

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

**Erzeugung und Charakterisierung von Biofilm bildenden
Staphylococcus-epidermidis-Transposonmutanten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Constanze Heinze
aus Reinbek

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.09.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/ die Vorsitzende:

PD Dr. H. Rohde

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prof. Dr. P.-M. Kaulfers

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:

Prof. Dr. D. Singer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Das Genus der Staphylokokken.....	5
1.2 Koagulase-negative Staphylokokken als Krankheitserreger.....	6
1.3 Pathogenese Fremdmaterial-assoziiertes <i>Staphylococcus-epidermidis</i> -Infektionen ..	8
1.4 Die Phase der primären Anheftung (<i>primary adherence</i>).....	11
1.5 Die akkumulative Phase	12
1.6 Regulation der <i>S. epidermidis</i> -Biofilmbildung.....	14
1.7 Voraussetzungen für diese Arbeit und Fragestellung	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Material	18
2.1.1 Chemikalien und Einwegartikel.....	18
2.1.2 Laborgeräte	18
2.1.3 Medien	20
2.1.4 Lösungen.....	21
2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide	24
2.1.6 Oligonukleotide und Sonden.....	25
2.1.7 Datenbanken und Programme	26
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden	26
2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien	26
2.2.1.2 Resistenztestung	27
2.2.1.3 Biofilmtestung	27
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.2.1 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	28
2.2.2.2 Plasmidpräparation	29
2.2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	30
2.2.2.4 <i>Arbitrary-primed-PCR</i>	30
2.2.2.5 Restriktionsverdau	31
2.2.2.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	31
2.2.2.7 Transposonmutagenese	32
2.2.2.8 Klonierung.....	33

2.2.2.9	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	35
2.2.2.10	Extraktion von RNA aus <i>S. epidermidis</i>	35
2.2.2.11	Relative Transkriptionsanalyse durch <i>real-time-PCR</i>	36
2.2.3	Proteinchemische Methoden	37
2.2.3.1	Präparation von Proteinen aus <i>S. epidermidis</i>	37
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.2.3.3	Immuno-Dot-Blot	38
2.2.3.4	Western Blot	38
2.2.3.5	<i>Skim-Milk-Assay</i>	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Erstellung einer Transposonmutantenbank	40
3.2	Untersuchung der Transposonmutantenbank zum Nachweis von Biofilm-positiven Mutanten	40
3.3	Phänotypische Untersuchung der Transposonmutanten 1585-M254 und 1585-M266	43
3.3.1	Untersuchung der Wachstumskinetik in Schüttelkultur	43
3.3.2	Zellclusterbildung	44
3.4	Genetische Analyse der Transposonmutanten 1585-M254 und 1585-M266	46
3.5	Analyse der Tn917-Insertion in der kodierenden Sequenz des <i>Staphylococcal accessory regulators sarA</i>	47
3.6	Veränderung des Musters der Oberflächenproteine	49
3.7	Analyse der Protease-Aktivität der Transposonmutanten	50
3.8	Untersuchung der Embp-Expression in der Mutante 1585-M254	51
4	Diskussion	53
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	62
7	Abkürzungsverzeichnis	77
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	78
8.1	Abbildungsverzeichnis	78
8.2	Tabellenverzeichnis	78
9	Danksagung	80
10	Lebenslauf	81
11	Eidesstattliche Erklärung	82

1 Einleitung

1.1 Das Genus der Staphylokokken

Der Name Staphylokokken - nach dem griechischen Wort „*staphyle*“ für Traubenhäufen - wurde vor über 100 Jahren durch den schottischen Chirurgen Sir Alexander Ogston eingeführt, als er im Eiter einer Wunde Kokken entdeckte, die sich zu Häufen zusammenlagerten (Ogston 1883).

Staphylokokken sind unbewegliche, nicht sporenbildende, gram-positive Kokken, die fakultativ anaerob wachsen können und sich zu Häufen zusammenlagern. Staphylokokken sind meist positiv für den Nachweis des Enzyms Katalase (Pfaller und Herwaldt 1988) und sind bis auf die *S. sciuri*-Gruppe Cytochrom-Oxidase-negativ. Sie messen 0,5 bis 1,5 µm im Durchmesser und gehören taxonomisch zur Familie der *Staphylococcaceae* aus der Ordnung der *Bacillales* (Bergey 2001). Innerhalb des Genus *Staphylococcus* lassen sich zurzeit 36 Spezies und diverse Subspezies differenzieren (Mack et al. 2006; Götz et al. 2004).

Durch den Nachweis des Enzyms Koagulase lassen sich innerhalb des Genus *Staphylococcus* Koagulase-positive und Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) unterscheiden. *S. aureus* und *S. intermedius* besitzen als einzige Spezies des Genus die Fähigkeit Blutplasma mit Hilfe des Enzyms Koagulase zum Gerinnen zu bringen (Sperber und Tatini 1975). Die Koagulase-negativen Staphylokokken lassen sich je nach ihrer Novobiocin-Empfindlichkeit weiter unterteilen. Hierbei gehört *S. epidermidis* zur Gruppe der Koagulase-negativen und Novobiocin-empfindlichen Staphylokokken (Diekema et al. 2001).

Koagulase-negative Staphylokokken gehören mit einem Anteil von über 50 % zu den vorherrschenden Bakterien, die von menschlicher Haut isoliert werden können. Die Dichte der Besiedelung variiert hierbei von 10^3 CFU/cm² bis zu 10^6 CFU/cm². Unterschiedliche Spezies sind ausschließlich in bestimmten Körperregionen zu finden. So ist *S. capitis* beispielsweise besonders häufig auf der Kopfhaut und *S. auricularis* im externen Gehörgang des Erwachsenen angesiedelt. *S. epidermidis* ist auf der ganzen Körperoberfläche zu finden mit besonders hoher Dichte in der vorderen Nasenhöhle, axillär, inguinal und perianal (Kloos und Musselwhite 1975; Kloos 1986; Kloos und Bannerman 1994; Pfaller und Herwaldt 1988; Rupp und Archer 1994).

1.2 Koagulase-negative Staphylokokken als Krankheitserreger

KNS gehören zur normalen Haut- und Schleimhautflora des Menschen. Früher wurde ihr Nachweis in klinischen Materialien in der Regel als Kontamination gewertet. Lediglich *Staphylococcus saprophyticus* ist schon länger als Erreger von meist ambulant erworbenen Harnwegsinfekten speziell bei jungen Frauen bekannt (Jordan et al. 1980). Heute jedoch gehören KNS, und hierbei insbesondere *Staphylococcus epidermidis*, zu den wichtigsten Erregern nosokomialer Infektionen (Rupp und Archer 1994; Wisplinghoff et al. 2003b; Wisplinghoff et al. 2003a). Zahlen des *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNIS) des *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), die zwischen Januar 1990 und Mai 1999 gewonnen wurden, zeigen, dass Koagulase-negative Staphylokokken mit 37,3 % die am häufigsten isolierten Keime bei Patienten auf Intensivstationen mit Bakteriämien waren. Im Vergleich dazu wurde *S. aureus* nur in 12,6 % der Fälle isoliert (CDC 1999). In einer anderen Studie werden KNS als dritthäufigster isolierter Keim bei Bakteriämien aufgeführt (Diekema et al. 2001). Ungefähr 80 % der aus Blutkulturen isolierten KNS entfallen auf *S. epidermidis* (Mack et al. 2012).

S. epidermidis verursacht, abgesehen von Nativklappenendokarditiden, nur selten Infektionen bei immunkompetenten Patienten. Betroffen von *S. epidermidis*-Infektionen sind in besonderem Maße Patienten, die immungeschwächt oder über einen längeren Zeitraum hospitalisiert sind. Hierzu gehören insbesondere Neu- und Frühgeborene (Winston 1983; Wade et al. 1982; Wisplinghoff et al. 2003b; Wisplinghoff et al. 2003a). *S. epidermidis* und zu einem geringeren Anteil auch andere Spezies aus der Gruppe der KNS sind jedoch die bedeutendste Bakterienart, die im Kontext von Fremdmaterial-assoziierten Infektionen nachgewiesen werden können. Zu diesen Fremdmaterialien zählen zum Beispiel periphere und zentralvenöse Katheter, künstliche Herzklappen, Liquorshuntsysteme, Peritonealdialysekatheter, Gefäßprothesen, Gelenkendoprothesen, Brustimplantate aus Silikon und intraokuläre Linsen-Implantate (George et al. 1979; Karchmer et al. 1983; West et al. 1986). Durch optimierte Implantationsstrategien sind die Infektionsraten im Zusammenhang mit implantierten Fremdmaterialien insgesamt als niedrig zu bezeichnen. So treten Infektionen nach Hüftendoprothesen-Implantation durchschnittlich nur bei etwa 1 % der Fälle auf. Auf Grund der enormen Anzahl der durchgeführten Implantationen ist jedoch tatsächlich mit einer erheblichen Fallzahl von bis zu 4000/ Jahr zu rechnen (Mack et al. 2006). Im Ganzen muss in Deutschland allein mit bis zu 100 000 Fremdmaterial-assoziierten Infektionen gerechnet werden (Otto 2010).

Tabelle 1.1: Schätzung der jährlich in Deutschland auftretenden Fremdkörper-assoziierten Infektionen (Mack et al. 2005)

Fremdkörper	Anwendungen/ Jahr ^a	Infektionsrate ^b	Infektionen/ Jahr
Zentrale Venenkatheter	~ 1.750.000	1-5 %	17.000-87.000
Hüftprothesen	≥200.000	≤ 2 %	~4.000
Knieprothesen	60.000	≤ 1-6 %	≤ 600-3.600
Herzklappen	18.000	0,8-5,7 %	150-1.000
Schrittmacher	70.000	≤ 1-3 %	700-2.100
künstliche Linsen	~ 300.000	≤ 0,1-0,3 %	≤ 300-900
CSF- Shunts	10.000	2-20 %	200-2.000

a Zahlen der Hersteller und Fachleuten im Gebrauch der jeweiligen Katheter.

b Daten von Bisno und Waldvogel (Bisno and Waldvogel, 1994).

Wesentlicher Schritt für die Pathogenese von Fremdmaterial-assoziierten Infektionen stellt die Kontamination des Materials während der Implantation dar. Hierbei wird der Fremdkörper mit der patienteneigenen Hautflora besiedelt. Somit stellen Fremdmaterial-assoziierte Infektionen klassische endogene Infektionen dar. Nur selten kommt es zu einer späteren Fremdkörperbesiedelung nach Implantation, zum Beispiel über einen hämatogenen Infektionsweg, durch das Krankenhauspersonal oder durch kontaminierte Infusionslösungen (Herwaldt et al. 1992; Costa et al. 2006).

Die Tatsache, dass Fremdkörper-assoziierte Infektionen durch kutane Besiedelungsflora hervorgerufen werden, ist wesentliche Ursache für die Komplexität einer sicheren und zweifelsfreien Diagnose einer solchen Infektion. Vor allem gestaltet es sich schwierig, selbst bei Nachweis von *S. epidermidis* in einem primär sterilen Material, wie zum Beispiel intraoperativen Abstrichen oder einer Blutkultur, ein klinisch signifikantes Isolat von einer einfachen Kontaminante zu unterscheiden. So ist tatsächlich davon auszugehen, dass ein großer Anteil der bei Bakteriämien aus Blutkulturen isolierten KNS-Stämme als Kontamination zu werten ist (Souvenir et al. 1998; Weinstein et al. 1997; Beekmann et al. 2005). Es ist gängige Meinung, dass erst bei Nachweis eines identischen Klons aus mindestens zwei unabhängig voneinander gewonnenen Materialien von einem invasiven und damit klinisch signifikantem Isolat ausgegangen werden kann.

Ein weiteres erhebliches Problem im Zusammenhang mit *S. epidermidis*-verursachten Infektionen stellt die Therapie dar. Problematisch ist hierbei, dass ein großer Anteil der isolierten *S. epidermidis*-Stämme gegen viele der gebräuchlichen Antibiotika, vor allem aber auch gegen Methicillin, resistent ist. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, dass über 80 % der klinischen Isolate das *mecA*-Gen besitzen, welches genetische Grundlage für eine Resistenz gegen alle verfügbaren Betalaktam-Antibiotika ist (Archer und Climo 1994; Diekema et al. 2001; Rohde et al. 2004; Rohde et al. 2007). Doch selbst wenn bei einem klinisch signifikanten Isolat *in vivo* als wirksam getestete Antibiotika zum Einsatz gebracht werden, kommt es regelhaft zu einem Therapieversagen. Schon frühzeitig konnte festgestellt werden, dass die Ursache für diesen Sachverhalt insbesondere die spezielle Organisationsform der Bakterien auf der Oberfläche des implantierten Fremdmaterials darstellt. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung konnte direkt mit einer Verminderung der Empfindlichkeit von *S. epidermidis* in Verbindung gebracht werden (Knobloch et al. 2002b; Ceri et al. 1999). Zudem sind Biofilm bildende *S. epidermidis* vor den Effektormechanismen der angeborenen Immunität geschützt (Vuong et al. 2004b; Schommer et al. 2011). Beide Aspekte begünstigen den chronisch persistierenden Verlauf Fremdmaterial-assoziiertes *S. epidermidis*-Infektionen und sind direkte Ursache dafür, dass zur sanierenden Therapie einer *S. epidermidis*-Infektion in der Regel die Entfernung und der Ersatz des Fremdmaterials die einzige therapeutische Option darstellt (Younger et al. 1987; Darouiche 2004).

Aus den genannten Gründen hat die Erforschung der molekularen Mechanismen, die zur Entstehung Fremdmaterial-assoziiertes Infektionen beitragen, großes Interesse erzeugt. Durch die Kenntnis dieser Mechanismen erhofft man sich, neue Ansatzpunkte für die Prophylaxe, Diagnose und Therapie zu finden.

1.3 Pathogenese Fremdmaterial-assoziiertes *Staphylococcus-epidermidis*-Infektionen

Bei der Untersuchung explantierter Katheter wurde bereits früh beobachtet, dass *S. epidermidis*-Stämme, die Katheter-assoziiertes Infektionen verursachen, auf Polymer-Oberflächen ein schon makroskopisch sichtbares, mukoides Bakterienkonsortium bilden. Dieses Phänomen wurde zunächst als Schleimbildung bezeichnet (Bayston und Penny 1972; Christensen et al. 1982; Peters et al. 1982). Da der Terminus Schleim jedoch bereits als Bezeichnung für nicht-kovalent an Bakterienoberflächen gebundene Polysaccharide

verwendet wurde, wird diese spezielle Form des Staphylokokken-Wachstums heutzutage generell als Biofilmbildung benannt (Hussain et al. 1993; Mack et al. 2000). Fremdkörper-assoziierte Staphylokokken-Infektionen sind der Prototyp einer Biofilm-assoziierten Infektion. Mikrobielle Biofilme sind als komplexe Gruppe von anhaftenden Mikroorganismen umhüllt von einer selbst synthetisierten polymeren Matrix definiert (Hall-Stoodley et al. 2004).

Biofilmbildung ist in vielen Ökosystemen ein seit langem beobachtetes Phänomen. Viele Bakterien sowohl im gram-negativen Bereich, wie beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa* oder *Escherichia coli*, als auch im gram-positiven Bereich sind in der Lage, Biofilme zu bilden.

Biofilme sind gekennzeichnet durch eine irreversible Anheftung von Mikroorganismen an meist künstliche Oberflächen. Hier sind sie in eine polymere Matrix eingebettet, die durch die Organismen selbst produziert wird und in welcher sie dann unter günstigen Lebensbedingungen und geschützt vor Umwelteinflüssen sukzessive akkumulieren können (Donlan und Costerton 2002; O'Toole et al. 2000). Als Biofilm wird dabei das Gemisch aus Bakterien und extrazellulärer Matrix, welches hauptsächlich aus Zellwandbestandteilen wie Lipoteichonsäuren besteht, bezeichnet (Hussain et al. 1993; Rohde et al. 2007; Otto 2010). Bei dem Prozess der Biofilmbildung kann man generell zwei Phasen unterscheiden. In der ersten Phase kommt es zur initialen, noch reversiblen Anheftung der Bakterien an eine Oberfläche. In der zweiten Phase kommt es zur interzellulären Adhäsion und Akkumulation, die in der typischen komplexen Architektur eines Biofilms resultiert (Otto 2010; Rohde et al. 2007; Peters et al. 1982).

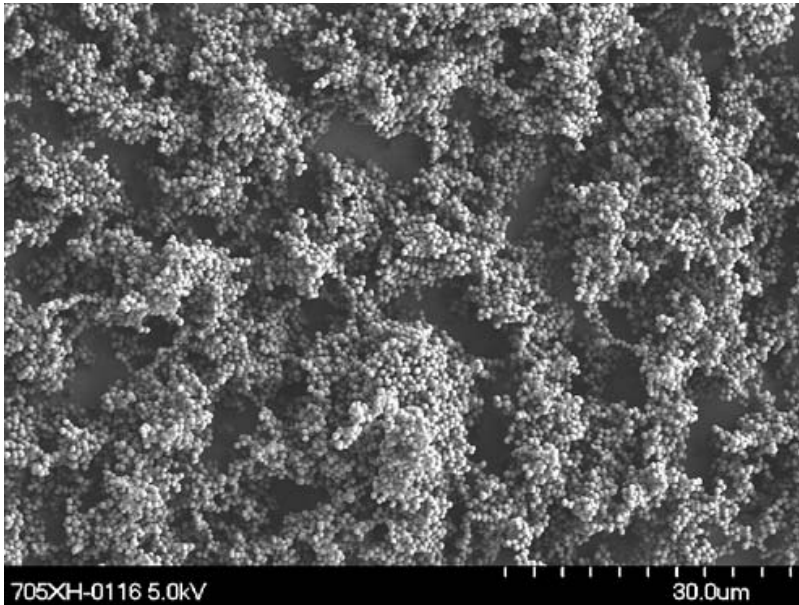


Abbildung 1-1: Elektronenmikroskopisches Bild eines von *S. epidermidis* 1457 synthetisierten Biofilms auf rostfreiem Stahl nach 18 Stunden Inkubation (Mack et al. 2006)

Die von Staphylokokken gebildeten Biofilme sind wegen ihrer besonderen Dicke schon mit dem bloßen Auge sichtbar und wachsen schnell. Zur Untersuchung der gebildeten Biofilme wurde ein semi-quantitativer Assay in 96-well-Mikrotiterplatten von Christensen *et al.* etabliert. Durch die Festlegung von Grenzwerten kann so eine Differenzierung von Biofilm bildenden zu nicht Biofilm bildenden Stämmen festgelegt werden (Christensen et al. 1982).

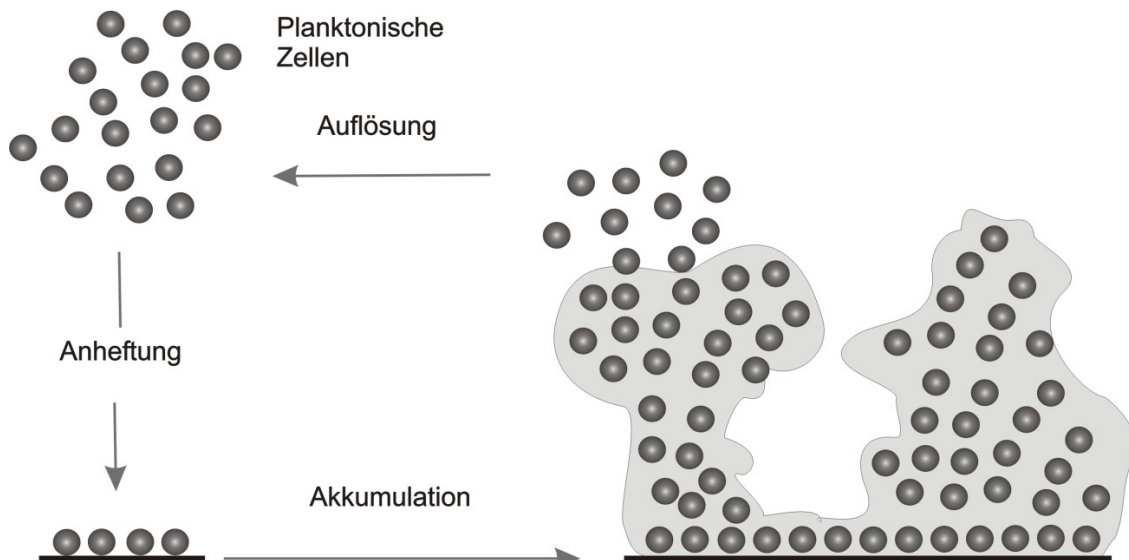


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Modells der Biofilmbildung in *S. epidermidis* (nach Mack et al. 2006)

1.4 Die Phase der primären Anheftung (*primary adherence*)

In der Phase der Adhäsion an eine Oberfläche kommen verschiedene spezifische und unspezifische Faktoren zusammen, die entscheidend von der Konsistenz der Oberfläche (Ludwicka et al. 1984; Hogt et al. 1983) und der Zelloberfläche der Bakterien abhängen. Nach Einbringen eines Fremdkörpers in den menschlichen Körper kommt es rasch zur Umhüllung der polymeren Oberfläche mit Plasma und verschiedenen extrazellulären Proteinen wie Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin, Thrombospondin und von-Willebrand-Faktor (Dickinson und Bisno 1989; Cottonaro et al. 1981). Diese extra-zellulären Matrixproteine (EZM) erleichtern die Anheftung der Bakterien durch Interaktion mit verschiedenen Oberflächen-Proteinen, welche durch die Staphylokokken produziert werden. Besonders für *S. aureus* sind viele dieser Oberflächen-assoziierten Proteine, welche an EZM binden, bekannt und werden in der Familie der MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) zusammengefasst (Foster und Höök 1998). Auch bei *S. epidermidis* konnten Proteine mit EZM-bindenden Eigenschaften identifiziert werden (Otto 2010). Zum Beispiel besitzt das Oberflächen-assoziierte Autolysin AtlE, welches im Zellwand-Metabolismus eine Rolle spielt, Vitronectin-bindende Eigenschaften und könnte daher auch *in vivo* funktionell an der Bindung an die Fremdkörperoberfläche beteiligt sein (Heilmann et al. 1997). Die Bedeutung von AtlE für die Virulenz von *S. epidermidis* konnte in einem Tiermodell gezeigt werden: Eine AtlE-negative-Mutante war deutlich weniger virulent als der korrespondierende Wildtyp (Rupp et al. 2001).

Neben AtlE besitzt auch das 1 MDa große Protein *extracellular matrix binding protein* (Embp) durch seine Fibronectin-bindenden Eigenschaften eine Rolle bei der Adhärenz an Matrix-beschichtete Oberflächen (Williams et al. 2002; Christner et al. 2010). Embp ist in klinischen *S. epidermidis*-Populationen aus Blutkulturen und Endoprothesen-Infektionen weit verbreitet (Rohde et al. 2004; Rohde et al. 2007), wird jedoch *in vitro* praktisch nicht exprimiert (Christner et al. 2010).

Ein weiteres Oberflächen-Protein, das spezifisch an Fibrinogen-beschichtete Oberflächen bindet, ist Fbe/ SdrG. Fbe besitzt Homologien zu den Oberflächen-Rezeptoren der sdrCDE-Familie bei *S. aureus* (Pei und Flock 2001). Ebenso wie Embp konnte Fbe bei einer Vielzahl klinischer Isolate identifiziert werden, wie bei Embp ist die Expression von Fbe *in vitro* hoch variabel (Nilsson et al. 1998; Hartford et al. 2001; Pei und Flock 2001). Der sezernierten Lipase GehD wurde Kollagen-bindende Aktivität zugeschrieben (Bowden et al. 2002). Neben

Oberflächenproteinen sind auch weitere Zellwandbestandteile von *S. epidermidis* an der Bindung an extrazelluläre Wirtsproteine beteiligt. Beispielhaft sei hier die Bindung von Teichonsäuren an Fibronectin genannt (Hussain et al. 2001).

1.5 Die akkumulative Phase

Auf die Phase der primären Adhäsion an polymere Oberflächen folgt die Vermehrung und Akkumulation der Bakterien in vielschichtigen Zellclustern. In dieser Phase ist die interzelluläre Vernetzung ein wichtiger Schritt, der durch verschiedene Proteine vermittelt wird (von Eiff et al. 2002; Mack et al. 2006).

Wesentlich daran beteiligt ist das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin (PIA- *polysaccharid intercellular adhesin*), welches erstmals 1996 aus dem Biofilm-positiven Stamm 1457 von Mack *et al.* isoliert werden konnte. Nach Aufreinigung und struktureller Analyse zeigte sich, dass PIA aus zwei Fraktionen besteht: Polysaccharid I, welches den größeren PIA-Anteil mit über 80 % bildet, ist ein lineares Homoglykan, welches aus etwa 130 β -(1,6)-gebundenen 2-Deoxy-2-Amino-D-Glucopyranosylresten besteht und zu ungefähr 80 % N-acetyliert ist. Polysaccharid II, welches mit Polysaccharid I strukturelle Ähnlichkeiten aufweist, unterscheidet sich durch einen geringeren Gehalt an N-acetylierten D-Glucosaminyln-Resten (Mack et al. 1996). Die Gene, welche für PIA kodieren, sind im *icaADBC*-Operon (*intercellular adhesion*-Operon) lokalisiert. Das *ica*-Operon besteht aus den vier Genen *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* (Heilmann et al. 1996; Fey et al. 1999). *icaR* reguliert die Transkription von *icaADBC* als Repressor und ist in der Nähe des *icaA*-Start-Codons lokalisiert (Conlon et al. 2002b).

Die funktionelle Bedeutung von PIA bei der Entwicklung von Fremdkörper-assoziierten Infektionen konnte im Tiermodell unter Verwendung definierter Mutanten belegt werden (Rupp et al. 1999a; Rupp et al. 1999b; Rupp et al. 2001). Vor kurzer Zeit gelang es zusätzlich, durch die Etablierung eines *Caenorhabditis elegans*-Modells die Bedeutung von PIA als Virulenzfaktor von *S. epidermidis* zu bestätigen (Begun et al. 2007). Dabei zeigte sich, dass sich *S. epidermidis* durch die Synthese von PIA vor den Effektormechanismen der humoralen und angeborenen Immunität schützen kann und damit die Möglichkeit zur Persistenz von *S. epidermidis* während einer Besiedelung möglich ist (Foster 2005; Vuong et al. 2004b; Kristian et al. 2008).

Die Bedeutung von *icaADBC* als generelles Prinzip der bakteriellen Biofilmbildung wird dadurch unterstrichen, dass dieser Genlokus nicht nur bei *S. epidermidis*, sondern auch bei vielen anderen KNS und auch bei *S. aureus* nachgewiesen werden kann (Cramton et al. 1999; Rohde et al. 2001a, 2001b; Kropec et al. 2005; Nilsdotter-Augustinsson et al. 2007; Moretro et al. 2003). Darüber hinaus gelang es bei gram-negativen Bakterien wie *E. coli*, *Yersinia pestis* und *A. actinomycetemcomitans* *icaADBC*-homologe Genorte nachzuweisen. Im Falle von *E. coli* konnte direkt belegt werden, dass der hier kodierte Enzymapparat die Synthese eines strukturell mit PIA praktisch identischen Polysaccharids ermöglicht (Wang et al. 2004; Kaplan et al. 2004). Aus der Gesamtkonstellation mit der weiten Verbreitung in den verschiedensten mikrobiologischen Familien wurde vermutet, dass es sich bei der PIA-vermittelten interzellulären Adhäsion um ein generelles Prinzip interzellulärer Adhäsion und der Biofilmbildung bei Bakterien handelt. Tatsächlich konnte durch epidemiologische Studien bei *S. epidermidis*-assoziierten Fremdkörperinfektionen gezeigt werden, dass *icaADBC* bei 50 bis 80 % der klinisch relevanten Isolate nachgewiesen werden kann (Rohde et al. 2001a; Gelosia et al. 2001; Arciola et al. 2001, 2002; de Silva et al. 2002; Vandecasteele et al. 2003; Chaieb et al. 2005; Kozitskaya et al. 2005; Ninin et al. 2006; Klingenberg et al. 2007; Ziebuhr et al. 1997). Darüber hinaus war bei klinisch nicht-signifikanten, kommensalen *S. epidermidis*-Isolaten von gesunden Probanden ohne Krankenhauskontakt nur in 13 bis 52 % der *icaADBC*-Genort nachweisbar (Miyamoto et al. 2003; Rohde et al. 2004; Ziebuhr et al. 1997). Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse wurde postuliert, dass *icaADBC*-negative *S. epidermidis*-Isolate im Allgemeinen als apathogen gelten könnten (Zhang et al. 2003; Yao et al. 2005; Li et al. 2005). Somit schien der Nachweis von *icaADBC* ein geeigneter Parameter zur Unterscheidung zwischen invasiven klinisch-relevanten *S. epidermidis*-Isolaten und harmlosen Kommensalen darzustellen (Mack et al. 2006; Yao et al. 2005; Ziebuhr et al. 1997). Zudem wurde unter der Annahme, dass es sich bei PIA somit um den zentralen Virulenzfaktor von *S. epidermidis* handelt, versucht, PIA als Basis eines Impfstoffes, nicht nur zur Prävention von *S. epidermidis*-, sondern auch von *S. aureus*-Infektionen, zu verwenden (Götz et al. 2004; McKenney et al. 2000; Maira-Litran et al. 2005, 2004).

Allerdings haben sich in den letzten Jahren die Hinweise darauf verdichtet, dass es sich bei der Staphylokokken-Biofilmmakkumulation nicht nur um einen monokausalen Prozess, sondern um ein multimodales Geschehen handelt. So konnte im Kontext größerer epidemiologischer Studien, bei welcher gut definierte *S. epidermidis*-Isolate untersucht wurden, klinische *S. epidermidis*-Isolate gefunden werden, welche Biofilm bildeten, aber PIA-negativ waren (Ziebuhr et al. 1997; Frebourg et al. 2000; Vandecasteele et al. 2003; Klug et al. 2003; Rohde

et al. 2007). In vielen Fällen konnte hier gezeigt werden, dass der Biofilm dieser Stämme auf der Aktivität von Proteinfaktoren beruht. Daneben zeigte sich schon in früheren Untersuchungen, dass auch Proteine in der extrazellulären Biofilmmatrix vorhanden sind (Hussain et al. 1993). Diese wurden, wie oben beschrieben, jedoch insbesondere mit der primären Adhäsion in Verbindung gebracht (Mack et al. 2006).

Das erste Protein, dessen Rolle bei der *S. epidermidis*-Biofilmbildung detaillierter untersucht wurde, ist das 220 kDa *accumulation associated protein* (Aap) (Hussain et al. 1997; Rohde et al. 2005; Sun et al. 2005). Für dessen adhäsive Funktion ist eine proteolytische Aktivierung nötig, welche entweder durch Staphylokokken-eigene Exoproteasen oder durch körpereigene Proteasen stattfindet (Rohde et al. 2005). Daneben konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch Embp eine Rolle bei der *S. epidermidis*-Biofilmmakumulation spielt (Christner et al. 2010). Hervorgehoben werden muss, sowohl bei der Embp- wie auch der Aap-vermittelten Biofilmbildung, dass diese Mechanismen üblicherweise unter *in-vitro*-Kulturbedingungen nicht exprimiert werden. Dies weist darauf hin, dass bei *S. epidermidis* Regulatoren existieren müssen, die direkt oder indirekt bei Kultur im Labor die Expression des jeweiligen interzellulären Adhäsins und damit die Ausbildung eines Biofilms unterbinden.

1.6 Regulation der *S. epidermidis*-Biofilmbildung

Die Expression eines Biofilm-positiven Phänotyps durch Staphylokokken ist hoch variabel. In den letzten Jahren konnten viele Faktoren identifiziert werden, welche die Biofilmbildung regulieren (Christensen et al. 1987; Baddour et al. 1990): Eine Vielzahl von Umweltfaktoren wie das Wachstumsmedium, Sauerstoffgehalt, Eisengehalt des Mediums, subinhibitorische Antibiotika-Konzentrationen, Ethanol-Konzentration und Osmolarität können die Biofilmbildung qualitativ und quantitativ beeinflussen (Mack et al. 1992; Cramton et al. 2001; Deighton und Borland 1993; Hussain et al. 1992; Fitzpatrick et al. 2002; Knobloch et al. 2002a; Rachid et al. 2000). Diese verschiedenen Umweltbedingungen werden auf der Erregerseite durch komplexe sensorische und regulatorische Systeme aufgenommen und durch Änderung der Transkriptionssensitivität definierter Gene oder Änderungen der Stoffwechselaktivität beantwortet.

Die Regulation der *S. epidermidis*-Biofilmbildung ist vor allem anhand der Modulation von *icaADBC*-Expression und der konsekutiven PIA-Synthese untersucht worden (Mack et al. 2006). Hierbei spielten zunächst Phänomene der bakteriellen genomischen Plastizität eine

Rolle. So konnte gezeigt werden, dass durch Insertion und präzise Exzision des mobilen genetischen Elements *IS256* in *icaADBC* die Expression von *icaADBC*, PIA-Synthese und Biofilmbildung im Sinne einer Phasenbildung moduliert werden kann (Conlon et al. 2004; Handke et al. 2004; Ziebuhr et al. 1999).

Daneben konnten verschiedene spezifische regulatorische Systeme, welche Einfluss auf die quantitative Biofilmbildung nehmen, dargestellt werden. Hierbei spielt scheinbar vor allem der alternative Sigmafaktor σ^B eine große Rolle. σ^B ist ein positiver Regulator der *icaADBC*-Expression und damit der *S. epidermidis*-Biofilmbildung (Knobloch et al. 2001). Die Synthese von σ^B selbst wird durch das σ^B -Operon gesteuert, welches aus den positiven Regulatoren *RsbU* und *RsbV* sowie dem negativen Regulator *RsbW* besteht. Mutation in *RsbU* führte über einen unbekanntenen Regulationsmechanismus zu einem Biofilm-negativen Phänotyp (Knobloch et al. 2004). σ^B scheint auch für die Langzeit-Stabilität eines Biofilms wichtig zu sein. Wird Ethanol zur Induzierung eines Biofilms genutzt, so zeigen die Wildtyp-Biofilme eine höhere Stabilität als die der σ^B -Mutanten (Jäger et al. 2005).

Das *icaR*-Gen kodiert einen transkriptionalen Repressor, der eine zentrale Rolle in der Anpassung an Umweltbedingungen bei der *ica*-Operon-Expression bei *S. epidermidis* spielt (Conlon et al. 2002a). Das *ica*-Operon kann jedoch durch die Zugabe von Natriumchlorid oder Ethanol in das Medium auch über alternative Signalwege aktiviert werden, die *icaR*-ähnlich ablaufen (Conlon et al. 2002b).

Neben den oben beschriebenen Regulatoren sind zwei *quorum-sensing*-Systeme bei *S. epidermidis* bekannt, welche ebenfalls Einfluss auf die Biofilmbildung nehmen. Durch diese *quorum-sensing*-Systeme, bei welchen sezernierte *Autoinducer* durch Nachbarzellen über spezielle Rezeptoren erkannt werden und intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, können Bakterien wachstumsphasenabhängig die Bakterienzellichte erkennen, wodurch wiederum die bakterielle Teilungsaktivität moduliert wird (Mack et al. 2007). Eines der am detailliertesten beschriebenen *quorum-sensing*-Systeme bei Staphylokokken ist das *agr*-System (*accessory gene regulator*). Dieses wurde zunächst bei *S. aureus* detailliert beschreiben, jedoch auch bei *S. epidermidis* nachgewiesen und funktionell charakterisiert. Die Inaktivierung des *agr-quorum-sensing*-Systems führt bei *S. epidermidis* zu einer Zunahme der Biofilmbildung (Vuong et al. 2004a). *Agr* scheint jedoch keinen Einfluss auf die *icaADBC*-Expression und die Produktion von PIA zu haben (O'Gara 2007). Vielmehr wird angenommen, dass die verstärkte Biofilmbildung einerseits durch eine verstärkte primäre

Adhäsion durch eine Zunahme der AtIE-Expression sowie andererseits durch eine Abnahme der Bildung von *phenol-soluble peptides* (PSM), welche durch ihren detergenzartigen Charakter Biofilme auslösen können, zu erklären ist (Kong et al. 2006; Vuong et al. 2003; Vuong et al. 2004a; Yao et al. 2005). Ein weiteres *quorum-sensing*-System ist das *luxS*-System. *LuxS* existiert sowohl bei gram-negativen als auch bei gram-positiven Bakterien und ist in die AI-2-Synthese, ein Molekül welches als *Autoinducer* fungiert, involviert (Xu et al. 2006). Mutation im *luxS*-Gen führt zu einer Hochregulierung der *icaADBC*-Transkription und so zu einer vermehrten PIA-Synthese und Biofilm-Bildung (Kong et al. 2006).

Ein weiterer Regulator der *S. epidermidis*-Biofilmbildung ist *sarA* (*staphylococcal accessory regulator*), ein Protein, welches bei *S. epidermidis* zu 84 % identisch ist mit dem des *sarA* bei *S. aureus* (Fluckiger et al. 1998). Aktuelle Studien unter Verwendung von spezifischen *sarA*-Mutanten in *icaADBC*-positiven genetischen Hintergründen haben gezeigt, dass *sarA* durch Verstärkung der *icaADBC*-Transkription ein positiver Regulator der *S. epidermidis*-Biofilmbildung ist (Conlon et al. 2004; Tormo et al. 2005).

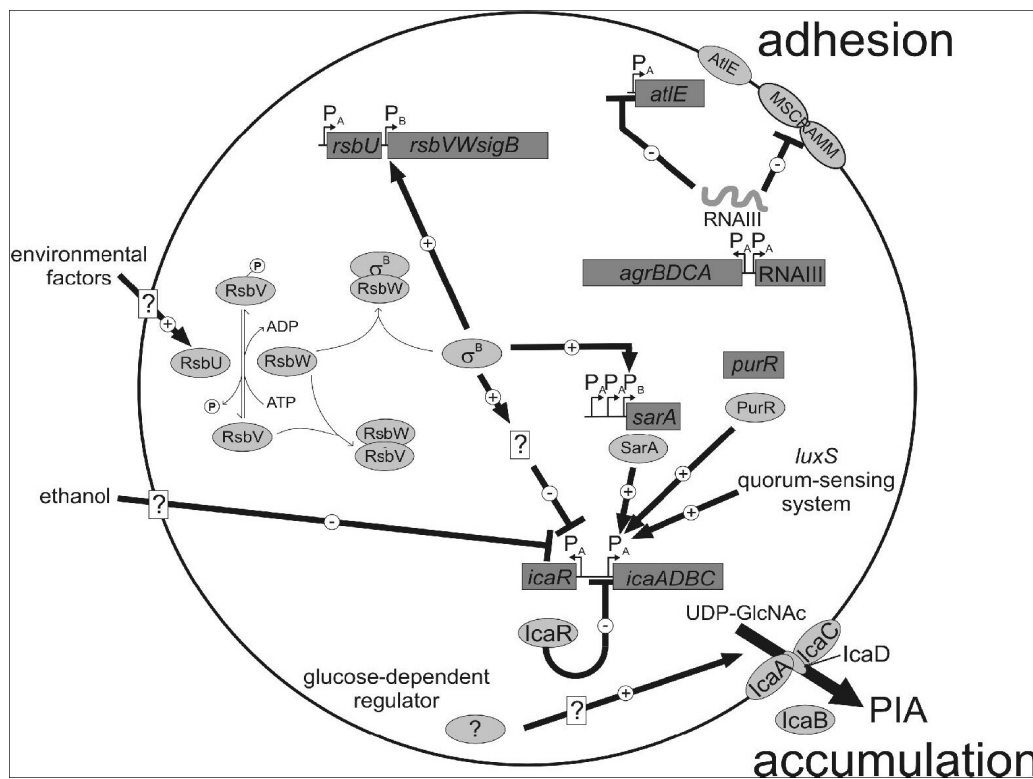


Abbildung 1-3: Vereinfachtes Modell der Interaktion von regulatorischen Strukturen und interzellulären Adhäsinen bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung (Mack et al. 2006)
Gene sind durch Rechtecke repräsentiert. Proteinfaktoren werden durch Ovale dargestellt.

1.7 Voraussetzungen für diese Arbeit und Fragestellung

Auf Grund des häufigen Nachweises klinisch signifikanter, jedoch *in vitro* Biofilm-negativer *S. epidermidis*-Isolate aus Biofilm-assoziierten Infektionen wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass *S. epidermidis* über Regulatoren verfügt, die unter artifiziellen Wachstumsbedingungen im Labor die Expression der notwendigen interzellulären Adhäsion unterdrücken. Auch könnte es möglich sein, dass positive Regulatoren dieser interzellulären Adhäsine im Labor nicht aktiv sind.

Um diese Arbeitshypothese zu prüfen, wurde der klinisch signifikante jedoch Biofilm- und PIA-negative *S. epidermidis*-Stamm 1585 näher untersucht. Dieser Stamm konnte bei einem Patienten mit einer Biofilm-assoziierten Fremdmaterial-Infektion isoliert werden. Nach mehrfacher Passage in Subkulturen und Selektion oberflächenadhärenter Zellen konnte eine spontan zur Ausbildung eines Biofilms befähigte Subpopulation des Stammes 1585 isoliert werden. Da dieser Stamm sowohl Aap- als auch *icaADBC*-negativ ist und potentiell in der Lage zu sein scheint, einen Biofilm zu bilden, muss es noch weitere Mechanismen geben, die den Stamm 1585 zur Biofilmbildung befähigen. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass es sich bei dem funktionell beteiligten interzellulären Adhäsine um das *extracellular matrix binding protein* (Embp) handelt (Christner et al. 2010). Die Überexpression des Embp-kodierenden Gens konnte auf eine strukturelle chromosomale Umlagerung zurückgeführt werden, in deren Rahmen Embp unter der Kontrolle eines vor allem in der exponentiellen Phase aktiven Promotors des Gens *msrR* exprimiert wird. Letztlich ist jedoch unklar, weshalb Embp *in vitro* nicht produziert wird.

Ziele dieser Arbeit lassen sich daher folgendermaßen formulieren:

1. Etablierung einer Transposonmutantenbank des Biofilm-negativen *S. epidermidis*-Stammes 1585.
2. Durchmusterung der Mutanten-Bank nach Mutanten mit einem Biofilm-positiven Phänotyp.
3. Identifikation und Charakterisierung der in den Biofilm-positiven Mutanten inaktivierten Genorte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Einwegartikel

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) in *Pro-analyse*-Qualität bezogen. Plastikartikel und Einwegmaterialien stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Becton Dickinson (Cockeysville, MD, USA), Eppendorf (Hamburg) und Greiner (Nürtingen).

2.1.2 Laborgeräte

Tabelle 2.1: Übersicht über verwendete Laborgeräte

	Gerätebezeichnung	Hersteller
Brutschrank	5050E	Heraeus (Osterode)
Digital-pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick (Berlin)
Elektroporator	Gene Pulser® II	BioRad (Hercules, USA)
Einwegzellschaber	Cell Scraper	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Fluoreszenzobjektträger		BioMérieux (Marcy l'Etoile, Frankreich)
Geldokumentationssysteme	ChemiDoc™ XRS UV-Transilluminator	BioRad (Hercules, USA) Phase (Lübeck)
Gelelektrophoresekammern →horizontal (Agarosegelelektrophorese) →vertikal (Polyacrylamidgele)	X Cell Sure Lock™ Protean® II Xi Cell	Keutz (Reiskirchen) Invitrogen (Carlsbad, USA) BioRad (Hercules, USA)
Küvetten	Quarz Spectrophotometer Cell	BioRad (Hercules, USA)

Mikrotiterplatten	Mikrotiterplatte, U-förmig, 96-well	Greiner (Nürtingen)
	Mikrotiterplatte, Flachboden, Nunclon-Delta-Oberfläche, 96-well	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Photometer	SmartSpec™ 3000 ELISA Processor II	BioRad (Hercules, USA) Behring (Marburg)
Röntgenfilme	Super RX	Fuji Photo Film Europe (Düsseldorf)
Röntgenfilmentwickler	Curix 60	Agfa Gevaert N.V., Germany
Schüttelinkubator		New Brunswick Scientific Co. (New Brunswick, USA)
Spannungsquelle	Power Pac 1000	BioRad (Hercules, USA)
Sterilfilter 0,22 µm	Spitzenvorsatzfilter	Merck (Darmstadt)
Thermocycler	Primus 96 plus Mastercycler gradient icycler IQ™	MWG (Eberswalde) Eppendorf (Hamburg) BioRad (Hercules, USA)
Thermoinkubator	Blockthermostat BT 100	Kleinfeld
Ultraschallzerkleinerer	Digital Sonifier®	Branson (Danbury, USA)
Vortex	Genie 2	Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)
Waagen	PC 4400	Mettler (Giessen, Schweiz)
	Sartorius 4232	Sartorius (Göttingen)
Westernblotkammer	X Cell II™ Blot Module	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Zellkulturschalen	96-Loch-Schalen- Zellkulturschalen Zellkulturschalen, beide NunlonΔ™-beschichtet	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Zentrifugen	Biofuge pico Biofuge 28 RS	Heraeus (Osterode)

2.1.3 Medien

Alle Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, mit entionisiertem Wasser angesetzt und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert.

Columbia Blutagar, pH 7,0

Columbia-Agar (Difco) 42 g/l

Bacto®-Agar (Difco) 1 g/l

Glucose 2,2 g/l

Schafblut 72 ml/l

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

Trypton (Oxoid) 10 g/l

Hefeextrakt (Difco) 5 g/l

NaCl 10 g/l

Trypticase Soy Broth (TSB)

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

Hirn-Herz-Medium (*Brain Heart Infusion*, BHI), pH 7,4

BHI-Brühe pH 7,4 ± 0,2 (Difco) 37 g/l

Zur Verwendung bei der Phagentransduktion wurde dem Medium Natriumcitrat 5 g/l zugesetzt.

Für Agarplatten wurde dem Medium 12 g/l Bacto®-Agar (Difco) zugesetzt.

NB2+ Brühe zur Phagentransduktion

Nutrient Broth No. 2 (Oxoid) 20 g/l

CaCl₂ 0,4 g/l

ST-Agar (*Staphylococcus Typing Agar*)

Nutrient Broth No. 2 (Oxoid) 20 g/l

CaCl₂ 0,4 g/l

NaCl 5 g/l

Bacto®-Agar (Difco) 12 g/l

Für Softagar wurde dem Medium 6 g/l Bacto®-Agar (Difco) zugesetzt.

Einfriermedium

Bacto[®]-Peptone 1,5 %

Glycerin 87 %

Die Medien wurden getrennt autoklaviert und erst nach dem Autoklavieren wurden 60 ml Glycerin 87 % mit 100 ml Bacto- Peptone 1,5 % (wt/ vol) gemischt.

Magermilch-Agar (*skimmilk*-Agar)

Lösung I:

Hefeextrakt (Difco) 10 g/l

Bacto[®]-Peptone (Difco) 5 g/l

NaCl (Baker) 5 g/l

Bacto[®]-Agar (Difco) 32 g/l

Lösung II:

Magermilchpulver (Merck) 16 g/l

Beide Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt. Lösung I wurde 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Lösung II wurde 10 Minuten bei 110 °C autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden beide Lösungen auf 50 °C abgekühlt, vereint und in Petrischalen gegossen.

2.1.4 Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit entionisiertem Wasser angesetzt und ohne vorheriges Autoklavieren verwendet.

Anodenpuffer I für Westernblot

Tris (Invitrogen) 300 mM

Methanol 20 % [v/v]

Anodenpuffer II für Westernblot

Tris (Invitrogen) 25 mM

Methanol 20 % [v/v]

DNA-Ladepuffer

Bromphenolblau 0,25 %

Xylen Cyanol FF 0,25 %

Ficoll 15 %

Ethidiumbromid-Stammlösung

Es wurde eine Ethidiumbromidlösung mit 10 mg/ml in dH₂O angesetzt.

Kathodenpuffer für Westernblot

Tris (Invitrogen) 25 mM

6-Aminohexansäure 40 mM

Methanol 20 % [v/v]

PBST-Puffer

Phosphatgepufferte Salzlösung versetzt mit Tween20 0,1 % [v/v]

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4

NaCl 8 g/l

KCl 0,2 g/l

Na₂HPO₄ 1,44 g/l

KH₂PO₄ 0,24 g/l

4x Probenpuffer zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 1 ml

Glycerin 87 % 1,6 ml

SDS 10 % 1,6 ml

β-Mercaptoethanol 0,4 ml

Bromphenolblau 0,5 % [w/v] 0,4 ml

dH₂O 3 ml

Der Probenpuffer wurde für 4 min auf 95 °C erhitzt und ohne Sterilisation verwendet.

SDS

Es wurde eine 20 %ige Stammlösung Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS) in dH₂O angesetzt.

10 % Ammonium-Persulfat (w/v) (APS)

100 mg Ammonium-Persulfat (APS) wurden in 1 ml dH₂O gelöst.

5 x Elektrophoresepuffer für Maxigele

(1 x = 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH8,3)

45 g Tris-Base, 216 g Glycin und 15 g SDS wurden in dH₂O gelöst und bis zu einem Gesamtvolumen von 3 l aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wurden 300 ml der Stammlösung mit 1,2 l dH₂O aufgefüllt.

5 x TBE

Tris (Invitrogen) 54 g/l

Borsäure 27,5 g/l

EDTA 0,5 M, pH 8 20 ml/l

TE, pH 8

Tris (Invitrogen) 10 mM

EDTA 1 mM

TE-Puffer wurde vor Gebrauch 15 min bei 121 °C autoklaviert.

X-Gal-Lösung

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosamid wurde in einer Konzentration von 40 mg/ml in Dimethylformamid gelöst.

2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> - Wirt zur Klonierung von Plasmiden	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>S. epidermidis</i> 1585	Klinisches Isolat von einem Patienten mit einer Port-Katheter-Infektion, Aap-negativ, Biofilm-negativ, <i>icaADBC</i> -negativ	(Rohde et al. 2005)
<i>S. epidermidis</i> 1585hc (pTV1ts)	Durch Passage bei steigenden Temperaturen von <i>S. epidermidis</i> 1585 abgeleiteter, hitzetoleranter Stamm; trägt Plasmid pTV1ts	(Christner et al. 2010)
<i>S. epidermidis</i> 1585-Ra	Abgeleitet von <i>S. epidermidis</i> 1585; bildet Embp, Biofilm-positiv	(Christner et al. 2010)

Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pTV1ts	Plasmid für die Transposonmutagenese; temperatursensitives Regulon, trägt Transposon Tn917; vermittelt Resistenz gegen Chloramphenicol (Plasmidmarker) und Erythromycin (Transposonmarker).	
pCR 2.1	Plasmid zur TA-Klonierung von PCR-Produkten, <i>blue-white-screening</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.1.6 Oligonukleotide und Sonden

Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten Primer

Name	Sequenz	Verwendung
M13 for	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	Sequenzierung von pCR2.1-Inserts
M 13 rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	Sequenzierung von pCR2.1-Inserts
gyrB real 1	5'-CTGACAATGGCCGTGGTATTC-3'	Relative Transkriptionsanalyse
gyrB real 2	5'-GAAGATCCAACACCGTGAAGAC-3'	Relative Transkriptionsanalyse
sarA95 for	5'-TTTACGCTGCTTAGAATCTACTAAGA-3'	Amplifikation <i>sarA</i>
sarA364 rev	5'-TGAATTATTAGCTATGGTCACTTATG-3'	Amplifikation <i>sarA</i>
STAPHarb1	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTCA(AGCT) (AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT) (AGCT)(AGCT)(AGCT)ATAT-3'	Amplifikation von Tn917-flankierenden chromosomalen Abschnitten
STAPHarb2	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTCA(AGCT) (AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT) (AGCT)(AGCT)(AGCT)GATCA-3'	Amplifikation von Tn917-flankierenden chromosomalen Abschnitten
STAPHarb3	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTCA-3'	Amplifikation von Tn917-flankierenden chromosomalen Abschnitten
917-5.3	5'-CCAATCACTCTCGGACAATAC-3'	Amplifikation von Tn917-flankierenden chromosomalen Abschnitten
917-5.2	5'-AACCGTTACCTGTTTGTGCC-3'	Amplifikation von Tn917-flankierenden chromosomalen Abschnitten

917-5.1	5'-ATCGATACAAATTCCTCGTAGG-3'	Amplifikation von Tn917-flankierenden chromosomalen Abschnitten
917-3.3	5'-GAACGCCGTCTACTTACAAGC-3'	Amplifikation von Tn917-flankierenden chromosomalen Abschnitten
917-3.2	5'-GGGAGCATATCACTTTTCTTGG-3'	Amplifikation von Tn917-flankierenden chromosomalen Abschnitten
917-3.1	5'-TTTAGTGGGAATTTGTACCCC-3'	Amplifikation von Tn917-flankierenden chromosomalen Abschnitten

2.1.7 Datenbanken und Programme

Die durch die PCR und Sequenzierungsreaktion gewonnenen DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programmes Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, MA) bearbeitet und analysiert. Mikroskopische Bilder wurden unter Verwendung der Visitron Software (Visitron Systems GmbH, Puchheim) erfasst und unter Verwendung von Corel Photopaint nachbearbeitet.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden in der Regel bei 37 °C in Flüssig- oder Festmedien kultiviert. Vorkulturen wurden entweder für 6 h oder über Nacht inkubiert und anschließend für die Hauptkulturen 1:100 im gewünschten Medium verdünnt. Schüttelkulturen wurden bei 200 rpm in sterilen Glasgefäßen inkubiert. Für eine Stammhaltung wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, 24 h bei 37 °C bebrütet

und anschließend bei 4°C gelagert. Gegebenenfalls wurden den Agarmedien Antibiotika in geeigneter Konzentration zur Selektion zugesetzt. Mittels der Mast Diagnostica Cryobank wurden die Bakterienstämme bei –80 °C archiviert.

2.2.1.2 Resistenztestung

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

2.2.1.3 Biofilmtestung

Die Fähigkeit von *S. epidermidis*-Stämmen zur Bildung von Biofilmen wurde mittels eines semiquantitativen Biofilmtests beurteilt (Christensen et al. 1985). Als Positivkontrolle diente *S. epidermidis* 1585v (Biofilm-positiv), als Negativkontrolle *S. epidermidis* 1585 (Biofilm-negativ). Standardmäßig wurde eine Einzelkolonie in 2 ml TSB_{BBL} suspendiert und für 6 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde eine 1:100 Verdünnung im gleichen Medium hergestellt. Hiervon wurden je zwei- bis viermal 200 µl in die Näpfe einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (NunclonΔ, Fa. Nunc, Roskilde) gegeben. Für die Untersuchung von Plasmid-tragenden Stämmen wurde ein Antibiotika-haltiges Medium verwendet. Nach etwa 20-stündigem Wachstum bei 37 °C wurde das Medium abgegossen und die Platte dreimal mit 200 µl PBS pro Napf mit Hilfe einer Mehrkanalpipette gewaschen. Die Platte wurde anschließend bei 37 °C getrocknet und die anheftenden Bakterien mit 50 µl Kristallviolett pro Napf für 5 min gefärbt. Die Färbelösung wurde unter fließendem Wasser vorsichtig ausgespült. Nach erneutem Trocknen konnte die Absorption im Infinite Plattenlesegerät (Tecan) bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm bestimmt werden. Der Biofilmphänotyp wurde durch Bildung des Mittelwertes der Einzelwerte

beurteilt. Hierbei gilt ein *cut-off* von A_{570} von 0,1 als Trennpunkt zwischen Biofilm-positiven und Biofilm-negativen Phänotyp.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die horizontale Gelelektrophorese wurde zur größenabhängigen Auftrennung von Plasmiden, von Fragmenten gespaltener Plasmide oder dem Nachweis von Amplifikaten aus der PCR eingesetzt (Sambrook et al. 1989). Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden 0,8 bis 2,0 %ige [w/v] Agarosegele verwendet. Hochreine Agarose (SeaKem ME Agarose, Cambrex Bioscience Rockland Inc., Rockland, ME USA) wurde in 100 ml 0,5-fach TBE-Puffer aufgekocht und in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Die Proben wurden mit 3 μ l DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels eingefüllt. Eine Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 3-6 V/cm in 0,5-fach TBE als Laufpuffer. Als Größenstandard wurde ein Mix aus *HindIII*-gespaltener DNA des λ -Phagens und *HaeIII*-gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Finnzymes, Espoo, Finnland) aufgetragen. Er enthält 19 Fragmente der folgenden Größen: 23 kb, 9,4 kb, 6,6 kb, 4,3 kb, 2,3 kb, 2,0 kb, 1,4 kb, 1,1 kb, 872 bp, 603 bp, 564 bp, 310 bp, 281 bp, 271 bp, 234 bp, 194 bp, 125 bp, 118 bp und 72 bp. Für alle durchgeführten Gelelektrophorese-Gele dieser Arbeit wurde dieser Marker verwendet. Die Gele wurden auf einem Transilluminator mit einem angeschlossenen Bilddokumentationssystem (Biorad ChemiDoc™ XRS) dokumentiert. In der folgenden Abbildung werden die Größen der einzelnen Banden definiert (Abbildung 2-1). Diese gelten für alle folgenden Gelelektrophorese-Abbildungen.

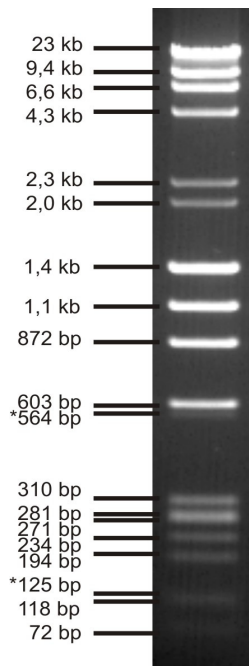


Abbildung 2-1: Größenstandard Marker für Gelelektrophorese Gele.

Als Größenstandard wurde ein Mix aus *Hind*III-gespaltener DNA des λ -Phagens und *Hae*III-gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Finnzymes, Espoo, Finnland) verwendet. Die Größe der einzelnen Banden ist beschriftet. * markiert die Banden, die auf Grund der üblicherweise verwendeten DNA-Menge kaum erkennbar sind.

2.2.2.2 Plasmidpräparation

Plasmidpräparationen von *E. coli* wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das System beruht auf alkalischer Lyse der Bakterienzellen, gefolgt von einer Denaturierung und Präzipitation der chromosomalen DNA, sowie der Proteine, wobei die Plasmid-DNA in Lösung verbleibt (Birnboim und Doly 1979). Zur Aufreinigung erfolgte eine Adsorption der Plasmid-DNA an eine Silicatmatrix in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. Die anschließende Elution der DNA erfolgte in salzarmem Puffer. Für Plasmidpräparationen aus *E. coli* wurden die Bakterien in der Regel über Nacht in LB-Medium unter Zusatz von 100 μ g/ml Ampicillin angezüchtet. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Da sich die Zellwände von Staphylokokken durch das beschriebene Verfahren nicht aufschließen lassen, wurde das Protokoll um einen weiteren Lyseschritt ergänzt. Zunächst wurden die Bakterien auf Antibiotika-haltigen Selektivagarplatten angezogen und direkt in Puffer 1 resuspendiert, der mit 15 U/ml Lysostaphin versetzt war. Die Suspension wurde für 30 min bei 37 °C unter regelmäßigem Schwenken inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden danach nach den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

2.2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ist eine Standardmethode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Doppelsträngige DNA dient dabei als Vorlage (*Template*). Zwei zu den Einzelsträngen komplementäre, gegenläufige Oligonukleotide, die sogenannten Primer, dienen der DNA-Polymerase als Starthilfe. Durch alternierende Zyklen von Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer und Synthese des komplementären Stranges erzielt man eine exponentielle Vervielfältigung des ursprünglichen Fragments. Standardmäßig wurde die PCR mit Hilfe des DyNAzyme™ DNA Polymerase Kit (Finnzyme, Espoo, Finnland) in einem DNA Thermal Cycler (MWG) mit beheiztem Deckel durchgeführt. In einem 50 µl Ansatz wurden circa 100 ng Template-DNA, Primer in einer Konzentration von 15 pM/µl, dNTPs mit je 200 µM, 1 U Polymerase und der zugehörige Mg²⁺-haltige Puffer (1,5 mM) eingesetzt. Initial wurde die DNA zwei Minuten bei 94 °C denaturiert, in den anschließenden Zyklen jeweils nur für 15 s. Für die Anlagerung der Primer wurde die Temperatur für 30 s auf 55 °C abgesenkt. Die Synthese des Zweitstranges erfolgte bei 72 °C (Extensionsphase). Nach in der Regel 30 Zyklen schloss sich eine siebenminütige Synthesephase an, um eine vollständige Komplementierung aller Einzelstränge zu gewährleisten. In Abhängigkeit von den gewählten Primern wurden gegebenenfalls andere Bedingungen in der Anlagerungsphase gewählt. Am Ende eines Programms wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt. In einer Agarosegelelektrophorese fand die Kontrolle des PCR-Ergebnisses statt.

2.2.2.4 Arbitrary-primed-PCR

Mit Hilfe einer *arbitrary-primed* PCR oder auch RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) lassen sich unbekannte DNA-Sequenzen, deren Ende sich innerhalb einiger Kilobasen befindet, zufällig amplifizieren. Für die Identifizierung der chromosomalen Insertionsstellen des Transposons Tn917 mittels *arbitrary*-PCR wurde im Wesentlichen nach der von Knobloch *et al.* beschriebenen Methode verfahren (Knobloch *et al.* 2003).

Für die Amplifizierung kurzer DNA-Fragmente wurde standardmäßig das DyNAzyme™ DNA Polymerase Kit (Finnzyme, Espoo, Finnland) nach Angaben des Herstellers in einem DNA Thermal Cycler (MWG) genutzt. Die benutzten Primer, welche spezifisch für das 5'-Ende (917-5.1, 917-5.2, 917-5.3) und das 3'-Ende (917-3.1, 917-3.2, 917-3.3) von Tn917 sind, sowie die *arbitrary*-Primer (STAPHarb1, STAPHarb2, arb-3) wurden durch MWG Biotech synthetisiert (siehe Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten Primer).

Im ersten Schritt wurden 50 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Ein *arbitrary*-Primer (STAPHarb1 oder STAPHarb2; 200 pmol/ Reaktion) wurde mit einem der proximal gelegenen Tn917-Primer kombiniert (homolog zu dem außenliegenden PCR-Primer; 917-5.2, 917-5.3, 917-3.2 oder 917-3.3; 10 pmol/ Reaktion). Als Vorlage (*template*) wurde zuvor präparierte chromosomale DNA des jeweiligen Klons eingesetzt und die PCR lief unter folgenden Bedingungen ab: 94 °C für 5 min, 6 Zyklen 94 °C für je 30 s, 30 °C für 30 s, 72 °C für 1 min, 30 Zyklen bei 94 °C für je 30 s, 45 °C für 30 s, 72 °C für 1 min und 72 °C für 5 min. Am Ende des Programms wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt.

Im zweiten Schritt wurde ein Gesamtvolumen von 100 µl mit jeweils 5 µl *template* aus dem ersten Schritt der PCR eingesetzt. Der Primer arb 3 (20 pmol/ Reaktion) wurde mit einem der distal gelegenen Tn917-Primer (homolog zu dem innenliegenden PCR-Primer; 917-5.1, 917-5.2, 917-3.1 oder 917-3.2; Konzentration 20 pmol/ Reaktion). Die PCR lief unter folgenden Bedingungen: 30 Zyklen bei 94 °C für je 30 s, 45 °C für 30 s, 72 °C für 1 min und 72 °C für 5 min. Am Ende des Programms wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt. In einer Agarosegelelektrophorese fand die Kontrolle des PCR-Ergebnisses statt. Sichtbare Banden wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Sequenzierung an MWG Biotech gesendet. Zur Identifikation der Insertionsstelle wurde dann mit der gefundenen Sequenz eine BLASTn-Suche sowie eine Analyse mit Hilfe des Programmes Vector NTI durchgeführt.

2.2.2.5 Restriktionsverdau

Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* oder Staphylokokken extrahiert und einer Spaltung mit Restriktionsenzymen unterzogen (Sambrook et al. 1989). Die Restriktionsansätze enthielten 5 bis 15 µl DNA, 1 µl Enzym sowie den geeigneten Puffer und wurden mit sterilem dH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Es erfolgte eine Inkubation für 4 bis 24 h bei 37 °C. Die DNA wurde dann in einer horizontalen Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Ergebnis des Restriktionsverdaus wurde durch Betrachtung unter dem Transilluminator dokumentiert.

2.2.2.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Zunächst wurden die gewünschten Banden auf einem Transilluminator aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend unter Verwendung des Kits aufgereinigt. Das System beruht auf Lyse des Agarosegels,

gefolgt von einer Adsorption der DNA an eine Silicatmatrix. Das Bindungsverhalten ist dabei abhängig vom pH-Wert und dem Salzgehalt der Lösung. Die anschließende Elution erfolgte in einem EDTA-freien Puffer. Die DNA-Konzentration des Eluats wurde durch Agarosegelelektrophorese und Messung der DNA-Konzentration im Photometer überprüft.

2.2.2.7 Transposonmutagenese

Als Ausgangsstamm für das Mutagenese-Experiment diente der Biofilm-negative Stamm *S. epidermidis* 1585hc(pTV1ts). Das Prinzip der Transposonmutagenese besteht darin, dass zunächst ein Plasmid mit temperatursensitivem Regulon in den Zielstamm eingebracht und dieses unter permissiven Bedingungen kultiviert wird. In dieser Zeit kommt es spontan zu einer Translokation des Transposons vom Plasmid in das bakterielle Chromosom. Wird die Kultur nun auf einem Medium ausgestrichen, welches Antibiotika zur Selektion des Transposonmarkers enthält (hier: Erythromycin) und bei nicht permissiven Temperaturen kultiviert, so können idealer Weise ausschließlich Klone mit chromosomal integriertem Transposon wachsen, da Klone, bei denen dieses nicht der Fall ist, das Plasmid nicht propagieren können und damit keine resistenzvermittelnden Determinanten mehr aufweisen. Konkret wurde in dieser Arbeit zunächst eine Kolonie des Stammes 1585hc(pTV1ts) in 2 ml TSB_{BBL}-Medium mit 10 µg/ml Chloramphenicol und 10 µg/ml Erythromycin bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde 1:100 in TSB_{BBL}-Medium mit 2,5 µg/ml Erythromycin verdünnt und für weitere fünf Stunden bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 1:100 in PBS verdünnt und je 100 µl dieser Verdünnung auf BHI-Agar ausplattiert. Zur Selektion auf das Transposon enthielten diese Platten 10 µg/ml Erythromycin. Die Platten wurden bei einer nichtpermissiven Temperatur für die Replikation des Plasmids pTV1ts von 46 °C inkubiert. Nach 48 Stunden wurden Klone mit sterilen Zahnstochern von den Platten gepickt und auf BHI-Agar mit 10 µg/ml Erythromycin übertragen. Diese Platten wurden erneut für 24 Stunden bei 46 °C inkubiert. Um Stämme, die das Plasmid zu diesem Zeitpunkt nicht eliminiert hatten, auszusortieren, wurden danach alle Klone auf BHI-Agar mit 10 µg/ml Chloramphenicol übertragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Differenzierung war möglich, da die Erythromycinresistenz durch das Transposon vermittelt wird, während die Chloramphenicolresistenz auf dem Trägerplasmid kodiert ist. Alle so identifizierten Erythromycin-resistenten aber Chloramphenicol-sensiblen Transposonmutanten wurden auf BHI-Agar mit 10 µg/ml Erythromycin isoliert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Zur Archivierung der Mutantenbank wurden die Klone in jeweils

50 µl Einfriermedium (1,5 % Bacto-Peptide mit Glycerin 87 % gemischt) pro Napf in einer 96-Napf-Mikrotiterplatte (Greiner, Nürtingen) gelöst und bei -80 °C eingefroren.

2.2.2.8 Klonierung

Eine Klonierung von PCR-Amplifikaten erfolgte mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, K4700, Vers. J) nach Angaben des Herstellers. Dabei besitzt der linearisierte Vektor pCR4-TOPO beidseitig 3'-Desoxyadenosin-Überhänge. Mit Hilfe der Topoisomerase I wurden Vektor und Amplifikate ligiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert. Die *multiple cloning site* des Vektors liegt in einem *lacZ* Gen. Somit können Klone mit erfolgreicher Insertion anhand eines *blue-white-Screenings* (Sambrook et al. 1989) identifiziert werden. Es wurden 1 bis 4 µl eines PCR-Amplifikats und 1 µl Salzlösung mit sterilem dH₂O auf 5 µl aufgefüllt und mit 1 µl Vektor gemischt. Die Ligation fand für 5 min bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt.

Chemische Transformation

Chemokompetente *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, MA) wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl des Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 s bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und erneut auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit 250 µl SOC-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Für die Transformation von pCR4 wurde zunächst 40 µl X-Gal auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und die Platten bei 37 °C vorgewärmt. Die Bakteriensuspension wurde unverdünnt auf jeweils drei LB-Agarplatten ausplattiert. Nach 24 h wurden weiße Kolonien zur weiteren Analyse ausgewählt.

Phagentransduktion

Bei der Phagentransduktion handelt es sich um ein Verfahren, bei dem genetisches Material eines Donors im Rahmen des Vermehrungszyklus eines Bakteriophagen mobilisiert und bei der Infektion des Rezipienten in diesen eingeführt (transduziert) wird. Hierfür wurde der von Vibeke T. Rosdahl (Staten Serum Institute, Copenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellte Phage A6C verwendet.

Herstellung eines plasmidtragenden Phagenlysates

Um ein Plasmid durch Phagentransduktion in einem anderen Stamm zu überführen, wurde ein Phagenlysat hergestellt, indem man eine Vorkultur des plasmidtragenden Stammes in NB2+-Medium 1:100 im gleichen Medium zur Hauptkultur verdünnte und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte OD_{578} von 0,1 bis 0,2 wachsen ließ. Es wurde 1 ml der Bakteriensuspension mit 1 ml Phagensuspension und 3 ml auf 42 °C erwärmten STA-Softagar vermischt und die Mischung zügig auf vorbereiteten ST-Agarplatten verteilt, die über Nacht bei 30 °C bebrütet wurden. Um die Phagen aus dem Softagar zu extrahieren, wurden 5 ml NB2+-Brühe dazugegeben, die Softagarschicht mit einem Glasspatel zerkleinert, in einem 50 ml Falcon-Röhrchen für 1 min kräftig geschüttelt und der Agar durch zweimalige Zentrifugation bei 1560xg für je 10 min von dem Phagenlysat abgetrennt. Dieses wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Die Titer von mit dieser Methode gewonnener Lyse lagen bei etwa 10^9 bis 10^{10} PFU/ml.

Plaquetitration

Die Phagenkonzentration eines Lysates wurde durch Erstellen einer Verdünnungsreihe ermittelt. Hierzu wurde der Empfängerstamm, wie für die Herstellung eines Phagenlysates beschrieben, kultiviert und in gleicher Weise mit dem in Stufen von 10^{-3} bis 10^{-9} in NB2+-verdünnten plasmidtragenden Phagenlysat auf ST-Agar für 24 h inkubiert. Die entstandenen Plaques wurden ausgezählt, wobei die optimale Konzentration durch das Vorhandensein eines gerade nicht-konfluierenden Plaquemusters gekennzeichnet ist.

Transduktion

Der über Nacht auf Blutagar kultivierte Empfängerstamm *S. epidermidis* 1585 wurde in einer Konzentration von 0,5 bis 1×10^{10} CFU/ml entsprechend einer OD_{578} von 11 in NB2+ suspendiert. Hiervon wurde 1 ml mit dem gleichen Volumen des plasmidtragenden Phagenlysates in einem Phagen-Bakterien-Verhältnis von 0,1 bis 1 für 30 min in einem Schüttelinkubator bei 37 °C infiziert. Die Adsorption der Phagenpartikel wurde durch Zugabe von 40 µl eiskaltem 1 M Natriumcitrat gestoppt. Das Medium wurde bei 1560xg abzentrifugiert, die Zellen zweimal in 2 ml BHI-Brühe mit 20 mM Natriumcitrat gewaschen und in 3 ml des gleichen Mediums resuspendiert. Um die Expression der plasmidkodierten Resistenzgene zu gewährleisten, wurden die Bakterien in diesem Medium für 1 h in einem Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde mit 3 ml BHI-Softagar, der mit 20 mM Natriumcitrat und 10 µg/ml Erythromycin versetzt war, gemischt und auf BHI-

Agarplatten mit 10 µg/ml Erythromycin verteilt. Transduktanden wurden in der Regel nach 24 bis 48 h isoliert.

2.2.2.9 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese wurde die Klonalität der Bakterienstämme untersucht. Zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnene Bakterienisolate galten als klonal identisch, wenn das Bandenmuster der Pulsfeldgelelektrophorese weniger als drei Bandendifferenzen zeigte. Durchgeführt wurden die Pulsfeldgelelektrophoresen unter Mithilfe von S. Scherpe (Institut für Medizinische Mikrobiologie, UK Hamburg-Eppendorf) mit dem CHEFDR II (Bio-Rad, München, Deutschland), wobei ein Standardprotokoll zur Anwendung kam (Schwarzkopf et al. 1993).

2.2.2.10 Extraktion von RNA aus *S. epidermidis*

Für die Extraktion von Ribonukleinsäuren aus *S. epidermidis* 1585, *S. epidermidis* 1585v sowie den beiden Transposonmutanten *S. epidermidis* 1585-M254 und *S. epidermidis* 1585-M266 wurde im Wesentlichen nach der von Dobinsky beschriebenen Methode verfahren (Dobinsky und Mack 2001).

Eine Kolonie des Stammes wurde in 2 ml selektivem TSB_{BBL}-Medium bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Diese Vorkultur wurde 1:100 in selektivem TSB_{BBL}-Medium verdünnt und für weitere sechs Stunden bei 37 °C in Nunclon-Zellschalen (Durchmesser 9 cm) inkubiert. Nach sechs Stunden wurden die Zellen geerntet, die OD₅₇₈ bestimmt und 5 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Zugabe von 3 ml RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen) wurden die Zellen bei langsamer Geschwindigkeit gevortext. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm und 4 °C für 5 min. Danach wurde das Pellet in 200 µl TE-Puffer resuspendiert und unter Schütteln für 25 min bei 37 °C mit 150 U/ml Lysostaphin verdaut. Nach Zugabe von 700 µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen), 7 µl β-Mercaptoethanol und 15 s vortexen wurde die Probe in eine 2 ml Lysing Matrix Tube (Bio 101 Systems, Qbione, Morgan Irvine, CA, USA) mit Silikapartikeln überführt. Der Zellaufschluss erfolgte im Fast Prep Zeldisruptor (FB 120, BIO 101, Savant instruments, Farmingdale, NY, USA) dreimal 20 s bei maximaler Geschwindigkeit. Sofort wurde der Ansatz auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zelltrümmer 1 min bei Maximalgeschwindigkeit abzentrifugiert. Die weitere Bearbeitung des Überstandes wurde

unter Verwendung des RNeasy Mini Kits nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch im GeneQuant Spektralphotometer bei 260 nm bestimmt. Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.2.11 Relative Transkriptionsanalyse durch *real-time*-PCR

Bei der *real-time*-PCR ist dem PCR-Ansatz ein fluoreszierender Farbstoff Sybrgreen beigefügt, der unspezifisch an Doppelstrang-DNA bindet. Durch Quantifizierung der Fluoreszenzintensität nach jedem Zyklus kann festgestellt werden, ob Doppelstrang-DNA durch die PCR-Reaktion entstanden ist. Die Dynamik der Fluoreszenzintensitätszunahme steht in quantitativer Beziehung zur DNA-Ausgangskonzentration der Probe.

Die Extraktion der Ribonukleinsäure wurde wie oben beschrieben durchgeführt und diese nach photometrischer Konzentrationsbestimmung in Aliquots von $5\text{ }\mu\text{g}$ Gesamt-RNA aufgeteilt. Um auszuschließen, dass die Probe durch DNA-Reste verunreinigt ist, wurde ein Verdau mit der RQ1 RNase-freien DNase (Promega, Madison, USA) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Der Erfolg wurde mittels PCR im Vergleich zur unverdauten Probe überprüft. Diese wurde im iCycler (BioRad) unter Verwendung des IQ SYBR Green Supermix Kit (BioRad) und der Primer *empbA2* for und *empbA2* rev nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 3 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ folgten 40 Zyklen mit Denaturierung der DNA bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 s, Anlagerung der Primer bei $56,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 s und Synthese des Zweitstranges bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 s. Am Ende wurde das System auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ heruntergekühlt. Die mit DNase verdauten RNA-Proben wurden nun mit dem iScript™ cDNA Synthese Kit (BioRad) und der darin enthaltenen reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese Reaktion wurde in einem Thermocycler mit beheiztem Deckel (MWG) nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Nun erfolgte die relative Transkriptionsanalyse im iCycler (BioRad) unter Verwendung des IQ SYBR Green Supermix Kit (BioRad) und der Primer *empbA2* for und *empbA2* rev. Es wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen und ein 35 Zyklen umfassendes Programm nach den oben beschriebenen Bedingungen verwendet.

Transkriptionelle Unterschiede wurden nach der $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001) berechnet. Diese Methode geht davon aus, dass es zu Beginn einer PCR in jedem Zyklus zu einer Verdoppelung der Amplifikat-Kopienzahl kommt. Durch Bindung des im PCR-Ansatz enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffes an die entstandene Doppelstrang-DNA kommt es im Verlauf des PCR-Programms zu einem exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz. Übersteigt die nach jedem Zyklus gemessene Fluoreszenz-Intensität der Probe einen

festgelegten Grenzwert, der weit am Beginn des exponentiellen Anstiegs liegt, so wird dies vom Gerät registriert. Parallel wird die Transkription eines bekanntermaßen konstitutiv exprimierten Gens mit untersucht, dessen Wert jeweils als Referenzwert abgezogen wird. Aus der zahlenmäßigen Distanz der Grenzwertüberschreitungen unterschiedlicher Proben ($\Delta\Delta CT$) können Unterschiede in der DNA-Ausgangskonzentration berechnet werden.

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Präparation von Proteinen aus *S. epidermidis*

Für die Extraktion von Oberflächen-assoziierten Proteinen wurden Schüttelkulturen der stationären Wachstumsphase in TSB_{BBL} (Ernte nach 24 h) eingesetzt. Zur Zellernte wurden 20 ml der Kulturen auf Eis entnommen, 15 min bei 5242xg und 4 °C zentrifugiert und einmal in 5 ml PBS gewaschen. Es folgte ein erneutes Zentrifugieren für 15 min bei 5242xg, 4 °C. Das Pellet wurde dann in 1000 µl 1xLDS-Probenpuffer für 5 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Zelltrümmer 30 min bei 13280xg und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand konnte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert werden.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Minigel

Es wurden NuPage[®] 4-12 % Bis-Tris Gradientengele (Invitrogen) mit Aliquots einer Proteingesamtkonzentration von 0,01-1,0 µl beladen, die mit 1xLDS-Probenpuffer versetzt waren. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte in einer X Cell Sure Lock Elektrophoresekammer bei 150 V für 45 min. Als Laufpuffer diente der NuPage[®] MES SDS Running Buffer (Invitrogen).

Maxigel

Es wurden selbstgegossene SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die nach folgendem Rezept hergestellt wurden (Laemmli 1970). Zuerst wurde das 7,5 %ige Trenngel gegossen, wobei APS und TEMED (Tetramethylethylendiamin) die Polymerisation auslösen. APS wurde vor Gebrauch als 10 %ige [w/v] Stammlösung frisch angesetzt. Nach Aushärten des Trenngels wurde das 4 %ige Sammelgel gegossen und Probenaschen durch das Einstecken eines Kamms erzeugt. Das Gel wurde mit den Proteinproben beladen, die mit 1xLDS-Probenpuffer

versetzt waren. Man ließ die Proben bei 25 mA in das Sammelgel einlaufen und trennte sie bei 35 mA für ca. 3 h nach ihrer Größe auf. Als Laufpuffer diente 1xElektrophoresepuffer.

2.2.3.3 Immuno-Dot-Blot

Für die Extraktion von Proteinen wurden Schüttelkulturen der stationären Wachstumsphase in TSB_{BBL} (Ernte nach 24 h) eingesetzt. Zur Zellernte wurden 20 ml der Kulturen auf Eis entnommen, 15 min bei 5242xg und 4 °C zentrifugiert und einmal in 5 ml PBS gewaschen. Es folgte ein erneutes Zentrifugieren für 15 min bei 5242xg und 4 °C. Danach wurden die Zellen für 4x10 s mit einer Amplitude von 60 % ultraschallbehandelt und danach für 10 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden Verdünnungsreihen (1:2 bis 1:32) mit einem Endvolumen von 5 µl erstellt und auf eine mit Methanol vorbehandelte Invitrolon PVDF-Blot-Membran (Invitrogen) aufgetragen. Anschließend wurde für 1 h mit 3 % (wt/v) BSA in PBS-Puffer bei Raumtemperatur geblockt. Zur Detektion von Embp wurde die Membran mit dem anti-rEmpb17383-Kaninchenantiserum (1:5000 in PBST verdünnt) für 2 h inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS + Tween20 0,05 % für 3x15 min. Alle Inkubationsschritte erfolgten auf dem Schüttelinkubator und wurden zwischendurch jeweils einmal 15 min und zweimal 5 min mit PBST 0,05 % gewaschen. Danach wurde dieser mit einem HRP-markiertem anti-Kaninchen-IgG, der 1:10 000 in PBST verdünnt war, gekoppelt. Die Chemilumineszenz-Detektion der Embp-spezifischen Antigen-Antikörperkomplexe erfolgte mit jeweils 1 ml ECL *Western blotting detection reagent 1* und *2* (Amersham Bioscience) für 1 min. Die Detektion erfolgte mit der Röntgendetektionsmaschine Curix 60 (Agfa).

2.2.3.4 Western Blot

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine Polyvinylidifluoridmembran (PVDF)-Nitrozellulosemembran (NCF) übertragen. Die Gele wurden im X Cell II Blot Module (Invitrogen) für 1 h bei 30 V auf eine Invitrolon PVDF-Membran (Invitrogen) transferiert. Als Laufpuffer diente der NuPage Transferpuffer. Es wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

Die Membran wurde danach zunächst mit 3 % (wt/v) BSA in 15 ml PBST 0,05% über Nacht bei 4 °C geblockt. Zur Detektion des Embp wurde die Membran mit anti-rEmpb-Kaninchenantiserum (1:10000 in PBS + Tween20 0,05 %) für 2 h inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten auf dem Schüttelinkubator und wurden zwischendurch jeweils

einmal 15 min und zweimal 5 min mit PBS + Tween20 0,05 % gewaschen. Danach wurde dieser mit einem HRP-markierten anti-Kaninchen-IgG gekoppelt. Die Chemilumineszenz-Detektion der Embp-spezifischen Antigen-Antikörperkomplexe erfolgte mit jeweils 1 ml ECL *Western blotting detection reagent* 1 und 2 (Amersham Bioscience) für 1 min. Die Detektion der Banden erfolgte mit der Röntgendetektionsmaschine Curix 60 (Agfa).

2.2.3.5 *Skim-Milk-Assay*

Skim-Milk-Agar dient dem qualitativen Nachweis von Proteasen, die um den Impfstrich einen klaren Hof im durch das Protein getrübbten Medium bilden. Es wurde eine Einzelkolonie in 2 ml TSB_{BBL} suspendiert und bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 200 *rpm* bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4 inkubiert. Auf den frischen Agar wurde mittig ein autoklaviertes, trockenes Antibiotika-Testplättchen (Schleicher & Schuell, Durchmesser 9 mm) gelegt. Aus den Kulturen wurden 10 µl Suspension mittig auf das Testplättchen gegeben. Die Platten wurden bei 30 °C für 72 h inkubiert. Nach jeweils 24h wurden die Proteolysezonen vermessen.

3 Ergebnisse

Zentrales Ziel dieser Arbeit war, unter Verwendung eines genetischen Ansatzes *icaADBC*-alternative Mechanismen der *S. epidermidis*-Biofilmbildung zu identifizieren. Hierzu wurde zunächst eine Transposonmutantenbank aus dem Biofilm-negativen, Aap-negativen und *icaADBC*-negativen *S. epidermidis*-Stamm 1585 aufgebaut. Die jeweiligen Transposonmutanten wurden mittels Biofilm-Assay hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung geprüft. Die funktionelle Assoziation zwischen Transposoninsertion und Änderung des Biofilmphänotyps sollte durch Transduktion der jeweiligen chromosomalen Transposoninsertionen in den Biofilm-negativen Ausgangsstamm geklärt werden. Daraufhin erfolgte die genetische Analyse zweier Biofilm-positiver Transposonmutanten.

3.1 Erstellung einer Transposonmutantenbank

Durch ein Transposonmutagenese-Experiment kann ein einzelner Genort durch Insertion eines transponierbaren genetischen Elements in zufälliger Weise inaktiviert werden. Für den Transfer des Transposons Tn917, welches eine Erythromycin-Resistenz vermittelt (Shaw und Clewell 1985), wurde hier das temperatursensitive Plasmid pTV1ts verwendet. Dieses Plasmid kodiert für eine Chloramphenicolresistenz. Der Verlust dieses Resistenzmarkers konnte als Hinweis auf eine vollständige Eliminierung des Plasmids angesehen werden.

In aufeinander folgenden, entsprechend dem Vorgehen in Material und Methoden durchgeführten Mutagenese-Experimenten wurden insgesamt etwa 5000 Klone isoliert. 17 % der Klone wuchsen auch unter Chloramphenicolselektion und hatten somit das Plasmid offensichtlich nicht eliminiert. Diese wurden verworfen. Die übrigen etwa 4100 Klone wurden auf BHI-Agar unter Erythromycin-Selektionsdruck isoliert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Archivierung eingefroren.

3.2 Untersuchung der Transposonmutantenbank zum Nachweis von Biofilm-positiven Mutanten

Die 4100 Transposonmutanten, welche das Plasmid eliminiert hatten, wurden mittels des Biofilm-Assays (Christensen et al. 1982) hinsichtlich einer Änderung ihres Phänotyps untersucht. Pro Klon wurden zwei Näpfe einer Nunclon Δ -96-well-Mikrotiterplatte zur

Biofilmtestung beimpft. Nach Übernachtkultur unter statischen Bedingungen wurde das Medium verworfen und die Nöpfchen zur Entfernung nicht-adhärenter Zellen gespült. Nach einem Trocknungsschritt wurden die adhären Zellen mittels Gentianaviolett gefärbt. Die quantitative Biofilmbildung wurde dann durch Bestimmung der Absorption bei 570 nm analysiert. Ab einem Wert von 0,1 galt der Klon als Biofilm-positiv. In diesem ersten Screening wurden elf Transposonmutanten gefunden, die eine Änderung des Biofilm-Phänotyps hin zu Biofilm-positivem Phänotyp zeigten. Die Mutanten wurden zunächst durch Anfertigung eines AntibioGRAMMS charakterisiert. Es zeigte sich, dass alle Mutanten den erwarteten Resistenzphänotyp aufwiesen: Zusätzlich zu der auch beim Wildtyp nachweisbaren Gentamicin-Resistenz fand sich bei allen Mutanten eine Erythromycin-Resistenz sowie eine induzierbare Clindamycin-Resistenz. Keine Mutante war resistent gegenüber Chloramphenicol, hinweisend auf eine Elimination des Plasmids während der Transposonmutagenese. Die tatsächliche Elimination wurde durch Plasmidpräparation nachgewiesen.

Um die Klonalität der Mutanten zu zeigen, wurde eine PFGE chromosomaler DNA nach Spaltung mit dem Restriktionsenzym *SmaI* durchgeführt. Hier zeigte sich, dass - entsprechend den gängigen Kriterien zur Beurteilung der klonalen Verwandtschaft - der Biofilm-negative Ausgangsstamm 1585 sowie die resultierenden Transposonmutanten als klonal identisch beurteilt werden konnten. Dies zeigt, dass die im Rahmen der Transposonmutagenese kultivierten Bakterien tatsächlich aus dem Ausgangsstamm hervorgegangen waren und dementsprechend keine Kontaminanten darstellten. Interessanterweise konnte im Vergleich zum Bandenmuster des Stamms 1585 bei einzelnen Mutanten singuläre Änderungen des Bandenmusters festgestellt werden. Diese können als Ausdruck der Insertion des Transposons in die jeweiligen *SmaI*-Fragmente des Wildtyps aufgefasst werden.

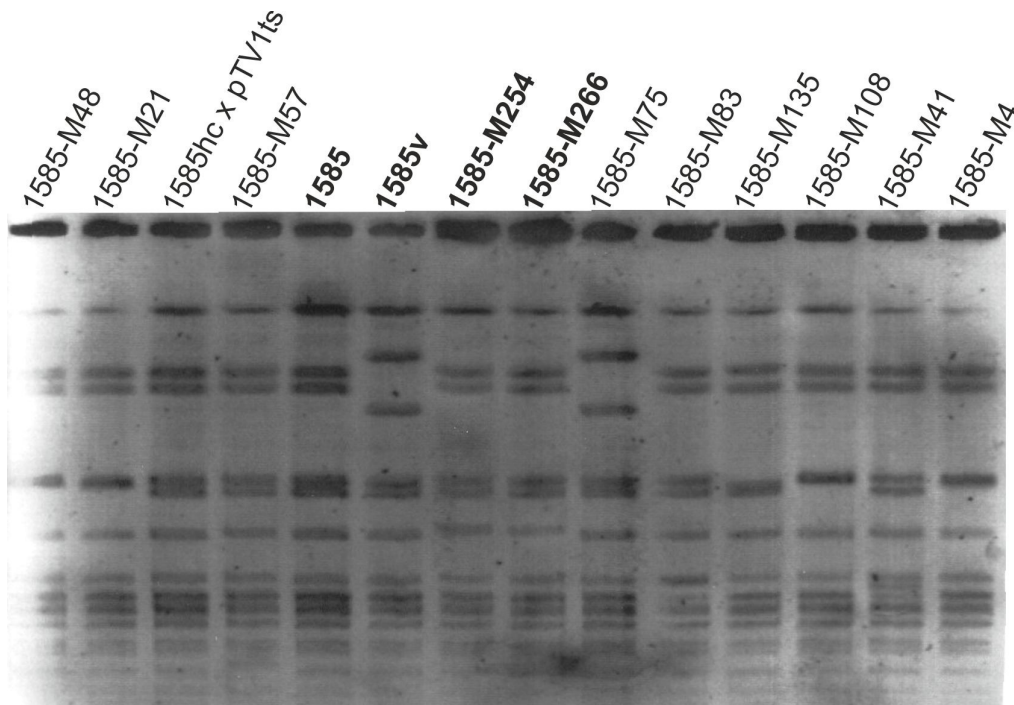


Abbildung 3-1: Untersuchung der klonalen Verwandtschaft von Transposonmutanten und dem Biofilm-negativen Ausgangsstamm 1585.

*Sma*I-gespaltene DNA der *S. epidermidis*-Stämme wurde mittels PFGE aufgetrennt und die resultierenden Banden durch Ethidiumbromid-Färbung dargestellt. Im Vergleich zum Ausgangsstamm weisen die Transposonmutanten keine signifikanten Änderungen der Bandenmuster auf. Dies belegt die Klonalität der Mutanten und des Ausgangsstamms. Bei einzelnen Mutanten zeigen sich im Vergleich zum Wildtyp 1585 singuläre veränderte Banden (1585-M4, -M75, -M108, -M135). Man kann annehmen, dass diese Änderungen auf die Insertion des Transposons zurückzuführen ist.

Bei Wiederholung der Biofilm-Testungen zeigte sich, dass bei neun der elf Mutanten Schwankungen des Biofilm-Phänotyps auftraten. Auf Grund dieser phänotypischen Instabilität wurden nur die Mutanten M254 und M266 weiter untersucht.

Um zu prüfen, ob tatsächlich die Transposoninsertionen, und nicht unabhängige genetische Ereignisse, die während der Transposonmutagenese aufgetreten sein könnten, Ursache für die beobachtete Phänotypänderung sind, wurden zunächst die Insertionsorte des Transposons in den Mutanten M254 und M266 mittels Phagentransduktion in den Wildtyp-Stamm *S. epidermidis* 1585wt zurücktransduziert. Die dadurch entstandenen Mutanten *S. epidermidis* 1585-M254 und *S. epidermidis* 1585-M266 zeigten ebenfalls eine verstärkte Biofilmbildung. Hierdurch konnte die genetische Verbindung zwischen der Transposoninsertion und der veränderten Biofilmbildung bestätigt werden. Für alle weiteren Experimente wurden diese Transduktanden verwendet.

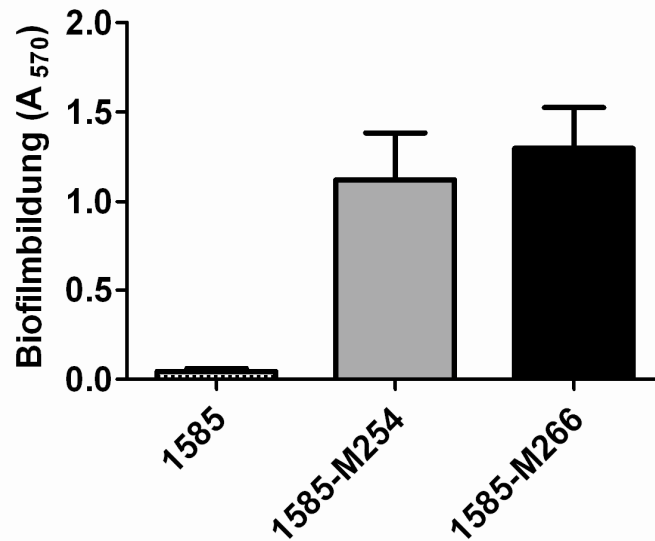


Abbildung 3-2: Quantitative Analyse der Biofilmbildung des Wildtyps 1585 sowie der Mutanten 1585-M254 und 1585-M266 im Biofilmassay.

Während der Wildtypstamm keine Biofilmbildung zeigt, sind die Mutanten zur Ausbildung eines starken Biofilms in der Lage. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert aus zwölf Messwerten, die in drei unabhängigen Experimenten erhoben wurden.

3.3 Phänotypische Untersuchung der Transposonmutanten 1585-M254 und 1585-M266

3.3.1 Untersuchung der Wachstumskinetik in Schüttelkultur

Um zu zeigen, dass die beobachtete stärkere Biofilmbildung der Mutanten 1585-M254 und 1585-M266 nicht durch eine erhöhte Zelldichte entsteht, wurde das Wachstum in Schüttelkulturen über einen Zeitraum von 36 Stunden beobachtet. Zum Vergleich wurden der Biofilm-negative Ausgangsstamm 1585 und der stark Biofilm-bildende Stamm 1585v mitgeführt. Hierbei zeigte sich, dass beide Transposonmutanten ein annähernd gleiches Wachstum wie der Ausgangsstamm zeigten, besonders in den ersten zehn Stunden. Das exponentielle Wachstum setzte in allen Schüttelkulturen nach circa vier Stunden ein und die stationäre Phase wurde nach zehn Stunden erreicht. Nach 24 Stunden konnte ein Absterben der Bakterien beobachtet werden. Einzig die Transposonmutante M254 zeigte bereits ein Absterben nach zehn Stunden.

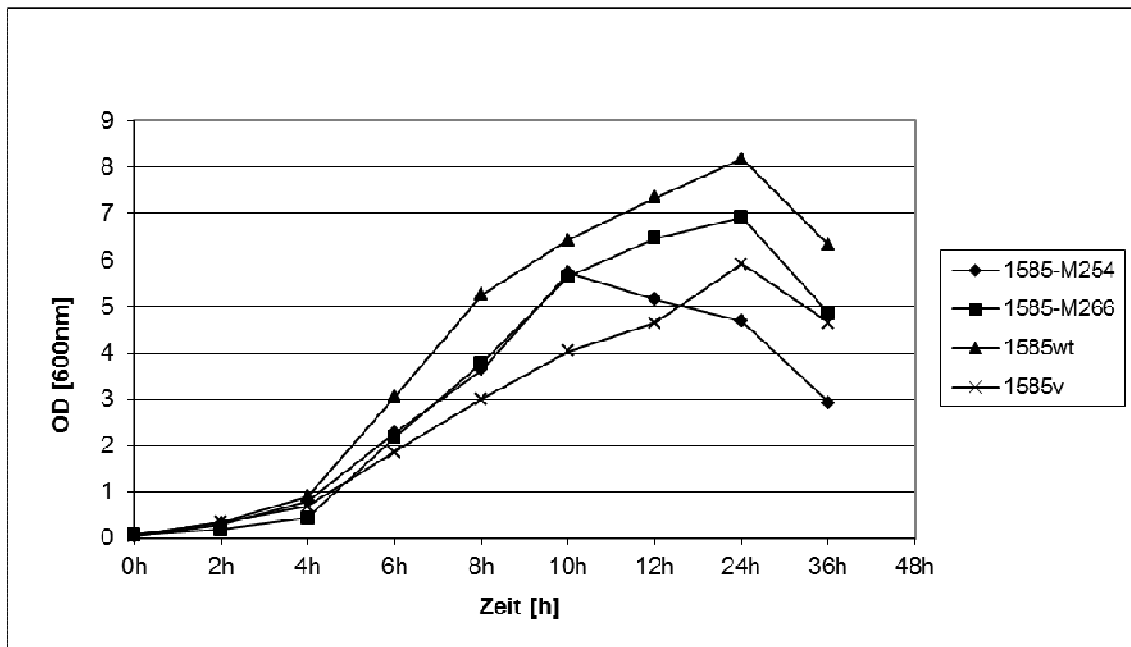
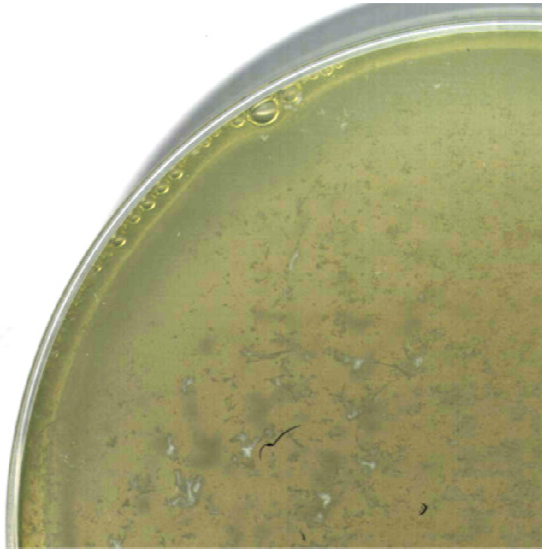


Abbildung 3-3: Analyse der Wachstumskurve der Mutanten 1585-M254 und 1585-M266 im Vergleich zum Wildtyp 1585 sowie dem Stamm *S. epidermidis* 1585v.

Die Bakterien wurden in TSB bei 37 °C unter ständiger Bewegung (200 rpm) kultiviert. An den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Die Grafik zeigt den Verlauf eines typischen Experiments.

3.3.2 Zellclusterbildung

Zur weiteren Charakterisierung der Biofilm-bildenden Transposonmutanten 1585-M266 und 1585-M254 wurden statische Kulturen in Nunclon Δ -Schalen (Durchmesser 9 cm) angezchtet. Als Vergleich wurden, wie schon bei der Kontrolle des Wachstumsverhaltens in Schüttelkulturen, der Ausgangsstamm 1585 und der stark Biofilm-positive Stamm 1585v mitgeführt. Ebenso wie der stark Biofilm-bildende Stamm 1585v zeigten auch die Transposonmutanten ein aggregatives Wachstum, welches sich in Form großer Zellcluster zeigte. Diese waren insbesondere bei der Mutante M254 zu beobachten. Des Weiteren zeigte sich, dass im Vergleich zum Biofilm-negativen Ausgangsstamm 1585 der gebildete Biofilm schwieriger von der Schalenoberfläche ablösbar war und eine zähere Struktur aufwies.



S. epidermidis 1585v



S. epidermidis 1585-M 254



S. epidermidis 1585



S. epidermidis 1585-M 266

Abbildung 3-4: Zellcluster-Bildung nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C in TSB-Medium in Nunc-Zellkulturschalen.

Nach Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellscrapers von der Oberfläche mobilisiert und die Zellcluster in den Kulturschalen eingescannt. Die Mutante 1585-M254 zeigt hier besonders deutlich sichtbare Zellklumpen im Vergleich zum Wildtyp.

3.4 Genetische Analyse der Transposonmutanten 1585-M254 und 1585-M266

Um zu klären, welche exakten genetischen Änderungen zum beobachteten Phänotyp einer verstärkten Biofilmbildung führten, sollten die Orte der Transposoninsertion in den Mutanten 1585-M254 und 1585-M266 identifiziert werden. Hierzu wurde eine *arbitrary-primed* PCR durchgeführt. Mit Hilfe der *arbitrary-PCR* lassen sich die flankierenden chromosomalen Sequenzen von Tn917-Insertionen in *S. epidermidis*-Mutanten schnell identifizieren (Knobloch et al. 2003). Da mittlerweile zwei *S. epidermidis* Genome vollständig sequenziert wurden, reichen bereits kurze Nukleotid-Sequenzen zur Identifizierung des Genortes aus. Es wurden sechs Tn917-spezifische Primer benutzt, die homolog zum 5'- und 3'-Ende des Transposons Tn917 sind, sowie drei *arbitrary*-Primer. Der erste Schritt der *arbitrary-PCR* wird bei niedrigen Temperaturen amplifiziert. Um unspezifische Bindungen der Tn917-Primer bei niedrigen Temperaturen zu verhindern, werden im zweiten Schritt Tn917-Primer verwendet, die distaler lokalisiert sind. Jede *arbitrary-PCR* wurde mehrfach wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der identifizierten Tn917-Insertion zu überprüfen.

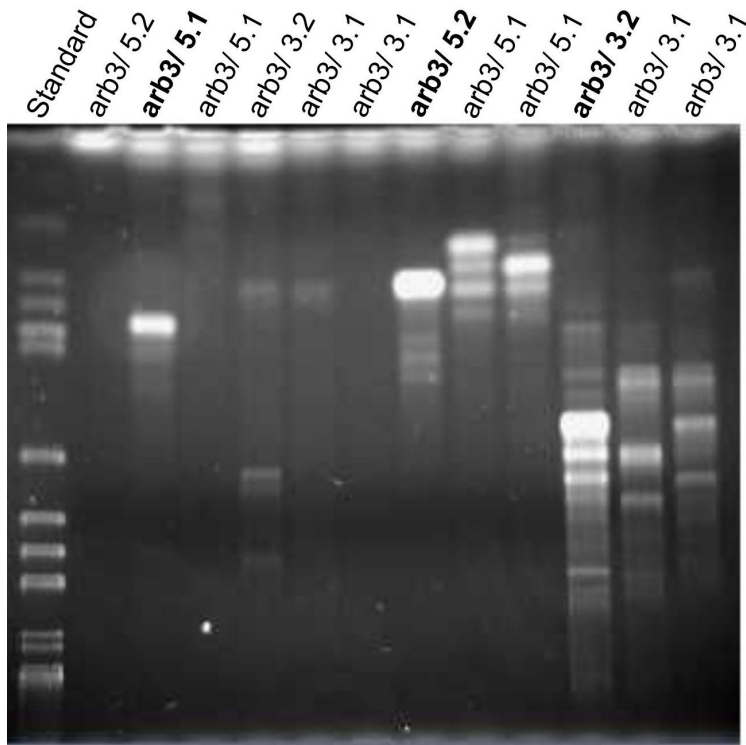


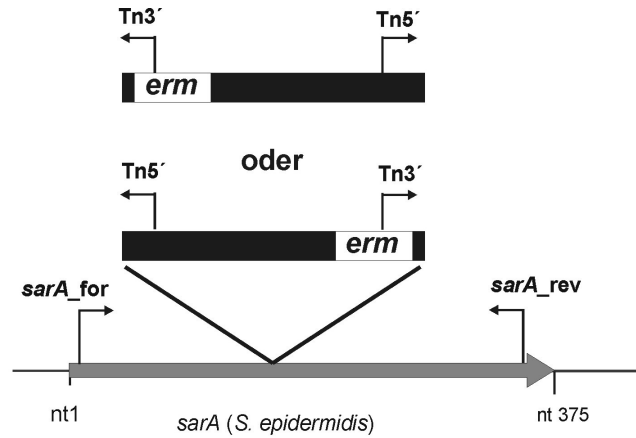
Abbildung 3-5: Gelelektrophoretische Auftrennung der mittels *arbitrary-primed* PCR amplifizierten Tn917-Insertionen in der Transposonmutante *S. epidermidis* 1585-M 254. Mit derselben Methode konnten die Tn917-Insertionen auch für die Transposonmutante *S. epidermidis* 1585-M266 identifiziert werden.

Die so gefundenen DNA-Amplifikate wurden aus 2 %igem Agarose-Gel ausgeschnitten, nach Protokoll aufgereinigt (Macherey Nagel Nucleo Spin II) und sequenziert. Die Analyse der ermittelten Sequenzen ergab, dass sich in beiden Mutanten jenseits des Übergangs von Tn917 in das *S. epidermidis*-Genom die Sequenz des *Staphylococcal accessory gene regulators A* (*sarA*) befand.

3.5 Analyse der Tn917-Insertion in der kodierenden Sequenz des *Staphylococcal accessory regulators sarA*

Das nächste Ziel war nun, die Insertion des Transposons in *sarA* zu bestätigen, die exakte Insertionsposition zu definieren sowie die Frage zu klären, in welcher Orientierung das Transposon in das *S. epidermidis*-Genom integriert wurde. Hierzu wurde eine PCR mit den Primern *sarA_for* und *sarA_rev* durchgeführt. Diese wurden kombiniert mit Primern, welche am 5'-Ende oder dem 3'-Ende von Tn917 Bindungsstellen und eine aus dem Transposon heraus gerichtete Leserichtung aufweisen (Abbildung 3-6 A). In Abhängigkeit davon, mit welcher Kombination von Primern ein Amplifikat erzeugt werden kann, lässt sich durch diesen Ansatz die Orientierung des Transposons im *S. epidermidis*-Genom festlegen. Tatsächlich konnte sowohl bei Mutante M254 als auch M266 Amplifikate dargestellt werden. Hieraus ergibt sich, dass die auf dem Transposon lokalisierte *ermB*-Resistenzkassette nahe am Startkodon von *sarA* lokalisiert ist (Abbildung 3-6 B).

A



B

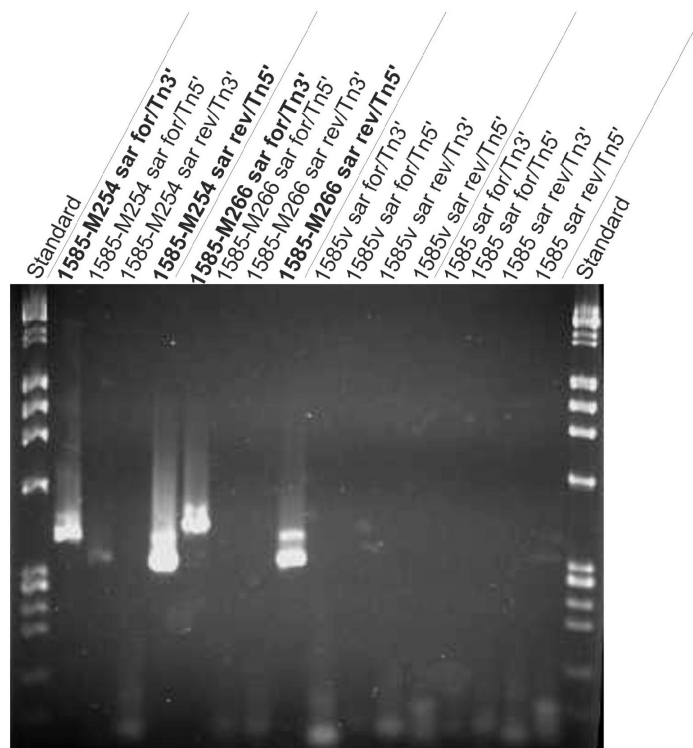


Abbildung 3-6: Tn917-Insertion in sarA

(A) Schematische Darstellung der sarA-kodierenden Sequenz und der möglichen Organisation der Tn917-Insertion. Grundsätzlich kann das Transposon in zwei unterschiedlichen Orientierungen in das Genom integriert worden sein. In Abhängigkeit hiervon weist das ermB-Gen in Richtung des Transkriptionsstarts von sarA oder von diesem weg. Unter Verwendung verschiedener Kombinationen der Primer sarA_for und sarA_rev sowie Tn5' und Tn3' war es möglich, die Organisation der Insertion näher zu beschreiben. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

(B) Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten nach Amplifikation mit den Primern sarA_for und sarA_rev. Lediglich mit den Primern sarA_for/Tn3' und sarA_rev/Tn5' konnten bei den Mutanten M234 und M266 Amplifikate erzeugt werden. Hieraus kann auf die Orientierung des Transposons im Genom rückgeschlossen werden. Durch Sequenzierung der Amplifikate erfolgte die exakte Bestimmung des Insertionsortes. Als Kontrolle wurde chromosomale DNA der Stämme *S. epidermidis* 1585 und *S. epidermidis* 1585v mitgeführt.

Die hierdurch erzeugten DNA-Amplifikate wurden nach Gelaufreinigung sequenziert und die Sequenz mittels BLASTn Analyse weiter untersucht. Die detaillierte Betrachtung der Sequenzierung zeigte, dass sowohl bei der Mutante 1585-M254 wie auch 1585-M266 die Tn917-Insertion an der Position des Nucleotids 160 der *sarA*-kodierenden Sequenz lokalisiert ist.

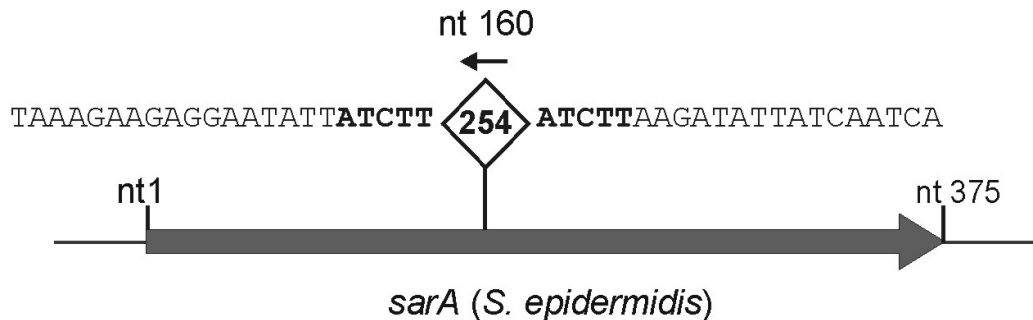


Abbildung 3-7: Schematische Darstellung der chromosomalen Tn917-Insertion in Mutante 1585-M254.

Die Sequenzanalyse zeigte, dass in dieser Mutante die Tn917-Insertion an Position des Nucleotids (nt) 160 in der kodierenden Sequenz von *sarA* (dicker Pfeil) lokalisiert ist. Die Transposoninsertion wird flankiert von *direct repeats* (fünf Nucleotide, fett). Der Pfeil über dem Transposonsymbol zeigt die Transkriptionsrichtung des auf Tn917 lokalisierten *ermB* an.

3.6 Veränderung des Musters der Oberflächenproteine

Es ist bekannt, dass *sarA* als globaler Regulator pleiotrope Effekte auf die Expression verschiedener *S. epidermidis*-Oberflächenproteine hat (Fluckiger et al. 1998). Daher sollte der Einfluss der *sarA*-Inaktivierung auf die Oberflächenproteinexpression von *S. epidermidis* 1585-M254 und 1585-M266 untersucht werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden Oberflächenproteinpräparationen durchgeführt und diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert. Hierbei wurden jeweils die transduzierten Stämme eingesetzt und der Ausgangsstamm *S. epidermidis* 1585 als Vergleich mitgeführt. Es zeigten sich beim Vergleich der Bandenmuster zwischen dem Wildtyp 1585 und den Mutanten 1585-M254 und 1585-M266 signifikante Unterschiede. So exprimierte der Wildtyp 1585 ein etwa 150 kDa Protein, welches bei den Mutanten jeweils nicht nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus fand sich bei 1585 eine etwa 115 kDa große Bande, die bei beiden Mutanten gleichermaßen in ihrer Intensität vermindert war. Demgegenüber konnte festgestellt werden, dass beide Mutanten ein etwa 60 kDa beziehungsweise 55 kDa großes Protein exprimierten, welches beim Wildtyp 1585 nicht oder nur sehr schwach gefunden werden konnte. Um die differentiell exprimierten Proteine zu identifizieren, wurden die jeweiligen Banden aus dem

Gel ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau unter Verwendung von Trypsin mittels Massenspektrometrie analysiert. Hierbei zeigte sich, dass es sich bei allen differentiell exprimierten Proteinen um das *S. epidermidis* Autolysin E (AtIE) handelt.

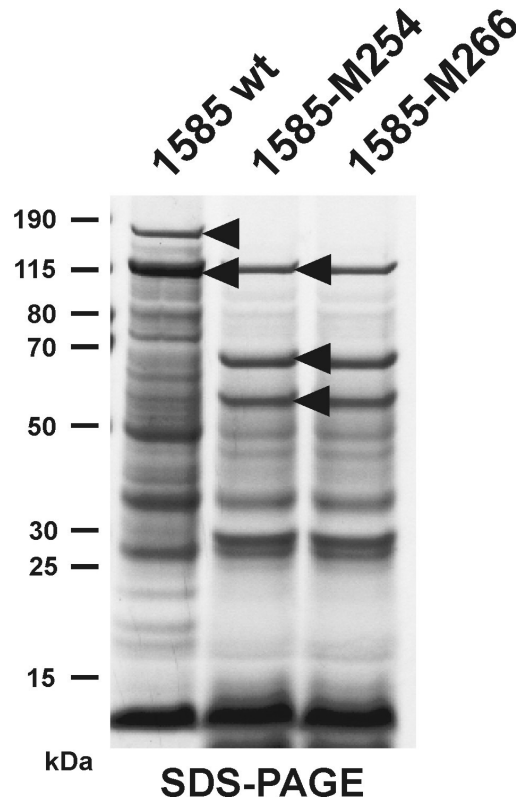


Abbildung 3-8: Analyse von Oberflächenproteinen der Stämme 1585, 1585-M254 und 1585-M266.

Gleiche Mengen einer Oberflächenproteinpräparation der Stämme 1585, 1585-M254 und 1585-M266 wurden auf einem 4 bis 12 % Bis-Tris Gradientengel aufgetrennt und nach Coomassie gefärbt. Die differentiell exprimierten Banden (schwarze Pfeilköpfe) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und nach tryptischen Verdau mittels ESI Massenspektrometrie identifiziert. Alle Proteine konnten eindeutig als das *S. epidermidis* Autolysin E (AtIE) identifiziert werden.

Die Ergebnisse der Oberflächenproteinanalyse zeigen, dass die Inaktivierung von *sarA* in den Mutanten 1585-M254 und 1585-M266 vor allem zu einer Veränderung der Isoformen-Muster des *S. epidermidis* Autolysins E führen.

3.7 Analyse der Protease-Aktivität der Transposonmutanten

In der Gelelektrophorese der Oberflächenproteine zeigten sich deutlich veränderte Banden bei den Transposonmutanten. Besonders augenfällig war eine starke Modifikation des Isoformenmusters von AtIE. Eine mögliche Ursache für dieses veränderte Profil könnte in einer verstärkten Proteaseexpression mit konsekutiver proteolytischer Prozessierung von AtIE

sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die verschiedenen Stämme mittels eines so genannten *Skim-Milk-Agar-Tests* untersucht. Bei diesem kann eine verstärkte Proteaseaktivität durch eine Zunahme einer hydrolytischen Zone um auf dem Agar inokulierte Bakterienkolonien abgeschätzt werden. In diesem Test zeigte sich, dass nach 72 Stunden Inkubation bei 37 °C die Stämme 1585-254 und -266 im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant vergrößerte Hydrolysezone aufwiesen. Diese Untersuchung zeigt, dass die Inaktivierung von *sarA* in den Transposonmutanten zu einer verstärkten Expression von Proteasen führt.

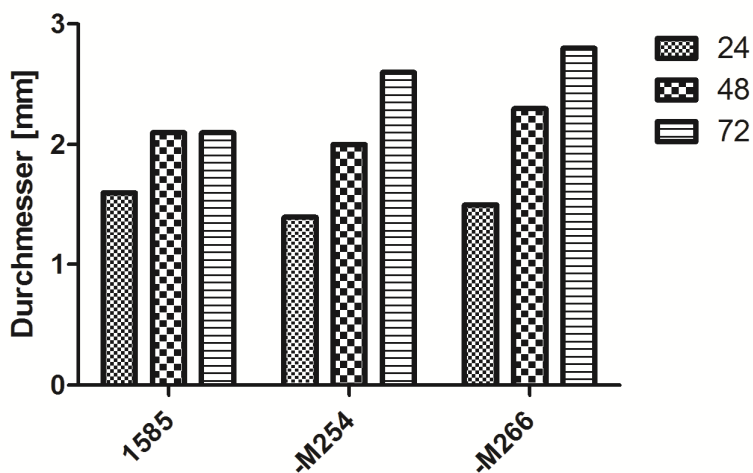


Abbildung 3-9: Hydrolysezonen in cm nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation.

Die Transposonmutanten und der Stamm 1585 wurden in TSB für 24 h vorinkubiert und dann mittels Filterplättchen auf *Skim-Milk-Agar* aufgebracht. Während der 72-stündigen Inkubation bei 30 °C wurden alle 24 Stunden die Hydrolysezonens Durchmesser gemessen.

3.8 Untersuchung der Embp-Expression in der Mutante 1585-M254

In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Embp in *S. epidermidis* 1585 zu einem Biofilm-positiven Phänotyp führt. Aus diesem Grund sollte geprüft werden, ob die Inaktivierung von *sarA* zu einer verstärkten Embp-Produktion führt. Um diese Frage zu untersuchen, wurde Embp zunächst in geometrisch verdünnten Oberflächenproteinpräparationen von *S. epidermidis* 1585 und 1585-M254 mittels eines Dot-Immuno-Assays unter Verwendung des Embp-spezifischen Kaninchenantisera anti-rEmb6599 (Christner et al. 2010) semiquantitativ dargestellt. Es zeigte sich, dass beim Stamm *S. epidermidis* 1585 nur bis zu einer Verdünnung von 1:2 ein als positiv zu betrachtendes Signal nachweisbar war. Im Gegensatz dazu war bei Mutante 1585-M254 bis

zu einer Verdünnung der Oberflächenproteine von 1:16 ein Signal detektierbar. Dies weist darauf hin, dass die Inaktivierung von *sarA* tatsächlich zu einer verstärkten Embp-Produktion führt.

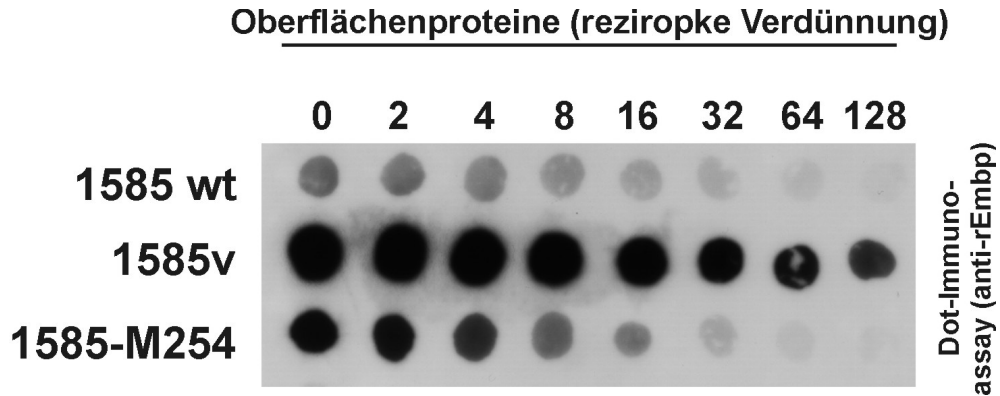


Abbildung 3-10: Nachweis einer Embp-Expression.

Zur Untersuchung der Embp-Expression wurden Oberflächenproteinpräparationen der Stämme 1585 und 1585-M254 geometrisch verdünnt und 10 µl der jeweiligen Verdünnung auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Die Membran wurde mit anti-rEmb2588 (1:10 000) inkubiert und gebundene Antikörper mit Peroxidase-markiertem anti-Kaninchen-IgG mittels Chemilumineszenz detektiert. Der Stamm 1585v, welcher Embp überexprimiert (Christner et al. 2010), diente als Positivkontrolle.

Um die verstärkte Embp-Expression in der Mutante 1585-M254 mit einem unabhängigen Verfahren zu überprüfen, wurde die *embp*-Expression in RNA-Präparationen der Stämme *S. epidermidis* 1585 und 1585-M254 mittels semiquantitativer *real-time*-PCR untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass in der exponentiellen Wachstumsphase *embp* in der *sarA* Mutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant um den Faktor 231,1 (Bereich 128 bis 294) heraufreguliert war. Auch am Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase fand sich in der Mutante noch eine *embp*-Heraufregulation um den Faktor 74,7 (Bereich 49,6 bis 108,9). Diese Untersuchungen machen deutlich, dass die verstärkte Embp-Produktion in der *sarA*-Mutante zumindest teilweise durch eine verstärkte *embp*-Transkription erklärt werden kann.

4 Diskussion

Staphylococcus epidermidis ist einer der bedeutendsten Keime im Rahmen Fremdkörper-assoziiierter Infektionen. Von überragender Bedeutung für die Entstehung einer *S. epidermidis*-Infektion ist die Fähigkeit des Erregers auf künstlichen Oberflächen sogenannte Biofilme zu bilden (Otto 2009). Tatsächlich konnte die Bildung dieser besonderen bakteriellen Wachstumsform auf *ex vivo* gewonnenen Implantaten elektronenmikroskopisch dargestellt werden (Peters et al. 1982). Zudem konnte durch die Untersuchung von definierten Mutanten in Tiermodellen gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur Biofilmbildung von entscheidender Bedeutung für die Virulenz des Erregers ist (Mack 1999; Vuong et al. 2004b). Umso erstaunlicher ist es, dass im klinischen Alltag häufig *S. epidermidis* aus Fremdmaterial-assoziierten Infektionen angezüchtet werden können, die unter *in-vitro*-Wachstumsbedingungen keinen Biofilm bilden.

Unter der Annahme, dass die Fähigkeit zur Biofilmbildung als entscheidender Faktor für die Entstehung einer *S. epidermidis*-Infektion zu betrachten ist, sollte vor dem Hintergrund dieser epidemiologischen Situation die Hypothese geprüft werden, dass bei diesen klinisch signifikanten, jedoch *in vitro* Biofilm-negativen Stämmen Mechanismen zur Biofilmbildung beitragen, die zwar möglicherweise *in vivo* exprimiert, jedoch *in vitro* supprimiert werden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine Transposonmutagenese des klinisch signifikanten, aber *in vitro* Biofilm-negativen *S. epidermidis*-Stamm 1585 durchgeführt. Es wurden Mutanten gesucht, die eine im Vergleich mit dem Wildtypstamm verstärkte Biofilmbildung aufweisen. Dass der Stamm 1585 potentiell in der Lage ist einen Biofilm zu bilden, wurde in vorrausgegangenen Untersuchungen bereits gezeigt. So war es durch Passage und Selektion adhärenter Zellen gelungen, eine Biofilm-positive Subpopulation dieses Stamms zu erzeugen. Bei dieser als 1585v bezeichneten Subpopulation beruht die Fähigkeit zur Biofilmbildung auf einer Überexpression des *extracellular matrix binding proteins* (Embp). Embp wird unter *in vitro* Bedingungen nicht exprimiert, was einen Biofilm-negativen Phänotyp trotz Nachweis des kodierenden Gens erklärt. Genetische Untersuchungen belegten, dass im Stamm 1585v die Überexpression von Embp auf eine größere chromosomale Umlagerung zurückzuführen ist, bei der Anteile des *embp*-Gens *in frame* mit dem Promotor des Gens *msrR* fusioniert wurden (Christner et al. 2010). Die bei *S. epidermidis* 1585v nachweisbare Embp-Expression kann demnach als artifiziell betrachtet werden, der Stamm zeigt aber prototypisch, dass die Induktion von *in vitro* stummen Genen potentiell Einfluss auf

die Biofilmbildung nehmen kann. Diese Induktion ist zum Beispiel durch die Expression positiver Regulatoren möglich, jedoch auch durch die verminderte Expression negativer Regulatoren.

Es ist zum Beispiel gut bekannt, dass der alternative Sigmafaktor σ^B als ein positiver Regulator die *S. epidermidis*-Biofilmbildung steuert (Knobloch et al. 2001; Knobloch et al. 2004). σ^B kontrolliert die Expression des *ica*-Operons durch Unterdrückung der Expression von *icaR* und dadurch die PIA-Synthese und Biofilmbildung bei *S. epidermidis* (Knobloch et al. 2004). Durch Ausschalten von σ^B kam es zu einem deutlichen Rückgang der PIA-Synthese und Biofilmbildung (Knobloch et al. 2004). Der hier gewählte Versuchsansatz macht die Identifizierung solcher positiver Regulatoren eher unwahrscheinlich, da das Prinzip der Transposonmutagenese ja gerade auf der Inaktivierung einzelner Gene beruht. Eine Möglichkeit positive Regulatoren durch die zufällige Insertion von beweglichen genetischen Elementen zu finden, wäre der Einsatz anderer Transposonmutagenesesysteme, die zum Beispiel zu einer Insertion konstitutiv aktiver Promotoren in das Chromosom einführen und hierüber stumme Gene exprimieren.

Tatsächlich gelang es aber, zwei Mutanten zu isolieren, welche im Biofilmassay einen Biofilm-positiven Phänotyp zeigten. Die genetische Charakterisierung der Tn917-Insertionsorte zeigte, dass die Transposoninsertionen in dem für den globalen Regulator *sarA* kodierenden Genort lokalisiert waren. Der Nachweis eines Biofilm-positiven Phänotyps nach *sarA*-Inaktivierung zeigt, dass es sich bei diesem Regulator im Stamm 1585 um einen negativen Regulator der *S. epidermidis*-Biofilmbildung handelt.

SarA ist ein globaler Regulator, welcher erstmals bei *S. aureus* beschrieben wurde. Zum Teil direkt durch Bindung an Promotorstrukturen, zum Teil indirekt durch Modulation des *agr*-Systems steuert *sarA* in *S. aureus* die Expression von verschiedenen Virulenzfaktoren wie Hämolysinen und zellwandassoziierten Proteinen (Cheung et al. 2004). Auch bei *S. epidermidis* konnte ein dem *sarA* bei *S. aureus* homologes Gen identifiziert werden (Fluckiger et al. 1998).

Der *sarA*-Locus bei *S. epidermidis* besteht aus drei überlappenden transkriptionellen Einheiten, die ihren Ursprung in der Expression von drei individuellen Promotoren P1 bis P3 haben (Cheung et al. 2008). P1 hat eine deutliche Homologie zu σ^B -abhängigen Promotoren, die üblicherweise bei vermehrtem Stress, zum Beispiel hohe Salzkonzentrationen, exprimiert werden. Die Expression von P1 ist bei *S. epidermidis* am stärksten in der postexponentiellen Wachstumsphase. P2 zeigt Ähnlichkeiten zum σ^A -abhängigen Promotor von *B. subtilis*. Für P3 fanden sich keine eindeutigen Sequenz-Homologien (Fluckiger et al. 1998).

Insgesamt besteht zwar eine 86 %ige Homologie des *sarA*-Gens von *S. epidermidis* zu *sarA* bei *S. aureus*, auffällig ist aber, dass die Promotor-Regionen bei *S. epidermidis* deutlich dichter liegen. Zudem ist in den außerhalb der kodierenden Sequenzen liegenden Genabschnitten nur noch eine 50 %ige Homologie zu *S. aureus* finden. Diese Differenzen können auf unterschiedliche Aktivierungsmöglichkeiten und Regulationsmechanismen bei *S. aureus* und *S. epidermidis* hindeuten (Fluckiger et al. 1998).

Bei *S. aureus* kontrolliert *sarA* durch Modulation der Expression des *accessory gene regulators* (*agr*) sowohl die Synthese extrazellulärer Proteine als auch die Synthese von Zellwand-assoziierten Proteinen. Inaktivierung von *agr* führt zu einer verminderten Produktion von Exoproteinen, wohingegen die Synthese einiger Oberflächenproteine heraufreguliert wird (Fluckiger et al. 1998). Bei *S. aureus* besteht der *agr*-Lokus aus fünf Genen, die sich aus zwei unterschiedlichen Transkriptionseinheiten - RNA II und RNA III - zusammensetzen. Die Transkription wird durch die Promotoren P2 und P3 vermittelt (Fluckiger et al. 1998). *SarA*-Genprodukte können direkt an den *agr*-Promotor binden und so die Synthese bestimmter Proteine durch Veränderung der Transkription vermitteln.

Ein *agr*-Homolog wurde auch bei *S. epidermidis* beschrieben, die Homologie zu *S. aureus* ist jedoch geringer als die *sarA*-Homologie. Es liegt aber nahe, dass eine ähnliche Interaktion zwischen *sarA* und *agr* wie bei *S. aureus* existiert (Fluckiger et al. 1998; Kong et al. 2006).

Eine Beteiligung von *sarA* an der Kontrolle der *S. epidermidis*-Biofilmbildung konnte bereits vor einiger Zeit dokumentiert werden. So zeigte sich, dass in einem *icaADBC*-positiven und PIA-produzierenden Stamm die Inaktivierung von *sarA* zu einer deutlichen Abnahme der PIA-Bildung und somit zu einer verminderten Biofilmbildung führt (Tormo et al. 2005).

In einem solchen genetischen Hintergrund ist *sarA* demnach ein positiver Regulator der Biofilmbildung. Diese Funktion wird direkt durch die Bindung an den *icaA*-Promotor vermittelt: Nach Bindung von *sarA* wird die *icaADBC*-Expression verstärkt, was zur Produktion großer PIA-Mengen und damit zur Biofilmbildung führt (Tormo et al. 2005).

Diese Befunde scheinen zunächst im Gegensatz zu den hier erhobenen Daten zu stehen, welche klar zeigen, dass die Inaktivierung von *sarA* in *S. epidermidis* 1585 zu einem Biofilm-positiven Phänotyp führt. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu verstehen, dass dieser Stamm *icaADBC*-negativ ist, also nicht zu einer PIA-abhängigen Form der *S. epidermidis*-Biofilmbildung fähig ist. Bei diesem Stamm können demnach ausschließlich PIA-unabhängige Mechanismen der Biofilmbildung aktiviert werden. Die hier vorgestellten Daten

zeigen, dass *sarA* als negativer Regulator solcher PIA-unabhängiger Mechanismen der *S. epidermidis*-Biofilmbildung fungiert.

In der Vergangenheit konnten verschiedene PIA-unabhängige Mechanismen der *S. epidermidis*-Biofilmbildung beschrieben werden. Diese Mechanismen beruhen auf der Expression von Zelloberflächenproteinen, die als interzelluläre Adhäsine fungieren und PIA somit funktionell substituieren. Das erste *S. epidermidis*-Protein mit Biofilm-induzierender Funktion ist das *accumulation associated protein* (Aap) (Hussain et al. 1997). Aap stellt sich im SDS-PAGE als 240 kDa großes Protein dar, welches in unterschiedlichen Isoformen auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Rohde et al. 2005; Banner et al. 2007). Bedeutsam ist, dass die bloße Expression von Aap nicht grundsätzlich zu einem Biofilm-positiven Phänotyp führt, sondern hierfür vielmehr eine proteolytische Aktivierung notwendig ist. Hierbei wird durch eine bislang nicht bekannte Protease die sogenannte A-Domäne des Proteins abgespalten. Die noch in Zellwand-gebundener Form verbleibende B-Domäne fungiert dann als interzelluläres Adhäsins und führt zur Zellaggregation und Biofilmbildung (Rohde et al. 2005). Aap ist in klinischen *S. epidermidis*-Isolaten weit verbreitet, etwa 80 % aller Stämme besitzen das für Aap kodierende Gen (Rohde et al. 2004; Rohde et al. 2007). Der Stamm *S. epidermidis* 1585, der in dieser Arbeit untersucht wurde, ist jedoch Aap-negativ (Christner et al. 2010). Somit kann der bei der Mutante 1585-M254 beobachtete, Biofilm-positive Phänotyp nicht auf einer veränderten Aap-Expression oder modifizierten Aap-Prozessierung beruhen.

Als weiteres Oberflächenprotein, welches Biofilm-induzierende Eigenschaften aufweist, konnte kürzlich das *extracellular matrix binding protein* Embp identifiziert werden (Christner et al. 2010). Embp ist mit einem errechneten Molekulargewicht von 1 MDa das größte Protein, das bei Staphylokokken gefunden werden kann (Reva und Tummeler 2008). Die bioinformatische Analyse des Proteins zeigt, dass Embp einen charakteristischen modularen Aufbau besitzt. Neben einem N-terminalen Exportsignal, welches für die extrazelluläre Lokalisation notwendig ist, finden sich sogenannte FIVAR (*Found in Various Architectures*)- und GA (*G-related albumin-binding*)-Module (Christner et al. 2010). Am C-Terminus ist eine putative Transmembrandomäne lokalisiert, welche vermutlich die Bindung des Proteins an die Zelloberfläche realisiert (Christner et al. 2010). Embp wurde zunächst durch seine Fibronectin-bindenden Eigenschaften identifiziert (Williams et al. 2002). Auf Grund dieses ging man zunächst davon aus, dass Embp vor allem in der frühen Phase der *S. epidermidis*-Biofilmbildung funktionelle Relevanz besitzen könnte. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Embp-vermittelte Bindung an Fibronectin notwendige Voraussetzung für die

Entstehung eines *S. epidermidis*-Biofilms auf Fibronektin-beschichteten Oberflächen ist (Christner et al. 2010). Neben der Bedeutung von Embp in der Phase der primären Bindung konnte zusätzlich auch eine Rolle bei der Biofilmmakkumulation dargestellt werden: Embp besitzt auch interzellulär adhäsive Eigenschaften (Christner et al. 2010). Das Embp-kodierende Gen ist in klinischen *S. epidermidis*-Isolaten weit verbreitet, es kann bei nahezu allen Stämmen nachgewiesen werden (Rohde et al. 2007). Auch ist Embp in *S. epidermidis* 1585 nachweisbar. Tatsächlich konnte in Vorarbeiten bereits gezeigt werden, dass die Überexpression dieses Gens in einer Biofilm-positiven Subpopulation von *S. epidermidis* 1585 direkt für die Ausbildung mehrschichtiger Zellaggregate verantwortlich ist (Christner et al. 2010). Aus diesem Grund war eine naheliegende Hypothese, dass Embp auch in der Biofilm-positiven Mutante 1585-M254 funktionell an der Biofilmbildung beteiligt sein könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Embp-Expression in der Mutante 1585-M254 mit der des Wildtyps 1585 verglichen. Mittels quantitativer RT-PCR ließ sich in der Tat bei der Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp hochregulierte Embp-Transkription finden. Dieser Befund konnte auch auf Proteinebene nachvollzogen werden. In einem Dot-Immunoassay zeigte sich, dass die Mutante große Embp-Mengen auf der Zelloberfläche trägt. Es erscheint daher möglich, dass Embp an der Biofilmbildung der Mutante 1585-M254 funktionell beteiligt sein könnte. Weitere Untersuchungen müssen nun dieser Frage nachgehen. Eine geeignete Methode, die funktionelle Relevanz für den Biofilm-positiven Phänotyp zu prüfen, wäre die Inaktivierung des Gens in der Mutante 1585-M254. Sollte diese Maßnahme zu einem Biofilm-negativen Phänotyp führen, so könnte dies als genetischer Beleg für die Relevanz von Embp bei der Biofilmbildung durch die Mutante 1585-M254 gewertet werden.

Der Befund einer transkriptionellen Überexpression von Embp in der Mutante 1585-M254 ist auch in einer weiteren Hinsicht für unser Verständnis der Biologie von Embp bedeutsam: Bislang war es nicht gelungen, *S. epidermidis*-Stämme zu finden, die unter *in vitro*-Kulturbedingungen Embp exprimieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig, dass die Expression des spezifischen Regulators *sarA* mit der Embp-Expression interferiert. Somit ist es erstmals gelungen, Einblick in die komplexe Regulation von Embp zu erhalten. Auch hier wird es zukünftig notwendig sein, die exakten Modalitäten dieser Regulation zu analysieren. Eine zentrale Frage ist hierbei vor allem, ob die Interferenz von *sarA* mit der Embp-Expression direkt, also durch Bindung des Regulators an den Promotor von Embp zustande kommt, oder ob weitere zwischengeschaltete Regulatoren hierfür verantwortlich sind.

In der Analyse der Zelloberflächen-assoziierten Proteine der Mutante 1585-M254 fanden sich neben der Hochregulation von Embp im Vergleich mit dem Wildtyp weitere differentiell exprimierte Proteine. Es zeigte sich bei den anschließenden Untersuchungen, dass es sich bei diesen Proteinen um Isoformen des Autolysin E (AtIE) von *S. epidermidis* handelt.

Bei *S. epidermidis* kommt dem Autolysin AtIE eine bedeutende Rolle im Zellwandstoffwechsel zu. Eine AtIE-Inaktivierung führt zu einer beinahe kompletten Aufhebung der bakteriellen Autolyse (Heilmann et al. 1997; Qin et al. 2007), so dass diesem neben dem Oberflächenprotein Aae (Heilmann et al. 2003), welches ebenfalls bakteriolytische Eigenschaften besitzt, eine große Bedeutung im Rahmen der Autolyse bei *S. epidermidis* zukommt.

AtIE gehört zusammen mit dem Autolysin AtlA von *S. aureus* zur Gruppe von Peptidoglycan (PGN)-Hydrolasen, denen eine entscheidende Rolle bei der Zersetzung bakterieller Zellwände zukommt. AtIE besteht aus einem Signal-Peptid, einem Pro-Peptid, drei Wiederholungen (R1 bis R3) und den bakteriolytisch aktiven Domänen. Zu den bakteriolytisch aktiven Domänen gehört eine 60 kDa großen Amidase AmiE, die die Amidbindung zwischen N-Acetylmuramyl-Säuren und L-Alanin spaltet, und eine 52 kDa große Glucosaminidase. Nach der Freisetzung des Vorläufer-Proteins wird AtIE extrazellulär proteolytisch prozessiert. Hierbei entstehen dann die zwei Isoformen, die die Amidase- oder die Glucosaminidase-Aktivität aufweisen. Neben der katalytischen Domäne umfasst die Amidase-Domäne die *repeat*-Domänen R1 und R2, die für die Anheftung des Enzyms an die Zellwand wichtig sind, selber aber keine lytische Aktivität besitzen (Heilmann et al. 1997; Zoll et al. 2010).

In den in dieser Arbeit beschriebenen Transposonmutanten ließen sich im SDS-PAGE veränderte Proteinbandenmuster von AtIE darstellen. Eine Ursache hierfür könnte eine in den Mutanten veränderte Aktivität von *S. epidermidis*-Proteasen sein. Tatsächlich ließ sich in der Analyse mittels *Skim-Milk-Agar-Test* bestätigen, dass die *sarA*-Mutanten verstärkt Proteasen exprimieren. Diese verstärkte Proteaseexpression ist vermutlich Ursache für die veränderte Prozessierung von AtIE. Die hieraus resultierende verstärkte autolytische Aktivität könnte wichtige Bedeutung für die Biofilmbildung der *sarA*-Mutanten haben, da gut bekannt ist, dass durch den Untergang bakterieller Zellen vermehrt DNA in den extrazellulären Raum freigesetzt wird (sogenannte eDNA). Eindeutige Belege hierfür finden sich auch bei *S. aureus*: Auch hier erfolgt die eDNA-Freisetzung durch bakterielle Autolyse durch Aktivität eines Holin-Antiholin-Systems (Rice et al. 2007).

Von großem Interesse ist, dass die eDNA-Freisetzung schon bei vielen Mikroorganismen im Zusammenhang mit Zellaggregationen (Allesen-Holm et al. 2006; Mulcahy et al. 2008) und Biofilmbildung beschrieben wurde, so auch im Rahmen der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* (Bayles 2007). Bislang wurde eDNA-Bildung jedoch nur bei PIA-positiven Stämmen untersucht. In diesem genetischen Hintergrund wurde gezeigt, dass DNase I Biofilmbildung zwar inhibieren kann, jedoch nicht in der Lage ist, einen gefestigten Biofilm zu zerstören (Izano et al. 2008; Qin et al. 2007). Deswegen wurde die Vermutung aufgestellt, dass eDNA zwar in frühen Phasen der Biofilmbildung, wie der primären Anheftung, eine Bedeutung zukommt, dass sie jedoch nicht zur Stabilisierung des Biofilms beiträgt (Izano et al. 2008). In Folgeexperimenten (nicht Bestandteil dieser Arbeit) konnte jedoch gezeigt werden, dass bei der *S. epidermidis*-Mutante 1585 Δ *sarA*, in der *sarA* inaktiviert ist, DNase I nicht nur die Biofilmbildung verhindern kann, sondern auch in der Lage ist, einen bereits etablierten Biofilm aufzulösen (Christner et al. 2010). Dieses Ergebnis zeigt, dass neben der Überexpression von Embp die Autolyse-assoziierte Freisetzung von eDNA funktionell an der Entstehung des Biofilms der Mutanten 1585-M254 und 1585-M266 beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Einblicke in die Bedeutung von *sarA* als wichtigem Regulator der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* gewonnen werden. *SarA* scheint hierbei eine duale Rolle zu erfüllen, indem einerseits die PIA-abhängige Biofilmbildung positiv, die PIA-unabhängige, Embp-vermittelte Biofilmbildung negativ reguliert wird. Damit zeigt diese Arbeit erstmalig die Existenz eines molekularen „Schalters“, der es *S. epidermidis* ermöglicht, die verschiedenen Mechanismen der Biofilmbildung subtil zu regulieren. Die durch PIA oder Embp vermittelten Biofilme weisen charakteristische ultrastrukturelle und biomechanische Eigenschaften auf (Schommer et al. 2011). Durch *sarA* kann es *S. epidermidis* gelingen, die Form und Struktur des jeweils ausgebildeten Biofilms den jeweiligen Umweltbedingungen anzupassen. Bedenkt man die zentrale Bedeutung der *S. epidermidis*-Biofilmbildung, nicht nur für die Entstehung einer Fremdmaterial-assoziierten Infektion, sondern auch für die Besiedlung humaner Schleimhautoberflächen, so wird klar, dass *sarA* eine überragende grundsätzliche Rolle für die Biologie von *S. epidermidis* besitzt. Die Tatsache, dass *S. epidermidis* verschiedene Mechanismen zu Ausbildung eines Biofilms nutzen kann, macht die Entwicklung eines monovalenten Impfstoffes praktisch unmöglich. Als alternative Strategie zur Bekämpfung Biofilm-assoziiierter *S. epidermidis*-Infektionen kommt daher die Interferenz mit den Regulatoren der Biofilmbildung in Frage. Die vorliegende Arbeit ist ein

wichtiger Beitrag für zukünftige Entwicklungen in diese Richtung, denn es zeigt sich erstmalig, dass *sarA* eine zentrale Rolle bei den adaptiven Vorgängen von *S. epidermidis* besitzt und daher eine interessante Zielstruktur für therapeutische Prinzipien darstellen könnte. Es besteht die Hoffnung, dass durch tiefer gehende Analyse der Funktion von *sarA*, Embp und eDNA bei der *S. epidermidis*-Biofilmbildung in der Zukunft neue Behandlungsmöglichkeiten für das Management Fremdmaterial-assoziiertes Infektionen resultieren.

5 Zusammenfassung

Biofilmbildung ist einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *S. epidermidis* im Zusammenhang mit Fremdkörper-assoziierten Infektionen. Paradoxe Weise finden sich jedoch im klinischen Alltag häufig *S. epidermidis*-Isolate aus Fremdmaterial-assoziierten Infektionen, die *in vitro* keinen Biofilm bilden.

In dieser Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob bei diesen Stämmen Mechanismen der Biofilmbildung *in vivo* exprimiert, *in vitro* jedoch supprimiert werden.

Durch Transposonmutagenese des Biofilm-negativen Stammes *S. epidermidis* 1585 konnten Biofilm-positive Mutanten gefunden werden. Dies bestätigt die Ausgangshypothese dieser Arbeit, die davon ausgeht, dass genetische Elemente die Ausbildung eines Biofilms *in vitro* unterdrücken. Durch weiterführende genetische Analyse konnte gezeigt werden, dass zwei der gefundenen Mutanten eine Tn917-Insertion in dem übergeordneten Virulenzregulator *sarA* aufwiesen. Zudem konnte hier gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *sarA* zu einer Überexpression des interzellulären Adhäsins Embp führt. Zusätzlich kommt es zu einer verstärkten proteolytischen Prozessierung des Autolysins E (AtIE), wodurch dieses funktionell aktiviert wird und zu einer vermehrten Freisetzung von extrazellulärer DNA führt. In der vorliegenden Arbeit konnten neue Einblicke in die Bedeutung von *sarA* als wichtigem Regulator der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* gewonnen werden. Die Ergebnisse weisen dem schon lange bekannten Regulator *sarA* eine völlig neue und bislang nicht beschriebene Funktion zu. Das vertiefte Verständnis des regulatorischen Netzwerkes, in welchem die funktionell an der *S. epidermidis*-Biofilmbildung beteiligten Oberflächenstrukturen kontrolliert exprimiert werden, kann zukünftig zu neuen Strategien in der Bekämpfung Biofilm-assoziiertes *S. epidermidis*-Infektionen führen.

6 Literaturverzeichnis

- Allesen-Holm, M.; Barken, K. B.; Yang, L.; Klausen, M.; Webb, J. S.; Kjelleberg, S. et al. (2006): A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. In: *Mol Microbiol.* 59 (4), S. 1114–1128.
- Archer, G. L.; Climo, M. W. (1994): Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci. In: *Antimicrob Agents Chemoth.* 38 (10), S. 2231–2237.
- Arciola, C. R.; Baldassarri, L.; Montanaro, L. (2001): Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. In: *J Clin Microbiol.* 39 (6), S. 2151–2156.
- Arciola, C. R.; Baldassarri, L.; Montanaro, L. (2002): In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (*ica*) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. In: *J Biomed Mater Res.* 59 (3), S. 557–562.
- Baddour, L. M.; Barker, L. P.; Christensen, G. D.; Parisi, J. T.; Simpson, W. A. (1990): Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* in infection of transvenous endocardial pacemaker electrodes. In: *J Clin Microbiol.* 28 (4), S. 676–679.
- Banner, MiriamA; Cunniffe, JohnG; Macintosh, RobinL; Foster, TimothyJ; Rohde, Holger; Mack, Dietrich et al. (2007): Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. In: *J Bacteriol* 189 (7), S. 2793–2804.
- Bayles, KennethW (2007): The biological role of death and lysis in biofilm development. In: *Nat Rev Microbiol* 5 (9), S. 721–726.
- Bayston, R.; Penny, S. R. (1972): Excessive production of mucoid substance in staphylococcus SIIA: a possible factor in colonisation of Holter shunts. In: *Dev Med Child Neurol Supp.* (27), S. 25–28.
- Beekmann, S. E.; Diekema, D. J.; Doern, G. V. (2005): Determining the clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. In: *Infect Control Hosp Epidemiol.* 26 (6), S. 559–566.
- Begun, J.; Gaiani, J. M.; Rohde, H.; Mack, D.; Calderwood, S. B.; Ausubel, F. M.; Sifri, C. D. (2007): Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. In: *PLoS Pathog.* 4 (3), S. e57.

- Bergey, David H (2001): Bergeys manual of systematic bacteriology. Volume 1, S. 163. 2. ed. New York, NY: Springer.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic Acids Res.* 7 (6), S. 1513–1523.
- Bowden, M. G.; Visai, L.; Longshaw, C. M.; Holland, K. T.; Speziale, P.; Hook, M. (2002): Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? In: *J Biol Chem.* 277 (45), S. 43017–43023.
- CDC (1999): National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report. Data Summary from January 1990 - May 1999, Issued June 1999. In: *Am J Infect Control* 27, S. 520–532.
- Ceri, H.; Olson, M. E.; Stremick, C.; Read R. R.; Morck, D.; Buret A. (1999): The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. In: *J Clin Microbiol.* 37 (6), S. 1771–1776.
- Chaieb, K.; Mahdouani, K.; Bakhrouf, A. (2005): Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. In: *J Hosp Infect.* 61 (3), S. 225–230.
- Cheung, A. L.; Bayer, A. S.; Zhang, G.; Gresham, H.; Xiong, Y. -Q (2004): Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. In: *FEMS Immunol Med Microbiol.* 40 (1), S. 1–9.
- Cheung, A. L.; Nishina, K. A.; Trottonda, M. P.; Tamber, S. (2008): The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. In: *Int J Biochem Cell Biol.* 40 (3), S. 355–361.
- Christensen, G. D.; Baddour, L. M.; Simpson, W. A. (1987): Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production in vitro and in vivo. In: *Infect Immun* 55 (12), S. 2870–2877.
- Christensen, G. D.; Simpson, W. A.; Bisno, A. L.; Beachey, E. H. (1982): Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. In: *Infect Immun* 37 (1), S. 318–326.
- Christensen, G. D.; Simpson, W. A.; Younger, J. J.; Baddour, L. M.; Barrett, F. F.; Melton, D. M.; Beachey, E. H. (1985): Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. In: *J Clin Microbiol.* 22 (6), S. 996–1006.

- Christner, M.; Franke, G. C.; Schommer, N. N.; Wendt, U.; Wegert, K.; Pehle, P. et al. (2010): The giant extracellular matrix-binding-protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. In: *Mol Microbiol.* 75 (1), S. 187–207.
- Conlon, K. M.; Humphreys, H.; O'Gara, J. P. (2002a): icaR Encodes a Transcriptional Repressor Involved in Environmental Regulation of ica Operon Expression and Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Bacteriol.* 184 (16), S. 4400–4408.
- Conlon, K. M.; Humphreys, H.; O'Gara, J. P. (2002b): Regulation of icaR gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 216 (2), S. 171–177.
- Conlon, K. M.; Humphreys, H.; O'Gara, J. P. (2004): Inactivations of rsbU and sarA by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Bacteriol.* 186 (18), S. 6208–6219.
- Costa, S. F.; Barone, A. A.; Miceli, M. H.; van der Heijden, I. M.; Soares, R. E.; Levin, A. S.; Anaissie, E. J. (2006): Colonization and molecular epidemiology of coagulase-negative *Staphylococcal* bacteremia in cancer patients: a pilot study. In: *Am J Infect Control* 34 (1), S. 36–40.
- Cottonaro, C. N.; Roohk, H. V.; Shimizu, G.; Sperling, D. R. (1981): Quantification and characterization of competitive protein binding to polymers. In: *Trans Am Soc Artif Intern Organs* (27), S. 391–395.
- Cramton, S. E.; Gerke, C.; Schnell, N. F.; Nichols, W. W.; Götz, F. (1999): The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. In: *Infect Immun* 67 (10), S. 5427–5433.
- Cramton, S. E.; Ulrich, M.; Götz, F.; Döring, G. (2001): Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. In: *Infect Immun* 69 (6), S. 4079–4085.
- Darouiche, R. O. (2004): Treatment of infections associated with surgical implants. In: *N Engl J Med* 350 (14), S. 1422–1429.
- Deighton, M.; Borland, R. (1993): Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. In: *Infect Immun* 61 (10), S. 4473–4479.

- Dickinson, G. M.; Bisno, A. L. (1989): Infections Associated with Indwelling Devices: Concepts of Pathogenesis; Infections Associated with Intravascular Devices. In: *Antimicrob Agents Chermother.* 33 (5), S. 597–601.
- Diekema, D. J.; Pfaller, M. A.; Schmitz, F. J.; Smayevsky, J.; Bell, J.; Jones, R. N.; Beach, M. and the SENTRY Participants Group (2001): Survey of Infections Due to Staphylococcus Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. In: *Clinical Infectious Diseases* 32 (2), S. 114–132.
- Dobinsky, S.; Mack, D. (2001): Efficient RNA isolation method for analysis of transcription in sessile Staphylococcus epidermidis biofilm cultures. In: *Methods Enzymol.* (336), S. 255–262.
- Donlan, R. M.; Costerton, J. W. (2002): Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. In: *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2), S. 167–193.
- Eiff, C. von; Peters, G.; Heilmann, C. (2002): Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. In: *Lancet Infect Dis* 2, S. 677–685.
- Fey, P. D.; Ulphani, J. S.; Götz, F.; Heilmann, C.; Mack, D.; Rupp, M. E. (1999): Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in Staphylococcus epidermidis. In: *J Infect Dis.* 179 (6), S. 1561–1564.
- Fitzpatrick, F.; Humphreys, H.; Smyth, E.; Kennedy, C. A.; O'Gara, J. P. (2002): Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of Staphylococcus epidermidis. In: *J Hosp Infect.* 52 (3), S. 212–218.
- Fluckiger, U.; Wolz, C.; Cheung, A. L. (1998): Characterization of a sar Homolog of Staphylococcus epidermidis. In: *Infect Immun* 66 (6), S. 2871–2878.
- Foster, T. J. (2005): Immune evasion by staphylococci. In: *Nat Rev Microbiol.* 3 (12), S. 948–958.
- Foster, T. J.; Höök, M. (1998): Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. In: *Trends in Microbiology* 6 (12), S. 484–488.
- Frebourg, N. B.; Lefebvre, S.; Baert, S.; Lemeland, J. F. (2000): PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating Staphylococcus epidermidis strains. In: *J Clin Microbiol.* 38 (2), S. 877–880.

- Gelosia, A.; Baldassarri, L.; Deighton, M.; Nguyen, T. van (2001): Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. In: *Clin Microbiol Infect.* 7 (4), S. 193–199.
- George, R.; Leibrock, L.; Epstein, M. (1979): Long-term analysis of cerebrospinal fluid shunt infections. A 25-year experience. In: *J Neurosurg.* 51 (6), S. 804–811.
- Götz, F.; Bannerman, T. L.; Schleifer, K. H. (2004): The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer und Erko Stackebrandt (Hg.): *The Prokaryotes. Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria.* New York, NY: Springer, S. 5–75.
- Hall-Stoodley, L.; Costerton, J. W.; Stoodley, P. (2004): Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. In: *Nat Rev Microbiol.* 2 (2), S. 95–108.
- Handke, L. D.; Conlon, K. M.; Slater, S. R.; Elbaruni, S.; Fitzpatrick, F.; Humphreys, H. et al. (2004): Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* isolates. In: *J Med Microbiol.* 53 (5), S. 367–374.
- Hartford, O.; O'Brien, L.; Schofield, K.; Wells, J.; Foster, T. J. (2001): The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. In: *Microbiology* 147 (9), S. 2545–2552.
- Heilmann, C.; Hussain, M.; Peters, G.; Götz, F. (1997): Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. In: *Mol Microbiol.* 24 (5), S. 1013–1024.
- Heilmann, C.; Schweitzer, O.; Gerke, C.; Vanittanakom, N.; Mack, D.; Götz, F. (1996): Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. In: *Mol Microbiol.* 20 (5), S. 1083–1091.
- Heilmann, Christine; Thumm, Gunther; Chhatwal, GursharanS; Hartleib, Jorg; Uekotter, Andreas; Peters, Georg (2003): Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. In: *Microbiology* 149 (Pt 10), S. 2769–2778.
- Herwaldt, L. A.; Hollis, R. J.; Boyken, L. D.; Pfaller, M. A. (1992): Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci isolated from immunocompromised patients. In: *Infect Control Hosp Epidemiol.* 13 (2), S. 86–92, zuletzt geprüft am 14.01.2009.

- Hogt, A. H.; Dankert, J.; de Vries J. A.; Feijen, J. (1983): Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. In: *J Gen Microbiol.* 129 (9), S. 2959-2568.
- Hussain, M.; Heilmann, C.; Peters, G.; Hermann, M. (2001): Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. In: *Microb Pathog.* 31 (6), S. 261–270.
- Hussain, M.; Herrmann, M.; Eiff, C. von; Perdreau-Remington, F.; Peters, G. (1997): A 140-Kilodalton Extracellular Protein Is Essential for the Accumulation of *Staphylococcus epidermidis* Strains on Surfaces. In: *Infect Immun* 65 (2), S. 519–524.
- Hussain, M.; Wilcox, M. H.; White, P. J. (1993): The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. In: *FEMS Microbiol Rev.* 10 (3-4), S. 191–207.
- Hussain, M.; Wilcox, M. H.; White, P. J.; Faulkner, M. K.; Spencer, R. C. (1992): Importance of medium and atmosphere type to both slime production and adherence by coagulase-negative staphylococci. In: *J Hosp Infect.* 20 (3), S. 173–184.
- Izano, EraA; Amarante, MatthewA; Kher, WilliamB; Kaplan, JeffreyB (2008): Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. In: *Appl Environ Microbiol* 74 (2), S. 470–476.
- Jäger, S.; Mack, D.; Rohde, H.; Horstkotte, M. A.; Knobloch, Johannes K. -M (2005): Disintegration of *Staphylococcus epidermidis* biofilms under glucose-limiting conditions depends on the activity of the alternative sigma factor sigmaB. In: *Appl Environ Microbiol.* 71 (9), S. 5577–5581.
- Jordan, P. A.; Iravani, A.; Richard, G. A.; Baer, H. (1980): Urinary tract infections caused by *Staphylococcus saprophyticus*. In: *J Infect Dis.* 142 (4), S. 510–515.
- Kaplan, J. B.; Velliyagounder, K.; Ragunath, C.; Rohde, H.; Mack, D.; Knobloch, J. K. M.; Ramasubbu, N. (2004): Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. In: *J Bacteriol.* 186 (24), S. 8213–8220.
- Karchmer, A. W.; Archer, G. L.; Dismukes, W. E. (1983): *Staphylococcus epidermidis* causing prosthetic valve endocarditis: microbiologic and clinical observations as guides to therapy. In: *Ann Intern Med.* 98 (4), S. 447–455.

- Klingenberg, C.; Ronnestad, A.; Anderson, A. S.; Abrahamsen, T. G.; Zorman, J.; Villaruz, A. et al. (2007): Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. In: *Clin Microbiol Infect.* 13 (11), S. 1100–1111.
- Kloos, Wesley E. (1986): Ecology of human skin. In: *Mardh, P. A.; Schleifer, K. H. (Hrsg.): Coagulase-negative Staphylococci, Almquist & Wiksell, Stockholm, S. 37.*
- Kloos, Wesley E.; Bannerman, Tammy L. (1994): Update on Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci. In: *Clinical Microbiology Reviews* 7 (1), S. 117–140.
- Kloos, Wesley E.; Musselwhite, Margaret S. (1975): Distribution and Persistence of Staphylococcus and Micrococcus Species and Other Aerobic Bacteria on Human Skin. In: *Applied Microbiology* 30 (3), S. 381–395.
- Klug, D.; Wallet, F.; Kacet, S.; Courcol, R. J. (2003): Involvement of adherence and adhesion Staphylococcus epidermidis genes in pacemaker lead-associated infections. In: *J Clin Microbiol.* 41 (7), S. 3348–3350.
- Knobloch, J. K. M.; Bartscht, K.; Sabottke, A.; Rohde, H.; Feucht, H. H.; Mack, D. (2001): Biofilm Formation by Staphylococcus epidermidis Depends on Functional RsbU, an Activator of the sigB Operon: Differential Activation Mechanisms Due to Ethanol and Salt Stress. In: *J Bacteriol.* 183 (8), S. 2624–2633.
- Knobloch, Johannes K. -M; Horstkotte, M. A.; Rohde, H.; Kaulfers, P. M.; Mack, D. (2002a): Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of Staphylococcus epidermidis. In: *J Antimicrob Chemother.* 49 (4), S. 683–687.
- Knobloch, Johannes K. -M; Jäger, S.; Horstkotte, M. A.; Rohde, H.; Mack, D. (2004): RsbU-dependent regulation of Staphylococcus epidermidis biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene icaR. In: *Infect Immun* 72 (7), S. 3838–3848.
- Knobloch, Johannes K. -M; Osten, H. von; Horstkotte, M. A.; Rohde, H.; Mack, D. (2002b): Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative Staphylococcus epidermidis. In: *Med Microbiol Immunol* (191), S. 107–114.
- Knobloch, Johannes K.-M; Nedelmann, Max; Kiel, Kathrin; Bartscht, Katrin; Horstkotte, Matthias A; Dobinsky, Sabine et al. (2003): Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in Staphylococcus epidermidis: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. In: *Appl Environ Microbiol* 69 (10), S. 5812–5818.

- Kong, K. F.; Vuong, C.; Otto, M. (2006): Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection. In: *Int J Med Microbiol.* 296 (2-3), S. 133–139.
- Kozitskaya, S.; Olson, M. E.; Fey, P. D.; Witte, W.; Ohlsen, K.; Ziebuhr, W. (2005): Clonal analysis of Staphylococcus epidermidis isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. In: *J Clin Microbiol.* 43 (9), S. 4751–4757.
- Kristian, S. A.; Birkenstock, T. A.; Sauder, U.; Mack, D.; Götz, F.; Landmann, R. (2008): Biofilm formation induces C3a release and protects Staphylococcus epidermidis from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. In: *J Infect Dis.* 197 (7), S. 1028–1035.
- Kropec, A.; Maira-Litran, T.; Jefferson, K. K.; Grout, M.; Cramton, S. E.; Götz, F. et al. (2005): Poly-N-acetylglucosamine production in Staphylococcus aureus is essential for virulence in murine models of systematic infection. In: *Infect Immun* 73 (10), S. 6868–6876.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Li, H.; Xu, L.; Wang, J.; Wen, Y.; Vuong, C.; Otto, M.; Gao, Q. (2005): Conversion of Staphylococcus epidermidis strains from commensal to invasive by expression of the ica locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. In: *Infect Immun* 73 (5), S. 3188–3191.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCT Method. In: *Methods* 25 (4), S. 402–408.
- Ludwicka, A.; Jansen, B.; Wadström, T.; Pulverer, G. (1984): Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. In: *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 256 (4), S. 479–489.
- Mack, D. (1999): Molecular mechanisms of Staphylococcus epidermidis biofilm formation. In: *J Hosp Infect* 43, S. S113-25.
- Mack, D.; Davies, A. P.; Harris, L. G.; Rohde, H.; Horstkotte, M. A.; Knobloch, J. K. M. (2007): Microbial interactions in Staphylococcus epidermidis biofilms. In: *Anal Bioanal Chem.*, S. 399–408.
- Mack, D.; Davies, Angharad P.; Llinos, Harris G.; Jeeves, Rose; Pascoe, Ben; Rohde, Holger; Wilkinson, Thomas S. (2012): Staphylococcus epidermidis in biomaterial-associated infections. In: *in Druck*.

- Mack, D.; Fischer, W.; Krokotsch, A.; Leopold, K.; Hartmann, R.; Egge, H.; Laufs, R. (1996): The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear 1,6-beta-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. In: *J Bacteriol.* 178 (1), S. 175–183.
- Mack, D.; Horstkotte, M. A.; Rohde, H.; Knobloch, J. K. M. (2005): Coagulase-Negative Staphylococci. In: J. L. Pace, M. E. Rupp und R. G. Finch (Hg.): *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. London: CRC Press, S. 109–153.
- Mack, D.; Rohde, H.; Dobinsky, S.; Riedewald, J.; Nedelmann, M.; Knobloch, J. K. M. et al. (2000): Identification of Three Essential Regulatory Gene Loci Governing Expression of *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin and Biofilm Formation. In: *Infect Immun* 68 (7), S. 3799–3807.
- Mack, D.; Rohde, H.; Harris, L. G.; Davies, A. P.; Horstkotte, M. A.; Knobloch, J. K. M. (2006): Biofilm formation in medical device-related infection. In: *Int J Artif Organs* 29 (4), S. 343–359.
- Mack, D.; Siemmsen, N.; Laufs, R. (1992): Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. In: *Infect Immun* 60 (5), S. 2048–2057.
- Maira-Litran, T.; Kropec, A.; Goldmann, D. A.; Pier, G. B. (2004): Biologic properties and vaccine potential of the staphylococcal poly-N-acetyl glucosamine surface polysaccharide. In: *Vaccine* 22 (7), S. 872–879.
- Maira-Litran, T.; Kropec, A.; Goldmann, D. A.; Pier, G. B. (2005): Comparative opsonic and protective activities of *Staphylococcus aureus* conjugate vaccines containing native or deacylated Staphylococcal Poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. In: *Infect Immun* 73 (10), S. 6752–6762.
- McKenney, D.; Pouliot, K.; Wang, Y.; Murthy, V.; Ulrich, M.; Döring, G. et al. (2000): Vaccine potential of poly-1-6-beta-D-N-succinylglucosamine, an immunoprotective surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Biotechnol.* 83 (1-2), S. 37–44.
- Miyamoto, H.; Imamura, K.; Kojima, A.; Takenaka, H.; Hara, N.; Ikenouchi, A. et al. (2003): Survey of nasal colonization by, and assessment of a novel multiplex PCR method for detection of biofilm-forming methicillin-resistant staphylococci in healthy medical students. In: *J Hosp Infect.* 53 (3), S. 215–223.

- Moretro, T.; Hermansen, L.; Holck, A. L.; Sidhu, M. S.; Rudi, K.; Langsrud, S. (2003): Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. In: *Appl Environ Microbiol.* 69 (9), S. 5648–5655.
- Mulcahy, Heidi; Charron-Mazenod, Laetitia; Lewenza, Shawn (2008): Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. In: *PLoS Pathog* 4 (11), S. e1000213.
- Nilsson-Augustinsson, A.; Koskela, A.; Ohman, L.; Söderquist, B. (2007): Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from patients with infected hip prostheses: use of phenotypic and genotypic analyses, including tests for the presence of the *ica* operon. In: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 26 (4), S. 255–265.
- Nilsson, M.; Frykberg, L.; Flock, J. I.; Pei, L.; Lindberg, M.; Guss, B. (1998): A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. In: *Infect Immun* 66 (6), S. 2666–2673.
- Ninin, E.; Caroff, N.; Espaze, E.; Marailac, J.; Lepelletier, D.; Milpied, N.; Richet, H. (2006): Assessment of *ica* operon carriage and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing bacteraemia in bone marrow transplant recipients. In: *Clin Microbiol Infect.* 12 (5), S. 446–452.
- O’Gara, J. P. (2007): *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 270 (2), S. 179–188.
- Ogston, A. (1883): Micrococcus Poisoning. In: *J. Anat. Physiol.* (17), S. 24–58.
- O’Toole, G.; Kaplan, H. B.; Kolter, R. (2000): Biofilm Formation as Microbial Development. In: *Annu Rev Microbiol.* 54, S. 49–79.
- Otto, M. (2009): *Staphylococcus epidermidis*- the "accidental" pathogen. In: *Nat Rev Microbiol.* 7 (8), S. 555–567.
- Otto, Michael (2010): *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. In: *Expert Rev. Dermatol.* 5 (2), S. 183–195.
- Pei, L.; Flock, J. I. (2001): Lack of *fbe*, the gene for a fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*, reduces its adherence to fibrinogen coated surfaces. In: *Microb Pathog.* 31 (4), S. 185–193.
- Peters, G.; Locci, R.; Pulverer, G. (1982): Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. In: *J Infect Dis.* 146 (4), S. 479–482.

Pfaller, Michael A.; Herwaldt, Loreen A. (1988): Laboratory, Clinical, and Epidemiological Aspects of Coagulase-Negative Staphylococci. In: *Clinical Microbiology Reviews* 1 (3), S. 281–299.

Qin, Z.; Ou, Y.; Yang, L.; Zhu, Y.; Tolker-Nielsen, T.; Molin, S.; Qu, D. (2007): Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. In: *Microbiology* 153, S. 2083–2092.

Rachid, S.; Ohlsen, K.; Witte, W.; Hacker, J.; Ziebuhr, W. (2000): Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. In: *Antimicrob Agents Chemoth.* 44 (12), S. 3357–3363.

Reva, Oleg; Tumbler, Burkhard (2008): Think big--giant genes in bacteria. In: *Environ Microbiol* 10 (3), S. 768–777.

Rice, K. C.; Mann, E. E.; Endres, J. L.; Weiss, E. C.; Cassat, J. E.; Smeltzer, M. S.; Bayles, K. W. (2007): The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. In: *PNAS* 104 (19), S. 8113–8118.

Rohde, H.; Burandt, E. C.; Siemssen, N.; Frommelt, L.; Burdelski, C.; Wurster, S. et al. (2007): Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. In: *Biomaterials* 28 (9), S. 1711–1720.

Rohde, H.; Burdelski, C.; Bartscht, K.; Hussain, M.; Buck, F.; Horstkotte, M. A. et al. (2005): Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. In: *Mol Microbiol.* 55 (6), S. 1883–1895.

Rohde, H.; Kalitzky, M.; Kröger, N.; Scherpe, S.; Horstkotte, M. A.; Knobloch, Johannes K. - M et al. (2004): Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. In: *J Clin Microbiol.* 42 (12), S. 5614–5619, zuletzt geprüft am 25.01.2009.

Rohde, H.; Knobloch, J. K. M.; Horstkotte, M. A.; Mack, D. (2001a): Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. In: *Med Microbiol Immunol* 190 (3), S. 105–112.

- Rohde, H.; Knobloch, J. K. M.; Horstkotte, M. A.; Mack, D. (2001b): Correlation of *Staphylococcus aureus* icaADBC genotype and biofilm expression phenotype. In: *J Clin Microbiol.* 39 (12), S. 4595–4596.
- Rupp, M. E.; Archer, G. L. (1994): Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. In: *Clinical Infectious Diseases* 19 (2), S. 244–245.
- Rupp, M. E.; Fey, P. D.; Heilmann, C.; Götz, F. (2001): Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. In: *J Infect Dis.* 183 (7), S. 1038–1042.
- Rupp, M. E.; Ulphani, J. S.; Fey, P. D.; Mack, D. (1999a): Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/ hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. In: *Infect Immun* 67 (5), S. 2656–2659.
- Rupp, M. E.; Ulphani, J. S.; Fey, P. D.; Bartscht, K.; Mack, D. (1999b): Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/ hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. In: *Infect Immun* 67 (5), S. 2627–2632.
- Sambrook, Joseph; Fritsch, E. F.; Maniatis, Tom (1989): Molecular cloning. A laboratory manual. 2. Aufl. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schommer, NinaN; Christner, Martin; Hentschke, Moritz; Ruckdeschel, Klaus; Aepfelbacher, Martin; Rohde, Holger (2011): *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. In: *Infect Immun* 79 (6), S. 2267–2276.
- Schwarzkopf, A.; Karch, H.; Schmidt, H.; Lenz, W.; Heesemann, J. (1993): Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping factor-negative, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *J Clin Microbiol.* 31 (9), S. 2281–2285.
- Shaw, J. H.; Clewell, D. B. (1985): Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. In: *J Bacteriol* 164 (2), S. 782–796.
- Silva, G.D. de; Kantzanou, M.; Justice, A.; Massey, R. C.; Wilkinson, A. R.; Day, N. P.; Peacock, S. J. (2002): The ica operon and biofilm production in coagulase-negative

- Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. In: *J Clin Microbiol.* 40 (2), S. 382–388.
- Souvenir, D.; Anderson, D. E., JR.; Palpant S.; Mroch, H.; Askin, S.; Anderson, J. et al. (1998): Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antisepsis, pseudobacteremia, and therapy of patients. In: *J Clin Microbiol.* 36 (7), S. 1923–1926.
- Sperber, W. H.; Tatini, S. R. (1975): Interpretation of the Tube Coagulase Test for Identification of *Staphylococcus aureus*. In: *Applied Microbiology* 29 (4), S. 502–505.
- Sun, D.; Accavitti, M. A.; Bryers, J. D. (2005): Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. In: *Clin Diagn Lab Immunol.* 12 (1), S. 93–100.
- Tormo, M. A.; Marti, M.; Valle, J.; Manna, A. C.; Cheung, A. L.; Lasa, I.; Penadés, J. R. (2005): SarA Is an Essential Positive Regulator of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Development. In: *J Bacteriol.* 187 (7), S. 2348–2356.
- Vandecasteele, S. J.; Peetermans, W. E.; R Merckx, R.; Rijnders, B. J.; van Eldere, J. (2003): Reliability of the *ica*, *aap* and *atIE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. In: *Clin Microbiol Infect.* 9 (2), S. 114–119.
- Vuong, C.; Gerke, C.; Somerville, G. A.; Fischer, E. R.; Otto, M. (2003): Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Infect Dis.* (188), S. 706–718.
- Vuong, C.; Kocianova, S.; Yao, Y.; Carmody, A. B.; Otto, M. (2004a): Increased Colonization of Indwelling Medical Devices by Quorum-Sensing Mutants of *Staphylococcus epidermidis* In Vivo. In: *J Infect Dis.* (190), S. 1498–1505.
- Vuong, C.; Voyich, J. M.; Fischer, E. R.; Braughton, K. R.; Whitney, A. R.; DeLeo, F. R.; Otto, M. (2004b): Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. In: *Cell Microbiol.* 6 (3), S. 269–275.
- Wade, J. C.; Schimpf, S. C.; Newman, K. A.; Wiernik, P. H. (1982): *Staphylococcus epidermidis*: an increasing cause of infection in patients with granulocytopenia. In: *Ann Intern Med.* 97 (4), S. 503-308.

- Wang, X.; Preston, J.F., 3rd; Romeo, T. (2004): The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. In: *J Bacteriol.* 186 (9), S. 2724–2734.
- Weinstein, M. P.; Towns, M. L.; Quartey, S. M.; Mirrett, S.; Reimer, L. G.; Parmigiani, G.; Reller, L. B. (1997): The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology and outcome of bacteremia and fungemia in adults. In: *Clinical Infectious Diseases* 24 (4), S. 584–602.
- West, T. E.; Walshe, J. J.; Krol, C. P.; Amsterdam, D. (1986): Staphylococcal peritonitis in patients on continuous peritoneal dialysis. In: *J Clin Microbiol.* 23 (5), S. 809–812.
- Williams, R. J.; Henderson, B.; Sharp, L. J.; Nair, S. P. (2002): Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis*. In: *Infect Immun* 70 (12), S. 6805–6810.
- Winston, D. J. et al (1983): Coagulase-negative staphylococcal bacteremia in patients receiving immunosuppressive therapy. In: *Arch Intern Med.* 143 (1), S. 32–36.
- Wisplinghoff, H.; Seifert, H.; Tallent, S. M.; Bischoff, T.; Wenzel, R. P.; Edmond, M. B. (2003a): Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in the United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibilities. In: *Pediatr Infect Dis J.* 22 (8), S. 686–691.
- Wisplinghoff, H.; Seifert, H.; Wenzel, R. P.; Edmond, M. B. (2003b): Current Trends in the Epidemiology of Nosocomial Bloodstream Infections in Patients with Hematological Malignancies and Solid Neoplasms in Hospitals in the United States. In: *Clinical Infectious Diseases* 36, S. 1103–1110.
- Xu, L.; Hualin, L.; Vuong, C.; Vadyvaloo, V.; Wang, J.; Yao, Y. et al. (2006): Role of the luxS Quorum-Sensing System in Biofilm Formation and Virulence of *Staphylococcus epidermidis*. In: *Infect Immun* 74 (1), S. 488–496.
- Yao, Y.; Sturdevant, D. E.; Villaruz, A.; Xu, L.; Gao, Q.; Otto, M. (2005): Factors Characterizing *Staphylococcus epidermidis* Invasiveness Determined by Comparative Genomics. In: *Infect Immun* 73 (3), S. 1856–1860.
- Younger, J. J.; Christensen, G. D.; Bartley, D. L.; Simmons, J. C.; Barrett, F. F. (1987): Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal to clinical outcome. In: *J Infect Dis.* 156 (4), S. 548–554.

Zhang, Y. Q.; Ren, S. X.; Li, H. L.; Wang Y. X.; Fu, G.; Yang, J. Qin Z. Q. et al. (2003): Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). In: *Mol Microbiol.* 49 (6), S. 1577–1593.

Ziebuhr, W.; Heilmann, C.; Götz, F.; Meyer, P.; Wilms, K.; Straube, E.; Hacker, J. (1997): Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. In: *Infect Immun* 65 (3), S. 890–896.

Ziebuhr, W.; Krimmer, V.; Rachid, S.; Lössner, I.; Götz, F.; Hacker, J. (1999): A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. In: *Mol Microbiol.* 32 (2), S. 345–356.

Zoll, Sebastian; Patzold, Bernhard; Schlag, Martin; Gotz, Friedrich; Kalbacher, Hubert; Stehle, Thilo (2010): Structural basis of cell wall cleavage by a staphylococcal autolysin. In: *PLoS Pathog* 6 (3), S. e1000807.

7 Abkürzungsverzeichnis

A ₅₇₀	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 570 nm
Aap	<i>accumulation associated protein</i>
agr	<i>accessory gene regulator</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (englisch: <i>bovine serum albumin</i>)
CFU	Koloniebildende Einheiten (englisch: <i>colony forming units</i>)
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
Embp	<i>Extracellular matrix binding protein</i>
EZM	Extrazelluläre Matrixproteine
ica	<i>intercellular adhesion</i> -Operon
kDa	Kilodalton
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
M	Mol
MDa	Megadalton
MSCRAMM	<i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
OD ₅₇₈	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: <i>polymerase chain reaction</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: <i>ribonucleic acid</i>)
Tn917	Transposon 917
TSB BBL	Trypton Soja Brühe (englisch: <i>trypticase soy broth</i>)
U	Einheit (englisch: <i>unit</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: <i>rounds per minute</i>)
v/v	Volumen pro Volumen
wt/v	Gewicht pro Volumen

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Elektronenmikroskopisches Bild eines von <i>S. epidermidis</i> 1457 synthetisierten Biofilms auf rostfreiem Stahl nach 18 Stunden Inkubation (Mack et al. 2006)	10
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Modells der Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> (nach Mack et al. 2006).....	10
Abbildung 1-3: Vereinfachtes Modell der Interaktion von regulatorischen Strukturen und interzellulären Adhäsinen bei der <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung (Mack et al. 2006)	16
Abbildung 2-1: Größenstandard Marker für Gelelektrophorese Gele.	29
Abbildung 3-1: Untersuchung der klonalen Verwandtschaft von Transposonmutanten und dem Biofilm-negativen Ausgangsstamm 1585.....	42
Abbildung 3-2: Quantitative Analyse der Biofilmbildung des Wildtyps 1585 sowie der Mutanten 1585-M254 und 1585-M266 im Biofilmassay.	43
Abbildung 3-3: Analyse der Wachstumskurve der Mutanten 1585-M254 und 1585-M266 im Vergleich zum Wildtyp 1585 sowie dem Stamm <i>S. epidermidis</i> 1585v.	44
Abbildung 3-4: Zellcluster-Bildung nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C in TSB-Medium in Nunc-Zellkulturschalen.	45
Abbildung 3-5: Gelelektrophoretische Auftrennung der mittels <i>arbitrary-primed</i> PCR amplifizierten Tn917-Insertionen in der Transposonmutante <i>S. epidermidis</i> 1585-M 254.	46
Abbildung 3-6: Tn917-Insertion in <i>sarA</i>	48
Abbildung 3-7: Schematische Darstellung der chromosomalen Tn917-Insertion in Mutante 1585-M254.	49
Abbildung 3-8: Analyse von Oberflächenproteinen der Stämme 1585, 1585-M254 und 1585-M266.	50
Abbildung 3-9: Hydrolysezonen in cm nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation.....	51
Abbildung 3-10: Nachweis einer Embp-Expression.....	52

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Schätzung der jährlich in Deutschland auftretenden Fremdkörper-assoziierten Infektionen (Mack et al. 2005)	7
Tabelle 2.1: Übersicht über verwendete Laborgeräte	18

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.	24
Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten Plasmide.....	24
Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten Primer.....	25

9 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten, Gerätschaften und Materialien bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn PD Dr. med. Holger Rohde für die Überlassung dieses interessanten Themas, die umfassende Betreuung und die stets engagierte Unterstützung beim Durchführen der Experimente sowie beim Verfassen dieser Arbeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. med. Gefion Franke und Martin Christner, die mir im Labor beim Durchführen der Versuche ebenfalls jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke meiner Familie und meinem Freund für die große Unterstützung und Motivation insbesondere bei der Erstellung dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich noch allen Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe für eine schöne Zeit danken.

10 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: