durch viele Ähnlichkeiten mit dem *agr* Lokus von *S. aureus* und auch *S. epidermidis* charakterisiert. Er setzt sich aus drei regulatorischen Genen zusammen: *fsrA*, *fsrB* und *fsrC*. Es bestehen Sequenzhomologien zwischen *fsrA*, *fsrC* und *agrA*, *agrC*. Auch auf funktioneller Ebene bilden FsrA und FsrC eine Einheit, in der FsrC das Sensorprotein und FsrA die Antwortregulation übernimmt. Des Weiteren bestehen Homologien zwischen FsrB und AgrB. Postuliert wurde hier eine Implikation des Quorum Sensing in der Mortalität von *C. elegans* durch Inokulation von *E. faecalis*. Ein weiteres Beispiel des gleichen Autors, ist die Implikation des Quorum Sensing von *Pseudomonas aeruginosa* in die Sterblichkeit ebenfalls von *C. elegans*. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nun trotz genetischen und funktionellen Homologien zwischen dem *fsr* und *agr* Lokus von *E. faecalis* und *S. epidermidis* keine statistisch signifikant erhöhte Mortalität von *C. elegans* in den Versuchsreihen Wiltyp *S. epidermidis* 1457 und 1057 versus Deletionsmutane *S. epidermidis* 1457*agr* und 1057*agr*. Nahe liegend ist hier die Annahme, dass die Expression der humanpathogenen Adhärenzfaktoren von *S. epidermidis* nicht in demselben Ausmaß pathogen für den Nematoden *C. elegans* sind und somit keine statistisch signifikante Mortalität beobachtet werden kann (Garsin et al., 2001; Tan et al., 1999b; Sifri et al., 2002).

In der letzten Versuchsreihe bezüglich *S. epidermidis* wurde nun getestet, ob die kombinierte Deletion von *sigBagr* und *rsbUVWagr* in *S. epidermidis* 1457 und 1057 im Vergleich mit den Wildtypstämmen eine signifikante Differenz der Sterbekinetik aufweist. Diese Deletionsmutanten weisen eine stark verminderte Expression von Virulenzfaktoren auf und durch Deletion des *agr*-Operons wird ebenfalls die negative Regulierung der Biofilmproduktion inhibiert. Auch in diesem Versuch konnte keine signifikante Differenz in der Sterbekinetik von *C. elegans* beobachtet werden.

In der Versuchskonstellation *E. coli* OP 50 versus diverse klinische *S. aureus*-Stämme konnte nach 24h-48h eine statistisch signifikant erhöhte Sterbekinetik von *C. elegans* mit den klinischen *S. aureus* Isolaten CF 2, CF 146 und ATCC 49775 beobachtet werden. Interessanterweise induzierten nicht alle *S. aureus* Isolate eine signifikant erhöhte Sterberate von *C. elegans*. Die Stämme CF 230, CA 10 und 32 hatten lediglich eine nicht signifikante, aber doch leicht erhöhte Sterberate von *C. elegans* provoziert. In den Versuchsreihen von C.D.

Sifri mit 23 unabhängigen klinischen *S. aureus* Isolaten waren durch die Mehrheit (70 %) der Bakterien mehr als 70 % der Nematoden innerhalb von 5 Tagen verstorben. Diese hohe Sterberate war in dieser Arbeit nicht reproduzierbar. Die Sterbekinetik von *C. elegans* in der Versuchsreihe dieser Arbeit war nur über einen Zeitraum von 2 Tagen untersucht worden. Im Falle des *C. elegans*-*S. aureus* Modells hatte sich gezeigt, dass adulte Nematoden höhere Sterberaten erreichten als die L4-Stadien, dass die Nematoden etwas länger auf BHI als auf TS-Agar überlebten und keine erhöhte Sterbekinetik von *C. elegans* bei durch Hitze oder Antibiotika abgetötete *S. aureus* zu beobachten gewesen war. Die vorliegende Arbeit war mit Nematoden im Stadium L4 durchgeführt worden, da adulte Würmer relativ schnell Eier legen. Die Tatsache, dass besonders die klinischen Lungenisolate CF 2, CF 146 eine erhöhte Wurmsterblichkeit induzieren, könnte sich durch die vergleichsweise hohe Produktion von PIA als Adhärenzfaktor erklären, da diese beiden klinischen Isolate PIA überproduzierend sind. Der Einfluß anderer Virulenzfaktoren lässt sich anhand der erfolgten Versuchsreihen schwer quantifizieren und qualifizieren, z. B. die gezielte Analyse der Virulenz vom PVL. Die Hypothese, dass eine erhöhte Biofilmbildung durch *S. aureus* eine erhöhte Nematodizität zur Folge hat, wird auch von den Versuchsreihen von J. Begun (2007) anhand der *in vitro* PIA überproduzierenden *S. aureus*-Stämme MN8m vs. MN8 gestützt (Begun et al., 2007). Aber auch eine variable Expression von Virulenzfaktoren in den verschiedenen *S. aureus*-Stämmen könnte Grund dieser nicht einheitlich erhöhten Sterbekinetik sein.

In fast allen diesen Versuchen mit *S. epidermidis*-Deletionsmutanten konnte somit demonstriert werden, dass eine erhöhte Biofilmbildung von *S. epidermidis* keine erhöhte Pathogenität von *C. elegans* zur Folge hat und somit keinen generellen Virulenzfaktor für *C. elegans* darstellt. Ausnahme war der Bakterienstamm *S. epidermidis* 9147. Auch in den übrigen Versuchsreihen mit *S. epidermidis*-Mutanten mit verschieden ausgeprägter Expression von Biofilm, Proteasen, Lipasen und Toxinen, waren keine signifikanten Änderungen in der Sterbekinetik von *C. elegans* zu beobachten gewesen. Vermutlich sind die humanpathogenen Virulenzfaktoren von *S. epidermidis* nicht in der gleichen Weise für *C. elegans* pathogen. Möglicherweise gibt es spezielle Virulenzfaktoren, die gegen *C. elegans* gerichtet sind, oder bestimmte Stoffwechselprodukte von *S. epidermidis*, die nicht von *E. coli* OP 50 exprimiert werden, und die zu einer erhöhten Sterblichkeit von *C. elegans* führen. In dieser Arbeit ist die Akkumulation von *S. epidermidis* im Intestinaltrakt von *C. elegans* nicht mikroskopisch untersucht worden. Aber es wird von einer Bakterienansammlung im Nematodenintestinaltrakt ausgegangen, wie sie von J. Begun beschrieben worden war (Begun et al., 2007). Dabei ist aber anzumerken, dass eine Bakterienansammlung im Nematoden zwar mit einer erhöhten Sterbekinetik korreliert,

aber nicht ausreichend ist. Aerob kultivierte Stämme von *E. faecium* z. B. akkumulieren im Verdauungstrakt von *C. elegans*, aber provozieren dadurch kein signifikant erhöhtes Wurmsterben (Garsin et al., 2001). Es ist kein von *C. elegans* oral aufgenommenes Pathogen beobachtet worden, welches die intestinalen Zellen penetriert und eine generalisierte Infektion hervorgerufen habe. Diese Tatsache lässt eine hohe zelluläre intestinale Immunkompetenz gegenüber mikrobiologischer Invasion vermuten. Trotz multipler Ansätze in der Erforschung der antimikrobiellen Immunabwehr bestehen weiterhin Fragen bezüglich der speziellen Abwehr von bakteriellen Mikroorganismen. In den Versuchsreihen mit *S. aureus* zeigte sich, dass die PIA überproduzierenden *S. aureus*-Stämme tatsächlich auch eine erhöhte Virulenz für *C. elegans* darstellen, während die übrigen Virulenzfaktoren der untersuchten *S. aureus*-Stämme in dieser Versuchskonstellation nicht weiter analysiert werden können.

Aus dieser Arbeit ergeben sich neue Aspekte zur Beurteilung des *C. elegans*-Modells. Das *C. elegans*-Staphylokokken-Modell erscheint zur Erforschung der Bedeutung von Virulenzfaktoren von Staphylokokken suboptimal. Wie die Versuchsergebnisse zeigen, müssen weitere Ansätze zur Erforschung von Pathogenität und Virulenz von *S. epidermidis* und *S. aureus* geprüft werden, um ein weiterführendes Verständnis dieser hochkomplexen Vorgänge zu erlangen.

5 Zusammenfassung

Nicht nur in Regionen mit unzulänglicher Hygiene und mangelhafter medizinischer Versorgung, sondern auch in den Breitengraden der hoch entwickelten Medizin stellen bakterielle Infektionen einen hohen Anteil an Morbidität und Mortalität dar. Das wissenschaftliche Modellsystem *C. elegans* zur Analyse der Interaktionen zwischen bakteriellen Virulenzfaktoren und Wirtsabwehrmechanismen, gering an Kosten und Aufwand, übertragbar auf den Säugetierwirt ist daher von großem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand des „slow-killing“ *C. elegans*-*Staphylococcus*-Modells erforscht, inwiefern es sich zur Untersuchung von charakteristischen humanpathogenen Virulenzfaktoren von Staphylokokken eignen würde. Gegenstand dieser Arbeit war die Erforschung der Bedeutung verschiedener Virulenzfaktoren von *S. epidermidis* und *S. aureus* anhand eines optimierten *C. elegans*-Staphylokokken-Pathogenitätsmodells. Zunächst erfolgte die Optimierung des bereits bestehenden *C. elegans*-Bakterienmodells, da sich Schwierigkeiten in der Kultivierung und Kulturerhaltung zeigten. Im neu etablierten Modellsystem wurde die Sterbekinetik von *C. elegans* anhand der *S. epidermidis* Wildtypstämme 1057, 1457, 9142, deren Transposonmutanten M10 und den *S. epidermidis* 1057- und 1457-Deletionsmutanten (*sigB*, *rsbUVW*, *agr*) untersucht. Somit wurden die charakteristischen Virulenzfaktoren (Biofilm, Protasen, Lipasen und Toxine) von *S. epidermidis* in unterschiedlich ausgeprägter Expression im *C. elegans*-Modell untersucht. Hier zeigte sich interessanterweise nur bei *S. epidermidis* 9142-M10 eine statistisch signifikante geringere Sterberate von *C. elegans*. In sämtlichen anderen Versuchsreihen mit *S. epidermidis*-Deletionsmutanten *sigB*, *rsbUVW*, *agr* und somit extremer Variabilität von Biofilmproduktion und Virulenzfaktorsynthese konnte keine statistisch signifikante Änderung der Sterbekinetik von *C. elegans* nachgewiesen werden. Des Weiteren erfolgten Versuchsreihen mit klinischen *S. aureus*-Isolaten (PIA-überproduzierend, PVL positiv). Eine erhöhte Sterberate von *C. elegans* war bei den PIA-überproduzierenden Stämmen CF 2, CF 146 und dem Stamm ATCC49775 zu detektieren. Die Resultate dieser Arbeit suggerieren, dass die humanpathogenen Virulenzfaktoren von *S. epidermidis* kein vergleichbares pathogenes Potential für *C. elegans* darstellen. Interessanterweise wurde aber eine erhöhte Virulenz der PIA überproduzierenden *S. aureus*-Stämme beobachtet. Weitere Virulenzfaktoren von *S. aureus* (z. B. PVL) lassen sich in dieser Versuchskonstellation schwer analysieren. Das *C. elegans*-Staphylokokken-Modell erscheint daher zur Erforschung der Bedeutung von Virulenzfaktoren von Staphylokokken suboptimal. Weitere Ansätze zur Erforschung von Pathogenität und Virulenz von *S. epidermidis* und *S. aureus* sind somit für ein weiterführendes Verständnis dieser hochkomplexen Vorgänge notwendig.

6 Literaturverzeichnis

- Alegado, R. A., M. C. Campbell, W. C. Chen, S. S. Slutz and M.-W. Tan.** 2003. Characterization of mediators of microbial virulence and innate immunity using the *Caenorhabditis elegans* host-pathogen model. *Cellular Microbiology*. 5: 435-444.
- Arvidson, S. and K. Tegmark.** 2001. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 291: 159-170.
- Ausubel, F. M.** 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*. 268: 1899-1902.
- Barber, M.** 1947. Staphylococcal infections due to penicillin resistant strains. *British Medical Journal*. 2: 863-865.
- Barber, M.** 1961. Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol*. 14: 385-393.
- Bayer, M. G., J. H. Heinrichs and A. L. Cheung.** 1996. The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 178: 4563-4570.
- Bayston R. and S. R. Penny.** 1972. Excessive production of mucoid substance in staphylococcus SIIA: a possible factor in colonisation of Holter shunts. *Dev Med Child Neurol Suppl*. 27:25-8.
- Begun, J., Gaian, J. M., Rohde, H., Mack, D., Calderwood, S. B., Ausubel F. M. and C. D. Sifri.** 2007. Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defense. *PLoS Pathog*. 3(4): e57: 0526-2540.
- Bergdoll, M. S.** 1983. Enterotoxins. 559-598. In *Staphylococci and Staphylococcal Infections*. Easman, C.S.F. and C. Adlam (eds.). Academic Press, London, UK.
- Blevins, J. S., Gillaspay, A. F., Rehtin, T. M., Hurlburt, B. K. and M. S. Smeltzer.** 1999. The Staphylococcal accessory regulator (*sar*) represses transcription of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesin gene (*cna*) in an *agr*-independent manner. *Mol Microbiol*. 33: 317-326.
- Boyce, J. M.** 1997. Epidemiology and Prevention of Nosocomial Infections. 309-323. In *The staphylococci in human disease*. Crossley, K. B. and G. L. Archer (eds). New York: Churchill Livingston.
- Brenner, S.** 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77: 71-94.
- Cheung, A. L., K. J. Eberhardt, E. Cheung, M. R. Yeaman, P. M. Sullam, M. Ramos and A. S. Bayer.** 1994. Diminished virulence of a *sar*-/*agr*-mutant of *Staphylococcus aureus* in a rabbit model of endocarditis. *J Clin Invest*. 94: 1815-1822.
- Cheung, A. L., J. M. Koomey, C. A. Butler, S. J. Projan and V. A. Fischetti.** 1992. regulation of exoprotein expression by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 6462-6466.

- Christensen, G. D., W. A. Simpson, A. L. Binso and E. H. Beachey.** 1982. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun.* 37: 318-326.
- Conlon, K.M., H. Humphreys and J. P. O'Gara.** 2002. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol.* 184: 4400-4408.
- Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey and T. I. Ladd.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann Rev Microbiol.* 41: 435-464.
- Cramton, S. E., M. Ulrich, F. Götz and G. Doring.** 2001. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 69: 4079-4085.
- Deighton, M. and R. Borland.** 1993. Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun.* 61: 4473-4479.
- Dufour, A. and W. G. Haldenwang.** 1994. Interactions between a *Bacillus subtilis* anti- σ -factor (*RsbW*) and its antagonist (*RsbV*). *J. Bacteriol.* 176:1813-1820.
- Espersen, F., B. J. Wilkinson, B. Gahrn-Hansen, V. Thamdrup Rosdahl and I. Clemmensen.** 1990. Attachment of staphylococci to silicone catheters in vitro. *APMIS* 98(5): 471-478.
- Fey, P. D., J. S. Ulphani, F. Götz, C. Heilmann, D. Mack and M. E. Rupp.** 1999. Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.* 179: 1561-1564.
- Finlay, B. B.** 1999. Bacterial disease in diverse hosts. *Cell.* 96: 315-318.
- Finlay, B. B. and S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61(2): 136-169.
- Fleer, A. and J. Verhoef.** 1989. An evaluation of surface hydrophobicity and extracellular slime in the pathogenesis of foreign-body-related infections due to coagulase-negative staphylococci. *J Invest Sur.* 2: 391-396.
- Franson, T. R., N. K. Sheth, H. D. Rose and P. G. Sohnle.** 1984. Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters. *J Clin Microbiol.* 20: 500-505.
- 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.
- Garrity, G. M., D. R. Boone and R. W. Castenholz.** 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore (edt.). Vol 1, 2nd Edition.
- Garsin, D. A., C. D. Sifri, E. Mylonakis, X. Qin, K. V. Singh, B. E. Murray, S. B. Calderwood and F. M. Ausubel.** 2001. A simple model host for identifying gram-positive virulence factors. *Proc Nat Acad Sci USA.* 98:10892-10897.

Gerke, C., A. Kraft, R. Süßmuth, O. Schweitzer and F. Götz. 1998. Characterization of the Nacetyl-glucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem.* 273: 18586-18593.

Giachino, P., S. Engelmann and M. Bischoff. 2001. σ^B activity depends on *RsbU* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 183: 1843-1852.

Götz, F. 2002. Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol.* 43: 1367-1378.

Götz, F. and G. Peters. 2000. Colonization of Medical Devices by Coagulase-Negative Staphylococci. 55-88. In *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*. Bisno, A. L. and F. A. Waldvogel (eds). Washington DC: American Society of Microbiology.

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

Hecker, M. and U. Volker. 1998. Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the *sigB* regulon. *Mol Microbiol.* 29(5): 1129-1136.

Heilmann, C., C. Gerke, F. Pedreau-Remington and F. Götz. 1996a. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect. Immun.* 64: 277-282.

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

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

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

Helmann, J. D. and M. J. Chamberlin. 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem.* 57:839-872.

Higashi, J. M., I. W. Wang, D. M. Shlaes, J. M. Anderson and R. E. Marchant. 1998. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and transposon mutant strains to hydrophobic polyethylene. *J Biomed Mater Res.* 39: 341-350.

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

Horsburgh, M. J., J. L. Aish, I. J. White, L. Shaw, J. K. Lithgow and S. J. Foster. 2002. *SigB* modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a

functional *rsbU* strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Bacteriol.* 184: 5457-5467.

Humphreys H, C. T. Keane and R. Hone. 1989. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolates from cases of septicaemia and from healthy carriers. *J Med Microbiol.* (England), 28(3): 163-72.

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.

Janzon, L. and S. Arvidson. 1990. The role of the delta-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Biology of the Staphylococci. Embo J.* 9(5): 1391-1399.

Jarvis, W. R. and W. J. Martone. 1992. Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother.* 29 Suppl A: 19-24.

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

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

Kayser, F. H., K. A. Bienz, J. Eckert Johannes und R. M. Zinkernagel. 1998. Bakterien als Krankheitserreger. 221-350. *In Medizinische Mikrobiologie.* Stuttgart, New York (eds.): Georg Thieme Verlag.

Kiel, K. 2002. Einfluss des Phosphoenolpyruvat: Zucker Phosphotransferase Systems auf die Expression des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins von mukoiden *Staphylococcus epidermidis*. Dissertation, Universität Hamburg.

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

Kloos, W. E. 1997. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. Crossley, 113-137. *In* The staphylococci in human disease. K. B. and G. L. Archer (ed.). New York, Churchill Livingstone.

Kloos, W. E. and T. L. Bannerman. 1994. Update on Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 7(1): 117-40.

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.

Knobloch, J. K. M., S. Jäger, M. A. Horstkotte, H. Rohde, S. Dobinsky, and D. Mack. 2004. RsbU dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor σ_B by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infect Immun.* 72: 3838-3848.

Knobloch, J. K. M., M. Nedelmann, K. Kiel, K. Bartscht, M. A. Horstkotte, S. Dobinsky, H. Rohde and D. Mack. 2003. Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: characterization of biofilmnegative and nonmucoid mutants. *Appl Environ Microbiol.* 69(10): 5812-5818.

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

Kothe, M., Antl M., Huber, B., Stoecker, K., Ebrecht, D., I. Steinmetz and L. Eberl. 2003. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the *cep* quorum-sensing system. *Cell. Microbiol.* 5: 343-351.

Kramer, J. M. 1997. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 471-500.

Kresken, M., D. Hafner, F.-J. Schmitz and T. A. Wichelhaus. 2007. PEG-Resistenzstudie. Empfindlichkeitsprüfungen und Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2007: 1-84.

Krokotsch, A. 1998. Reinigung und Charakterisierung eines für biofilmbildene *Staphylococcus epidermidis*-Stämme spezifischen Polysaccharids. Dissertation im Fachbereich Medizin, Universität Hamburg.

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

Kullik, I., P. Giachino and T. Fuchs. 1998. Deletion of the alternative *sigB* in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J Bacteriol.* 180: 4814-4820.

Lewis, J. A. and J. T. Fleming. 1995. Basic culture methods. 4-29. In *Caenorhabditis elegans*: modern biological analysis of an organism. H.F. Epstein and D. C. Shakes (edt.). Academic Press, San Diego, Calif.

Linde, H., F. Wagenlehner, B. Strommenger, I. Drubel, J. Tanzer, U. Reischl, U. Raab, C. Höller, K. G. Naber, W. Witte, F. Hanses, B. Salzberger and N. Lehn. 2005. Healthcare-associated outbreaks and community-acquired infections due to MRSA carrying the Panton-Valentine leucocidin gene in southeastern Germany. *Euro J Clin Microbiol Inf Dis.* 24(6): 419-22.

Ludwicka, A., B. Jansen, T. Wadstrom and G. Pulverer. 1984. Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg. [A]* 256(4): 479-489.

Mack, D., K. Bartscht, S. Dobinsky, M. A. Horstkotte, K. Kiel, J. K. M. Knobloch and P. Schäfer. 2000a. Staphylococcal factors involved in adhesion and biofilm formation on biomaterials. 307-330. In Handbook for studying bacterial adhesion: Principles, methods and applications. An, Y. H., R. J. Friedman, R. J. And N. J. Totowa (eds). Humana Press.

Mack, D., W. Fischer, Krokotsch, and K. Leopold. 1996a. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear $\beta(1-6)$ -linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol.* 178: 175-183.

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

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

Mack, D., 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.

Mack, D., H. Rohde, S. Dobinsky, J. Riedewald, M. Nedelmann, J. K. M. Knobloch, H. A. Elsner and H. H. Feucht. 2000b. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun.* 68: 3799-3807.

Mack, D., A. Sabottke, S. Dobinsky, H. Rohde, M. A. Horstkotte and J. K. M. Knobloch. 2002. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative *Staphylococcus epidermidis* transposon mutant classes. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 178-183.

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.

Mahajan-Miklos, S., L. G. Rahme und F. M. Ausubel. 2000. Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Mol Microbiol.* 37: 981-988.

Mahajan-Miklos, S., M.-W. Tan, L. G. Rahme und F. M. Ausubel. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell.* 96: 47-56.

Manna, A.C., M. G. Bayer and A. L. Cheung. 1998. Transcriptional analysis of different promoters in the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 180: 3828-3836.

McKenney, D., J. Hubner, E. Muller, Y. Wang, D. A. Goldmann and G. B. 1993. Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. *Infect Immun.* 61(2): 551-558.

Miyazaki, E., J. M. Chen, C. Ko and W. Bishai. 1999. The *Staphylococcus aureus* *rsbW* (*orf159*) gene encodes an anti-sigma factor of σ^B . *J Bacteriol.* 181: 2846-2851.

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

- Muller, E., J. Hübner, N. Gutierrez, S. Takeda, D. Goldman and G. B. Pier.** 1993a. Isolation and characterization of transposon mutants deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. *Infect Immun.* 61: 551-558.
- Muller, E., S. Takeda, H. Shiro, D. Goldman and G. B. Pier.** 1993b. Occurrence of polysaccharide/adhesin among clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis.* 168: 1211-1218.
- Mylonakis, E., F. M. Ausubel, J. R. Perfect, J. Heitman and S. B. Calderwood.** 2002. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 15675-15680.
- Nedelmann, M., A. Sabottke, R. Laufs and D. Mack.** 1998. Generalized transduction for genetic linkage analysis and transfer of transposon insertions in different *Staphylococcus epidermidis* strains. *Zentralbl Bakteriologie.* 287: 85-92.
- Nilsson, M., L. Frykberg, J. I. Flock, L. Pei, M. Lindberg and B. Guss.** 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 66: 2666-2673.
- North E. A. and R. Christie.** 1946. Acquired resistance of staphylococci to the action of penicillin. *Med J Australia.* 1: 176-179.
- Nobel, W. C.** 1997. Staphylococci carriage and skin and soft tissue infection. 401-412. *In The staphylococci in human disease.* Crossley, K. B. and G. L. Archer (eds.). New York: Churchill Livingstone.
- Nobel, W. C. and J. Naidoo.** 1986. Coagulase-negative staphylococci as skin commensals. *J Med Microbiol.* 22: 287.
- Novick, R. P.** 2000. Pathogenicity factors and their regulation, 392-407. *In Gram-positive pathogens.* V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy and J. A. Rood (ed.). ASM Press, Washington, D.C.
- Novick, R. P., H. F. Ross, S. J. Projan, J. Kornblum, B. Kreiswirth and S. Moghazeh.** 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 12: 3967-3975.
- O'Quinn, A.L., E. M. Wiegand and J.A. Jeddloh.** 2001. *Burkholderia pseudomallei* kills the nematode *Caenorhabditis elegans* using an endotoxin-mediated paralysis. *Cell Microbiol.* 3: 381-393.
- Otto, M., R. Sussmuth, G. Jung and F. Götz.** 1998. Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis agr* system. *FEBS Lett.* 424: 89-94.
- Pascual, A., A. Fleer, N. A. Westerdaal and J. Verhoef.** 1986. Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to Teflon catheters in vitro. *Eur J Clin Microbiol.* 5(5): 518-522.
- Pei, L. and J. I. Flock.** 2001. Functional study of antibodies against a fibronectin-binding protein in *Staphylococcus epidermidis* adherence to polyethylene catheters. *J Infect Dis.* 184: 52-55.

- Pei, L., M. Palma, M. Nilsson, B. Guss and J. I. Flock.** 1999. Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 67: 4525-4530.
- Peters, G., R. Locci and G. Pulverer.** 1981. Microbial colonization of prosthetic devices: Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zbl Bakt Hyg Orig B.* 173: 293-299.
- Pier, G.B.** 1998. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect Immun.* 66: 4711-4720.
- Rachid, S., K. Ohlsen, W. Witte, J. Hacker and W. Ziebuhr.** 2000. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 3357-3363.
- Rand, J. B. and M. L. Nonet.** 1997. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 611-643.
- Richards, M. J., J. R. Edwards, D. H. Culver and R. P. Gaynes.** 2000. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 21: 510-515.
- Riddle, D. L., T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess.** 1997. Introduction to *C. elegans*. In *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, S. 1-22.
- Robert Koch Institut.** 2002. Nosokomiale Infektionen. Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, RKI in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt. 8: 1-12
- Robert Koch Institut.** 2009a. Epidemiologisches Bulletin. 19/2009.
- Robert Koch Institut.** 2009b. Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA, RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten. Stand 07/09/2009.
- Rohde, H., C. Burdelski, K. Bartscht, M. Hussain, F. Buck, M. A. Horstkotte, J. K. M. 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.
- Rupp, M. E. and G. L. Archer.** 1992. Hemagglutination and adherence to plastic by *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 60: 4322-4327.
- Rupp, M. E. and G. L. Archer.** 1994. Coagulase-negative staphylococci: Pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis.* 19: 231-245.
- Sadovskaya, I., E. Vinogradov, S. Flahaut, G. Kogan and S. Jabbouri.** 2005. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun.* 73: 3007-3017.
- Schierenberg, E. and R. Cassada.** 1986. Der Nematode *Caenorhabditis elegans*-ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus unserer Zeit. *Biologie in unserer Zeit.* 1: 1-7.

Schlegel, H G. 1992. Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

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

Schumacher-Perdreau, F., H. Roterling and G. Pulverer. 1983. Cell Wall Analysis and Taxonomy of Staphylococci. *Zbl Bakt Hyg.* 256: 25-36.

Shenkman, B., E. Rubinstein, A. L. Cheung, G. E. Brill, R. Dardik, I. Tamarin, N. Savion and D. Varon. 2001. Adherence properties of *Staphylococcus aureus* under static and flow conditions: roles of *agr* and *sar* loci, platelets, and plasma ligands. *Infect Immun.* 69: 4473-4478.

Sifri, C. D., J. Begun and F. M. Ausubel. 2005. The worm has turned-microbial virulence modeled *C. elegans*. *Trends in microbiology.* 13(3): 119-27.

Sifri, C. D., J. Begun, F. M. Ausubel and S. B. Calderwood. 2003. *Caenorhabditis elegans* as a Model Host for *Staphylococcus aureus* Pathogenesis. *Infect Immun.* 71: 2208-2217.

Sifri, C. D., E. Mylonakis, K. V. Singh, X. Qin, D. A. Garsin, B. E. Murray, F. M. Ausubel and S. B. Calderwood. 2002. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* Protease Genes and the Quorum-Sensing Locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and Mice. *Infect Immun.* 70: 5647-5650.

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

Takano, M., T. Oshida, A. Yasojima, M. Yamada, C. Okagaki, M. Sugai, H. Suginaka and T. Matsushita. 2000. Modification of autolysis by synthetic peptides derived from the presumptive binding domain of *Staphylococcus aureus* autolysin. *Microbiol Immunol.* 44: 463-472.

Tan, M.-W., S. Mahajan-Miklos and F. M. Ausubel. 1999a. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 715-720.

Tan, M.-W., L. G. Rahme, J. A. Sternberg, R. G. Tompkins and F. M. Ausubel. 1999b. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 2408-2413.

The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science.* 282: 2012-2017.

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

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

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.

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.

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

Veenstra, G. J., F. Cremers, H. van Dijk and A. Fleer. 1996. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol.* 178: 537-541.

Völker, U., A. Dufour and W. G. Haldenwang. 1995a. The *Bacillus subtilis* *rsbU* gene product is necessary for RsbX-dependent regulation of *sigB*. *J Bacteriol.* 177: 114-122.

Völker, U., S. Engelmann, B. Maul, S. Riethdorf, A. Völker, R. Schmid, H. Mach and M. Hecker. 1994. Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* 140: 741-752.

Völker, U., A. Völker, B. Maul, M. Hecker, A. Dufour and W. G. Haldenwang. 1995b. Separate mechanisms activate *sigB* of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J Bacteriol.* 177: 3771-3780.

Vuong, C., C. Gerke, G. A. Somerville, E. R., Fischer and M. Otto. 2003. Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*. *JID.* 188: 706-718.

Vuong, C., F. Götz and M. Otto. 2000a. Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 68: 1048-1053.

Vuong, C., S. Kocianova, J. M. Voyich, Y. Yao, E. R. Fischer, F.R. DeLeo and M. Otto. 2004a. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem.* 279: 54881-54886.

Vuong, C., S.Kocianova, Y. Yao, A. B. Carmody and M.Otto. 2004b. Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. *J Infect Dis.* 190: 1498-1505.

Vuong, C., H. L. Saenz, F. Götz and M. Otto. 2000b. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 182: 1688-1693.

Wood, W. B. 1988. Introduction into *C. elegans* biology. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Wood, W. B. (edt.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1-16.

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

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

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

Yang, X., C. M. Kang, M. S. Brody and C. W. Price. 1996. Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Dev.* 10: 2265-2275.

Zajdel, M., Z. Wegrzynowicz, J. Jeljaszewicz and G. Pulverer. 1973. Mechanism of action of staphylocoagulase and clumping factor. *Contrib Microbiol Immunol.* 1: 364-375.

7 Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Eppendorf durchgeführt. Herrn Professor Aepfelbacher, dem Direktor des Instituts, danke ich für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte in seinem Institut und außerdem für die Arbeit in diesem vielfältigen wissenschaftlichen Umfeld.

Für die Vergabe des Themas und Betreuung bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor J. K. M. Knobloch. Insbesondere für die hilfreichen, beratenden und motivierenden Gespräche bin ich außerordentlich dankbar.

Ein besonderer Dank gilt Frau G. Kroll und dem restlichen Laborpersonal für hervorragende technische Unterstützung, sowie die äußerst freundschaftliche Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre und Frau Dr. B. Kahl für die Bereitstellung der klinischen *S. aureus*-Isolate.

Ebenfalls danke ich den anderen Doktoranden aus dem Institut für ihre herzliche Aufnahme und freundliche Hilfsbereitschaft. Außerdem möchte ich mich bei allen anderen Kollegen des Instituts herzlich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die mir von allen Seiten entgegengebrachte Hilfsbereitschaft bedanken.

Schließlich bedanke ich mich noch bei all den nicht genannten, die mir bei weiteren Fragen tapfer zur Seite standen und mich tatkräftig unterstützten.

8 Abkürzungsverzeichnis

Für die im Text verwendeten Gewichts-, Volumen- und Zeiteinheiten wurden die Bezeichnungen nach dem internationalen SI System verwendet und werden im Abkürzungsverzeichnis nicht gesondert angegeben. Abkürzungen für un-supplementierte Nährmedien und deren Zusammensetzungen finden sich in 2.1.5.

AAP	<i>accumulation associated protein</i>
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
Abb.	Abbildung
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
AtIE	Autolysin E
°C	Grad Celsius
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
CA-MRSA	<i>community-acquired MRSA</i>
DNA	<i>desoxiribonucleid acid</i> (Desoxiribonukleinsäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECTA	<i>extracellular teichoic protein</i>
EtOH	Ethanol
Fbe	<i>fibinogen binding protein</i>
HA-MRSA	<i>hospital-acquired-MRSA</i>
<i>ica</i>	<i>intercellular adhesion</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
KNS	Koagulase negative Staphylokokken
L	Larve (larvae)
MAP-K	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Med.	Medizinisches
min	Minute
MRSA	Methicillin (Oxacillin)-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin (Oxacillin)-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>

NG	<i>nematode growth</i>
NRZ	Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen
<i>Orf</i>	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
ORSA	Oxacillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
P	Promotor
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PIA	<i>polysaccharide intercellular adhesin</i> (interzelluläres Polysaccharidadhäsın)
PS/A	<i>capsular polysaccharide adhesin</i> (kapsuläres Polysaccharidadhäsın)
PVL	<i>Panton-Valentine Leukozidin</i>
RT	Reverse Transkriptase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
s	Sekunden
subsp.	Subspezies
SSPI	<i>staphylococcal surface protein</i>
Tab.	Tabelle
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Tn	Transposon
U	<i>unit</i> (enzymatische Einheit)
z. B.	zum Beispiel
σ^A	Sigmafaktor A (Protein)
σ^B	Sigmafaktor B (Protein)

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation “ **Bedeutung verschiedener Virulenzfaktoren von Staphylokokken im *Caenorhabditis elegans* Modell**“ selbständig verfasst habe.

Bei der Anfertigung wurden keine Hilfen Dritter in Anspruch genommen. Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für die Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Ich habe die Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf angefertigt.

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

.....

Anne Kuhn

Hamburg, den