

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

**Untersuchung zum Effekt von Tigecyclin auf die Biofilmbildung von
*Staphylococcus epidermidis***

Dissertation

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

vorgelegt von:

Dr. med. dent. Julian Otto Weiser
aus Frankfurt am Main

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.05.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Holger Rohde

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Dominic Wichmann

Inhaltsverzeichnis

1. Originalarbeit	
Sub-inhibitory tigecycline concentrations induce extracellular matrix binding protein Embp dependent <i>Staphylococcus epidermidis</i> biofilm formation and immune evasion	4
2. Zusammenfassende Darstellung der Publikation	12
Einleitung	12
Ziel der Arbeit.....	14
Material und Methoden	14
Ergebnisse und Diskussion.....	16
Fazit	22
3. Literaturverzeichnis.....	23
4. Zusammenfassung	26
5. Summary	27
6. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation	28
7. Danksagung	29
8. Lebenslauf	30
9. Eidesstattliche Versicherung	31



Sub-inhibitory tigecycline concentrations induce extracellular matrix binding protein Embp dependent *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and immune evasion

Julian Weiser^{a,1}, Hanae A. Henke^{a,1}, Nina Hector^a, Anna Both^a, Martin Christner^a, Henning Büttner^a, Jeffery B. Kaplan^b, Holger Rohde^{a,*}

^a Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, D-20246 Hamburg, Germany

^b Department of Biology, American University, Washington, DC 20016, USA



ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 February 2016

Received in revised form 19 May 2016

Accepted 24 May 2016

Keywords:

Staphylococcus epidermidis

Biofilm formation

Antibiotic resistance

Extracellular matrix binding protein

Persistence

Immune evasion

ABSTRACT

Biofilm-associated *Staphylococcus epidermidis* implant infections are notoriously reluctant to antibiotic treatment. Here we studied the effect of sub-inhibitory concentrations of penicillin, oxacillin, vancomycin, daptomycin, linezolid and tigecycline on *S. epidermidis* 1585 biofilm formation, expression of extracellular matrix binding protein (Embp) and potential implications for *S. epidermidis* – macrophage interactions. Penicillin, vancomycin, daptomycin, and linezolid had no biofilm augmenting effect at any of the concentrations tested. In contrast, at sub-inhibitory concentrations tigecycline and oxacillin exhibited significant biofilm inducing activity. In *S. epidermidis* 1585, SarA is a negative regulator of giant 1 MDa Embp, and down regulation of sarA induces Embp-dependent assembly of a multi-layered biofilm architecture. Dot blot immune assays, confocal laser scanning microscopy, and qPCR showed that under biofilm inducing conditions, tigecycline augmented embp expression compared to the control grown without antibiotics. Conversely, expression of regulator sarA was suppressed, suggesting that tigecycline exerts its effects on embp expression through SarA. Tigecycline failed to induce biofilm formation in embp transposon mutant 1585-M135, proving that under these conditions Embp up-regulation is necessary for biofilm accumulation. As a functional consequence, tigecycline induced biofilm formation significantly impaired the up-take of *S. epidermidis* by mouse macrophage-like cell line J774A.1. Our data provide novel evidence for the molecular basis of antibiotic induced biofilm formation, a phenotype associated with inherently increased antimicrobial tolerance. While this could explain failure of antimicrobial therapies, persistence of *S. epidermidis* infections in the presence of sub-inhibitory antimicrobials is additionally propelled by biofilm-related impairment of macrophage-mediated pathogen eradication.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

The ability to substitute organ functions by the use of implanted medical devices represents a remarkable advance in modern medicine. Indeed, implants like central venous catheters, artificial lenses, heart valves or prosthetic joints are part of established therapeutic strategies in almost every medical speciality. Interestingly, however, implantation of a device puts the patient at significant risk for complications, and among these, infections rank among the most feared manifestations (Rosenthal et al., 2014; Chu et al., 2009;

Rohacek and Baddour, 2015; Lentino, 2003; Wisplinghoff et al., 2004). Although usually relatively low infection rates between 1 and 5% are encountered, related to the absolute number of devices used, it is estimated that in the USA alone, over 400,000 device-associated infections occur per year (Darouiche, 2004; Maki et al., 2006). Apart from significantly contributing to the morbidity and mortality of nosocomial infections, device-related infections also lead to a substantial economic burden. Indeed, it is estimated that in the USA annually 250–500,000 primary blood stream infections from intravascular devices occur, causing attributable excess costs of up to 56,000 US\$ per patient (Maki et al., 2006). Intriguingly, up to 80% of device associated infections are caused by otherwise harmless skin commensals belonging to the group of coagulase-negative staphylococci, most notably *Staphylococcus epidermidis* (Darouiche, 2004; Mack et al., 2006; Becker et al., 2014).

* Corresponding author.

E-mail address: rohde@uke.uni-hamburg.de (H. Rohde).

¹ Contributed equally to this work.

Electron microscopic studies and evidence from animal models of device associated-infections link *S. epidermidis* pathogenicity with the ability to form adherent, multi-layered biofilms on artificial implant surfaces (Marrie et al., 1982; Rupp et al., 1999a,b; Schaeffer et al., 2015; Stoodley et al., 2010). The stability and durability of the multicellular biofilm architecture essentially depends on the organization of an extracellular matrix that tightly tethers the bacterial cells (Flemming and Wingender, 2010; Büttner et al., 2015). The biofilm matrix consists of polysaccharides, proteins, DNA (i.e. extracellular DNA/eDNA), and teichoic acids. Specifically, polysaccharide intercellular adhesin PIA (Mack et al., 1996; Gerke et al., 1998), accumulation associated protein Aap (Schaeffer et al., 2015; Rohde et al., 2005; Decker et al., 2015), and extracellular matrix binding protein Embp (Christner et al., 2010; Christner et al., 2012) have been characterized with respect to their function during biofilm formation. PIA, Aap, and Embp all independently mediate *S. epidermidis* biofilm formation, although the specific mechanism underlying the intercellular adhesive properties are most likely different (Schommer et al., 2011).

Importantly, regardless of the basic mechanism leading to cell aggregation, biofilm formation in general renders *S. epidermidis* less susceptible to phagocytosis and effector mechanisms of the host's innate immune response, i.e. antimicrobial peptides and complement (Scherr et al., 2014). In fact, compared to biofilm forming wild type *S. epidermidis* strains, in animal models of implant infections isogenic biofilm-negative *S. epidermidis* mutants were more readily eliminated from host tissues and failed to establish persistent infections (Rupp et al., 1999a,b; Fey et al., 1999; Schaeffer et al., 2014). Thus, given the general chronic persistent course of device-associated infections, it is reasonable to assume that biofilm formation is directly associated with progression of disease in humans, too.

As a major consequence of the biofilm mode of growth, bacteria dramatically change their metabolic activity (Lewis, 2005). In turn, even if standard susceptibility testing indicates clinically useful activity of a given antibiotic, in contrast to their planktonic counterparts biofilm forming *S. epidermidis* are able to persist in the presence of antibiotics far above the MIC (Lewis, 2010). As a consequence, treatment of device-associated infections usually demands removal of the infected device in combination with long-term antibiotic treatment (Darouiche, 2004). Given the high prevalence of methicillin-resistant strains in clinical *S. epidermidis* populations, treatment options are often limited, making usage of last resort antibiotics (e.g. vancomycin, linezolid, daptomycin, tigecycline) necessary.

Tigecycline has been reported to induce *S. epidermidis* biofilm formation in some strains (Kaplan et al., 2011). This study analysis the determinants of *S. epidermidis* biofilm formation in the presence of sub-inhibitory tigecycline concentrations. Genetic evidence is provided to demonstrate that tigecycline-induced *S. epidermidis* biofilm formation is functionally linked to Embp over-expression, leading to production of an extracellular matrix and cell aggregation. Importantly, parallel to the induction of biofilm formation, resistance to phagocytosis emerged. Our results shed important mechanistic light onto effects of a last resort antibiotic that under certain circumstances obviously can induce bacterial phenotypes, i.e. biofilm formation, that are directly linked to persistence of infection. Furthermore, the evolving concept of combining traditional antimicrobial therapy with dedicated anti-biofilm strategies is further strengthened.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains

S. epidermidis 1585 was isolated from a port catheter infection. The strain is biofilm-negative when grown in trypticase soy broth

(TSB; Becton Dickinson, Cockeysville, USA) (Rohde et al., 2005). In the presence of goat serum, *S. epidermidis* 1585 forms an Embp-dependent biofilm (Christner et al., 2010). *S. epidermidis* 12 was isolated from a prosthetic joint infection (Rohde et al., 2007a). The strain is icaADBC-positive, but does not form a biofilm in TSB. *S. epidermidis* 1457 and isogenic icaA-transposon insertion mutant 1457-M10 served as PIA- and biofilm-positive and biofilm-negative controls, respectively (Mack et al., 1994). In some experiments, *S. epidermidis* 1585 transduced with pCM29 (Berends et al., 2010), resulting in constitutive expression of gfp, was used (Decker et al., 2015).

2.2. Biofilm assay

Biofilm forming ability was tested using a quantitative biofilm assay according to a published protocol (Mack et al., 2001). In brief, bacteria were inoculated into 2 ml of TSB and allowed to grow for 6 h at 37 °C. The culture was diluted 1:100 into fresh TSB with or without antibiotics, and wells of a 96-well microtiter plate were inoculated with 200 µl of the bacterial suspension. After growth for 20 h, the absorbance at 600 nm was recorded, and medium was removed. Non-adherent cells were removed from the surface by washing with 200 µl PBS three times. Adherent cells were dried, and stained with crystal violet. Biofilm formation was quantified by assessing the absorbance at 570 nm and 405 nm as a reference wavelength.

2.3. Quantitative real-time PCR

For the gene expression analysis of embp, triplicates of overnight cultures of strains 1585 and 12 were diluted 1:100 and grown for 6 h and 16 h in 20 ml of tryptic soy broth (TSB) or TSB supplemented with tigecycline. Bacterial cells were harvested, immersed in RNAProtect Bacteria reagent (Qiagen, Hilden, Germany) and lysed as described previously (Franke et al., 2007). RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA yield was quantified with the Qubit RNA HS Assay Kit on a Qubit 2.0 Fluorometer (both Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Following the extraction, a sample volume containing 1 µg of RNA was digested twice by use of DNA-free DNase (Ambion, Life Technologies, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Subsequently, 5 µl of DNase-digested RNA were reverse-transcribed, using the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Two technical replicates of the reverse transcription per RNA isolation were made. The resulting cDNA was frozen immediately at –80 °C until further use.

Relative gene expression quantification was performed on a Light Cycler 480 instrument, running with the LightCycler 480 Software Version 1.5.1 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Primers for target genes (embp, GenBank accession number SE1011; sarA, GenBank accession number SE0390; icaA, GenBank accession number SE2293) and reference genes (gyrB, GenBank accession number SE0004; rho, GenBank accession number SE1719; tpiA GenBank accession number SE0559) (Crawford et al., 2014; Theis et al., 2007) were designed using the Primer3 software (Untergasser et al., 2012; Koressaar and Remm, 2007). Primers and probes are summarized in Table 1. Hydrolysis probes contain FAM as fluorophore and BHQ1 as quencher, except for sarA.taq.probe, which contains a minor groove binder (MGB). Primers and probes were synthesized by Life Technologies (sarA.taq.probe) or MWG Eurofins. The TaqMan Fast Advanced Master Mix 2 x (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) was used as recommended by the manufacturer. The reaction was set up manually in a reaction volume of 15 µl. Cycling conditions were as follows: 10 min 95 °C, 40

Table 1
Primers used in this study.

Primer name	Sequence	Amplicon length	PCR Efficiency ^a
rho_taq.for	5'-TCGATGAACCACAGAACACCATG-3'	231 bp	98%
rho_taq.rev	5'-CTTCAATGTTACGTGCTGCCAGAA-3'		
rho_taq.probe	5'-ACGTACATITGTCAGGTGGGTTGATCCCGC-3'		
tpiA.for.taq	5'-GTGTGCTCACGTAAACAA-3'	194 bp	97%
tpiA.rev.taq	5'-TGACACCTCTAACAAATTGACCAAATC-3'		
tpiA.probe.taq	5'-CGATGGCGCTCTGTAGGTGGCGC-3'		
gyrB.for.taq	5'-TGGTCTGGGTTCAATTCAACAGAC-3'	246 bp	94%
gyrB.rev.taq	5'-CTTGGCGATGTTGATGGTCACA-3'		
gyrB.probe.taq	5'-GGCGGCTGAGCAATAAACGTAGCCCC-3'		
embp.taq.for	5'-ACCTGGTCTGCGTAATATAC-3'	189 bp	100%
embp.taq.rev2	5'-GCAGTCCCTTATTGTTGGTCCG-3'		
embp.probe2	5'-ATGGTCGTTGGACTGTTGAAACTGGGTC-3'		
icaA.for.2	5'-TGCTTATTATTGACAGTCGCTACG-3'	187 bp	92%
icaA.for.2	5'-CGTGGATATTGCTCTGCTGG-3'		
icaA.probe.taq	5'-ATACTGGITATCAATGCCGAGTGTCA-3'		
sarA.taq.for	5'-TGCTCTTGTACGGTTGTTACTCG-3'	316 bp	88%
sarA.taq.rev	5'-AGCTATGGTCACTTATGTCGACAGATT-3'		
sarA.taq.probe	5'-ACAGTCTCATCGTGTTCATTACGT-3'		

^a as determined using the LightCycler 480 Software Version 1.5.1.

cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s. Two technical replicates of each cDNA-sample and the corresponding RNA samples, as control for contaminating DNA, were measured. Analysis of the qPCR data was carried out in GenEx™ software (multiD, Gothenburg, Sweden). The expression of *embp*, *icaA*, and *sarA* was normalized to the geometric mean of all three reference genes, Cq-values were subjected to an efficiency correction in GenEx to account for differences in qPCR assay efficiency. Technical replicates were averaged. Differences in gene expression levels were assessed with the two-tailed Student's *t*-test. The significance level was set to 0.05.

2.4. Embp detection by dot immune assay (DIA)

For semi-quantitative detection of Embp, *S. epidermidis* were grown in 50 ml TSB under static growth conditions at 37 °C. After 20 h, the medium was removed, adherent cells were scraped off and re-suspended in LDS-buffer (Invitrogen, Heidelberg, Germany). After heating for 10 min at 70 °C, suspensions were centrifuged and supernatants were transferred to a fresh tube. Cell surface extracts were diluted geometrically, and 5 µl of each dilution was spotted onto a PVDF-membrane. Membranes were blocked at 4 °C overnight, and rabbit anti-rEmbp6599 antiserum at a dilution of 1:10,000 and peroxidase-coupled anti rabbit IgG were used to detect Embp by chemiluminescence (Christner et al., 2010).

2.5. Confocal laser scanning microscopy and quantification of phagocytic uptake

For analysis of *S. epidermidis* biofilm formation by confocal laser scanning microscopy, strain 1585xpCM29 was grown in TSB without antibiotics for six hours. Cultures were subsequently suspended 1:100 in plain TSB or TSB containing antibiotics tigecycline (0.6 mg/L). 200 µl of the suspension were used to inoculate the well of a µ-slide 8-well cell culture dish (ibidi, Munich, Germany) and bacteria were allowed to grow for 20 h. After removal of the medium, wells were washed once with 200 µl PBS buffer, bacteria were fixed using formaldehyde (3.7% [vol/vol]), and finally blocked overnight using fetal calf serum (FCS; 20% [vol/vol]). Embp was detected using rabbit anti-rEmbp6599 antiserum and an anti-rabbit IgG coupled to Alexa568. Images were then acquired using a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica, Solms, Germany) and processed using the Volocity software package (Perkin-Elmer, Waltham, USA).

Phagocytic uptake was quantified by differential detection of extra- and intracellular bacteria essentially as described

(Schommer et al., 2011), with the exception that *gfp*-expressing *S. epidermidis* 1585xpCM29 were used, making the immunologic detection of intracellular bacteria unnecessary. In brief, J774A.1 murine macrophages were exposed for 2 h to *S. epidermidis* 1585xpCM29 grown in the presence or absence of tigecycline, and then fixed in 2% (vol/vol) paraformaldehyde for 10 min at room temperature. After being washed with PBS, outside bacteria were detected using a rabbit anti-*S. epidermidis* antiserum (1:1000 in PBS containing 10% [vol/vol] FCS) and anti-rabbit IgG coupled with Cy5 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Stack images were collected with an Axiovert 200 M confocal laser scanning microscope at 100- and 60-fold magnifications, using the Volocity 4.3 Improvisation software, and mean numbers of intracellular bacteria were calculated from three independent experiments in which intracellular bacteria were counted in 15 macrophages.

3. Results and discussion

In clinical practice, given the high prevalence of PBP2a-mediated β-lactam resistance in clinical *S. epidermidis* populations (Mack et al., 2009), device-associated *S. epidermidis* infections almost always require the administration of vancomycin. Even if vancomycin susceptibility of a clinical *S. epidermidis* is proven, though, cure rates can be low (Marculescu et al., 2006). Intriguingly, there is evidence demonstrating a biofilm-inducing effect of sub-inhibitory vancomycin concentrations on *S. epidermidis* (Kaplan et al., 2011; Olsen, 2015), potentially contributing to the failure of antimicrobial therapies in device-associated infections. Under circumstances in which vancomycin is prohibited due to nephrotoxic side effects or hypersensitivity, linezolid, daptomycin or tigecycline are potential therapeutic alternatives (John et al., 2009; Leite et al., 2011; Aybar et al., 2012). So far, however, potential adverse effects related to biofilm inducing properties of these compounds have only rarely been analysed so far (Kaplan et al., 2011). To this end, we here analysed how linezolid, daptomycin and tigecycline affect *S. epidermidis* 1585 *in vitro* biofilm formation. *S. epidermidis* 1585 was recovered from a persistent port catheter associated infection (Rohde et al., 2005; Christner et al., 2010; Christner et al., 2012). Despite its clinical significance, *S. epidermidis* 1585 does not form a biofilm under standard laboratory conditions when grown in TSB (Christner et al., 2010; Christner et al., 2012). Indeed, there is clear indication from epidemiological studies that the frequency of clinically significant but biofilm-negative *S. epidermidis* strains, especially in bacterial populations causing prosthetic joint infections, can be as high as 60% (Rohde et al., 2007b). The majority of

these biofilm-negative *S. epidermidis* isolates do not carry *icaADBC*, an operon encoding for the synthesis machinery necessary for PIA-mediated biofilm formation (Heilmann et al., 1996). Instead, they are able to establish surface adherent cell aggregates via PIA-independent mechanisms (Rohde et al., 2005; Christner et al., 2010). There is mounting evidence that PIA-independent mechanisms are subject to rigorous regulation. While being suppressed under standard laboratory conditions (Christner et al., 2012), they are only expressed in the presence of specific environmental stimuli, e.g. antibiotics (Kaplan et al., 2011) or the presence of serum (Christner et al., 2010).

Resistance testing using Etest strips showed that, according to the EUCAST clinical breakpoints, *S. epidermidis* 1585 is resistant to oxacillin (MIC 1 mg/L), but susceptible to penicillin (MIC 0.125 mg/L), vancomycin (MIC 1 mg/L), daptomycin (MIC 0.125 mg/L), linezolid (MIC 1 mg/L), and tigecycline (MIC 0.5 mg/L). Neither growth in the presence of varying concentrations of penicillin (0.005–5 mg/L), vancomycin (0.005–5 mg/L), linezolid (0.005–5 mg/L) or daptomycin (0.005–5 mg/L) had any effect on the biofilm phenotype of *S. epidermidis* 1585 (Fig. 1). This is in contrast to previous reports demonstrating that vancomycin had biofilm inducing properties in different *S. epidermidis* strains, including reference strains 9142, 1457 and RP62A (Kaplan et al., 2011; Claessens et al., 2015; Cargill and Upton, 2009). Apparently, the impact of a given antibiotic on biofilm formation significantly depends on the genetic background of the *S. epidermidis* strains under investigation (Kaplan et al., 2011). Indeed, here we found that at 1.25 µg/ml, vancomycin induced biofilm formation in clonally independent *S. epidermidis* 12 (Supplementary Fig. S1A in the online version at DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.05.015), isolated from a PJI (Rohde et al., 2007b).

Importantly, within a narrow range of tigecycline concentrations between 0.156 and 0.625 mg/L, a clear 2–3-fold induction of *S. epidermidis* 1585 biofilm formation became evident (Fig. 1). Analysis of bacterial growth demonstrated that the phenotypic switch consistently became apparent at the transition from inhibitory to sub-inhibitory tigecycline concentrations and was lost when the antibiotic concentration was further lowered (Fig. 1). In addition, a 2-fold biofilm-inducing effect on *S. epidermidis* 1585 was also recorded for oxacillin at sub-inhibitory concentrations (0.02–0.35 mg/L).

Tigecycline is a bacteriostatic compound belonging to the group of glycyclines. Being a derivative of minocycline, the substance exerts a bacteriostatic effect by interfering with the ribosomal protein synthesis machinery, but is less susceptible to tetracycline resistance determinants, e.g. efflux mechanisms. Interestingly, tetracycline did not induce *S. epidermidis* 1585 biofilm formation at any of the concentrations tested (data not shown), indicating that the effect observed was tigecycline-specific. At sub-inhibitory concentrations, tigecycline also induced biofilm formation in *S. epidermidis* 12 (Supplementary Fig. S1A in the online version at DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.05.015).

Augmentation of *S. epidermidis* biofilm formation by sub-inhibitory antibiotic concentrations is so far mainly attributed to transcriptional up-regulation of *icaADBC*, leading to increased PIA synthesis (Chang et al., 2010; Gomes et al., 2011; Rachid et al., 2000). However, in these studies usually *icaADBC*-positive *S. epidermidis* strains were investigated, thus neglecting the possible involvement of PIA-independent mechanisms of intercellular adhesion. In fact, a study analysing the molecular basis of antibiotic-induced biofilm formation in *icaADBC*-positive *S. epidermidis* RP62A found that increased biofilm accumulation related to exposure to vancomycin most likely was linked to augmented PIA production, while in contrast, tigecycline boosted biofilm formation in a PIA-independent, most likely eDNA-dependent manner (Kaplan et al., 2011; Cargill and Upton, 2009). Previous work from

our group has demonstrated that *S. epidermidis* 1585 can use extracellular matrix binding protein Embp for cell aggregation and assembly of a multi-layered cell consortium (Christner et al., 2010; Christner et al., 2012). Embp is a giant protein with an estimated molecular weight of 1 MDa that forms an extracellular matrix embedding the bacterial cells (Schommer et al., 2011). The *embp* gene is widespread in clinical *S. epidermidis* isolates, being present in almost every strain (Rohde et al., 2007b; Rohde et al., 2004). Under standard culture conditions in TSB *embp* is expressed only at very low amounts (Fig. 2A) (Christner et al., 2010; Linnes et al., 2013). Presence of serum (Christner et al., 2010) or high osmotic pressure (Linnes et al., 2013), however, induce Embp production and biofilm formation. The repression of *embp* in TSB is associated with production of *S. epidermidis* master regulator SarA (Christner et al., 2012). Indeed, high-level expression of *sarA* reasonably explains why *icaADBC*-negative, *embp*-positive *S. epidermidis* isolates regularly fail to produce a biofilm in TSB (Rohde et al., 2007a). Given the finding that inactivation of *sarA* in genetically independent *S. epidermidis* isolates induces Embp-dependent biofilm formation (Christner et al., 2012), it appears plausible to assume that Embp-mediated biofilm formation is a common phenomenon in clinical *S. epidermidis* isolates. Here, Embp can functionally substitute or act in concert with PIA (Christner et al., 2010).

Building on these previous findings, we hypothesized that in *S. epidermidis* 1585 tigecycline-induced biofilm formation could be functionally linked to Embp. To test this hypothesis, first Embp production in the presence or absence of sub-inhibitory tigecycline concentrations was analysed. Dot blot immune assays (DIA) using a rabbit antiserum raised against a recombinant sub-domain of Embp (rEmbp6599) (Christner et al., 2010) found no or only weak Embp synthesis in *S. epidermidis* 1585 after 24 h of growth in TSB (Fig. 2A). In sharp contrast, the presence of tigecycline at a concentration of 0.625 mg/L resulted in an 8-fold Embp induction (Fig. 2A). Intriguingly, Embp-induction additionally became apparent in the presence of oxacillin and linezolid, while all other antibiotics tested failed augment Embp production (Fig. 2A).

S. epidermidis 1585 biofilm formation and Embp-expression was also analysed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). CLSM not only corroborated the biofilm inducing tigecycline-effect observed in the microtiter plate assay, but also showed that *S. epidermidis* 1585 formed an Embp-containing extracellular matrix (Fig. 2B).

Embp-induction by tigecycline as demonstrated by DIA and CLSM was also confirmed by quantitative real-time RT-PCR (Christner et al., 2010). Compared to *S. epidermidis* 1585 grown in TSB, presence of tigecycline induced a significant 3.7 ($p=0.04$; CI 1.1–13.1) – and 3.5 ($p=0.01$; CI 2–6.2) – fold *embp* up-regulation after 6 and 16 h of growth, respectively. Parallel analysis of *sarA* expression at these time points showed a significant 3.9– ($p=0.003$; CI 2.1–7.1) and 3.1– ($p=0.05$; CI -1.0–10.2) down-regulation, respectively. Thus, accumulation of Embp in the presence of sub-inhibitory tigecycline apparently relates to transcriptional changes. In line with published evidence (Christner et al., 2012), *embp* up-regulation is likely a direct or indirect consequence of *sarA* down-regulation in the presence of sub-inhibitory tigecycline. Future studies will have to address signalling events and regulatory networks involved in *S. epidermidis* adaptation to antibiotic exposure.

When grown in the presence of tigecycline, in *S. epidermidis* 12 a 3.7-fold *embp* up-regulation ($p<0.005$; CI 3.0–4.5) and parallel induction of Embp production (Supplementary Fig. S1B in the online version at DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.05.015) was observed. On the other hand, under these conditions no relevant *icaA*-regulation became apparent (1.3-fold regulation, CI -9.2–5.1),

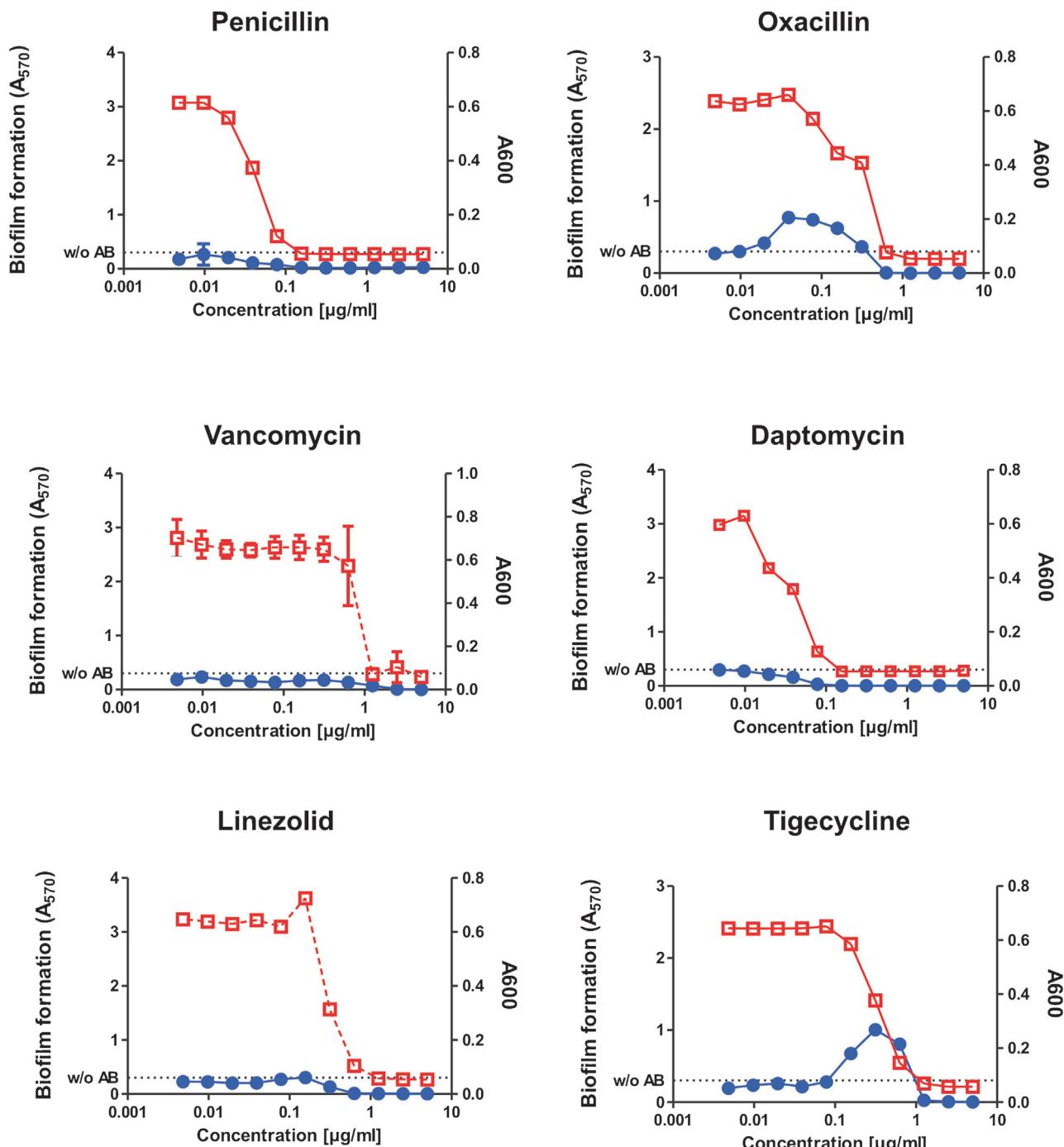


Fig. 1. Biofilm induction in the presence of antibiotics in *S. epidermidis* 1585. The strain was grown in TSB in the presence of varying concentrations of antimicrobials as indicated. After 20 h of growth cell densities were recorded at 600 nm (red graph, open boxes), while biofilm formation was quantified after staining of adherent cells with crystal violet and absorbance measurement at 570 nm (blue graph, closed circles). The dotted line indicates quantitative biofilm formation by *S. epidermidis* 1585 grown in TSB without antibiotics. Each data point represents the mean of 12 values from three independent experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

indicating that in *S. epidermidis* 12 PIA is not involved in tigecycline-induced biofilm formation.

Interestingly, induction of Embp only became evident when *S. epidermidis* 1585 was exposed to tigecycline in the early and mid-exponential growth phase, while exposure after six hours of growth in TSB did not increase Embp production (Supplementary Fig. S2 in the online version at DOI: [10.1016/j.ijmm.2016.05.015](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.015)). Likewise, biofilm induction in *S. epidermidis* 1585 only became apparent if exposure to tigecycline occurred in the early

or mid-exponential growth phase, suggesting a functional link between Embp expression and tigecycline-induced *S. epidermidis* biofilm formation. To test this hypothesis, we made use of isogenic *embp* mutant 1585-M135, carrying a Tn917 insertion within *embp* (Christner et al., 2010). When mutant 1585-M135 was grown in TSB containing sub-inhibitory tigecycline concentrations, a significant reduction in biofilm formation became evident, providing genetic evidence that in *S. epidermidis* 1585, tigecycline-induced biofilm formation is at least partially Embp-dependent (Fig. 2C). Likewise,

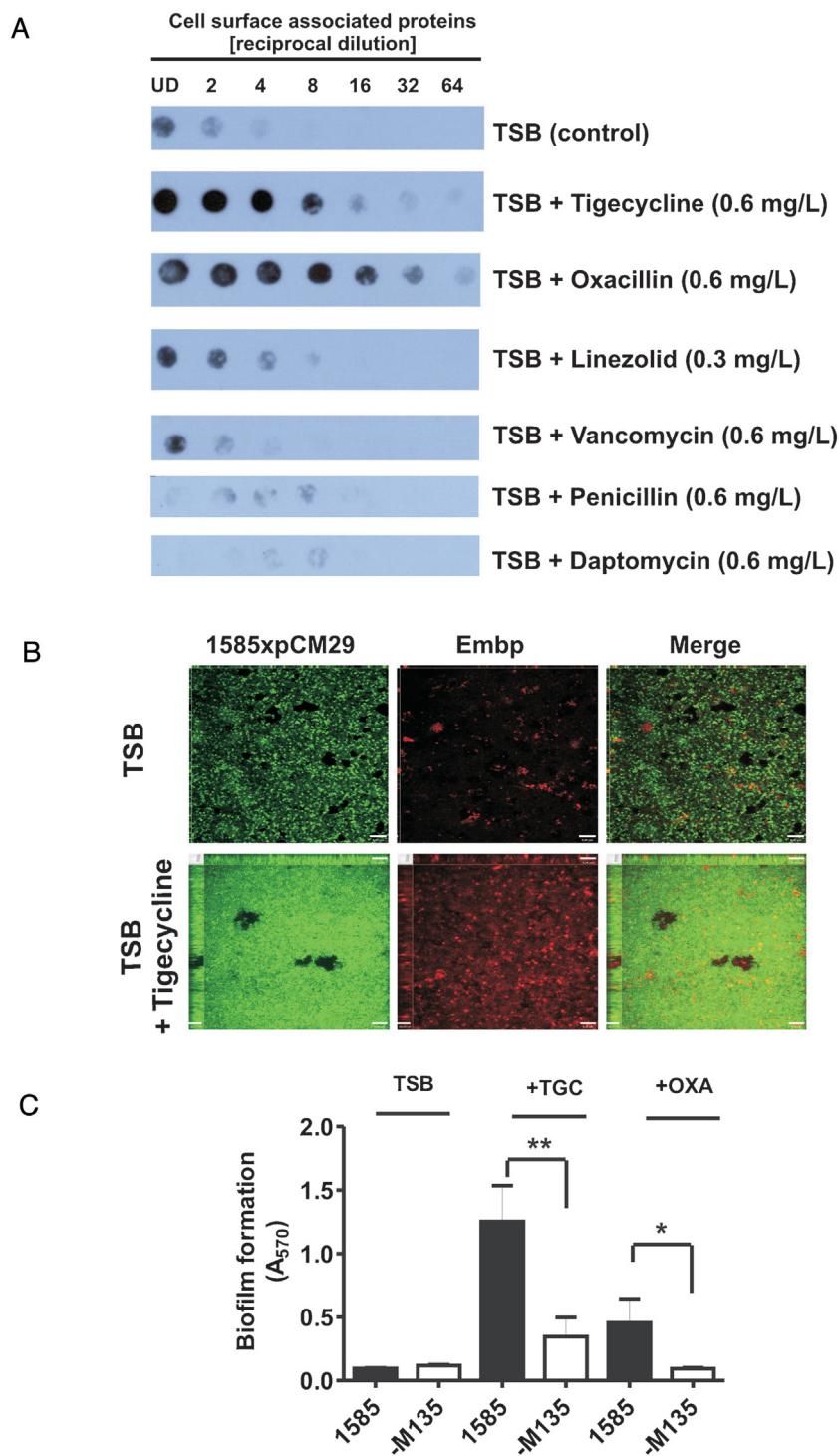


Fig. 2. Detection of Embp production in the presence of antimicrobials. (A) Cell surface adherent proteins were prepared from *S. epidermidis* 1585 grown in the presence of antimicrobials at concentrations as indicated. Serial dilutions of protein preparations were spotted onto PVDF membranes, and Embp was detected by chemiluminescence using a rabbit anti-rEmbp6599 antiserum and a peroxidase-coupled anti-rabbit IgG. Proteins from *S. epidermidis* 1585 grown in TSB without antibiotics served as a control. UD, undiluted. (B) Analysis of *S. epidermidis* 1585 biofilm formation and Embp production in the presence of tigecycline by confocal laser scanning microscopy. Gfp-expressing *S. epidermidis* 1585xpCM29 was grown in TSB or TSB + tigecycline (0.6 mg/L) over night. Embp was detected by rabbit anti-rEmbp6599 antiserum and an Alexa568-coupled anti-rabbit IgG antibody. White bars = 13 μ m. (C) Relevance of Embp for tigecycline- or oxacillin-induced biofilm formation. *S. epidermidis* 1585 and corresponding isogenic *embp* transposon mutant 1585-M135 were grown in the presence of 0.6 mg/L tigecycline or oxacillin and biofilm formation was quantified after 20 h of growth. Bars represent mean of 12 data points recorded in three independent experiments. The difference between means are significantly different (Wilcoxon matched pair test; ** p < 0.01; * p < 0.05).

inactivation of *embp* also abolished oxacillin-induced biofilm accumulation. The residual biofilm forming capacity of *embp* mutant 1585-M135 grown under inducing conditions (Fig. 2C) suggests that here, additional intercellular adhesive mechanisms, e.g. eDNA

release (Qin et al., 2007), are contributing to adhesive growth. The release of eDNA could be of significant importance for induction of an antibiotic-tolerant state, as evidence indicates that eDNA can bind antibiotics, soak them within the biofilm matrix

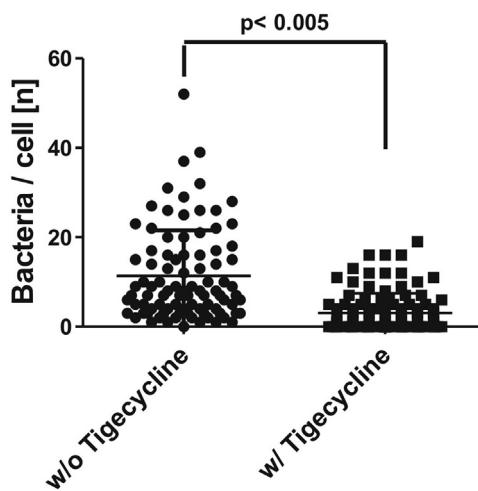


Fig. 3. Uptake of *S. epidermidis* 1585 by mouse macrophage-like J774A.1 cells. GFP-producing *S. epidermidis* 1585xpCM29 was grown in plain TSB or TSB supplemented with tigecycline (0.6 mg/L) overnight. Mouse macrophage-like J774A.1 cells were added. After 2 h of incubation and fixation with formaldehyde (3.7% [vol/vol]), outside cells were stained using a rabbit anti-*S. epidermidis* antiserum and an Alexa 568-coupled anti-rabbit IgG. Phagocytosed bacteria were enumerated for 15 macrophages. The graph represents data acquired during three independent experiments. The mean number of phagocytosed bacteria was significantly ($p<0.001$; Mann Whitney test) higher in the absence of tigecycline.

(Mulcahy et al., 2008), and render biofilm forming *S. epidermidis* less susceptible to e.g. vancomycin (Doroshenko et al., 2014). Moreover, inhibitors of protein biosynthesis used above their MIC have been shown to support the emergence of persister cells in *E. coli* (Kwan et al., 2013). Thus, it is tempting to speculate that tigecycline-induced biofilm formation could drive the development of persister cells in *S. epidermidis*.

As a key consequence, assembly of a multicellular biofilm architecture protects *S. epidermidis* not only from antibiotics, but also from effector mechanisms of the host innate immune system (Schommer et al., 2011; Vuong et al., 2004a; Vuong et al., 2004b). Therefore, we thought to investigate the consequences of tigecycline-induced biofilm formation on interactions with mouse macrophage-like cells J774A.1. J774A.1 cells were added to gfp-expressing *S. epidermidis* 1585xpCM29 grown overnight in the presence or absence of 0.6 mg/L tigecycline. After 2 h, intracellular (i.e. phagocytosed) bacteria were enumerated using fluorescence microscopy. Indeed, compared to bacteria that were grown under tigecycline-free conditions, tigecycline-induced *S. epidermidis* 1585 were significantly ($p<0.0001$; Mann Whitney test) less efficiently taken-up by mouse macrophages (Fig. 3). Given that tigecycline even at high concentrations only has a limited impact on bacterial uptake by phagocytes (Naess et al., 2011), it appears that indeed, tigecycline-induced biofilm formation interferes with phagocytosis. This is in line with previous results, showing that Embp-mediated biofilm formation protects *S. epidermidis* 1585 from uptake into mouse macrophages. Thus, the biofilm inducing effects of sub-inhibitory antimicrobials potentially promotes bacterial persistence by augmenting bacterial mechanisms fostering immune evasion.

In conclusion, our results not only provide additional information on molecular mechanisms related to sub-MIC-induced *S. epidermidis* biofilm formation, but also underscore the notion that this phenomenon could have significant detrimental effects on the course of a device associated-infection. Given the problematic penetration of antibiotics into infected tissues, e.g. joints and bones (Garazzino et al., 2008; Rodvold et al., 2006), it appears plausible to assume that indeed, during therapy *S. epidermidis* is exposed against only sub-inhibitory antibiotic concentrations, driving the

development of biofilm formation. Thus, a phenotype is promoted which itself is associated with an inherently increased resistance to antimicrobials, and effectors of the host immune system. In particular, the question if specific antimicrobials have unfavourable effects in host-pathogen interactions is so far underappreciated and demands further investigation.

Funding

This work was funded by an unrestricted grant from Pfizer, given to H.R.

Acknowledgements

We thank Gesche Kroll for excellent technical assistance.

References

- Aybar, Y., Ozaras, R., Besirli, K., Engin, E., Karabulut, E., Salihoglu, T., et al., 2012. **Efficacy of tigecycline and vancomycin in experimental catheter-related *Staphylococcus epidermidis* infection: microbiological and electron microscopic analysis of biofilm.** Int. J. Antimicrob. Agents 39 (April (4)), 338–342.
- Büttner, H., Mack, D., Rohde, H., 2015. **Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions.** Front. Cell. Infect. Microbiol. 5, 14.
- Becker, K., Heilmann, C., Peters, G., 2014. **Coagulase-negative staphylococci.** Clin. Microbiol. Rev. 27 (October (4)), 870–926.
- Berends, E.T., Horswill, A.R., Haste, N.M., Monestier, M., Nizet, V., von Kockritz-Blickwede, M., 2010. **Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps.** J. Innate Immun. 2 (6), 576–586.
- Cargill, J.S., Upton, M., 2009. **Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*.** J. Clin. Pathol. 62 (December (12)), 1112–1116.
- Chang, Y.M., Jeng, W.Y., Ko, T.P., Yeh, Y.J., Chen, C.K., Wang, A.H., 2010. **Structural study of TcaR and its complexes with multiple antibiotics from *Staphylococcus epidermidis*.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (May (19)), 8617–8622.
- 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.** Mol. Microbiol. 75 (January (1)), 187–207.
- Christner, M., Heinze, C., Busch, M., Franke, G., Hentschke, M., Bayard, D.S., et al., 2012. **sarA negatively regulates *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by modulating expression of 1 MDa extracellular matrix binding protein and autolysis-dependent release of eDNA.** Mol. Microbiol. 86 (October (2)), 394–410.
- Chu, V.H., Miro, J.M., Hoen, B., Cabell, C.H., Pappas, P.A., Jones, P., et al., 2009. **Coagulase-negative staphylococcal prosthetic valve endocarditis—a contemporary update based on the International Collaboration on Endocarditis: prospective cohort study.** Heart 95 (April (7)), 570–576.
- Claessens, J., Roriz, M., Merckx, R., Baatsen, P., Van Mellaert, L., Van Eldere, J., 2015. **Inefficacy of vancomycin and teicoplanin in eradicating and killing *Staphylococcus epidermidis* biofilms in vitro.** Int. J. Antimicrob. Agents 45 (April (4)), 368–375.
- Crawford, E.C., Singh, A., Metcalf, D., Gibson, T.W., Weese, S.J., 2014. **Identification of appropriate reference genes for qPCR studies in *Staphylococcus pseudintermedius* and preliminary assessment of icaA gene expression in biofilm-embedded bacteria.** BMC Res. Notes 7 (July), 451–457, <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-7-451>.
- Darouiche, R.O., 2004. **Treatment of infections associated with surgical implants.** N. Engl. J. Med. 350 (April (14)), 1422–1429.
- Decker, R., Burdelski, C., Zobiak, M., Büttner, H., Franke, G., Christner, M., et al., 2015. **An 18 kDa scaffold protein is critical for *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation.** PLoS Pathog. 11 (March (3)), e1004735.
- Doroshenko, N., Tseng, B.S., Howlin, R.P., Deacon, J., Wharton, J.A., Thurner, P.J., et al., 2014. **Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin.** Antimicrob. Agents Chemother. 58 (December (12)), 7273–7282.
- 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*.** J. Infect. Dis. 179 (June (6)), 1561–1564.
- Flemming, H.C., Wingender, J., 2010. **The biofilm matrix.** Nat. Rev. Microbiol. 8 (September (9)), 623–633.
- Franke, G.C., Dobinsky, S., Mack, D., Wang, C.J., Sobottka, I., Christner, M., et al., 2007. **Expression and functional characterization of gfpmut3.1 and its unstable variants in *Staphylococcus epidermidis*.** J. Microbiol. Methods 71 (November (2)), 123–132.

- Garazzino, S., Aprato, A., Baietto, L., D'Avolio, A., Maiello, A., De Rosa, F.G., et al., 2008. Glycopeptide bone penetration in patients with septic pseudoarthrosis of the tibia. *Clin. Pharmacokinet.* 47 (12), 793–805.
- Gerke, C., Kraft, A., Süßmuth, R., Schweitzer, O., Götz, F., 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* 273 (July (29)), 18586–18593.
- Gomes, F., Teixeira, P., Cerca, N., Ceri, H., Oliveira, R., 2011. Virulence gene expression by *Staphylococcus epidermidis* biofilm cells exposed to antibiotics. *Microb. Drug Resist.* 17 (June (2)), 191–196.
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., Götz, F., 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20 (June (5)), 1083–1091.
- John, A.K., Baldoni, D., Haschke, M., Rentsch, K., Schaefer, P., Zimmerli, W., et al., 2009. Efficacy of daptomycin in implant-associated infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: importance of combination with rifampin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (July (7)), 2719–2724.
- Kaplan, J.B., Jabbari, S., Sadovskaya, I., 2011. Extracellular DNA-dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Res. Microbiol.* 162 (June (5)), 535–541.
- Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23 (May (10)), 1289–1291.
- Kwan, B.W., Valenta, J.A., Benedik, M.J., Wood, T.K., 2013. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (March (3)), 1468–1473.
- Leite, B., Gomes, F., Teixeira, P., Souza, C., Pizzolitto, E., Oliveira, R., 2011. In vitro activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Curr. Microbiol.* 63 (September (3)), 313–317.
- Lentino, J.R., 2003. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin. Infect. Dis.* 36 (9), 1157–1161.
- Lewis, K., 2005. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc.)* 70 (February (2)), 267–274.
- Lewis, K., 2010. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 357–372.
- Linnemann, J.C., Ma, H., Bryers, J.D., 2013. Giant extracellular matrix binding protein expression in *Staphylococcus epidermidis* is regulated by biofilm formation and osmotic pressure. *Curr. Microbiol.* 66 (June (6)), 627–633.
- Mack, D., Nedelmann, M., Kroksch, A., Schwarzkopf, A., Heesemann, J., Laufs, R., 1994. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect. Immun.* 62 (August (8)), 3244–3253.
- Mack, D., Fischer, W., Kroksch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., et al., 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 178 (January (1)), 175–183.
- Mack, D., Bartscht, K., Fischer, C., Rohde, H., de Grah, C., Dobinsky, S., et al., 2001. Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Meth Enzymol.* 336, 215–239.
- Mack, D., Horstkotte, M.A., Rohde, H., Knobloch, J.K.M., 2006. Coagulase-negative *Staphylococci*. In: Pace, J.L., Rupp, M.E., Finch, R.G. (Eds.), *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. CRC Press, Boca Raton, pp. 109–153.
- Mack, D., Davies, A.P., Harris, L.G., Knobloch, J.K., Rohde, H., 2009. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: functional molecules, relation to virulence, and vaccine potential. *Top. Curr. Chem.* 288, 157–182.
- Maki, D.G., Kluger, D.M., Crnich, C.J., 2006. The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. *Mayo Clin. Proc.* 81 (September (9)), 1159–1171.
- Marculescu, C.E., Berbari, E.F., Hanssen, A.D., Steckelberg, J.M., Harmsen, S.W., Mandrekar, J.N., et al., 2006. Outcome of prosthetic joint infections treated with debridement and retention of components. *Clin. Infect. Dis.* 42 (February (4)), 471–478.
- Marrie, T.J., Nelligan, J., Costerton, J.W., 1982. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* 66 (December (6)), 1339–1341.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., Lewenza, S., 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* 4 (November (1)), e1000213.
- Naess, A., Andreeva, H., Sornes, S., 2011. Tigecycline attenuates polymorphonuclear leukocyte (PMN) receptors but not functions. *Acta Pharm.* 61 (September (3)), 297–302.
- Olsen, I., 2015. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34 (May (5)), 877–886.
- Qin, Z., Yang, X., Yang, L., Jiang, J., Ou, Y., Molin, S., et al., 2007. Formation and properties of in vitro biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* 56 (January (Pt 1)), 83–93.
- 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*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (December (12)), 3357–3363.
- Rodvold, K.A., Gotfried, M.H., Cwik, M., Korth-Bradley, J.M., Dukart, G., Ellis-Grosse, E.J., 2006. Serum, tissue and body fluid concentrations of tigecycline after a single 100 mg dose. *J. Antimicrob. Chemother.* 58 (December (6)), 1221–1229.
- Rohacek, M., Baddour, L.M., 2015. Cardiovascular implantable electronic device infections: associated risk factors and prevention. *Swiss Med. Wkly.* 145 (July), w14157, <http://dx.doi.org/10.4414/swm.2015.14157.eCollection@2015>.
- Rohde, H., Kalitzky, M., Kroger, N., Scherpe, S., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K., 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. *J. Clin. Microbiol.* 42 (December (12)), 5614–5619.
- 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. *Mol. Microbiol.* 55 (March (6)), 1883–1895.
- Rohde, H., Burandt, E.C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., et al., 2007a. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 28 (March (9)), 1711–1720.
- Rohde, H., Burandt, E.C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., et al., 2007b. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 28 (March (9)), 1711–1720.
- Rosenthal, V.D., Maki, D.G., Mehta, Y., Leblebicioglu, H., Memish, Z.A., Al-Mousa, H.H., et al., 2014. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007–2012. Device-associated module. *Am. J. Infect. Control* 42 (9), 942–956.
- Rupp, M.E., Ulphani, J.S., Fey, P.D., Bartscht, K., Mack, D., 1999a. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect. Immun.* 67 (May (5)), 2627–2632.
- Rupp, M.E., Ulphani, J.S., Fey, P.D., Mack, D., 1999b. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect. Immun.* 67 (May (5)), 2656–2659.
- Schaeffer, C.R., Woods, K.M., Longo, G.M., Kiedrowski, M.R., Paharik, A.E., Büttner, H., et al., 2014. Accumulation-associated protein (Aap) enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation under dynamic conditions and is required for infection in a rat catheter model. *Infect. Immun.*, IAI-14.
- Schaeffer, C.R., Woods, K.M., Longo, G.M., Kiedrowski, M.R., Paharik, A.E., Büttner, H., et al., 2015. Accumulation-associated protein enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation under dynamic conditions and is required for infection in a rat catheter model. *Infect. Immun.* 83 (January (1)), 214–226.
- Scherr, T.D., Heim, C.E., Morrison, J.M., Kilian, T., 2014. Hiding in plain sight: interplay between Staphylococcal biofilms and host immunity. *Front. Immunol.* 5 (February), 37, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00037>. eCollection@2014.
- Schommer, N.N., Christner, M., Hentschke, M., Ruckdeschel, K., Aeplfelsbacher, M., Rohde, H., 2011. *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 77A.1. *Infect. Immun.* (March).
- Stoodley, P., Braxton Jr., E.E., Nistico, L., Hall-Stoodley, L., Johnson, S., Quigley, M., et al., 2010. Direct demonstration of *Staphylococcus* biofilm in an external ventricular drain in a patient with a history of recurrent ventriculoperitoneal shunt failure. *Pediatr. Neurosurg.* 46 (August (2)), 127–132.
- Theis, T., Skurray, R.A., Brown, M.H., 2007. Identification of suitable internal controls to study expression of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance system by quantitative real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 70 (August (2)), 355–362.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., et al., 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40 (August (15)), e115.
- Vuong, C., Voyich, J.M., Fischer, E.R., Braughton, K.R., Whitney, A.R., DeLeo, F.R., et al., 2004a. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell. Microbiol.* 6 (March (3)), 269–275.
- Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J.M., Yao, Y., Fischer, E.R., DeLeo, F.R., et al., 2004b. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem.* 279 (December (52)), 54881–54886.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., Edmond, M.B., 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 39 (3), 309–317.

2. Zusammenfassende Darstellung der Publikation

Einleitung

Staphylococcus epidermidis stellt einen großen Anteil der residenten Hautflora und ist unter physiologischen Bedingungen harmlos (Kloos and Musselwhite, 1975). Allerdings ist *S. epidermidis*, gerade durch seine weite Verbreitung und den häufigen Einsatz von Fremdkörpern (zentrale Venenkatheter oder Totalendoprothesen) in der Medizin, als häufiger Erreger von Fremdkörper-assoziierten Infektionen von großer klinischer Bedeutung (Otto, 2009). So ist *S. epidermidis* die häufigste Ursache für Katheterinfektionen (Rogers et al., 2009), nach *S. aureus* die zweithäufigste Ursache für Herzklappenprothesen-Infektionen (Chu et al., 2009) und maßgeblich an Liquorshunt-, Schrittmacher-, Gefäßprothesen- sowie Gelenkprothesen-Infektionen beteiligt (Rogers et al., 2009). Diese sind oft auch mit Reserveantibiotika (wie Vancomycin, Linezolid, Daptomycin und Tigecyclin) schwer zu therapieren und erfordern nicht selten eine Explantation des infizierten Fremdkörpers. Diesem Umstand liegt die Fähigkeit von *S. epidermidis* zu Grunde feste Oberflächen als Biofilm zu kolonisieren, d.h. eine organisierte Struktur von mehreren Schichten fest haftender Bakterien zu bilden, die in einer extrazellulären Matrix eingebettet sind (Stoodley et al., 2010, Buttner et al., 2015). Für die meisten Bakterien stellt der bakterielle Biofilm in ihrem natürlichen Habitat die bevorzugte Lebensform dar (Costerton et al., 1995). Funktionell können 5 Phasen der Biofilmbildung unterschieden werden (Abbildung 1). Der planktonischen, frei schwebenden Lebensform folgt die primäre Adhäsion vereinzelter Bakterienzellen an Oberflächen, hauptsächlich aufgrund ihrer Hydrophobizität oder in vivo durch Bindung an wirtseigene Matrixproteine, welche Fremdkörperoberflächen nach kürzester Zeit überziehen (Otto, 2009). Im weiteren Verlauf kommt es durch Zellteilung zur Ausbildung von Mikrokolonien sowie durch Expression extrazellulärer Matrixproteine, welche Zell-Zell Interaktionen ermöglichen, zur Reifung eines stabilen Biofilmes (Flemming and Wingender, 2010, Buttner et al., 2015). In einer solchen Lebensgemeinschaft hat der Großteil der Bakterienzellen den Kontakt zur Oberfläche verloren und ist mit veränderten Lebensbedingungen, zum Beispiel im Hinblick auf das Nährstoffangebot konfrontiert. Die letzte Phase beschreibt die Möglichkeit vereinzelter Bakterien, sich aus dem Verband zu lösen und über die planktonische Form Absiedlungen zu bilden, wodurch das Modell zu einem Kreislauf geschlossen wird (Monds and O'Toole, 2009).

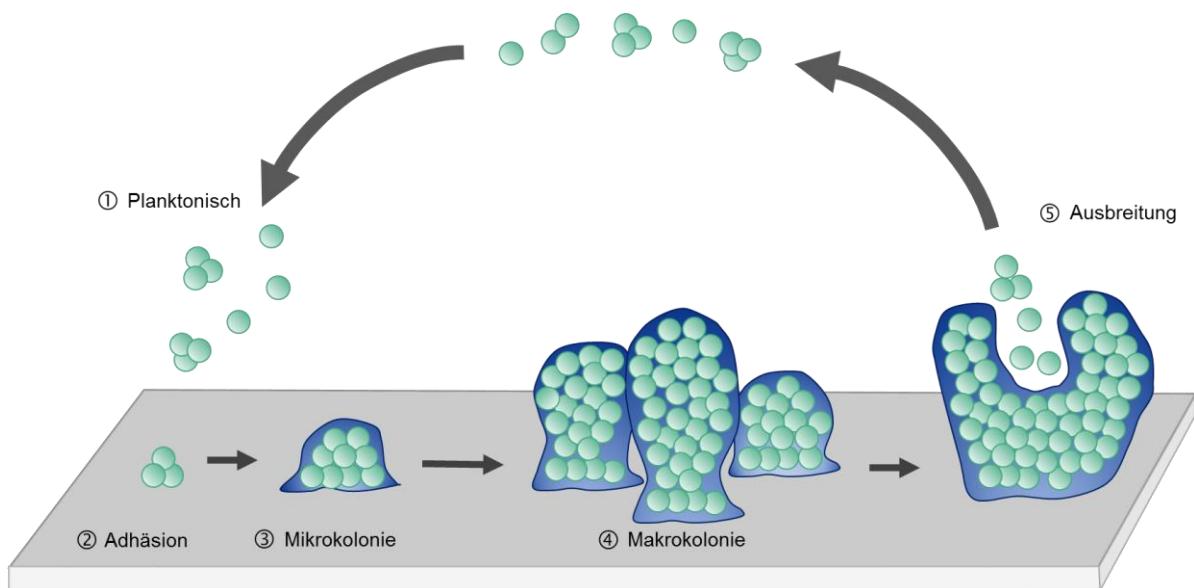


Abbildung 1 Phasen der bakteriellen Biofilmbildung.

Planktonische Bakterienzellen (1) haften an einer durch wirtseigene Matrixproteine konditionierten Fremdkörperoberfläche und vollziehen somit zunächst die primäre Adhäsion (2). Im weiteren Verlauf entstehen durch Entwicklung einer extrazellulären Matrix und Zellteilung Mikrokolonien (3) und nach Ausbildung einer dreidimensionalen Biofilmarchitektur Makrokolonien (4). Durch die Möglichkeit von Bakterienzellen sich aus dem reifen Biofilm abzulösen, wird das Modell zu einem Kreislauf geschlossen.

Die Architektur des reifen Biofilmes ist von der Bakterienspezies und den Lebensbedingungen abhängig, *S. epidermidis* bildet auf festen Oberflächen entweder pilzförmige Türme oder Rasen-ähnliche Strukturen (Rani et al., 2005, Okajima et al., 2006).

Über ein Zusammenwirken verschiedener Mechanismen wie niedrige Teilungsraten, Veränderungen des Metabolismus, die Etablierung von Persister-Zellen und extrazellulärer Biofilmmatrix sowie der Unfähigkeit von antimikrobiellen Substanzen in Biofilme einzudringen, erhöht dieser Wachstumsmodus die Antibiotikatoleranz (Romling and Balsalobre, 2012).

Die extrazelluläre Matrix ist aus Polysacchariden, Proteinen, eDNA und Teichonsäuren aufgebaut und ist wichtige Voraussetzung für die Ausbildung eines stabilen Biofilmes. Als beteiligte Faktoren wurden bisher vor allem das *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA) (Mack et al., 1996), das *accumulation associated protein* (Aap) (Rohde et al., 2005) und das *extracellular matrix binding protein* (Embp) (Christner et al., 2010) identifiziert, welche voneinander unabhängige Faktoren der Biofilmbildung darstellen.

Ziel der Arbeit

Der *S. epidermidis* Stamm 1585 ist ein klinisches Isolat einer besiedelten Portkatheterspitze und bildet trotz seiner klinischen Relevanz unter Standard-Laborbedingungen keinen Biofilm aus. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation biofilminduzierender Effekte von Antibiotika auf *S. epidermidis* 1585 sowie der dafür erforderlichen Bedingungen. Um den genauen Mechanismus zu untersuchen sollte der resultierende Biofilm insbesondere im Hinblick auf das beteiligte Adhäsionsprotein molekularbiologisch analysiert werden. Eine dreidimensionale Darstellung dieser organisierten Bakterienzelladhäsion mitsamt seiner extrazellulären Matrix sowie die Untersuchung dieses Gefüges auf eine entstandene Phagozytoseresistenz als beispielhafter erworberner Resistenzmechanismus von Biofilmen gegen das wirtseigene Immunsystem sollte die Arbeit komplettieren.

Material und Methoden

Die verwendeten Bakterienstämme und entsprechende relevante Eigenschaften sind in Tabelle 1 dargestellt. Eine Stammhaltung erfolgte auf Columbia Blutagarplatten.

Tabelle 1 Verwendete Bakterienstämme.

<i>S. epidermidis</i> Stamm	Beschreibung	Referenz
1585	Klinisches Isolat einer Port-Katheterinfektion. Biofilm-negativer Phänotyp in TSB. <i>embp</i> -positiver, <i>icaADBC</i> -negativer Genotyp.	Rohde 2005 Christner 2010
1585v	Biofilm-positive Subpopulation von <i>S. epidermidis</i> 1585, Biofilmbildung durch Embp-Expression.	Christner 2010
1585-M135	Biofilm-negative Mutante von <i>S. epidermidis</i> 1585v, trägt ein Tn917 in Embp	Christner 2010
12	Klinisches Wildtyp-Isolat aus einer Endoprotheseninfektion. Biofilm-negativer Phänotyp in TSB. <i>icaADBC</i> und <i>embp</i> -positiver Genotyp.	Rohde 2007

Biofilmassay. Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Antibiotika auf das Bakterienwachstum und die Biofilmbildung untersucht indem die Stämme *S. epidermidis* 1585 und M135 mit Verdünnungsreihen eines Antibiotikums (0–10 mg/L Tigecyclin, 0–10 mg/L Vancomycin oder 0–1 mg/L Penicillin) für 22 Stunden bei 37°C in Trypticase Sojabrühe (TSB) inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Zellwachstums durch Messung der optischen Dichte bei 600nm

(OD₆₀₀) sowie der Dicke des Biofilmes durch Messung bei 570nm (OD₅₇₀). Um den Einfluss der Bakterienwachstumsphase auf die Biofilminduktion zu ermitteln, wurde in weiteren Experimenten das Antibiotikum erst nach 12 Stunden, also in der stationären Phase zu den Bakterien gegeben.

Dot-blot Immunoassay. Um eine Veränderung der Embp-Expression im Biofilm nachzuweisen wurden die Stämme *S. epidermidis* 1585 und M135 für 22 Stunden bei 37°C in Zellkulturschalen mit TSB sowie Tigecyclin (0,0, 0,625 und 1,25 mg/L) inkubiert. Anschließend wurden die Proteine der adhärenten Bakterien präpariert und Dot-blot Immunoassays unter Verwendung von Embp-Antikörper angefertigt.

Quantitative real-time PCR Analyse (qPCR). Für eine quantitative Untersuchung von Veränderungen der Embp-Expression auf Transkriptionsebene wurde eine qPCR der Stämme *S. epidermidis* 1585, 1585v (Positivkontrolle) und M135 (Negativkontrolle) nach Wachstum in TSB/Tigecyclin durchgeführt und das relative Expressionslevel berechnet.

Konfokale Lasermikroskopie (CLSM). Zur 3D Darstellung des *S. epidermidis* Biofilms samt seiner Embp Verteilung wurde der Stamm 1585xpCM29 für 20 Stunden in Zellkulturschalen mit TSB oder TSB und Tigecyclin (0,6 mg/L) inkubiert. Nach Entfernen des Mediums, Waschen und Blocken wurde Embp durch Embp-Antikörper und Alexa568 gekoppelte IgG dargestellt. Mit einem konfokalen Lasermikroskop wurden dreidimensionale Bilder der Biofilme aufgenommen, wobei sich die Bakterienzellen des verwendeten Stammes durch das Exprimieren von *Gfp* darstellten und Embp, wie oben beschrieben, durch Alexa568 dargestellt wurde.

Makrophagen-Interaktion. Die Untersuchung der Bakterienzellenaufnahme durch Makrophagen wurde ähnlich wie zuvor durch (Schommer et al., 2011) beschrieben durchgeführt mit der Ausnahme, dass durch die Verwendung des *Gfp*-exprimierenden Stammes 1585xpCM29 eine immunologische Detektion intrazellulärer Bakterien unnötig war. Murine Makrophagen vom Typ J774A.1 wurden für 2 Stunden mit *S. epidermidis* 1585xpCM29, welcher zuvor mit oder ohne Tigecyclin kultiviert wurde, exponiert. Nach Fixieren und Waschen wurden extrazelluläre Bakterien durch anti-*S. epidermidis* Antikörper und IgG gekoppeltes Cy5 markiert. Mit einem konfokalen Lasermikroskop konnten nun Bilder generiert werden, in welchen die intrazellulären Bakterienzellen ausgezählt wurden.

Ergebnisse und Diskussion

Fremdkörperassoziierte Infektionen mit *S. epidermidis* werden im klinischen Alltag aufgrund der häufigen Resistzenzen gegen β -lactam Antibiotika (Mack et al., 2009) meist mit Vancomycin therapiert. Ist aufgrund von Nephrotoxizität oder Überempfindlichkeitsreaktionen Vancomycin kontraindiziert, wird auf Wirkstoffe wie Linezolid, Daptomycin oder Tigecyclin zurückgegriffen (John et al., 2009, Aybar et al.). Bisher wurden Nebenwirkungen im Zusammenhang mit Biofilm induzierenden Eigenschaften dieser Wirkstoffe wenig untersucht, es gibt aber Hinweise auf einen solchen Effekt durch subinhibitorische Vancomycin Konzentrationen (Kaplan et al., 2011). Im Rahmen der genaueren Untersuchung biofilminduzierender Effekte von Reserveantibiotika wurde in der vorliegenden Arbeit speziell die Wirkung von Linezolid, Daptomycin und Tigecyclin auf ein klinisches Isolat von *S. epidermidis* 1585 aus einer Port-Katheterinfektion untersucht (Rohde et al., 2005, Christner et al., 2010, Christner et al., 2012). Trotz seiner klinischen Relevanz bildet *S. epidermidis* unter Standard-Laborbedingungen keinen Biofilm aus (Christner et al., 2010, Christner et al., 2012). Die meisten der unter Laborbedingungen Biofilm-negativen Stämme sind trotz des Fehlens des *icaADBC* Operons als Voraussetzung für eine PIA vermittelte Biofilmbildung dennoch in der Lage, als Reaktion auf externe Stimuli (z.B. Antibiotika) Biofilme über PIA unabhängige Mechanismen auszubilden (Rohde et al., 2005, Christner et al., 2010, Kaplan et al., 2011). Dieser Vorgang unterliegt der Regulation des *SarA* Gens (Staphylococcal accessory regulator).

Die Resistenztestung mittels E-Test ergab, dass *S. epidermidis* 1585 resistent gegen Oxacillin, jedoch sensibel für Penicillin, Vancomycin, Daptomycin, Linezolid und Tigecyclin ist. Verschiedene Konzentrationen (0.005 – 5 mg/L) von Penicillin, Vancomycin, Linezolid oder Daptomycin hatten keinen Einfluss auf den Biofilmpänotyp (Abbildung 2). Dies steht im Gegensatz zu früheren Studien die einen biofilminduzierenden Effekt von Vancomycin auf *S. epidermidis* 9142, 1457 und RP62A zeigen konnten (Kaplan et al., 2011, Cargill and Upton, 2009, Claessens et al., 2015), was die Vermutung zulässt, dass der Einfluss von Antibiotika auf die Biofilmbildung vom Genotyp des jeweiligen Stammes abhängt (Kaplan et al., 2011). Damit in Übereinstimmung konnten wir einen biofilminduzierenden Effekt von 1,25 μ g/ml Vancomycin auf den genetisch unabhängigen Stamm *S. epidermidis* 12 (einem klinischen Isolat einer TEP-Infektion) zeigen (Rohde et al., 2007).

Insbesondere konnten wir auch Tigecyclin in einem schmalen Konzentrationsbereich zwischen 0,156 und 0,625 mg/L in *S. epidermidis* 1585 eine 2-3 fache Biofilmbildung nachweisen (Abbildung 2). Bei genauerer Betrachtung des Bakterienwachstums zeigte sich, dass der Phänotyp-Switch insbesondere am Übergang von inhibitorischen zu sub-inhibitorischen Tigecyclin-Konzentrationen auftrat und sich bei weiterer Verringerung der Konzentration wieder verlor (Abbildung 2).

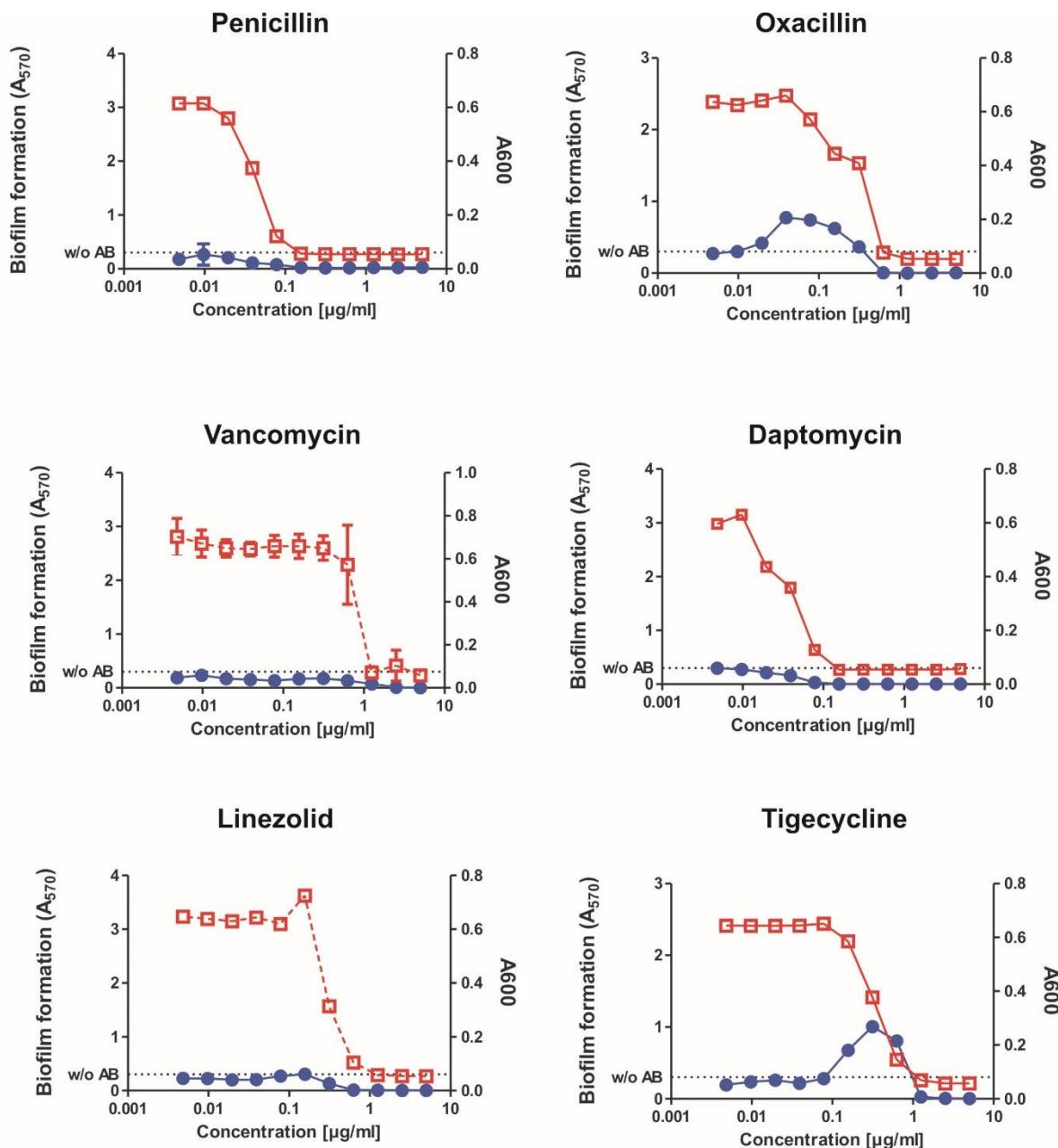


Abbildung 2 Biofilminduktion in *S. epidermidis* 1585 unter Anwesenheit von Antibiotika.

Nach 20 Stunden Wachstum in TSB unter Anwesenheit verschiedener Antibiotikakonzentrationen wurde die Zelldichte durch Messung der Absorption bei 600nm (rote Kästchen) und die Biofilmbildung nach Färbung adhärenter Zellen mit Gentianaviolett bei 570nm (blaue Punkte) gemessen. Die gepunktete Linie zeigt die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1585 in TSB ohne Antibiotika an. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von 12 Werten aus drei unabhängigen Experimenten.

Tigecyclin gehört zur Gruppe der Gycylcycline und wirkt ebenso wie die verwandten (herkömmlichen) Tetrazykline über eine Hemmung der ribosomalen Proteinbiosynthese bakteriostatisch bei jedoch geringerer Anfälligkeit für bakterielle Resistenzmechanismen. Erstaunlicherweise konnten wir für Tigecyclin keinen Einfluss auf die Biofilmbildung in *S. epidermidis* 1585 nachweisen, was auf einen Tigecyclin-spezifischen Effekt schließen lässt. Durch subinhibitorische Tigecyclin-Konzentrationen konnte auch in *S. epidermidis* 12 die Biofilmbildung induziert werden.

Bisher wurde die Biofilminduktion von subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen der Hochregulation von *icaADBC* und der darauffolgenden PIA-Synthese zugeschrieben (Gomes et al., 2011, Chang et al., 2010, Rachid et al., 2000), wobei mit der Betrachtung von überwiegend *icaADBC*-positiven Stämmen mögliche PIA unabhängige Mechanismen der Zellaggregation weitestgehend vernachlässigt worden sind. Es gibt bereits Hinweise, dass der biofilminduzierende Effekt von Vancomycin PIA-vermittelt wirkt, während Tigecyclin diesen Effekt höchstwahrscheinlich über einen PIA unabhängigen, eDNA-abhängigen, Mechanismus hervorruft (Kaplan et al., 2011, Cargill and Upton, 2009). Vorangegangene Studien der hiesigen Arbeitsgruppe zeigten, dass *S. epidermidis* 1585 in der Lage ist einen mehrschichtigen Zellverband anhand von Embp auszubilden (Christner et al., 2010, Christner et al., 2012).

Embp ist ein riesiges, etwa 1 Megadalton (MDa) großes Protein, welches eine extrazelluläre Matrix für Aufnahme und Zusammenhalt von Bakterienzellen bildet (Schommer et al., 2011). In klinischen *S. epidermidis* Isolaten ist das Embp Gen weit verbreitet und kann in fast jedem Stamm nachgewiesen werden (Rohde et al., 2007, Rohde et al., 2004). Unter Standard-Laborbedingungen wird *embp* nur sehr gering exprimiert (Abbildung 3A) (Christner et al., 2010), da diese bei Wachstum in TSB durch *SarA* supprimiert wird (Christner et al., 2012) wodurch sich erklären lässt warum *icaADBC*-negative, Embp-positive *S. epidermidis* Isolate unter Standard-Laborbedingungen keinen Biofilm ausbilden (Rohde et al., 2007).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen stellten wir die Hypothese auf, dass die Tigecyclin induzierte Biofilmbildung funktionell mit Embp zusammenhängt. Um diese Hypothese zu untersuchen wurde die Embp-Expression zunächst in An- oder Abwesenheit von Tigecyclin in Dot Blot Immunassays (DIA) mit einem Antiserum gegen eine Embp Subdomäne untersucht (Christner et al., 2010). Hierbei ließ sich nach 24 Stunden

Wachstum in TSB keine oder nur geringe Embp-Synthese nachweisen (Abbildung 3A), während in scharfem Kontrast dazu die Anwesenheit von 0,625 mg/L Tigecyclin zu einer 8-fachen Erhöhung der Embp-Synthese führte (Abbildung 3A).

Auch die Untersuchung der Biofilmbildung und Embp-Expression von *S. epidermidis* 1585 mittels konfokaler Lasermikroskopie bestätigte diese Ergebnisse nicht nur durch einen visuellen Nachweis der Biofilmbildung unter Tigecyclin Einfluss, sondern konnte sogar eine extrazelluläre Matrix aus Embp darstellen (Abbildung 3B).

Darüber hinaus konnte die Embp-Induktion auch durch quantitative real-time PCR (Christner et al., 2010) nachgewiesen werden, wobei die Anwesenheit von Tigecyclin 3,7-fach erhöhte Expressionslevel hervorrief, während die *sarA* Expression zugleich 3,9-fach herabreguliert war. Die Anhäufung von Embp ist somit durch Veränderungen auf Transkriptionsebene zu erklären und nicht durch langsamen Zellumsatz z.B. infolge Herunterregulation von extrazellulären Proteasen. Die *Embp* Hochregulation ist am ehesten als eine Konsequenz der *sarA* Herabregulation durch subinhibitorische Tigecyclin-Konzentrationen zu sehen (Christner et al., 2012).

Auch *S. epidermidis* 12 konnte unter subinhibitorischen Tigecyclinkonzentrationen eine 3,7-fache Heraufregulation von *embp* und eine damit einhergehende Induktion der Embp-Synthese nachgewiesen werden. Zugleich war in diesem Rahmen keine relevante *icaA*-Regulation zu beobachten, was darauf hindeutet, dass in *S. epidermidis* 12 PIA nicht an der Tigecyclin induzierten Biofilmbildung beteiligt ist.

Erstaunlicherweise konnte Embp nur in der frühen bis mittleren exponentiellen Wachstumsphase von *S. epidermidis* 1585 induziert werden, während eine Exposition mit Tigecyclin nach 20 Stunden Wachstum in TSB keinen Einfluss hatte. Da auch die Biofilmbildung ausschließlich in der frühen bis mittleren exponentiellen Wachstumsphase induziert werden konnte, stellt sich der Verdacht auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Tigecyclin induzierter *embp*-Expression und Biofilmbildung. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die isogene mutante 1585-M135, welche eine Tn917 Insertion in *embp* trägt, verwendet (Christner et al., 2010). Die signifikant herabgesetzte Biofilmbildung der Mutante 1585-M135 unter subinhibitorischen Tigecyclin-Konzentrationen zeigt, dass die Tigecyclin induzierte Biofilmbildung durch *S. epidermidis* 1585 zum mindest teilweise Embp abhängig ist (Abbildung 3C).

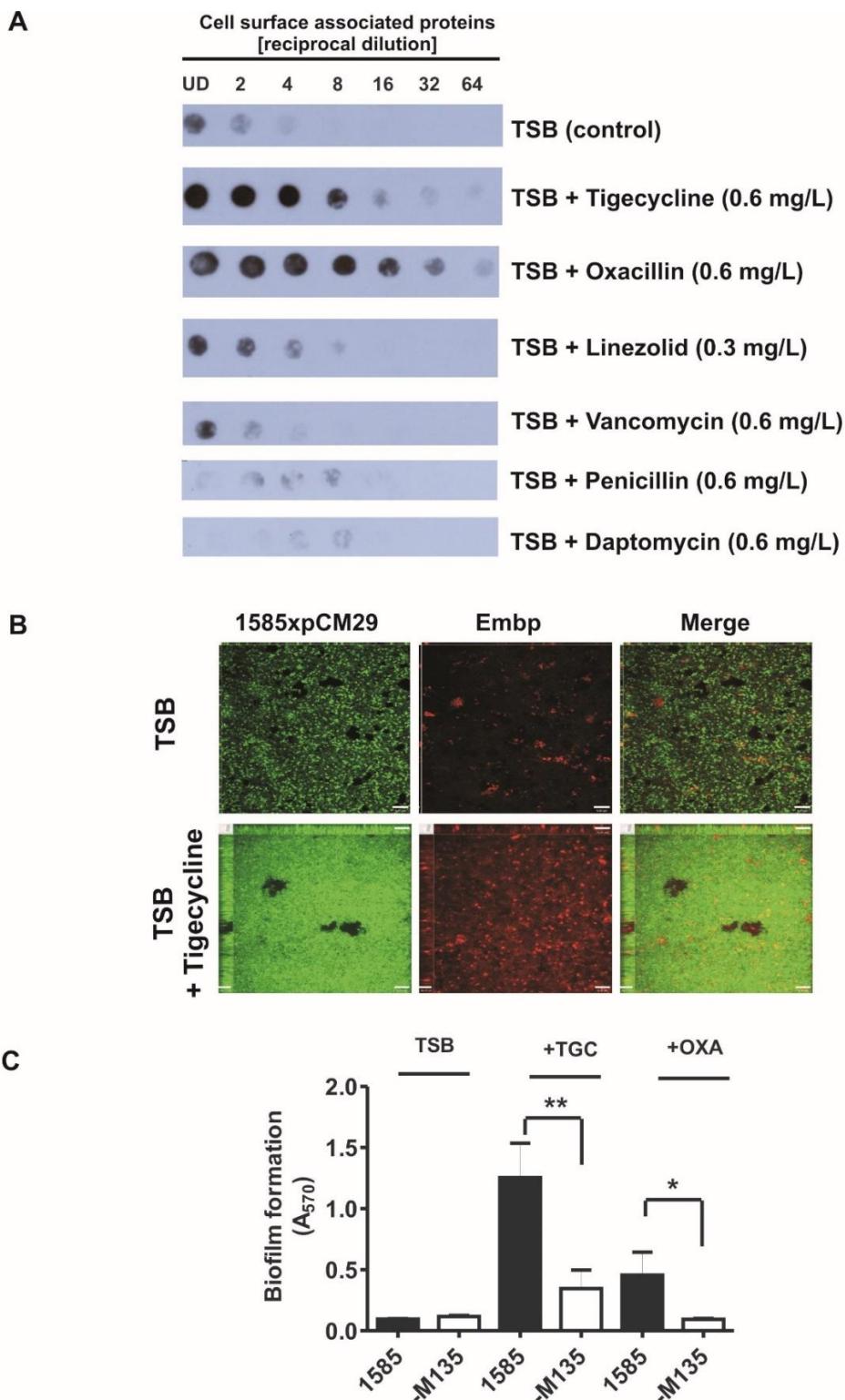


Abbildung 3 Detektion der Embp Produktion unter Anwesenheit von Antibiotika.

(A) Zelloberflächen-adhärente Proteine wurden aus *S. epidermidis* 1585 nach Wachstum unter den angegebenen Antibiotikakonzentrationen präpariert. Verdünnungsserien dieser Präparationen wurden auf vorhandenes Embp mittels Dotblot Immunoassays unter Verwendung von Anti-Embp Antikörper untersucht. UD= unverdünnt. (B) Untersuchung der *S. epidermidis* 1585 Biofilmbildung mittels Konfokaler Lasermikroskopie. *Gfp*-exprimierender *S. epidermidis* 1585xpCM29 (grün) wurde in TSB versus TSB + Tigecyclin kultiviert. Embp wurde Antikörper vermittelt markiert (rot). (C) Relevanz von Embp für die Tigecyclin und Oxacillin induzierte Biofilmbildung. *S. epidermidis* 1585 und die entsprechende isogene Transposon-Mutante 1585-M135 wurden unter Tigecyclin oder Oxacillin kultiviert. Im Anschluss wurde die Biofilmbildung quantifiziert. Jeder Balken repräsentiert 12 Werte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Mittelwerte unterscheiden sich signifikant (** p < 0,01; * p < 0,05).

Die verbliebene Biofilmbildung unter diesen Bedingungen (Abbildung 3C) deutet auf weitere interzelluläre Mechanismen hin, die adhäsives Wachstum ermöglichen, wie zum Beispiel die Freisetzung von eDNA (Qin et al., 2007). eDNA könnte eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit gesteigerter Antibiotikatoleranz darstellen, da bereits gezeigt werden konnte, dass eDNA Antibiotika in der Biofilmmatrix binden kann (Mulcahy et al., 2008) und die Sensibilität von biofilmbildenden *S. epidermidis* gegenüber Vancomycin verringert (Doroshenko et al., 2014). Da Hemmstoffe der Proteinbiosynthese in *E. coli* Persister-Zellen hervorrufen können (Kwan et al., 2013), ist die Vermutung naheliegend dass Tigecyclin induzierte Biofilmbildung einen ähnlichen Effekt auf *S. epidermidis* hat.

Das Wachstum in Biofilmen schützt *S. epidermidis* nicht nur vor Antibiotika, sondern auch vor Effektormechanismen des unspezifischen Immunsystems (Schommer et al., 2011, Vuong et al., 2004b, Vuong et al., 2004a). Diesen erworbenen Resistenzmechanismus wollten wir auch für den Tigecyclin-induzierten Biofilm untersuchen, in dem dieser murinen Makrophagen vom Typ J774A.1 ausgesetzt wurde. Nach zwei Stunden konnte durch den fluoreszenzmikroskopischen Vergleich der intrazellulären Bakterienzellen nachgewiesen werden, dass diese nach Wachstum in subinhibitorischer Tigecyclinkonzentration signifikant schlechter phagozytiert wurden als Bakterienzellen ohne vorherigen Tigecyclin-Kontakt (Abbildung 4).

Da Tigecyclin selbst in hohen Konzentrationen nur einen geringen Effekt auf die Aufnahme von Bakterien durch Phagozyten zu haben scheint (Naess et al., 2011), deutet das Ergebnis darauf hin, dass die Phagozytose tatsächlich durch den Tigecyclin-induzierten Biofilm beeinträchtigt wird. Somit wird durch diesen Wachstumsmodus über die Ausbildung von Mechanismen zur Immunevasion die Persistenz der Bakterien gesteigert. Aufgrund der erschwerten Verteilung von Antibiotika in infizierte Gewebe (Garazzino et al., 2008, Rodvold et al., 2006), kann davon ausgegangen werden, dass *S. epidermidis* im klinischen Alltag häufig subinhibitorischen Konzentrationen ausgesetzt ist, wodurch Biofilmbildung und letztendlich eine erhöhte Resistenz gegen antimikrobielle Wirkstoffe und das wirtseigene Immunsystem ausgebildet wird.

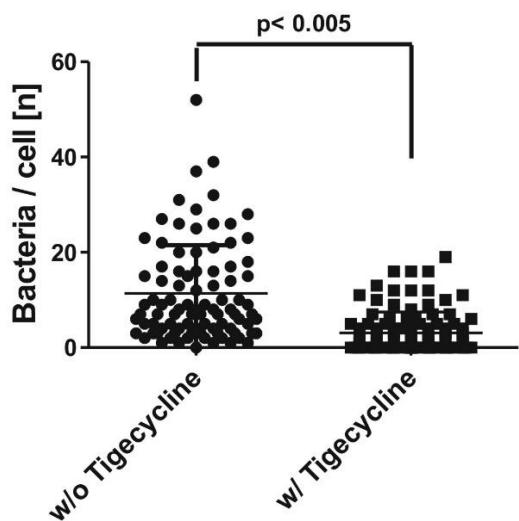


Abbildung 4 Phagozytose von *S. epidermidis* 1585 durch murine Makrophagen vom Typ J774A.1. Gfp synthetisierender *S. epidermidis* 1585xpCM29 wurde in TSB versus TSB + Tigecyclin kultiviert. 2h nach Inkubation mit murinen Makrophagen vom Typ J774A.1 wurden die extrazellulären Zellen Antikörper vermittelt markiert und phagozytierte Bakterienzellen von 15 Makrophagen ausgezählt. Der Mittelwert phagozytierter Bakterien war signifikant ($p < 0,001$) höher in Abwesenheit von Tigecyclin.

Fazit

In der vorliegenden Studie konnten wir eine paradoxe Wirkung von Tigecyclin auf *S. epidermidis* zeigen, welche bei subinhibitorischen Konzentrationen die Biofilmbildung induzieren konnte. In molekularbiologischen Verfahren konnte ein Zusammenhang mit der Hochregulation der Embp-Synthese festgestellt werden. Damit einher ging auch eine gesteigerte Phagozytoseresistenz, woraus zu schließen ist, dass das untersuchte Phänomen einen abträglichen Effekt auf den Verlauf von Fremdkörper assoziierten Infektionen haben kann. Die Ergebnisse der Studie verdeutlichen die Wichtigkeit des genauen Verständnisses der an der Biofilmbildung beteiligten Komponenten für die zukünftige Entwicklung von Präventions- und Therapieregimes im Umgang mit Fremdkörper-assoziierten Infektionen, an deren Ende möglicherweise biofilmauflösende Enzyme stehen könnten.

Bisher wurde der Einfluss von antimikrobiellen Wirkstoffen auf die Interaktion zwischen Wirt und Pathogen von der Wissenschaft nicht ausreichend untersucht. Weitere Studien sind notwendig um auch die Signaltransduktionswege und regulatorische Netzwerke aufzuklären, die der Expression von extrazellulären Proteinen im Rahmen der Biofilmbildung zugrunde liegen. Des Weiteren ist immer noch nicht vollständig geklärt, wie das 1MDa große Protein Embp in den Extrazellularraum gelangen kann.

3. Literaturverzeichnis

- AYBAR, Y., OZARAS, R., BESIRLI, K., ENGIN, E., KARABULUT, E., SALIHOGLU, T., METE, B., TABAK, F., MERT, A., TAHAN, G., YILMAZ, M. H. & OZTURK, R. Efficacy of tigecycline and vancomycin in experimental catheter-related *Staphylococcus epidermidis* infection: microbiological and electron microscopic analysis of biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39, 338-342.
- BUTTNER, H., MACK, D. & ROHDE, H. 2015. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol*, 5, 14.
- CARGILL, J. S. & UPTON, M. 2009. Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Pathology*, 62, 1112-1116.
- CHANG, Y.-M., JENG, W.-Y., KO, T.-P., YEH, Y.-J., CHEN, C. K.-M. & WANG, A. H.-J. 2010. Structural study of TcaR and its complexes with multiple antibiotics from *Staphylococcus epidermidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 8617-8622.
- CHRISTNER, M., FRANKE, G. C., SCHOMMER, N. N., WENDT, U., WEGERT, K., PEHLE, P., KROLL, G., SCHULZE, C., BUCK, F., MACK, D., AEPFELBACHER, M. & ROHDE, H. 2010. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Molecular Microbiology*, 75, 187-207.
- CHRISTNER, M., HEINZE, C., BUSCH, M., FRANKE, G., HENTSCHKE, M., DUHRING, S. B., BUTTNER, H., KOTASINSKA, M., WISCHNEWSKI, V., KROLL, G., BUCK, F., MOLIN, S., OTTO, M. & ROHDE, H. 2012. sarA negatively regulates *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by modulating expression of 1MDa extracellular matrix binding protein and autolysis-dependent release of eDNA. *Molecular Microbiology*, 86, 394-410.
- CHU, V. H., MIRO, J. M., HOEN, B., CABELL, C. H., PAPPAS, P. A., JONES, P., STRYJEWSKI, M. E., ANGUERA, I., BRAUN, S., MUÑOZ, P., COMMERFORD, P., TORNOS, P., FRANCIS, J., OYONARTE, M., SELTON-SUTY, C., MORRIS, A. J., HABIB, G., ALMIRANTE, B., SEXTON, D. J., COREY, G. R., FOWLER, V. G. & COLLABORATION, I. 2009. Coagulase-negative staphylococcal prosthetic valve endocarditis-a contemporary update based on the International Collaboration on Endocarditis: prospective cohort study. *Heart*, 95, 570-576.
- CLAESSENS, J., RORIZ, M., MERCKX, R., BAATSEN, P., VAN MELLAERT, L. & VAN ELDERE, J. 2015. Inefficacy of vancomycin and teicoplanin in eradicating and killing *Staphylococcus epidermidis* biofilms in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45, 368-375.
- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R. & LAPPINSCOTT, H. M. 1995. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711-745.
- DOROSHENKO, N., TSENG, B. S., HOWLIN, R. P., DEACON, J., WHARTON, J. A., THURNER, P. J., GILMORE, B. F., PARSEK, M. R. & STOODLEY, P. 2014. Extracellular DNA Impedes the Transport of Vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* Biofilms Preexposed to Subinhibitory Concentrations of Vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 7273-7282.
- FLEMMING, H. C. & WINGENDER, J. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8, 623-33.
- GARAZZINO, S., APRATO, A., BAIETTO, L., D'AVOLIO, A., MAIELLO, A., DE ROSA, F. G., ALOJ, D., SICCARDI, M., BIASIBETTI, A., MASSÈ, A. & DI PERRI, G. 2008. Glycopeptide Bone Penetration in Patients with Septic Pseudoarthrosis of the Tibia. *Clinical Pharmacokinetics*, 47, 793-805.
- GOMES, F., TEIXEIRA, P., CERCA, N., CERI, H. & OLIVEIRA, R. 2011. Virulence Gene Expression by *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Cells Exposed to Antibiotics. *Microbial Drug Resistance*, 17, 191-196.

- JOHN, A.-K., BALDONI, D., HASCHKE, M., RENTSCH, K., SCHÄERLI, P., ZIMMERLI, W. & TRAMPUZ, A. 2009. Efficacy of Daptomycin in Implant-Associated Infection Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Importance of Combination with Rifampin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 2719-2724.
- KAPLAN, J. B., JABBOURI, S. & SADOVSKAYA, I. 2011. Extracellular DNA-dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Research in Microbiology*, 162, 535-541.
- KLOOS, W. E. & MUSSELWHITE, M. S. 1975. Distribution and Persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* Species and Other Aerobic Bacteria on Human Skin. *Applied Microbiology*, 30, 381-395.
- KWAN, B. W., VALENTA, J. A., BENEDIK, M. J. & WOOD, T. K. 2013. Arrested Protein Synthesis Increases Persister-Like Cell Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 1468-1473.
- MACK, D., DAVIES, A. P., HARRIS, L. G., KNOBLOCH, J. K. & ROHDE, H. 2009. *Staphylococcus epidermidis* Biofilms: Functional Molecules, Relation to Virulence, and Vaccine Potential. *Top Curr Chem*, 288, 157-82.
- 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 beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol*, 178, 175-83.
- MONDS, R. D. & O'TOOLE, G. A. 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17, 73-87.
- MULCAHY, H., CHARRON-MAZENOD, L. & LEWENZA, S. 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog*, 4, e1000213.
- NAESS, A., ANDREEVA, H. & SORNES, S. 2011. Tigecycline attenuates polymorphonuclear leukocyte (PMN) receptors but not functions. *Acta Pharm*, 61, 297-302.
- OKAJIMA, Y., KOBAYAKAWA, S., TSUJI, A. & TOCHIKUBO, T. 2006. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* on intraocular lens material. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47, 2971-2975.
- OTTO, M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 555-567.
- QIN, Z. Q., YANG, X. M., YANG, L., JIANG, J., OU, Y. Z., MOLIN, S. & QU, D. 2007. Formation and properties of in vitro biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 83-93.
- 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*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 3357-3363.
- RANI, S. A., PITTS, B. & STEWART, P. S. 2005. Rapid diffusion of fluorescent tracers into *Staphylococcus epidermidis* biofilms visualized by time lapse microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 728-732.
- RODVOLD, K. A., GOTFRIED, M. H., CWIK, M., KORTH-BRADLEY, J. M., DUKART, G. & ELLIS-GROSSE, E. J. 2006. Serum, tissue and body fluid concentrations of tigecycline after a single 100 mg dose. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 1221-1229.

- ROGERS, K. L., FEY, P. D. & RUPP, M. E. 2009. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 23, 73-+.
- ROHDE, H., BURANDT, E. C., SIEMSSEN, N., FROMMELT, L., BURDELSKI, C., WURSTER, S., SCHERPE, S., DAVIES, A. P., HARRIS, L. G., HORSTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, J. K., RAGUNATH, C., KAPLAN, J. B. & MACK, D. 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*, 28, 1711-20.
- ROHDE, H., BURDELSKI, C., BARTSCHT, K., HUSSAIN, M., BUCK, F., HORSTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, J. K. M., HEILMANN, C., HERRMANN, M. & MACK, D. 2005. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular Microbiology*, 55, 1883-1895.
- ROHDE, H., KALITZKY, M., KROGER, N., SCHERPE, S., HORSTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, J. K., ZANDER, A. R. & MACK, D. 2004. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol*, 42, 5614-9.
- ROMLING, U. & BALSALOBRE, C. 2012. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med*, 272, 541-61.
- SCHOMMER, N. N., CHRISTNER, M., HENTSCHKE, M., RUCKDESCHEL, K., AEPFELBACHER, M. & ROHDE, H. 2011. *Staphylococcus epidermidis* Uses Distinct Mechanisms of Biofilm Formation To Interfere with Phagocytosis and Activation of Mouse Macrophage-Like Cells 774A.1. *Infection and Immunity*, 79, 2267-2276.
- STOODLEY, P., BRAXTON, J. E. E., NISTICO, L., HALL-STOODLEY, L., JOHNSON, S., QUIGLEY, M., POST, J. C., EHRLICH, G. D. & KATHJU, S. 2010. Direct Demonstration of *Staphylococcus* Biofilm in an External Ventricular Drain in a Patient with a History of Recurrent Ventriculoperitoneal Shunt Failure. *Pediatric Neurosurgery*, 46, 127-132.
- VUONG, C., KOCHANOV, S., VOYICH, J. M., YAO, Y. F., FISCHER, E. R., DELEO, F. R. & OTTO, M. 2004a. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 54881-54886.
- 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. *Cellular Microbiology*, 6, 269-275.

4. Zusammenfassung

Hintergrund

Biofilm-assoziierte *Staphylococcus epidermidis* Implantatinfektionen sind oft schwer mit antibiotischen Therapiestrategien zu eradicieren. Dieser Problematik liegen zum Teil die niedrigen und somit insuffizienten Antibiotika-Konzentrationen an der Implantat-Gewebe-Schnittstelle zu Grunde.

Ziel der Studie

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den Effekt solcher subinhibitorischen Antibiotika-Konzentrationen auf die *S. epidermidis* Biofilmbildung, die Expression interzellulärer Adhäsine und potentielle Auswirkungen auf die Interaktion zwischen Bakterienzellen und Makrophagen.

Ergebnisse

Die Biofilmbildung des klinischen Isolates *S. epidermidis* 1585 aus einer Portkatheter-Infektion wurde nach Wachstum unter zellwandaktiven Wirkstoffen (Oxacillin, Penicillin, Vancomycin, Daptomycin) und Proteinbiosyntheseinhibitoren (Erythromycin, Linezolid, Tigecyclin) untersucht. Weder Penicillin, Vancomycin, Daptomycin noch Erythromycin und Linezolid zeigten einen biofilminduzierenden Effekt unter den untersuchten Konzentrationen. Im Gegensatz dazu konnte in einem schmalen Bereich subinhibitorischer Konzentrationen von Oxacillin (0,04 – 0,16 µg/ml) und Tigecyclin (0,16 – 0,63 µg/ml) eine signifikante biofilminduzierende Aktivität nachgewiesen werden. In vorangegangenen Studien der hiesigen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *S. epidermidis* 1585 ein überdimensioniert 1MDa großes extrazelluläres Matrix-bindendes Protein (Embp) verwendet, um eine mehrschichtige Biofilm-Architektur aufzubauen. SarA ist ein negativer Regulator von Embp und Herabregulation von sarA induziert die Embp-abhängige Biofilmbildung. Mittels Dotblot Immunoassays, konfokaler Lasermikroskopie und qPCR konnte gezeigt werden, dass Tigecyclin im Zusammenhang mit der Induktion von Biofilmbildung auch die Embp-Expression steigerte. Die Expression von SarA wurde im Gegenzug supprimiert, was die Schlussfolgerung zulässt, dass der Effekt von Tigecyclin auf Embp durch SarA vermittelt wird. Da in der Biofilm-negativen Transposon-Mutante *S. epidermidis* 1585-M135 durch Tigecyclin keine Biofilmbildung induziert werden konnte, ist die Embp Hochregulation unter diesen Umständen offensichtlich Voraussetzung für eine Biofilmbildung. Als funktionelle Konsequenz wurde die Phagozytose von *S. epidermidis* durch murine Makrophagen vom Typ J774A.1 im Rahmen der Tigecyclin induzierten Biofilmbildung signifikant beeinträchtigt.

Fazit

Die Studie liefert neue Erkenntnisse über die molekulare Grundlage der Antibiotika-induzierten Biofilmbildung, einen Phänotyp mit gesteigerter antimikrobieller Toleranz. Zum einen könnte dieser Effekt frustrierte antimikrobielle Therapien zu Grunde liegen, zum anderen wird die Persistenz von *S. epidermidis* Infektionen durch die Biofilm-assoziierte Beeinträchtigung der Makrophagen-vermittelten Pathogen Eradikation zusätzlich gefördert.

5. Summary

Background

Biofilm-associated *Staphylococcus epidermidis* implant infections are notoriously reluctant to antibiotic treatment strategies. This failure is partly related to insufficient low antibiotic concentrations at the implant – tissue interface.

Hypothesis

In this study we analysed the effect of such sub-inhibitory concentrations on *S. epidermidis* biofilm formation, expression of intercellular adhesins and potential implications for *S. epidermidis* – macrophage interactions.

Results

Biofilm formation of clinical *S. epidermidis* isolate 1585 recovered from a port catheter infection was analysed after growth in the presence of cell wall active compounds (oxacillin, penicillin, vancomycin, daptomycin) and protein biosynthesis inhibitors (erythromycin, linezolid, tigecycline). Penicillin, vancomycin, daptomycin as well as erythromycin and linezolid had no biofilm augmenting effect at any of the concentrations tested. In contrast, within a narrow range of sub-inhibitory concentrations oxacillin (0.04 – 0.16 µg/ml) and tigecycline (0.16 – 0.63 µg/ml) exhibited significant biofilm inducing activity. Previous work from our lab has demonstrated that *S. epidermidis* 1585 uses giant 1 MDa extracellular matrix binding protein (Embp) to assemble a multilayered biofilm architecture. SarA is a negative regulator of Embp and down regulation of sarA induces Embp-dependent biofilm formation. Dot blot immune assays, confocal laser scanning microscopy and qPCR showed that under biofilm inducing conditions, tigecycline augmented embp expression compared to the control grown without antibiotics. Conversely, expression of regulator sarA was suppressed, suggesting that tigecycline exerts its effects on embp expression through SarA. Tigecycline failed to induce biofilm formation in embp transposon mutant 1585-M135, proving that under these conditions Embp up-regulation is necessary for biofilm accumulation. As a functional consequence, tigecycline induced biofilm formation significantly impaired the up-take of *S. epidermidis* by mouse macrophage-like cell line J774A.1.

Conclusion

Our data provide novel evidence for the molecular basis of antibiotic induced biofilm formation, a phenotype associated with inherently increased antimicrobial tolerance. While this could explain failure of antimicrobial therapies, persistence of *S. epidermidis* infections in the presence of sub-inhibitory antimicrobials is additionally propelled by biofilm-related impairment of macrophage-mediated pathogen eradication.

6. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Das Konzept der Untersuchungen wurde von Prof. Dr. Rohde gemeinsam mit mir entwickelt. Im Verlauf des Projektes konnte ich durch Einbringen weiterer Denkansätze den Versuchsaufbau maßgeblich mitgestalten.

Die Vorversuche mittels Western Blot, sowie die Untersuchung der Biofilmbildung mittels Dot Blot, Biofilmassay und die qPCR Analysen samt Auswertung wurden von mir durchgeführt.

Die Darstellung der Biofilme mittels konfokaler Lasermikroskopie wurden von Dr. Hanae Henke und mir durchgeführt.

Die Versuche zur Bestimmung der Makrophagenresistenz wurden von Dr. Hanae Henke und Frau Gesche Kroll durchgeführt.

Die Untersuchungen an *S. epidermidis* Stamm 12 wurden von Frau Gesche Kroll durchgeführt.

An der Verfassung des Manuskriptes sowie der Erstellung der Abbildungen war ich zusammen mit Prof. Dr. Rohde und Dr. Hanae Henke maßgeblich beteiligt.

7. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Prof. Dr. H. Rohde danke ich für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Arbeit als mein Doktorvater. Mit seinen fachlichen Ratschlägen hat er mir bei der Durchführung der Studie, nun zum zweiten Mal, stets zur Seite gestanden.

Dr. Hanae Henke danke ich für das erfolgreiche und harmonische Zusammenwirken an dieser Studie, die letztendlich zu einer geteilten Ko-Autorenschaft geführt hat.

Frau Gesche Kroll danke ich für die Einweisung in die mikrobiologische Labor-Routine und die Durchführung der Versuche an *S. epidermidis* 12.

Prof. Dr. M. Aepfelbacher danke ich für diese Arbeit die Räume und Geräte des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am UKE nutzen zu dürfen.

Ganz besonderer Dank gilt auch meiner Mutter Cornelia und meiner Verlobten Nicola, für die stetige Unterstützung und den bedingungslosen Rückhalt außerhalb des Labors.

8. Lebenslauf

Entfernt.

9. Eidestattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: