

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Universitätsklinikum des Saarlandes
Homburg/Saar

**Untersuchungen zum Einfluss des Transkriptionsfaktors SpoVG auf die
Biofilmbildung *in vitro* und *in vivo* von *Staphylococcus epidermidis***

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025

vorgelegt von: Hannah Benthien

geb. am: 11.12.1995 in Saarbrücken Stadtteil Dudweiler

Tag der Promotion: 09. Mai 2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Markus Bischoff

Prof. Matthias Hannig

Zum Teil sind dargestellte Abbildungen dieser Dissertation in ähnlicher Form in der nachfolgenden Publikation veröffentlicht:

Benthien H, Fresenborg B, Pätzold L, Elhawy MI, Huc-Brandt S, Beisswenger C, Krasteva-Christ G, Becker SL, Molle V, Knobloch JK, Bischoff M (2022) The Transcription Factor SpoVG Is of Major Importance for Biofilm Formation of *Staphylococcus epidermidis* under *In Vitro* Conditions, but Dispensable for *In Vivo* Biofilm Formation. International Journal of Molecular Sciences 23:3255

Zur Einhaltung der einheitlichen Form der vorliegenden Dissertation wurden die davon betroffenen Abbildungen entsprechend angepasst.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vi
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xi
1 Zusammenfassung.....	1
1.1 Zusammenfassung (Deutsche Version)	1
1.2 Summary (English Version)	2
2 Einleitung	4
2.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> und Koagulase-negative Staphylokokken	4
2.2 Opportunistische Infektionen.....	4
2.3 Biofilmbildung in drei Phasen	5
2.3.1 Primäre Anhaftung.....	6
2.3.2 Akkumulation	7
2.3.3 Strukturierung und Ablösung.....	9
2.4 Regulation der Biofilmbildung	10
2.5 Aktuelle Therapien Fremdkörper-assoziiertes Infektionen.....	13
2.6 Maus als <i>in vivo</i> Versuchsmodell	13
2.7 Fragestellung.....	15
3 Material und Methodik.....	16
3.1 Material.....	16
3.1.1 Bakterien.....	16
3.1.2 Versuchstiere	16
3.1.3 Oligonukleotide	16
3.1.4 Kits und Enzyme.....	17
3.1.5 Medikamente	17
3.1.6 Nährmedien, Lösungen und Chemikalien.....	18
3.1.7 Verbrauchsmaterialien und Geräte	19
3.1.8 Software	21
3.2 Methodik.....	21
3.2.1 Stammkulturen und Lagerung der Bakterienstämme.....	21

3.2.2	Spektralphotometrische Messungen	22
3.2.3	Herstellung der Vorkultur und der Hauptkultur.....	22
3.2.4	Isolation von RNA	22
3.2.5	Konzentrationsmessung von RNA.....	23
3.2.6	DNase-Verdau von RNA	23
3.2.7	Reverse Transkription von RNA	23
3.2.8	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	24
3.2.9	Untersuchungen zum Wachstumsverhalten	25
3.2.10	Ermittlung des linearen Messbereiches am Ensign™ Multimode Plate Reader.....	26
3.2.11	Semiquantitative Bestimmung der Biofilmbildung in Glasröhrchen.....	26
3.2.12	Semiquantitative Bestimmung der Biofilmbildung in 96 well Flachboden-Platten.....	26
3.2.13	Herstellung des bakteriellen Inokulums.....	27
3.2.14	Bestimmung der koloniebildenden Einheit (CFU)	27
3.2.15	Bestimmung der Biofilmbildung auf Fragmenten Peripherer Venenkatheter	28
3.2.16	Fremdkörper-assoziiertes Infektionsmodell in der Maus.....	28
3.2.16.1	Infektion.....	29
3.2.16.2	Überwachung und Dokumentation über den Infektionszeitraum	30
3.2.16.3	Probengewinnung und Aufarbeitung	31
3.2.17	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	32
3.2.18	Statistische Auswertung.....	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Bestätigung der <i>cis</i> -Komplementation von <i>S. epidermidis</i> 1457 Δ <i>spoVG</i>	34
4.2	Einfluss von SpoVG auf das Wachstumsverhalten unter aeroben Bedingungen.....	36
4.3	Einfluss von SpoVG auf die Biofilmbildung <i>in vitro</i>	38
4.3.1	Biofilmbildung in Glasröhrchen unter dynamischen Bedingungen.....	38
4.3.2	Biofilmbildung in 96 well Flachboden-Platten unter statischen Bedingungen.....	40
4.3.3	Biofilmbildung auf Fragmenten Peripherer Venenkatheter.....	42
4.4	Einfluss von SpoVG auf die Transkription von <i>icaD</i> und <i>icaR</i>	44
4.4.1	Transkriptionsanalysen zu <i>icaD</i>	45
4.4.2	Transkriptionsanalysen zu <i>icaR</i>	46

4.5	Fremdkörper-assoziiertes Infektionsmodell in der Maus.....	47
4.5.1	Ermittlung der idealen Infektionsdosis für <i>S. epidermidis</i> 1457.....	47
4.5.2	Einfluss von SpoVG auf das Fremdkörper-assoziierte Infektionsmodell in der Maus.....	50
4.5.2.1	Bakterielle Last am Infektionsort.....	51
4.5.2.2	Lokale Ödembildung am Infektionsort.....	52
4.5.2.3	Konzentration von Zytokinen am Infektionsort.....	54
4.5.2.4	Systemische Nachweisbarkeit der Infektion.....	55
4.5.2.5	Belastung der Versuchstiere über den Infektionszeitraum.....	56
5	Diskussion.....	59
5.1	<i>Cis</i> -Komplementation von <i>S. epidermidis</i> 1457 $\Delta spoVG$	59
5.2	Regulation der Biofilmbildung durch SpoVG <i>in vitro</i>	61
5.3	Regulation der Biofilmbildung durch SpoVG <i>in vivo</i>	66
5.4	Ausblick.....	74
6	Literaturverzeichnis.....	75
7	Publikationen und Kongressbeiträge.....	86
8	Dank.....	87
9	Lebenslauf.....	88

Abkürzungsverzeichnis

A ₅₃₀	Absorption bei Wellenlänge 530 nm
Aap	englisch <i>Accumulation-associated protein</i>
AG	Arbeitsgruppe Aktiengesellschaft
agr	englisch <i>accessory gene regulator</i>
arb. unit	willkürliche Einheit, englisch <i>arbitrary unit</i>
AtIE	Autolysin E
Bar	Biofilm-assoziiertes Regulator, englisch <i>biofilm associated regulator</i>
bp	Basenpaar
<i>broth</i>	englisch Nährmedium
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius, 1 °C = 274,15 K
c	centi, 10 ⁻¹
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure, englisch <i>complementary DNA</i>
CFU	Koloniebildende Einheit, englisch <i>colony forming unit</i>
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
Ct	englisch <i>cycle threshold</i>
CXC	Chemokine mit Cystein-X-Cystein (CXC)-Motiv
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure, englisch <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eDNA	extrazelluläre DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Embp	englisch <i>Extracellular matrix binding protein</i>
<i>ermB</i>	Resistenzgen gegen Erythromycin
<i>et al.</i>	Und andere, latein <i>et alii</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FIVAR	englisch <i>found in various architectures</i>
<i>forward</i>	englisch vorwärts
G	Gauge
g	Gramm, 1 g = 0,001 kg
GA	englisch <i>G-related Albumin-binding</i>

ggf.	gegebenenfalls
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
<i>gyrB</i>	Gen der Gyrase B (Haushaltsgen)
h	Stunde, 1 h = 3600 s
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser, aufbereitet durch das arium® pro VF System
<i>ica</i>	englisch <i>intercellular adhesion</i>
<i>icaR</i>	englisch <i>intercellular adhesion regulator</i>
IGR	Intergenische Region
IL	Interleukin
Inc.	englisch <i>incorporated</i>
k. A.	keine Angabe
KC	englisch <i>keratinocyte-derived chemokine</i>
KG	Körpergewicht
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KoNS	Koagulase-negative Staphylokokken
l	Liter, 1 l = 0,001 m ³
LB	englisch <i>lysogeny broth</i>
LTD	Kapitalgesellschaft, englisch <i>limited company</i>
m	molare Konzentration: mol/l
M	Mega, 10 ⁶
m	milli, 10 ⁻³
min	Minute, 1 min = 60 s
mind.	mindestens
mRNA	messenger-RNA
MSCRAMM	englisch <i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule</i>
μ	mikro, 10 ⁻⁶
n	nano, 10 ⁻⁹
	Anzahl der Merkmalsausprägungen
OD ₆₀₀ , OD _{600+err.}	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge, mit Verdünnungsfaktor multipliziert
<i>p</i>	<i>p</i> -Wert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, englisch <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, englisch <i>polymerase chain reaction</i>
PIA	englisch <i>polysaccharide intercellular adhesin</i>
PMN	Polymorphonukleäre Leukozyten
PSM	englisch <i>phenol-soluble modulins</i>
<i>purR</i>	englisch <i>purine repressor R</i>
PVK	Peripherer Venenkatheter

qPCR	quantitative Real-Time PCR (Echtzeit, englisch <i>real time</i>)
qRT-PCR	quantitative Real-Time Reverse-Transkriptase-PCR
RACE	englisch <i>rapid amplification of cDNA ends</i>
<i>reverse</i>	englisch rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure, englisch <i>ribonucleic acid</i>
<i>rsb</i>	englisch <i>regulator of sigB</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s.	siehe
S. A.	Aktiengesellschaft, französisch <i>société anonyme</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SarA	englisch <i>Staphylococcus accessory regulator A</i>
Sbp	englisch <i>Small basic protein</i>
SD	Standardabweichung
Sdr	englisch <i>serine-aspartate repeat</i>
SE	Europäische Gesellschaft, latein <i>Societas Europaea</i>
σ^A , σ^B	Alternativer Sigma-Faktor Sigma A, Sigma B
SpovG	englisch <i>stage V sporulation protein G</i> alias BarB
TcaR	englisch <i>teicoplanin-associated locus regulator</i>
TE-Puffer	TRIS und EDTA enthaltender Puffer
t_G	Generationszeit
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Trypton-Soja-Agar
TSB	englisch <i>trypticase soy broth</i>
TVV	Tierversuchsvorhaben
u. a.	unter anderem
UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat- <i>N</i> -Acetylglucosamin
UK	Vereinigtes Königreich, englisch <i>United Kingdom</i>
UPM	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika, englisch <i>United States of America</i>
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
W	Watt, $1 \text{ W} = 1 \text{ kg} \times \text{m}^2 / \text{s}^3$
w/v	Gewicht pro Volumen

<i>well</i>	englisch Kavität
YabJ	alias BarA
z. B.	zum Beispiel
ZVK	Zentraler Venenkatheter
$\times g$	x-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der Biofilmbildung in drei Phasen	6
Abbildung 2: Organisation des <i>ica</i> Gen-Clusters	8
Abbildung 3: Wichtige Regulatoren der Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i>	11
Abbildung 4: Versuchstier im Fremdkörper-assoziierten Infektionsmodell	30
Abbildung 5: Transkription von <i>spoVG</i>	35
Abbildung 6: Bakteriellles Wachstum unter aeroben Bedingungen.....	37
Abbildung 7: Optische Dichte des aeroben Wachstums zu ausgewählten Zeitpunkten.....	38
Abbildung 8: Einfluss von SpoVG auf die Biofilmbildung in Glasröhrchen.....	39
Abbildung 9: Einfluss von SpoVG auf die Biofilmbildung in 96 well Flachboden-Platten	40
Abbildung 10: Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> 1457 und 1457-M10 in 96 well Flachboden-Platten	41
Abbildung 11: Einfluss von SpoVG auf die Biofilmbildung auf Schlauchfragmenten Peripherer Venenkatheter.....	42
Abbildung 12: Optische Dichte bei Biofilmbildung auf Katheterfragmenten <i>in vitro</i>	43
Abbildung 13: Bakterielle Last bei Biofilmbildung auf Katheterfragmenten <i>in vitro</i>	44
Abbildung 14: Transkription von <i>icaD</i>	45
Abbildung 15: Transkription von <i>icaR</i>	46
Abbildung 16: Bakterielle Last an der Infektionsstelle (Pilotphase).....	48
Abbildung 17: Belastungsgrad der Versuchstiere (Pilotphase).....	49
Abbildung 18: Gewichtsverlauf der Versuchstiere (Pilotphase)	50
Abbildung 19: Bakterielle Last an der Infektionsstelle (Hauptversuch)	51
Abbildung 20: Entstehung von Ödemen an der Infektionsstelle.....	53
Abbildung 21: Ödemgröße an der Infektionsstelle 10 Tage nach Infektion	54
Abbildung 22: Konzentration von TNF, IL-6 und KC im Gewebe der Infektionsstelle.....	55
Abbildung 23: Leukozytenzahl im Blut der Versuchstiere	56
Abbildung 24: Belastungsgrad der Versuchstiere (Hauptversuch)	57
Abbildung 25: Gewichtsverlauf der Versuchstiere (Hauptversuch).....	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele der Unterschiede im Immunsystem zwischen Mensch und Maus.....	14
Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.....	16
Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Versuchstiere.....	16
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide für qPCR	17
Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Kits und Enzyme.....	17
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Medikamente.....	18
Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Nährmedien, Nährböden, Lösungen und Chemikalien	18
Tabelle 8: Zusammensetzung und Herstellung von Nährmedien und Puffern.....	19
Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Geräte.....	20
Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Software	21
Tabelle 12: Zusammensetzung des TE-Puffers	23
Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsmixes für RT-PCR.....	24
Tabelle 14: Zusammensetzung des Ansatzes für qPCR	25
Tabelle 15: Konzentrationen der in dieser Arbeit verwendeten Inokula.....	29
Tabelle 16: Belastungsgrade im Fremdkörper-assoziierten Infektionsmodell	30
Tabelle 17: Score Sheet im Fremdkörper-assoziierten Infektionsmodell.....	31
Tabelle 18: Zusammensetzung der Gemische und Puffer für ELISA	32
Tabelle 19: Generationszeit in der exponentiellen Wachstumsphase	36

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung (Deutsche Version)

Staphylococcus epidermidis ist als Erreger Fremdkörper-assoziiierter Infektionen in der Humanmedizin von großer Bedeutung. Eine seiner wichtigsten Virulenz-Eigenschaften ist die Fähigkeit, auf nahezu jeder Oberfläche mehrschichtige Biofilme ausbilden zu können, einschließlich Zentraler oder Peripherer Venenkatheter und Gelenkprothesen. Ein grundlegendes Verständnis der molekularen Mechanismen der Biofilmbildung ist für die Prävention Fremdkörper-assoziiierter Infektionen und für die Entwicklung neuer Therapien unerlässlich. Der σ^B -abhängige Transkriptionsfaktor SpoVG (*stage V sporulation protein G*) ist Teil des komplexen Regulationssystems der Biofilmbildung in *Staphylococcus epidermidis* und ist ein Aktivator der Biofilmbildung in dieser Spezies. Außerdem wurde eine positive Wirkung von SpoVG auf die Biosynthese des Exopolysaccharids PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) beschrieben, einem wesentlichen Bestandteil der extrazellulären Biofilmmatrix dieser Spezies. In den Versuchen dieser Arbeit wurde das *Staphylococcus epidermidis* Isolat 1457 eingesetzt. Eine beschriebene 1457 *spoVG*-Deletionsmutante stand bereits zur Verfügung und deren neu generierter *cis*-komplementierter *spoVG*⁺ Stamm wurde als erster Schritt dieser Arbeit mittels Transkriptionsanalysen erfolgreich identifiziert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass SpoVG unter einer Vielzahl von Bedingungen als Aktivator der *in vitro* Biofilmbildung dient. Sowohl unter dynamischen Bedingungen in Glasröhrchen als auch unter statischen Bedingungen in 96 well Flachboden-Platten verlor die 1457 *spoVG*-Deletionsmutante die Fähigkeit zur Biofilmbildung signifikant, im letzten Fall in einem vergleichbaren Ausmaß wie die als Biofilm-negativ beschriebene PIA-negative Mutante 1457-M10. Insbesondere führte die Deletion von *spoVG* zu einer reduzierten Biofilmbildung auf Polyurethan-basierten Katheterfragmenten *in vitro*. SpoVG beeinflusst sowohl die Transkription des *icaADBC*-Operons, welches die zur PIA-Synthese nötigen Enzyme codiert, als auch die Transkription des *icaADBC*-spezifischen Repressor-Gens *icaR*. Dies legt nahe, dass SpoVG seinen Einfluss auf die Biofilmbildung auf transkriptioneller Ebene durch Beeinflussung des *ica* Gen-Clusters ausübt.

Um den Einfluss von SpoVG auf die Infektiosität *in vivo* zu untersuchen, wurde ein murines Fremdkörper-assoziiertes Infektionsmodell für *Staphylococcus epidermidis* 1457 etabliert, wobei Polyurethan-basierte Katheterfragmente in die Subkutis implantiert und entsprechend inokuliert wurden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass SpoVG keine gravierende Auswirkung auf die Biofilmbildung unter *in vivo* Bedingungen besitzt, da die bakteriellen Lasten sowohl auf den implantierten Katheterfragmenten als auch in den Proben des umliegenden Gewebes in allen Infektionsgruppen vergleichbar waren. Die in diesem Tiermodell generierten Befunde legen nahe, dass die Synthese von PIA in diesem *in vivo* Modell keine wesentliche Rolle spielt oder *in vivo* nicht wesentlich von SpoVG beeinflusst wird. Zugleich zeigen diese Tierversuche aber auf, dass SpoVG in signifikantem Maße zur Entwicklung eines periimplantären Ödems beiträgt sowie die Konzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor an der Infektionsstelle erhöht und

folglich die Immunantwort des Wirtes moduliert. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass SpoVG eine bedeutende Rolle für die Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis* unter *in vitro* Bedingungen spielt, wohingegen es für die Biofilmbildung unter den hier gewählten *in vivo* Bedingungen unwesentlich zu sein scheint.

1.2 Summary (English Version)

Staphylococcus epidermidis as a causal agent of foreign body related infections is of great importance in human medicine. Its capacity to form multilayered biofilms on nearly any surface – including central or peripheral venous catheter and joint prosthesis – is considered to be a major virulence characteristic of this bacterium. A fundamental understanding of the molecular mechanisms of biofilm formation is crucial for the prevention of foreign body related infections and the development of new treatments. The σ^B -dependent transcription factor SpoVG (*stage V sporulation protein G*) forms part of the complex regulatory system controlling biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and is an activator of biofilm formation in this species. In addition, SpoVG has been described to positively affect the biosynthesis of the exopolysaccharide PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) which is a major component of the extracellular matrix in biofilms of this species.

The *Staphylococcus epidermidis* isolate 1457 was used in the experiments of this dissertation. A described 1457 *spoVG* deletion mutant was already available and its newly generated *cis* complemented *spoVG*⁺ strain was successfully identified via transcription analysis as first step of this work. The results of the present work show that SpoVG acts as an activator of the *in vitro* biofilm formation under a variety of conditions. The 1457 *spoVG* deletion mutant lost its capacity to form biofilms significantly under dynamic conditions in glass tubes as well as under static conditions in 96 well flat-bottom plates, in the latter condition to a comparable extent as the as biofilm-negative described PIA-negative mutant 1457-M10. Notably, the deletion of *spoVG* led to a reduced biofilm formation on polyurethane-based catheter fragments *in vitro*. SpoVG has an impact on the transcription of the *icaADBC* operon encoding for the enzymes required for PIA synthesis as well as it affects the transcription of the *icaADBC* specific repressor gene *icaR*. This indicates that SpoVG exerts its influence on biofilm formation at the transcriptional level by influencing the *ica* gene cluster.

To investigate the impact of SpoVG on the *in vivo* infectivity, a murine foreign body related infection model was established for *Staphylococcus epidermidis* 1457, in which polyurethane-based catheter fragments were implanted into the subcutis and inoculated respectively. The results indicate that SpoVG has no major effect on the *in vivo* biofilm formation, as the bacterial loads on the catheter tubings and surrounding tissues were comparable in all infection groups. These findings suggest that the synthesis of PIA does not play an essential role in the *in vivo* model chosen here or that SpoVG does not exert a major effect on PIA synthesis *in vivo*. Nevertheless, SpoVG contributed substantially to the development of peri-implantation edema and increased the concentration of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor at the infection site suggesting that SpoVG modulates the host immune response.

In summary, it could be shown that SpoVG plays an important role for the biofilm formation capacity of *Staphylococcus epidermidis* under *in vitro* conditions, whereas it appears to be dispensable for the biofilm formation under the experimental *in vivo* conditions chosen here.

2 Einleitung

2.1 *Staphylococcus epidermidis* und Koagulase-negative Staphylokokken

Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*) ist ein kugelförmiges, fakultativ anaerobes, in Haufen wachsendes, Gram-positives Bakterium, welches zum Genus *Staphylococcus* der Familie der Staphylococcaceae der Ordnung Caryophanales der Klasse Bacilli der Abteilung Bacillota gehört [108]. *S. epidermidis* gehört zur Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken (KoNS), welche eine heterogene Gruppe von Staphylokokken zusammenfasst, die durch das Fehlen der freien Koagulase charakterisiert sind [3]. Im Jahr 2020 umfasste die Gruppe der KoNS bereits über 40 beschriebene Spezies und ein weiterer Anstieg der Beschreibungen ist zu erwarten [3]. Demgegenüber beinhaltet die Gruppe der Koagulase-positiven Staphylokokken u. a. die klinisch relevante Spezies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), die fulminante Infektionen beim Menschen auslösen kann [15,34]. Die Einteilung anhand der Koagulase ist historisch gewachsen und berücksichtigt keine phylogenetischen Eigenschaften [3]. Im klinischen Alltag wird sie bisher trotzdem beibehalten, um *S. aureus* von vermeintlich apathogenen KoNS zu unterscheiden [3]. Tatsächlich werden KoNS heutzutage entsprechend ihrer Pathogenität in drei Gruppen mit niedrigem, mittlerem und hohem Virulenzpotential unterteilt, wobei *S. epidermidis* zur Gruppe mit mittlerem Virulenzpotential zählt [48].

Staphylokokken sind Teil der physiologischen Hautflora des Menschen und weisen eine unterschiedliche Verteilung in Abhängigkeit der Körperstelle auf, welche zusätzlich von individuellen Faktoren beeinflusst wird [12]. *S. epidermidis* als der häufigste KoNS der Hautflora besiedelt nahezu jedes Hautareal, wobei feuchte Hautareale wie die Ellenbeugenfalte bevorzugt besiedelt werden [124]. Auch von Schleimhäuten der Nasenhöhle ist *S. epidermidis* in der großen Mehrheit der Fälle kultivierbar [56]. Auf der Haut herrschen relativ harte Lebensbedingungen, welche unter anderem durch einen niedrigen pH-Wert, ein geringes Nährstoffangebot und einen hohen Salzgehalt gekennzeichnet sind und sich je nach Lokalisation in Feuchtigkeit und Talggehalt unterscheiden [124]. Als ubiquitärer Hautkommensale muss *S. epidermidis* also sehr anpassungsfähig sein, um mit den unterschiedlichen Bedingungen auf der Haut zurechtzukommen [124]. Dabei scheint unter anderem horizontaler Gentransfer von mobilen genetischen Elementen zwischen verschiedenen Stämmen zur genetischen Flexibilität und somit zur Anpassungsfähigkeit von *S. epidermidis* beizutragen [124].

2.2 Opportunistische Infektionen

S. epidermidis ist für gesunde Erwachsene ohne Risikofaktoren selten von klinischer Bedeutung und wurde bis vor wenigen Jahren bei Isolation aus klinischen Proben häufig als Kontamination betrachtet [34]. Unter bestimmten Umständen kann *S. epidermidis* jedoch zu opportunistischen Infektionen führen, welche meist subakut oder chronisch verlaufen [3,48]. Die wichtigste Virulenz-Eigenschaft von *S. epidermidis* ist die Fähigkeit zur Biofilmbildung, also Oberflächen zu kolonisieren und einen mehrschichtigen, schützenden Zellverband auszubilden [34]. Risikofaktoren für opportunistische

Infektionen sind Verletzung der Haut- bzw. Schleimhautbarriere, der Einsatz von Fremdkörpern bzw. Geräten, der in der modernen Medizin immer weiter zunimmt, sowie ein kompromittiertes Immunsystem (angeboren, durch Erkrankungen oder iatrogen) des Patienten [3,48]. *S. epidermidis* stellt einen wichtigen Erreger nosokomialer Infektionen dar, also einer Infektion, die laut Infektionsschutzgesetz „in zeitlichem Zusammenhang mit einer stationären oder ambulanten medizinischen Maßnahme steht [...]“ [10]. Jeder implantierte Fremdkörper kann eine Eintrittspforte für sogenannte Fremdkörper-assoziierte Infektionen sein: Zentrale bzw. Periphere Venenkatheter (ZVK bzw. PVK), Gelenk- oder Gefäßprothesen, künstliche Herzklappen, Brust- oder Cochleaimplantate [48]. Insgesamt ist *S. epidermidis* heutzutage als einer der häufigsten Erreger Fremdkörper-assoziiierter Infektionen anerkannt [3]. Prothetische Gelenkinfektionen mit *S. epidermidis* stellen ein großes Problem nach Arthroplastik von Knie- und Hüftgelenken dar, für die *S. epidermidis* als häufigster Erreger beschrieben wurde [89]. Intravasal liegende Fremdkörper wie ZVK begünstigen Blutstrominfektionen bis hin zur Sepsis [3]. In Deutschland wurde *S. epidermidis* als zweithäufigster Erreger von primären Blutstrominfektionen identifiziert, welche in 83,2 % der Fälle Gefäßkatheter-assoziiert waren [93]. In den USA erreichten KoNS im Zeitraum von 2015 bis 2017 den sechsten Platz der häufigsten antimikrobiell-resistenten Erreger von Infektionen im Zusammenhang mit Gesundheitspflege bei Erwachsenen, wobei etwa die Hälfte davon als *S. epidermidis* identifiziert wurde [140]. In demselben Report wurden KoNS bei ZVK-assoziierten Blutstrominfektionen auf Normalstation nach *S. aureus* am zweithäufigsten isoliert, bei ZVK-assoziierten Blutstrominfektionen auf Intensivstation sogar am häufigsten [140]. Besondere Risikogruppen hierfür sind neutropene Patienten und Neugeborene [3].

2.3 Biofilmbildung in drei Phasen

Staphylokokken können auf nahezu jeder Oberflächen mehrschichtige Biofilme ausbilden [36]. Dabei haften planktonische, also frei-flottierende Zellen zunächst an einer Oberfläche an und vermehren sich dort. In der Folge bildet sich ein mehrschichtiger Zellverband aus, dessen sessile Zellen in einer eigens produzierten extrazellulären Matrix (EZM) eingebettet sind [99]. Über die Zeit bildet sich ein dreidimensional strukturiertes Gebilde aus, in dem pilzartige „Zelltürme“ von flüssigkeitsgefüllten Transport-Kanälen durchzogen sind [36,99]. Die in „gereiften“ Biofilmen vorzufindenden Zellpopulationen weisen eine hohe Heterogenität auf und enthalten u. a. sogenannte Persister-Zellen, welche durch einen veränderten Metabolismus einen „schlafenden“ Phänotyp aufweisen [34]. Diese Persister-Zellen sind ein wesentlicher Faktor dafür, dass Biofilme eine Toleranz gegenüber Antibiotika entwickeln [34]. Auch flottierende Zell-Konglomerate stellen eine Form der Biofilmbildung dar [99]. Die Bildung eines *S. epidermidis*-Biofilms kann in drei Phasen eingeteilt werden: primäre Anhaftung, Akkumulation bzw. Strukturierung und Ablösung [99]. Für die Strukturierung des Biofilms und Ablösung sind ähnliche Faktoren wichtig [99], weshalb diese beiden Schritte im Folgenden zusammen betrachtet werden. Einen Überblick über die verschiedenen Phasen der Biofilmbildung gibt Abbildung 1.

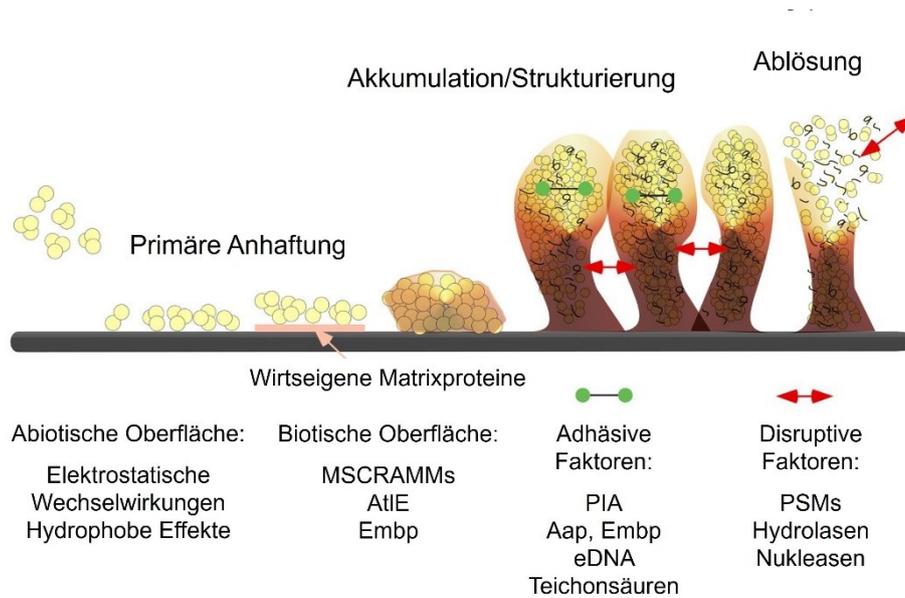


Abbildung 1: Modell der Biofilmbildung in drei Phasen modifiziert nach Otto 2018 [99], ergänzt durch Heilmann *et al.* 2019 [48]

Die Biofilmbildung kann in drei Phasen (Primäre Anhaftung, Akkumulation/Strukturierung, Ablösung) unterteilt werden. Wichtige Faktoren in den jeweiligen Phasen sind entsprechend dargestellt. MSCRAMMs *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*, AtIE Autolysin E, Embp *Extracellular matrix binding protein*, PIA *polysaccharide intercellular adhesin*, Aap *Accumulation-associated protein*, eDNA extrazelluläre DNA, PSM *phenole-soluble modulins*

2.3.1 Primäre Anhaftung

Der erste Schritt der Biofilmbildung ist die primäre Anhaftung an eine Oberfläche, wobei dieser Schritt bei flottierenden Biofilmen entfällt [99]. Bei der primären Anhaftung an abiotische, also nicht-lebende Oberflächen spielen vor allem unspezifische Kräfte wie Van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Wechselwirkungen oder hydrophobe Effekte eine Rolle [48].

Bei der primären Anhaftung an biotische, also lebendige bzw. mit wirtseigenen Matrixproteinen überzogene Oberflächen kommen zusätzlich spezifische Mechanismen hinzu: Staphylokokken verfügen über eine große Bandbreite von Oberflächen-Proteinen zur spezifischen Interaktion mit Wirtsfaktoren im Sinne einer Ligand-Rezeptor-Interaktion mit humanen Matrixproteinen wie Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen oder Vitronectin [34,99]. Eine wichtige Gruppe dabei sind die kovalent an die bakterielle Zellwand gebundenen MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) [11]. Dazu gehören Sdr (*serine-aspartate repeat*)-Proteine wie SdrG bzw. SdrF, welche entsprechend die Bindung an Fibrinogen bzw. Kollagen vermitteln [11]. Einen ausführlichen Überblick über weitere Zellwand-gebundene Proteine von *S. epidermidis* geben Ortega-Peña *et al.* [97].

Das Zellwand-assoziierte Autolysin AtlE, eine Hydrolase zum Abbau der bakteriellen Zellwand, vermittelt die Bindung an Vitronectin [11]. Embp (*Extracellular matrix binding protein*) ist ein weiteres Zellwand-assoziiertes Protein von ca. 1,1 Megadalton und besteht vor allem aus sogenannten FIVAR- (*found in various architectures*) und FIVAR-GA (*G-related Albumin-binding*)-Wiederholungen, welche

zu einer stabförmigen Konformation von Embp führen [3,11]. FIVAR-GA-Wiederholungen spielen eine Rolle bei der Bindung an Fibronectin und tragen somit zur primären Adhäsion bei [11].

Im klinischen Alltag ist die Anhaftung an biotische Oberflächen von größerer Bedeutung, da die Oberflächen der in den Körper eingebrachten Medizinprodukte binnen weniger Sekunden von wirtseigenen Matrixproteinen überzogen werden [99]. Andererseits spielt auch die Anhaftung an abiotische Oberflächen eine nicht zu unterschätzende Rolle, da es während der Implantation eines Fremdkörpers bereits nach kurzem Hautkontakt zur Inokulation mit ausreichend Bakterien mit anschließender Infektion kommen kann [48].

2.3.2 Akkumulation

In der Phase der Akkumulation beginnen die anhaftenden Zellen zu proliferieren und eine schützende EZM zu produzieren, die die interzelluläre Adhäsion vermittelt und die wachsenden Zellhaufen, sogenannte Mikrokolonien, wie „Klebstoff“ zusammenhält [11,99,119]. In dieser Phase haben die meisten Zellen bereits keinen direkten Kontakt mehr zur Substratoberfläche [11]. Die EZM besteht aus einer Vielzahl von Makromolekülen wie Polysacchariden, Proteinen, Lipiden, extrazellulärer DNA (eDNA), RNA und Teichonsäuren [34]. Je nach vorherrschendem Adhäsion in der EZM kann zwischen einem Polysaccharid-basierten und einem Protein-basierten Biofilm unterschieden werden, wobei in vielen *S. epidermidis* Isolaten ein Wechsel des Biofilm-Modus' durch redundante Organisation der nötigen Faktoren möglich ist und von den Umwelteinflüssen abhängig zu sein scheint [11,63,121]. Dabei können sich die verschiedenen Adhäsine der EZM funktionell ersetzen [112,121].

Der Hauptanteil der EZM in Polysaccharid-basierten Biofilmen von *S. epidermidis* ist das Exopolysaccharid PIA (*polysaccharide intercellular adhesion*) [94]. PIA wird in der Literatur auch als PNAG bzw. dPNAG (partiell *de-N*-acetyliertes *Poly-N*-Acetylglucosamin) bezeichnet [36] und wird im Folgenden kurz PIA genannt. Die Synthese von PIA wurde für die Fähigkeit zur *in vitro* Biofilmbildung in bestimmten *S. epidermidis* Isolaten als essenziell beschrieben und zeigte auch Auswirkung auf die Virulenz von *S. epidermidis* in *in vivo* Versuchsmodellen [75,114,115].

In Strukturanalysen stellte sich heraus, dass sich PIA aus Polysaccharid I (> 80 %) und Polysaccharid II (< 20 %) zusammensetzt [74]. Polysaccharid I ist ein lineares Homoglykan aus mindestens 130 *N*-Acetyl-D-Glucosamin-Resten (GlcNAc), die über eine β -1,6-glykosidische Bindung miteinander verbunden sind [74]. Bis zu 20 % der GlcNAc-Reste sind deacetyliert, was dem Molekül bei neutralem oder saurem pH-Wert durch Protonierung der Aminogruppe positive Ladungen verleiht [94]. Das strukturell ähnliche Polysaccharid II besitzt demgegenüber durch Ester-verknüpfte *O*-Succinat-Reste anionische Ladungen [11,74]. Zur Biosynthese von PIA sind diejenigen Enzyme erforderlich, die im *icaADBC*-Operon (*intercellular adhesion*, im Folgenden auch kurz *ica*-Operon genannt) codiert sind [40,46] (vgl. Abbildung 2). *icaADBC* besitzt vier offene Leseraster und wird von einem σ^A -abhängigen Promotor transkribiert [46,62], wobei die Transkriptionsrate in Glucose-haltigem Medium in der exponentiellen Wachstumsphase ein Maximum erreicht [29]. Strangaufwärts zum *icaADBC*-

Operon liegt das divergent orientierte Repressor-Gen *icaR* (*intercellular adhesion regulator*), welches ebenfalls σ^A -abhängig transkribiert wird [43]. Die Funktion von IcaR wird in Kapitel 2.4 näher beschrieben.

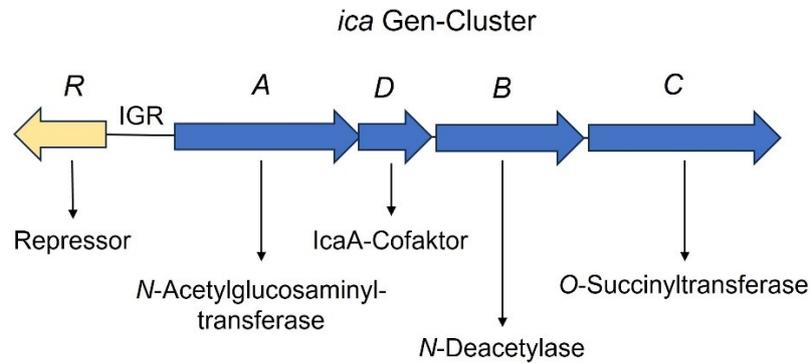


Abbildung 2: Organisation des *ica* Gen-Clusters modifiziert nach François *et al.* 2023 [36]

Das *icaADBC*-Operon besteht aus vier offenen Leserahmen, deren Genprodukte zur Synthese des Exopolysaccharids PIA benötigt werden. *icaA* codiert für eine N-Acetylglucosaminyltransferase, deren Cofaktor durch *icaD* codiert wird. Die Genprodukte von *icaB* und *icaC* sind an der Modifikation bzw. Elongation und am Export von PIA beteiligt. Strangaufwärts und divergent orientiert liegt *icaR*, dessen Genprodukt die Transkription von *icaADBC* reprimiert. Dazwischen liegt die intergenische Region (IGR), welche die Transkriptionsstartpunkte des *icaADBC*-Operons und von *icaR* enthält

Das Transmembranprotein IcaA besitzt N-Acetylglucosaminyltransferase-Aktivität, dessen Wirksamkeit durch das Transmembranprotein IcaD verbessert wird [40,46,94]. Gemeinsam produzieren sie aus dem Substrat Uridindiphosphat-GlcNAc (UDP-GlcNAc) Oligomere mit einer Kettenlänge von maximal 20 Einheiten [40]. Es wird vermutet, dass das Transmembranprotein IcaC für die weitere Elongation und den Export der wachsenden PIA-Kette verantwortlich ist [40,94]. Zusätzlich besitzt IcaC O-Succinyltransferase-Aktivität und ist daher mutmaßlich an der Modifikation von PIA beteiligt [36]. IcaB ist eine auf der Zelloberfläche lokalisierte N-Deacetylase, die das externalisierte PIA innerhalb der Zellwand-Matrix deacetyliert [135]. Die PIA-Ketten lagern sich auf der Zelloberfläche faserförmigen an [136]. Dabei interagiert das insgesamt positiv geladene PIA-Molekül mit negativ geladenen Oberflächen-Polymeren wie Teichonsäuren [33,98,99]. Über diesen Mechanismus kann es auch den interzelluläre Zusammenhalt zwischen verschiedenen Zellen vermitteln [99]. Im Biofilm sind die Zellen in ein Netzwerk aus PIA-Fasern eingebettet, welches sich über alle Schichten des Biofilms erstreckt [28,121]. In *S. epidermidis* fungiert PIA zusätzlich als Hämagglutinin [11].

Die interzelluläre Adhäsion im Biofilm kann auch durch Proteine wie Aap (*Accumulation-associated protein*), Bap (*Biofilm-associated protein*) oder Embp vermittelt werden [3]. Protein-basierte Biofilme sind von klinischer Relevanz, da in einer Vielzahl von Fremdkörper-assoziierten Infektionen *ica*- bzw. PIA-negative Isolate gefunden wurden [112]. Ein umfassend erforschtes Adhäsins ist das Protein Aap [11]. Aap ist kovalent an die Zellwand gebunden und besteht unter anderem aus einer A- und B-Domäne [11,99]. Der Aap-A-Domäne wird eine Funktion während der frühen primären Anhaftung zugewiesen [11]. Um seine Funktion als interzelluläres Adhäsins auszuführen, muss die A-Domäne proteolytisch

abgespalten werden [99,111]. Die verbleibende B-Domäne formt Fibrillen aus, die weit von der Zelloberfläche abstehen [99]. Aap ist Zink-abhängig zur Homodimerisation fähig, wodurch benachbarte Zellen miteinander verbunden werden können [99].

Als zusätzlicher Ligand der Aap-B-Domäne wurde Sbp (*Small basic protein*) beschrieben [28]. Dieses spielt als „Gerüst“-Protein eine wichtige Rolle bei der Kolonisation von Oberflächen und der Ausbildung eines mechanisch robusten Biofilms [28]. Bei der Aap-abhängigen Biofilmbildung scheint Sbp für die Zellaggregation erforderlich zu sein, wobei Sbp durch die Aap-B-Domäne an die Zelloberfläche rekrutiert wird [28]. Eine andere Studie legt nahe, dass Sbp Amyloid-artige Fibrillen ausbildet und so zum Gerüst der Biofilm-Matrix beiträgt [138].

Embp vermittelt als multifunktionelles Adhäsion nicht nur die primäre Anhaftung an Fibronektin (s. Kapitel 2.3.1), sondern auch interzelluläre Adhäsion während der akkumulativen Phase der Biofilmbildung [3,19]. Die Embp-abhängige Biofilmbildung wird *in vitro* erst durch die Zugabe von Serum induziert [19], weshalb diese Art der Biofilmbildung unter *in vivo* Bedingungen eine wichtige Rolle einnehmen könnte. Passend dazu ist *embp* in mehr als 90 % der klinischen Isolate nachweisbar [11]. Sowohl für Aap als auch für Embp wurde postuliert, dass sie mit PIA interagieren können, was auf ein Zusammenspiel von adhäsiven Polysacchariden und Proteinen in der EZM hindeutet [11,34].

Eine weitere wichtige strukturelle Komponente der Biofilm-Matrix ist eDNA [14]. Diese wird aus abgestorbenen Zellen und unter anderem durch AtlE-vermittelte Zellyse im Biofilm freigesetzt [11,99]. Durch seinen polyanionischen Charakter kann eDNA direkt mit anderen Matrix-Molekülen wie PIA interagieren und so zur interzellulären Adhäsion und Stabilisierung des Biofilms beitragen [11,14,48].

2.3.3 Strukturierung und Ablösung

Ein ausgereifter *S. epidermidis*-Biofilm weist eine dreidimensionale Struktur auf, wobei flüssigkeitsgefüllte Kanäle zwischen „Türmen von Zellen“ entstehen [99]. Die Kanäle dienen dem Nährstofftransport, der Bereitstellung von Sauerstoff und dem Abtransport von Metaboliten [36]. Bei der Ausbildung dieser Struktur sind Nukleasen und Proteasen von Bedeutung, die kovalente Bindungen hydrolytisch spalten [99]. Des Weiteren spielen die amphipathischen PSMs (*phenol-soluble modulins*) eine Rolle, die nicht-kovalente Bindungen über einen Surfactant-ähnlichen Mechanismus aufbrechen können [68,99]. Die Gruppe der im Biofilm wirksamen β -PSMs übernehmen Aufgaben zur Strukturierung und Ablösung, wobei diese Effekte konzentrationsabhängig zu sein scheinen: eine mittlere Konzentration von β -PSMs trägt zur Strukturierung und Ausbildung eines ausgereiften Biofilms bei, während hohe β -PSM-Konzentrationen die Ablösung von Zellen aus dem Biofilm bewirken und so zur Dissemination der Infektion beitragen [34,68,137]. Im *in vivo* Versuchsaufbau konnte entsprechend beobachtet werden, dass β -PSMs zur Dissemination einer Fremdkörper-assoziierten Infektion beitragen [137]. Die Synthese der β -PSMs steht unter der Kontrolle des Quorum Sensing-Systems *agr* (*accessory gene regulator*) [69]. Quorum Sensing-Systeme ermöglichen die Kommunikation zwischen Zellen und regulieren in Abhängigkeit der Zelldichte (Quorum) und den Umwelteinflüssen die Genexpression [69].

In Staphylokokken besitzt das agr-System über das Effektormolekül RNAlII einen positiven Effekt auf Toxine und Proteasen, während es wachstumsabhängig einen negativen Effekt auf die Expression von Oberflächenmolekülen hat [54,68,134].

2.4 Regulation der Biofilmbildung

Die Regulation der Biofilmbildung ist ein komplex organisierter Prozess [99]. Externe Bedingungen und Umwelteinflüsse haben eine große Auswirkung auf die Fähigkeit bzw. Induktion der Biofilmbildung. So können anaerobe Bedingungen, hohe Temperaturen, Scherspannungen unter Flussbedingungen, eine hohe Osmolarität sowie das Glucose-Angebot die Biofilmbildung induzieren [23,29,59,107,139]. Auch subinhibitorische Konzentrationen bestimmter Antibiotika und Ethanol wurden als Induktoren der Biofilmbildung beschrieben [62,107], was in der praktischen und häufigen Anwendung von Alkohol als Desinfektionsmittel in der Medizin ein Problem darstellen könnte [60]. Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass auch das extrazelluläre Eisen-Angebot in der Umgebung eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung spielt [95].

Interne Regulatoren der Biofilmbildung beinhalten globale Regulationssysteme wie das agr-System (s. Kapitel 2.3.3) und viele weitere Regulationssysteme [119]. Im Folgenden werden vor allem die Regulatoren vorgestellt, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind. Hier wird insbesondere auf die Regulation der PIA-Synthese eingegangen, welche meist auf transkriptioneller Ebene abläuft [24]. Einen Überblick über die Regulationssysteme gibt Abbildung 3.

IcaR ist ein spezifischer Repressor des *icaADBC*-Operons, der zur TetR (*tetracycline repressor*)-Proteinfamilie der Transkriptionsregulatoren gehört [22]. Im Jahr 2008 wurde die Kristallstruktur von IcaR aus *S. epidermidis* veröffentlicht [52]. Zur Funktionsweise von IcaR ist bekannt, dass zwei IcaR-Homodimere mutmaßlich direkt an die Promotorregion des *icaADBC*-Operons binden und dadurch dessen Transkription verhindern [52,94]. Ethanol reprimiert als externer Stimulus über einen bis dato unbekanntem Mechanismus die Transkription von *icaR* und führt konsekutiv zu einer erhöhten *icaADBC*-Transkription und Induktion der Biofilmbildung [22,59]. Zusätzlich steht *icaR* unter der Kontrolle des alternativen Sigma-Faktors σ^B [62], worauf im Folgenden ausführlich eingegangen wird. Mit TcaR (*teicoplanin-associated locus regulator*) wurde ein weiterer Repressor der *icaADBC*-Transkription beschrieben, der seine Wirkung mutmaßlich direkt im Bereich des *icaADBC*-Promotors entfaltet [36].

Ein Regulator der Biofilmbildung mit globalen Auswirkungen ist der Transkriptionsfaktor SarA (*Staphylococcus accessory regulator A*), wobei weiterhin nicht genau charakterisiert ist, welche Einflüsse zur Aktivierung von SarA führen [99]. Es existieren zwei σ^A -abhängige Promotoren und ein σ^B -abhängiger Promotor vor *sarA* [31], wobei das σ^B -abhängige Transkript für die Expression von *sarA* nicht essenziell ist [50]. SarA ist ein *icaR*-unabhängiger Transkriptionsaktivator von *icaADBC* und fördert somit die PIA-Synthese und Biofilmbildung in *S. epidermidis* direkt [132]. Es wurden insgesamt vier Bindungsstellen in der *icaADBC*-Promotorregion beschrieben, an die SarA binden kann [132].

Versuche mit dem *ica*-negativen *S. epidermidis* Isolat 1585 lassen zudem vermuten, dass SarA eine regulatorische Funktion in Bezug auf den Biofilm-Modus einnimmt [20]. Unter optimierten Laborbedingungen fördert SarA einen PIA-abhängigen Biofilm, während die Expression von *embp* reprimiert wird. Es wird spekuliert, dass bestimmte Umweltbedingungen hingegen *sarA* unterdrücken und somit eine *Emb*- bzw. Protein-abhängige Biofilmbildung fördern [11].

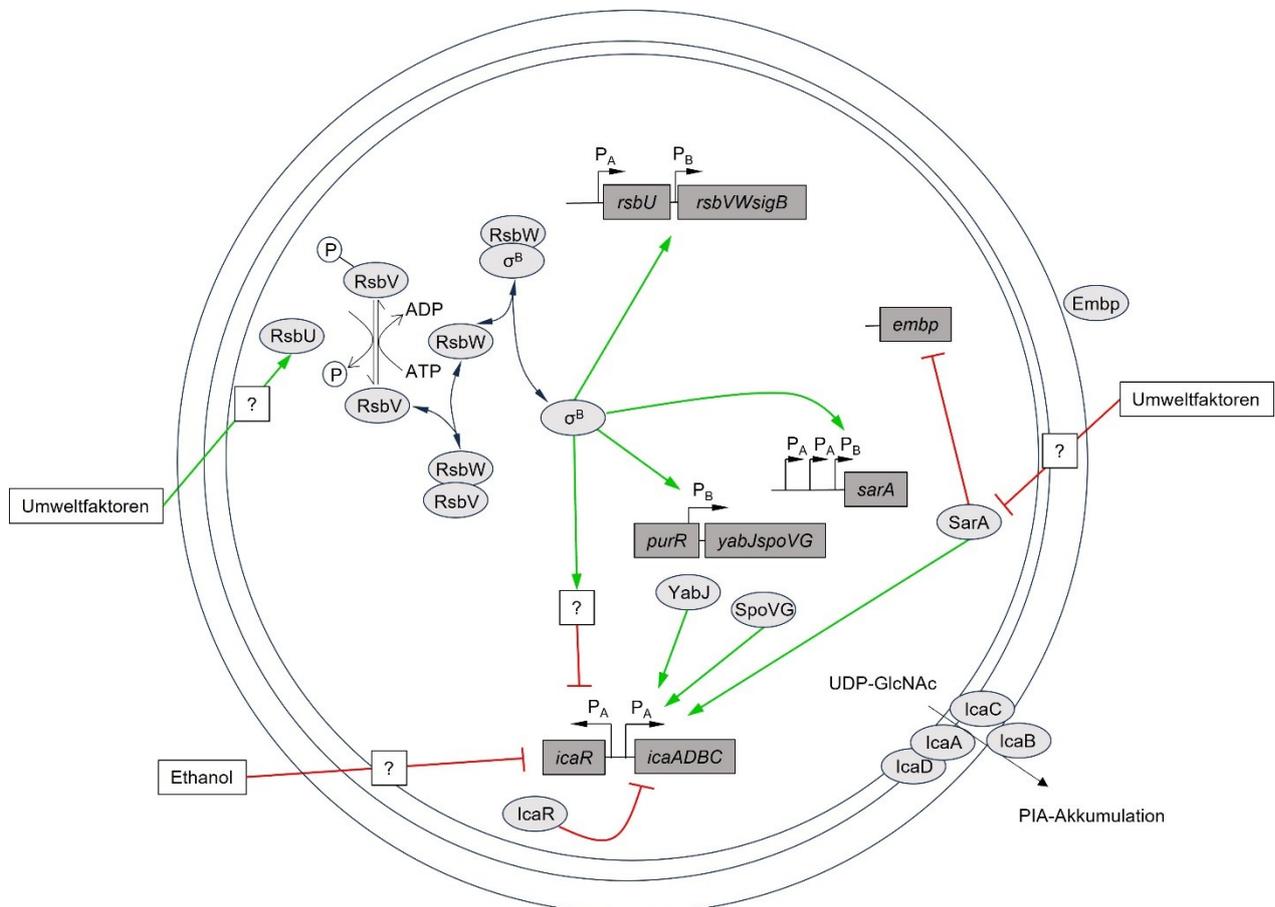


Abbildung 3: Wichtige Regulatoren der Biofilmbildung in *S. epidermidis* modifiziert nach Mack *et al.* 2007 [78], ergänzt durch Jonas 2009 [54] und Büttner *et al.* 2015 [11]

IcaR hemmt die Transkription des *icaADBC*-Operons, dessen Genprodukte zur Produktion von PIA benötigt werden. Der alternative Sigma-Faktor σ^B , dessen Aktivität durch Umwelteinflüsse über eine Regulationskaskade reguliert wird, übt indirekt einen positiven Einfluss auf die *icaADBC*-Transkription aus, indem die Transkription von *icaR* gehemmt wird. *YabJ* und *SpoVG* sind Aktivatoren der Biofilmbildung, die σ^B -abhängig transkribiert werden. *SarA* nimmt vermutlich eine regulatorische Funktion in Bezug auf den Biofilm-Modus ein und fördert eine PIA-abhängige Biofilmbildung. Schematische Darstellung einer bakteriellen Zelle, Gene sind in dunkelgrauen Rechtecken dargestellt, Proteine in hellgrauen Ovalen, aktivierende Wirkung in Grün, hemmende Wirkung in Rot. ATP, Adenosintriphosphat; ADP, Adenosindiphosphat; P, Phosphatgruppe; P_A , σ^A -abhängiger Promotor; P_B , σ^B -abhängiger Promotor

Unabhängig von *SarA* wirkt der alternative Sigma-Faktor σ^B positiv auf die Biofilmbildung in *S. epidermidis* [43]. Als Teil des RNA-Polymerase-Holoenzym reguliert σ^B in Gram-positiven Bakterien die Stressantwort auf Umwelteinflüsse oder metabolische Veränderungen, indem es die Genexpression entsprechend anpasst [110]. Sigma-Faktoren sind essentielle Faktoren der Transkrip-

tionsinitiation, indem sie reversibel an die RNA-Polymerase binden und Promotorsequenzen spezifisch ansteuern [27]. Aus diesem Grund kann σ^B die Aktivierung von Genen vermitteln, wobei die Inaktivierung von Genen nur indirekt über ein Intermediat ablaufen kann [62]. σ^B ist in *S. epidermidis* in einem Operon mit insgesamt vier offenen Leserahmen codiert: die drei Regulator-Gene *rsbUVW* (*regulator of σ^B*) und *sigB* selbst [59,62]. Die Aktivität von σ^B wird über eine Regulationskaskade kontrolliert: Durch Stresssignale wird die Phosphatase RsbU aktiviert, welche den Anti-Anti-Sigma-Faktor RsbV durch Dephosphorylierung aktiviert [62]. RsbV bindet den Anti-Sigma-Faktor RsbW, welcher dadurch nicht mehr im Komplex mit σ^B vorliegt, sodass σ^B seine Funktion als Stressregulator erfüllen kann [62]. RsbW besitzt selbst Kinase-Aktivität und kann RsbV durch Phosphorylierung deaktivieren [62]. In *S. aureus* werden durch σ^B über 250 Gene reguliert [5]. In *S. epidermidis* führt die Deletion von *sigB* ebenfalls zu markanten Veränderungen des Proteoms [54,57], wobei σ^B reprimierend auf die Expression von Proteasen wirkt [54,141]. σ^B übt eine positive Wirkung auf die Biofilmbildung in *S. epidermidis* aus: Die Deletion von *sigB*, dessen positiven Regulatoren *rsbU* und *rsbV* bzw. des gesamten σ^B -Operons führte in *S. epidermidis* Isolat 1457 zu einer starken Reduktion der Biofilmbildung [51,62,99]. Dies konnte auf eine verminderte PIA-Produktion in den entsprechenden Mutanten zurückgeführt werden [50]. Da sich vor dem *icaADBC*-Operon keine σ^B -Konsensussequenz befindet, wird die Wirkung von σ^B mutmaßlich indirekt vermittelt [59]. In *sigB*-Mutanten war eine erhöhte Transkription von *icaR* festzustellen, sodass der Biofilm-fördernde Effekt von σ^B wahrscheinlich durch die Repression der Transkription von *icaR* über ein noch unbekanntes Intermediat indirekt vermittelt wird [43,62].

Als weiterer Aktivator der Biofilmbildung in *S. epidermidis* wurde der Transkriptionsfaktor SpoVG (*stage V sporulation protein G*) beschrieben, der zu einer Familie von hochkonservierten DNA-bindenden Proteinen in Eubakterien gehört [54,55]. SpoVG wurde erstmalig in *Bacillus subtilis* beschrieben, wo es in Phase V der Sporulation für die Cortex-Bildung von Bedeutung ist [113]. In nicht sporenbildenden Bakterien wie *S. aureus* und *S. epidermidis* sind dazu homologe Proteine vorhanden, wobei deren Nukleotidsequenzen zwischen *S. aureus* und *S. epidermidis* 1457 eine Homologie von 90 % aufweisen [2]. In beiden Spezies ist *spoVG* zusammen mit *yabJ* in einem Operon organisiert, denen eine σ^B -Konsensussequenz vorausgeht [2,5]. In *S. aureus* ist der σ^B -abhängige *yabJ-spoVG*-Lokus bedeutend für die Kapselbildung, die Zunahme von Antibiotika-Resistenzen sowie die Expression weiterer Virulenzfaktoren [83,122,123]. Dabei scheint SpoVG und nicht YabJ der Haupteffektor dieses Regulationssystems zu sein [122]. Durch Phosphorylierung von SpoVG durch die Ser/Thr-Proteinkinase Stk1 kann dessen DNA-Bindungseigenschaft noch verstärkt werden [6]. YabJ, welches zur YigF-Proteinfamilie gehört, fungiert in *S. aureus* als Ribonuklease [58,126]. *S. epidermidis* besitzt im Vergleich zu *S. aureus* deutlich weniger Virulenzfaktoren, daher sind die Aufgaben von SpoVG in *S. epidermidis* trotz hoher Nukleotidsequenz-Homologie zwischen den Spezies vermutlich unterschiedlich [2,98]. In *S. epidermidis* konnte eine regulatorische Funktion von SpoVG auf die Biofilmbildung durch Transposon-Mutagenese ermittelt werden: Die Tn917-Transposonmutante

S. epidermidis 1457 M12 wies nicht nur einen Biofilm-negativen Phänotyp auf, es ließ sich auch kein *icaC*-Transkript und keine PIA-Synthese nachweisen [76]. In der *S. epidermidis* 1457 Mutante M12 wurde eine Insertion des Transposons Tn917 im Gen *purR* (*purine repressor*) induziert, die u. a. zum Verlust des strangabwärts gelegenen Transkripts von *yabJ-spoVG* führt [2,61]. Die regulatorische Funktion von YabJ und SpoVG auf die Biofilmbildung konnte nachfolgend durch Experimente mit entsprechenden Deletionsmutanten und durch Komplementation in *trans* nachgewiesen werden [54]. Dabei ist SpoVG alias BarB (*biofilm associated regulator*) und nicht YabJ alias BarA essenziell für die Biofilmbildung und besitzt entsprechend eine klare Auswirkung auf die *icaA*-Transkription und PIA-Synthese [54]. Die Funktionalität des σ^B -abhängigen Promotors vor dem *yabJ-spoVG*-Lokus wurde mittels Primer Extension und RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) bestätigt [54]. Zusätzlich beeinflusst SpoVG sowohl das intra- als auch das extrazelluläre Proteom und wurde demnach als globaler Regulator in *S. epidermidis* beschrieben [54]. SpoVG wird in *S. epidermidis* 1457 unter dynamischen Bedingungen kontinuierlich exprimiert und ist vermutlich ein sehr stabiles Protein [141]. Ob SpoVG auch unter *in vivo* Bedingungen für die Biofilmbildung eine Rolle spielt, wurde bisher noch nicht erforscht.

Weitere Regulationsmechanismen der Biofilmbildung in Staphylokokken sind von Cue *et al.* und Schilcher und Horswill übersichtlich zusammengefasst [24,119].

2.5 Aktuelle Therapien Fremdkörper-assoziiierter Infektionen

Fremdkörper-assoziierte Infektionen sind kompliziert zu behandeln und erfordern häufig die Entfernung des eingebrachten Fremdkörpers [3], da Biofilme eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika aufweisen und die EZM die Bakterienzellen vor Zellen des Immunsystems schützt [48,121]. Im Falle einer akuten periprothetischen Infektion, wie etwa nach Ersatz von Knie- oder Hüftgelenk, beinhaltet die Therapie daher zumindest chirurgisches Debridement sowie eine mehrmonatige Antibiotika-Therapie u. a. mit Fluorchinolonen und Biofilm-aktiven Substanzen wie Rifampicin oder hochdosiertem Daptomycin [102]. Chronische Protheseninfektionen erfordern in der Regel die Prothesen-Entfernung bzw. deren Austausch, da eine rein konservative Therapie geringe Heilungschancen verspricht [102]. Hinzu kommt, dass Resistenzen gegen Antibiotika weiterhin steigen [3]. Neue und effektivere Behandlungsmethoden von Fremdkörper-assoziierten Infektionen werden daher dringend benötigt. Neue therapeutische Ansätze beinhalten beispielsweise den Einsatz von Bakteriocinen, Bakteriophagen oder Nanotechnologie [63]. Inzwischen ist es wichtig, weiter Grundlagenforschung zu betreiben und die Schritte der Biofilmbildung und deren Regulation immer besser zu verstehen, um weitere therapeutische Angriffspunkte zu entwickeln.

2.6 Maus als *in vivo* Versuchsmodell

Zu Beginn einer bakteriellen Infektion erkennen Zellen des angeborenen Immunsystems sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) wie

Formylpeptide oder Lipoteichonsäuren durch Formylpeptidrezeptoren (FPR) oder Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptor*), zu denen Toll-like-Rezeptoren (TLR) gehören [64,82]. Dies führt zur Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6), welche der Signaltransduktion dienen und die Immunantwort fördern [82]. Chemokine wie CXCL8/Interleukin-8 (IL-8) rekrutieren Phagozyten zur Infektionsstelle [142]. Die Aktivierung des Komplementsystems führt zur Opsonierung und trägt zur Anaphylatoxin-vermittelten Chemotaxis durch C3a und C5a bei [79,82].

Um dieses komplexe Zusammenspiel zwischen Infektionserreger und Immunantwort abzubilden, nehmen Tierversuche in der Grundlagenforschung weiterhin eine wichtige Rolle ein. Bisher existieren neben Tierversuchen keine ausreichend entwickelten Alternativen, um die Immunantwort auf eine bakterielle Infektion ausreichend abzubilden [49]. Daher sind *in vivo* Versuche unter Beachtung des 3R-Prinzips (*replace, reduce, refine*; vermeiden, verringern, verbessern) weiterhin unerlässlich [8].

Die häufigste verwendete Tierart für Tierversuche in Deutschland sind mit 72,4 % Mäuse der Art *Mus musculus* [9]. Sie sind klein, einfach in der Handhabung und weisen eine kurze Generationsdauer auf [81]. Maus und Mensch besitzen zu über 90 % die gleichen Gene und der grundsätzliche Aufbau des Immunsystems ist vergleichbar [42,81]. Mit Hilfe von Maus-Modellen konnten bereits grundlegende Erkenntnisse über das Immunsystem gewonnen werden [81]. Allerdings weisen Maus-Modelle auch Limitationen auf. So sind viele Unterschiede sowohl im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem zwischen Mensch und Maus beschrieben [85]. Tabelle 1 gibt einige Beispiele dieser Unterschiede. Trotz dieser Unterschiede lassen sich durch murine Modelle für das Infektionsgeschehen hochrelevante Erkenntnisse gewinnen, solange die Ergebnisse unter Berücksichtigung der oben genannten Unterschiede interpretiert und kritisch hinterfragt werden.

Tabelle 1: Beispiele der Unterschiede im Immunsystem zwischen Mensch und Maus

Merkmal	Mensch	Maus
Blutbild [85]	Neutrophiles Blutbild	Lymphozytäres Blutbild
Neutrophile Granulozyten	50 – 70 % Neutrophile	10 – 25 % Neutrophile
Lymphozyten	30 – 50 % Lymphozyten	75 – 90 % Lymphozyten
Toll-like-Rezeptoren [91]	10 Stück TLR-1 – TLR-10	12 Stück TLR-1 – TLR-9 TLR-11 – TLR-13
Chemokine (Auswahl) [142]	CXCL1/Gro α CXCL2/Gro β CXCL8 (IL-8) -	Cxcl1/KC Cxcl2/MIP-2 - Cxcl15
IgG-Subklassen [42,85]	IgG ₁ , IgG ₂ , IgG ₃ , IgG ₄	IgG ₁ , IgG _{2a} , IgG _{2b} bzw. IgG _{2c} , IgG ₃

2.7 Fragestellung

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist die wichtigste Virulenz-Eigenschaft von *S. epidermidis*, der als häufiger Erreger von Fremdkörper-assoziierten Infektionen von Bedeutung ist. Die Biofilmbildung in Staphylokokken unterliegt einem komplexen Regulationswerk, das u. a. den σ^B -abhängigen Transkriptionsfaktor SpoVG beinhaltet. So konnte für SpoVG in *S. epidermidis* bereits eine positive Wirkung auf die *in vitro* Biofilmbildung gezeigt werden [54]. Dabei beeinflusst SpoVG die *ica*-Transkription und konsekutiv die PIA-Synthese, welches das vorherrschende Exopolysaccharid in Biofilmen von *S. epidermidis* ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Erkenntnisse über den Einfluss von SpoVG auf die Biofilmbildung gewonnen werden. Insbesondere sollte die Auswirkung der *spoVG*-Deletion auf die Biofilmbildung unter *in vivo* Bedingungen charakterisiert werden. In den Versuchen dieser Arbeit sollte das *S. epidermidis* Isolat 1457 eingesetzt werden, das *in vitro* einen PIA-abhängigen Biofilm ausbildet [38]. Eine *spoVG*-Deletionsmutante stand in diesem Stammhintergrund bereits zur Verfügung, welche ausführlich charakterisiert wurde [54]. Anders als in bisherigen *in vitro* Versuchen zu SpoVG sollte zusätzlich ein *cis*-komplementierter Stamm der Deletionsmutante eingesetzt werden, welcher für die Realisierung der Tierversuche elementar war, da in dem *cis*-komplementierten Derivat 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ der Erhalt des funktionalen *spoVG*-Gens auch ohne Antibiotikagabe möglich war. Dieses erfolgreich komplementierte Derivat sollte zunächst identifiziert und charakterisiert werden. Im Folgenden sollte die *in vitro* Biofilmbildung des 1457-basierten Stammtripleetts unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Eines der Ziele dieser Arbeit sollte auch sein, den Wirkmechanismus von SpoVG genauer zu charakterisieren, da bis dato nicht bekannt war, ob SpoVG seine Wirkung auf die Biofilmbildung direkt oder indirekt entfaltet. Anschließend sollte der Einfluss von SpoVG auf die Biofilmbildung in einem murinen Fremdkörper-assoziierten Infektionsmodell untersucht werden. Hierzu sollte das Infektionsmodell an Mäusen des Stammes C57BL/6 in einer Pilotphase für *S. epidermidis* etabliert werden. Im Anschluss sollte dieses Modell dazu genutzt werden, um die Rolle von SpoVG auf die *in vivo* Biofilmbildung und die Infektiosität von *S. epidermidis* zu untersuchen.

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Bakterien

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<i>S. epidermidis</i> 1457	Isolat eines Zentralvenenkatheters, starker Biofilmbildner, PIA-Produzent	Mack <i>et al.</i> 1992 [73]
1457 $\Delta spoVG$	1457 $\Delta spoVG::ermB$, Erythromycin- resistent	Jonas 2009 [54]
1457 $\Delta spoVG::spoVG$	Von 1457 $\Delta spoVG$ ausgehender <i>cis</i> - komplementierter Stamm	Benthien <i>et al.</i> 2022 [4]
1457-M10	Transposonmutante <i>icaA-Tn917</i> , Biofilm-negativ	Mack <i>et al.</i> 1999 [75]

3.1.2 Versuchstiere

Mäuse des Stammes C57BL/6 (s. Tabelle 3) wurden zur Eingewöhnung eine Woche vor Versuchsbeginn in den Tierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums des Saarlandes überführt. Dort wurden sie über den gesamten Versuchszeitraum in belüfteten Käfigen (Typ III) bei einer Temperatur von 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 20 % gehalten, Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Versuchstiere

Tierart	Eigenschaften	Herkunft
Mäuse des Stammes C57BL/6	weiblich, normoglykämisch 8 – 12 Wochen alt	Charles River Laboratories, Wilmington (USA)

3.1.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Hilfe des Programms OligoArchitect™ (<http://www.oligoarchitect.com/LoginServlet>) und der unter der GenBank Zugangsnummer CP020463.1 hinterlegten Sequenzinformationen erstellt und von der Firma Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg bezogen (s. Tabelle 4).

Lyophilisierte Primer wurden in DNase/RNase-freiem Wasser gelöst und für Stammlösungen auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt. Diese Stammlösung wurde vor Nutzung auf eine Arbeitskonzentration von 5 µM verdünnt. Die Lagerung erfolgte jeweils bei – 20 °C.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide für qPCR

Primer	Zielgen	Orientierung	Sequenz (5' – 3')
RT-HOM 256	<i>spoVG</i>	<i>forward</i>	GCAGTGATGAAAGTATATGATGA
RT-HOM 257	<i>spoVG</i>	<i>reverse</i>	CTTCGTCTGATTCTTCGTTATC
RT-HOM 186	<i>icaD</i>	<i>forward</i>	GTATTGTATCGTTGTGATGAT
RT-HOM 187	<i>icaD</i>	<i>reverse</i>	ACTTTCCATTTGAGAATTGAT
RT-HOM 184	<i>icaR</i>	<i>forward</i>	ATGGTACTACACTTGATGATA
RT-HOM 185	<i>icaR</i>	<i>reverse</i>	GTAATGATAATATAGACTAGCCTTT
RT-HOM 182	<i>gyrB</i> ^a	<i>forward</i>	CTAATGCTGATTTACGACGCGTAA
RT-HOM 183	<i>gyrB</i> ^a	<i>reverse</i>	TCTGTAGGACGCATTATTGTTGAAA

^a Referenz Hartmann 2014 [45]

3.1.4 Kits und Enzyme

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Kits und Enzyme

Produktname	Hersteller
Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Applied Biosystems™ Power SYBR® Green PCR Master Mix	Life Technologies LTD, Warrington (UK)
DuoSet® ELISA Mouse CXCL1/KC	R&D Systems Inc., Minneapolis (USA)
DuoSet® ELISA Mouse IL-6	R&D Systems Inc., Minneapolis (USA)
DuoSet® ELISA Mouse TNF-α	R&D Systems Inc., Minneapolis (USA)
Invitrogen™ RNase OUT™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Invitrogen™ TURBO DNA-free™ Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

3.1.5 Medikamente

Medikamente (s. Tabelle 6) zur Verabreichung an Versuchstiere wurden nach Bedarf entsprechend in 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt und mittels einer dünnen Kanüle (Sterican® Größe 20, B. Braun SE) subkutan bzw. intraperitoneal appliziert.

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Medikamente

Medikament	Hersteller
asid-med® Enthaarungscreme	Asid Bonz GmbH, Herrenberg
Atipamezol	Orion Pharma GmbH, Hamburg
Bepanthen® Augensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Carprofen	Zoetis Deutschland, Berlin
Fentanyl	Hexal AG, Holzkirchen
Flumazenil	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg im Breisgau
Isofluran	Piramal Critical Care Deutschland GmbH, Hallbergmoos
Medetomidin	Orion Pharma GmbH, Hamburg
Midazolam	Hameln Pharma GmbH, Hameln
Naloxon	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg im Breisgau
Rompun	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Sauerstoff	Nippon Gases Deutschland GmbH, Düsseldorf
Ursotamin	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg

3.1.6 Nährmedien, Lösungen und Chemikalien

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Nährmedien, Nährböden, Lösungen und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB)	BD GmbH, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Grüssing GmbH, Filsum
Essigsäure (99,8 %)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethanol (99 %)	BCD Chemie GmbH, Hamburg
Ethanol absolut (abs.) (99,5 %)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Grüssing GmbH, Filsum
Glycerin (99 %)	Grüssing GmbH, Filsum
Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-freies destilliertes Wasser	Life Technologies Limited, Paisley (UK)
Kaliumchlorid	Grüssing GmbH, Filsum
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt
Safranin	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure	Bernd Kraft, Duisburg
Tetramethylbenzidin (TMB-Lösung)	Calbiochem Merck KGaA, Darmstadt

Bezeichnung	Hersteller
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypticase™ Soja-Agar (TSA) 5 % Schafblut	BD GmbH, Heidelberg
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt

Zur Herstellung von Puffern, Nährmedien und Gemischen wurde Reinstwasser (H_2O_{reinst}) verwendet, welches durch das arium® pro VF System (Sartorius, Göttingen) aufbereitet wurde. Wenn nötig, wurde H_2O_{reinst} vor der Nutzung autoklaviert. Die Zusammensetzung häufig eingesetzter Nährmedien und Puffer ist in Tabelle 8 beschrieben. Spezielle Puffer und Gemische sind in den jeweiligen Kapiteln aufgeführt.

Tabelle 8: Zusammensetzung und Herstellung von Nährmedien und Puffern

Bezeichnung	Zusammensetzung und Herstellung
10× PBS	80,00 g NaCl, 2,00 g KCl, 14,20 g Na_2HPO_4 , 2,72 g KH_2PO_4 ad 1000 ml H_2O_{reinst} , pH 7,4, autoklavieren
1× PBS (Arbeitskonzentration)	40 ml 10× PBS, 360 ml H_2O_{reinst} pH 7,4, autoklavieren
TSB-Nährmedium	12 g Bacto™ TSB ad 400 ml H_2O_{reinst} , autoklavieren

3.1.7 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
96 well Flachboden-Platte	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
96 well Flachboden-Platte Nunclon™ Delta Oberfläche	Thermo Fisher Scientific, Roskilde (Dänemark)
96 well Mikrotiterplatte immunoGrade™	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
96 well Reaktionsplatte Applied Biosystems™ MicroAmp® Optical mit Cap Strips	Life Technologies AG, Carlsbad (USA)
Einmalskalpell Cutfix	B. Braun SE, Melsungen
Einweg-Saugpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Impfösen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kanülen Sterican® (Größe 1, 0,9 × 40 mm, Größe 20, 0,4 × 20 mm)	B. Braun SE, Melsungen
Kryoröhrchen Cryo.s™ (2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Küvetten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
L-Spatel	k. A.
Lysing Matrix B (2 ml)	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege
Mehrkanalpipette Transferpette® S	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim

Bezeichnung	Hersteller
Objektträger Fast-Read® 102	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg
Parafilm®	Bemis Company Inc., Neenah (USA)
Pasteur-Pipetten	k. A.
Pipetten Acura® <i>manual</i> Pipetten Research® plus	Socorex Isba S. A., Ecublens (Schweiz) Eppendorf SE, Hamburg
Pipettenspitzen (10 µl, 250 µl) Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen Biosphere® plus, DNase/RNase-frei	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Präparierbesteck: Schere SI-Line®; Pinzetten (anatomisch)	SCHREIBER GmbH, Fridingen und B. Braun SE, Melsungen; Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
PCR-8er-Kette Multiply®-µ Strip Pro	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäße, DNase/RNase-frei	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
RNaseZap™	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Spritze Plastipak™ (1 ml)	BD GmbH, Heidelberg
Teströhrchen Cellstar® (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Venenkatheter (peripher) Venflon™ Pro Safety (14 G)	BD GmbH, Heidelberg

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt
Autoklav Systec HX-320 Autoklav Vakulab HP	Systec GmbH & Co. KG, Linden MMM GmbH, Planegg/München
Brutschrank	Heraeus GmbH, Hanau
Eisbereiter Flake-Line	WESSAMAT GmbH, Kaiserslautern
EnSight™ Multimode Plate Reader	PerkinElmer GmbH, Rodgau
FLUOstar® Omega Microplate Reader	BMG Labtech, Ortenberg
Gene Amp® PCR System 9700	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt
Haartrimmer	B. Braun SE, Melsungen
Homogenisator FastPrep-24™ 5G Homogenisator POLYTRON® PT 1200 E	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege Kinematica AG, Eschbach
Isofluran-Verdampfer	Harvard Apparatus, Holliston (USA)
Kamera Leica D-Lux 3	Leica Camera AG, Wetzlar
Kolonienzähler aCOLyte	Synbiosis, Cambridge (UK)
Messschieber digital	TrendLine Globus Baumarkt, St. Wendel
Mikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss AG, Oberkochen

Bezeichnung	Hersteller
Mikroskop ELVAR Okularkamera Kaltlichtquelle Intralux 150H	Leitz, Wetzlar Seben Scientific Instruments GmbH, Berlin Volpi AG, Dietikon (Schweiz)
pH-Meter PHM220	Radiometer, Kopenhagen (Dänemark)
Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences AG, Zizers (Schweiz)
Schüttelinkubator Multitron	INFORS HT GmbH, Einsbach
Sicherheitswerkbank HERAsafe® Sicherheitswerkbank Biowizard Golden Line	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold Kojair Tech Oy, Vilppula (Finnland)
Spektralphotometer GeneQuant™ 1300	GE Healthcare Corporation, Chicago (USA)
Spektrophotometer NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Thermoschüttler CTM	HTA-BioTec, Bovenden
Ultraschallgerät LABSONIC 1510	B. Braun SE, Melsungen
Vakuumpumpe Laboport®	KNF GmbH, Freiburg im Breisgau
Vortexmischer Vortex-Genie® 2	Scientific Industries Inc., Bohemia (USA)
Waage AE 100 Waage KB 1200-2N Waage PC 4400	Mettler-Toledo GmbH, Gießen KERN & Sohn GmbH, Balingen Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Wundklammern mit Applikator AutoClip®	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Zentrifuge Centrifuge 5418 Zentrifuge SIGMA 4K15 Zentrifuge Spectrafuge Mini C1301 Zentrifuge Z 233 MK-2	Eppendorf SE, Hamburg SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode Labnet International Inc., Woodbridge (USA) HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen

3.1.8 Software

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism Version 6.04	GraphPad Software Inc., San Diego (USA)
Microsoft 365 Version 2303	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Zotero Version 6.0.26	Corporation for Digital Scholarship, Vienna (USA)

3.2 Methodik

3.2.1 Stammkulturen und Lagerung der Bakterienstämme

Zur langfristigen Lagerung von Bakterien wurden Glycerin-Stammkulturen angelegt. Dazu wurde eine Vorkultur (s. 3.2.3) des entsprechenden Bakterienstammes mit Glycerin 99 % im Verhältnis 5 : 1 vermischt. Die Mischung wurde in Kryoröhrchen überführt, sorgfältig durchmischt und bei – 70 °C gelagert. Bakterienstämme wurden alle zwei bis drei Wochen als Drei-Ösen-Ausstrich auf Blutagarplatten

(TSA mit 5 % Schafblut) ausplattiert und anschließend bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Lagerung der Platten erfolgte anschließend bei 4 °C.

3.2.2 Spektralphotometrische Messungen

Bakterielles Wachstum in einem wässrigen Nährmedium wurde indirekt durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD_{600}) am Spektralphotometer GeneQuant™ 1300 nach Angaben des Herstellers ermittelt. Um im linearen Messbereich zu arbeiten, wurden Proben mit einer $OD_{600} \geq 0,8$ entsprechend verdünnt [30]. Der gemessene OD_{600} -Wert wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und die Daten wurden als errechnete OD_{600} -Werte ($OD_{600+err.}$) angegeben.

3.2.3 Herstellung der Vorkultur und der Hauptkultur

Zur Herstellung einer Vorkultur wurde eine isolierte Kolonie des entsprechenden Bakterienstammes unter sterilen Bedingungen mit einer Impföse von einer Blutagarplatte (TSA mit 5 % Schafblut) aufgenommen und in ein Kulturröhrchen mit 3 ml TSB-Medium überführt. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Kultur bei 37 °C und 150 Umdrehungen pro Minute (UPM) über Nacht inkubiert.

Zur Herstellung einer Hauptkultur wurde das entsprechende Volumen einer Vorkultur genutzt, um die Hauptkultur auf eine optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge von 0,05 anzuimpfen. Wenn nicht anders angegeben, wurden hierzu 10 ml vorgewärmtes TSB-Medium in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben vorgelegt und nach Inokulation bei 37 °C und 225 UPM inkubiert.

3.2.4 Isolation von RNA

Bei Arbeiten mit RNA wurden stets DNase/RNase-freie Verbrauchsmittel sowie DNase/RNase-freies Wasser benutzt. Zusätzlich wurde RNaseZAP™ in regelmäßigen Abständen zur Wischdesinfektion genutzt. Die Lagerung der RNA während der Präparation erfolgte stets auf Eis.

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus Bakterienzellen wurde das „NucleoSpin® RNA“ Kit nach Herstellerangaben mit einer angepassten Methode zur Homogenisierung genutzt. Aus einer Hauptkultur (s. 3.2.3) wurde nach entsprechender Inkubationszeit (3 h, 6 h bzw. 9 h) eine Probe entnommen und direkt auf Eis gelagert. Das Volumen, das einer $OD_{600+err.}$ von 2,0 entsprach, wurde bei 4 °C und 5 000 UPM für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl TE-Puffer (s. Tabelle 12) aufgenommen. Anschließend wurden 500 µl Lysis-Puffer RA1 sowie 5 µl β -Mercaptoethanol zugegeben. Diese Mischung wurde nach kräftigem Mischen in ein Lysing Matrix B-Gefäß überführt. Der mechanische Aufschluss der Zellen erfolgte im Homogenisator FastPrep-24™ 5G. Es wurden 2 Zyklen von 40 s bei 6,0 m/s durchgeführt, zwischen denen die Probe für 5 min auf Eis gelagert wurde. Die Probe wurde bei 15 000 UPM für 1 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in einem frischen Reaktionsgefäß erneut bei 15 000 UPM für 2 min zentrifugiert. Aus diesem Überstand wurde die darin befindliche RNA durch genaue Durchführung des Herstellerprotokolls des

„NucleoSpin® RNA“ Kits isoliert. Dazu wurde der Überstand durch einen NucleoSpin® Filter gefiltert. Dem Filtrat wurden 350 µl 70 % (v/v) Ethanol (abs.) zugesetzt und die Mischung wurde durch die NucleoSpin® RNA Column gefiltert, um die RNA auf der Membran der Säule zu fixieren. Die Säulenmembran wurde entsalzen und es erfolgte ein DNase-Verdau für 15 min bei Raumtemperatur (RT). Die DNase wurde im folgenden Waschschrift inaktiviert. Nach zwei weiteren Waschschriften wurde die auf der Säulenmembran befindliche RNA mit DNase/RNase-freiem Wasser eluiert. Dazu wurde die Säule mit 60 µl DNase/RNase-freiem Wasser beladen und das Filtrat durch Zentrifugation in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Die Probe wurde bis zur weiteren Nutzung bei – 70 °C gelagert.

Tabelle 12: Zusammensetzung des TE-Puffers

Bezeichnung	Zusammensetzung
TE-Puffer	10 mM TRIS HCl, 1 mM EDTA pH 8,0, autoklavieren

3.2.5 Konzentrationsmessung von RNA

Die Messung der Konzentration von RNA in wässriger Lösung wurden am NanoDrop™ 2000 Spektrophotometer nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.6 DNase-Verdau von RNA

Die isolierte Gesamt-RNA (s. 3.2.4) wurde erneut mit DNase verdaut, um eine mögliche Kontamination mit noch vorhandener DNA zu vermeiden. Dazu wurden die RNA-Proben mit dem „TURBO DNA-free™“ Kit behandelt. Bis zu 7 µg RNA wurden mit DNase/RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 44 µl angesetzt. Anschließend wurden 5 µl 10× TURBO DNase™ Puffer und 0,5 µl TURBO DNase™ Enzym zugegeben und für 20 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Danach wurden erneut 0,5 µl TURBO DNase™ Enzym hinzugefügt und für weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde beendet, indem 5 µl DNase-Inaktivierungsreagenz zugegeben wurden und das Gemisch für 5 min bei RT inkubiert wurde. Die Probe wurde bei 10 000 × g für 90 s zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.2.7 Reverse Transkription von RNA

Die Umschreibung der DNase-behandelten Gesamt-RNA (s. 3.2.6) in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit Hilfe des „High-Capacity cDNA Reverse Transcription“ Kits. Bis zu 600 ng der DNase-behandelten RNA wurden mit DNase/RNase-freiem Wasser in einem PCR-Gefäß auf ein Volumen von 15 µl angesetzt. Anschließend wurden 15 µl des Reaktionsmixes für Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) hinzugegeben (s. Tabelle 13). Kurz vor dem Beladen des PCR-Cyclers Gene Amp® PCR System 9700 Version 3.12 wurden die Proben zentrifugiert. Das PCR-

Programm für Reverse Transkription startete mit 25 °C für 10 min, dann erfolgte die Reverse Transkription bei 37 °C für 120 min, gefolgt von 85 °C für 5 min zur Enzyminaktivierung und Lagerung bei 4 °C bis zur Entnahme der Proben. Anschließend wurden Aliquots der Proben mit DNase/RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 ng/μl verdünnt und bei – 20 °C gelagert.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsmixes für RT-PCR

Bezeichnung	Volumen pro Probe
10× RT-PCR Puffer	3,00 μl
25× dNTP	1,20 μl
10× Random Primers	3,00 μl
Reverse Transkriptase	1,50 μl
RNAse OUT™	0,38 μl
DNase/RNase-freies Wasser	5,92 μl

3.2.8 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) erlaubt die Quantifizierung der pro PCR-Zyklus entstandenen DNA in Echtzeit. Während der Elongation entsteht doppelsträngige DNA, an die der Farbstoff *Power SYBR® Green* binden und zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Der Anstieg der Signalintensität ist anfangs proportional zu der Menge des PCR-Produktes, das pro Zyklus verdoppelt wird. Der PCR-Zyklus, der einen festgelegten Schwellenwert überschreitet, wird als Ct-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet. Der Ct-Wert ist umso kleiner, je mehr DNA in der Probe ursprünglich enthalten war. Die Expression bestimmter Gene kann untersucht werden, indem RNA (s. 3.2.4) aus den zu untersuchenden Bakterienstämmen isoliert wird, in cDNA umgeschrieben (s. 3.2.7) und diese als Vorlage in einer qPCR eingesetzt wird. Dieses Vorgehen wird als quantitative Real-Time Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) bezeichnet. Durch Nutzung spezifischer Primer kann auf die in der Probe ursprünglich enthaltene Konzentration der mRNA des Zielgens geschlossen werden.

Für jedes Primer-Paar musste die optimale Konzentration der Primer zum Template als auch zueinander bestimmt werden. Dazu wurden verschiedene Primer-Konzentrationen mit 2,5 μl cDNA der Konzentration 1 ng/μl und 12,5 μl *Power SYBR® Green PCR Master Mix* in einem 25 μl-Ansatz getestet. Die getesteten Primer-Konzentrationen, dargestellt als Verhältnis von Primer *forward* zu Primer *reverse* in nM, waren 50/50, 50/100, 100/50, 100/100, 300/300 und 900/900. Als optimal galt diejenige Konzentration, die den niedrigsten Ct-Wert erbrachte, während in der Negativkontrolle (2,5 μl DNase/RNase-freies Wasser statt cDNA) keine Amplifikation nachweisbar war. Die Effizienz der ermittelten Primer-Konzentration wurde anschließend überprüft, indem eine Standardkurve erstellt wurde. Dazu wurden je 2,5 μl cDNA der Verdünnungsstufen 20 ng/μl, 4 ng/μl, 0,8 ng/μl, 0,16 ng/μl, 0,032 ng/μl, 0,0064 ng/μl und 0,00128 ng/μl vorgelegt und mit jeweils 12,5 μl *Power SYBR® Green PCR Master Mix* und der ermittelten Primer-Konzentration in einem 25 μl-Ansatz getestet. Lag die

Steigung der Standardkurve zwischen $-3,3$ bis $-3,4$, konnte von einer Effizienz der Primer von nahezu 100 % ausgegangen werden, d.h. die eingesetzte Primer-Konzentration führte pro PCR-Zyklus zu einer Verdopplung des PCR-Produktes. Für alle in dieser Arbeit verwendeten Primer (s. Tabelle 4) wurde die optimale Konzentration von 300 nM Primer *forward* zu 300 nM Primer *reverse* festgestellt.

Alle qPCR-Läufe wurden am ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System mit der Sequence Detection Software Version 1.2.3 in 96 *well* Mikrotiterplatten (MicroAmp® Optical, Life Technologies AG, Carlsbad (USA)) in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Zusammensetzung eines 25 μ l-Ansatzes pro Kavität (*well*) kann Tabelle 14 entnommen werden. Zusätzlich wurden stets zwei Negativkontrollen mit DNase/RNase-freiem Wasser pro Primer-Paar angefertigt. Kurz vor dem qPCR-Lauf erfolgte eine Zentrifugation der Mikrotiterplatte sowie eine optische Kontrolle auf Luftblasen, die zur Verfälschung des Experiments hätten führen können. Das qPCR-Programm startete mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 10 min. Darauf folgten 40 Zyklen mit 95 °C für 15 s und 60 °C für 60 s. Zur Qualitätskontrolle des entstandenen PCR-Produktes wurde anschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Tabelle 14: Zusammensetzung des Ansatzes für qPCR

Bezeichnung	Volumen pro Probe
cDNA (1 ng/ μ l)	2,5 μ l
Primer <i>forward</i>	1,5 μ l
Primer <i>reverse</i>	1,5 μ l
DNase/RNase-freies Wasser	7,0 μ l
Power SYBR® Green PCR Master Mix	12,5 μ l

Die Expression des Zielgens wurde relativ zu der Expression des Haushaltsgens *gyrB* angegeben [72,109]. Dazu wurde der Mittelwert der Ct-Werte von *gyrB* von dem Mittelwert der Ct-Werte des Zielgens abgezogen (Δ Ct). Diese Differenz wurde nach Schmittgen und Livak [120] in die Formel $2^{-\Delta Ct}$ eingesetzt, um die Expression des Zielgens normiert auf die Expression von *gyrB* als relative Transkription darzustellen.

3.2.9 Untersuchungen zum Wachstumsverhalten

Mit einer Vorkultur (s. 3.2.3) des zu untersuchenden Bakterienstammes wurde eine 10 ml-Kultur aus vorgewärmtem TSB in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben auf eine optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge von 0,05 angeimpft (Flüssigkeit-zu-Kolben-Ratio 1 : 10). Anschließend wurde die Kultur bei 37 °C und 225 UPM inkubiert. Jede Stunde wurde unter sterilen Bedingungen eine Probe von 100 μ l abgenommen und deren OD₆₀₀ bzw. OD_{600+err.} bestimmt (s. 3.2.2). Die Berechnung der Generationszeit t_G während der exponentiellen Wachstumsphase erfolgte nach folgender Formel:

$$t_G = \ln(2) \times (t_2 - t_1) / (\ln(OD_2) - \ln(OD_1))$$

Hierbei ist OD1 die OD_{600} bzw. $OD_{600+err.}$ zum Zeitpunkt 1 (t_1) und OD2 ist die OD_{600} bzw. $OD_{600+err.}$ zum Zeitpunkt 2 (t_2).

3.2.10 Ermittlung des linearen Messbereiches am Ensign™ Multimode Plate Reader

Zum Färben von *in vitro* gewachsenen Biofilmen wurde Safranin [96] als wässrige Lösung in der Konzentration 0,1 % (w/v) eingesetzt. Safranin bindet die gesamte Biomasse eines Biofilms ab, da es unspezifisch an negativ geladene Moleküle bindet [131]. So werden sowohl tote Zellen, vitale Zellen als auch Bestandteile der EZM angefärbt, wobei die Menge des Färbemittels mit dem Ausmaß der Biofilmbildung korreliert [100]. Vor Nutzung des Färbemittels Safranin 0,1 % (w/v) am Ensign™ Multimode Plate Reader wurde der lineare Messbereich bei 530 nm Wellenlänge mittels Verdünnungsreihe bestimmt. 200 µl der 0,1 % (w/v) Safraninlösung wurden mit 30 % (v/v) Essigsäure 1 : 2 seriell verdünnt. Anschließend wurden pro Verdünnungsstufe je 200 µl in eine Kavität einer 96 well Flachboden-Platte (Nunclon™ Delta Oberfläche, Thermo Fisher Scientific, Roskilde (Dänemark)) pipettiert. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 530 nm (A_{530}) wurde am Ensign™ Multimode Plate Reader mit folgenden Parametern gemessen: *Absorbance Monochromator-based* (ABS mono), Single-Messmodus, 100 Blitze pro Messung. Der lineare Messbereich wurde nach vierfach unabhängiger Durchführung für diesen Versuchsaufbau auf Absorptionswerte zwischen 2,7 bis 0,04 festgelegt. Darüber liegende Werte wurden entsprechend verdünnt. Die ermittelten Messwerte wurden mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert.

3.2.11 Semiquantitative Bestimmung der Biofilmbildung in Glasröhrchen

In ein steriles Kulturröhrchen aus Glas wurden 3 ml TSB vorgelegt und mit einer Vorkultur des entsprechenden Bakterienstammes (s. 3.2.3) auf eine $OD_{600+err.}$ von 0,05 eingestellt. Die Kultur wurde bei 37 °C und 150 UPM für 18 h inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und das Kulturröhrchen zweimal mit 2 ml PBS gewaschen. Das Röhrchen wurde mit der Öffnung nach unten zeigend für 1 h bei RT getrocknet. Anschließend erfolgte die Färbung der noch am Glas haftenden Biomasse mit 1 ml Safranin 0,1 % (w/v) durch kontinuierliches Schwenken für 2 min, danach wurde dreimal mit je 2 ml H_2O_{reinst} gewaschen. Das Röhrchen wurde erneut umgedreht und für 30 min bei RT getrocknet, danach erfolgte eine fotografische Dokumentation. Das Färbemittel wurde in 1 ml 30 % (v/v) Essigsäure gelöst und 200 µl dieser Lösung wurden in eine 96 well Flachboden-Platte (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht) überführt. Die Messung der A_{530} erfolgte unter Berücksichtigung des linearen Messbereiches (s. 3.2.10) am Ensign™ Multimode Plate Reader.

3.2.12 Semiquantitative Bestimmung der Biofilmbildung in 96 well Flachboden-Platten

Assays zur Biofilmbildung orientierten sich am Vorgehen von Christensen *et al.* [17] und wurden entsprechend modifiziert [72]. Eine Vorkultur (s. 3.2.3) wurde in 200 µl TSB bis zu einer $OD_{600+err.}$ von

0,05 verdünnt und in eine Kavität einer sterilen 96 *well* Flachboden-Platte (Nunclon™ Delta Oberfläche, Thermo Fisher Scientific, Roskilde (Dänemark)) gegeben. Als Negativkontrolle dienten je 200 µl TSB-Medium. Die Platte wurde mit Parafilm® verschlossen und bei 37 °C ohne Schütteln für 18 h inkubiert. Der Überstand wurde unter Neigung der Platte und ohne den Boden des *wells* zu berühren mit Hilfe einer auf eine Vakuumpumpe aufgesetzten Pasteurpipette abgesaugt. Jede Kavität wurde dreimal mit 200 µl PBS gewaschen, wobei mit einer Mehrkanalpipette langsam gegen den Rand der Kavität pipettiert und mit der Vakuumpumpe abgesaugt wurde, um Scherspannungen auf den Biofilm zu minimieren. Die Platte wurde umgekehrt bei 65 °C für 1 h getrocknet. Zum Färben wurden 200 µl Safranin 0,1 % (w/v) pro Kavität für 2 min belassen, abgesaugt und dreimal mit 200 µl H₂O_{reinst} gewaschen. Die umgedrehte Platte wurde für 30 min bei RT getrocknet und danach zur Dokumentation fotografiert. Das Färbemittel wurde in 200 µl 30 % (v/v) Essigsäure gelöst und die A₅₃₀ wurde am Ensight™ Multimode Plate Reader gemessen. Verdünnungen wurden entsprechend des linearen Messbereiches (s. 3.2.10) vorgenommen und zur Normierung wurden die Messwerte mit den Negativkontrollen verrechnet.

3.2.13 Herstellung des bakteriellen Inokulums

Eine Hauptkultur des gewünschten Bakterienstammes wurde wie beschrieben hergestellt (s. 3.2.3). Nach 3 h Inkubationszeit wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm Wellenlänge (s. 3.2.2) das bakterielle Wachstum überprüft. Die Hauptkultur wurde in ein Teströhrchen überführt und bei 4 500 UPM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Diese Zellsuspension wurde insgesamt dreimal gewaschen, indem sie bei 13 200 UPM für 2 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert wurde. Die Bakteriensuspension wurde in 1 ml bzw. 1,5 ml PBS auf eine bestimmte optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge verdünnt, um eine gewünschte Zellzahl pro ml einzustellen. Zur Überprüfung erfolgte eine photometrische Messung (s. 3.2.2) und die zweifach durchgeführte Ermittlung der koloniebildenden Einheit (CFU, *colony forming unit*) (s. 3.2.14). Bis zur Verwendung wurde das Inokulum auf Eis gelagert.

Der Umrechnungsfaktors von OD_{600+err.} zu Zellzahl pro ml (CFU/ml) wurde in Vorversuchen mit *S. epidermidis* 1457 empirisch ermittelt. Es ergab sich folgender Umrechnungsfaktor:

$$\text{OD}_{600+\text{err.}} \cdot 1 \cong 3,3 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$$

Für *in vitro* (s. 3.2.15) als auch *in vivo* (s. 3.2.16) Versuche wurde dieser Umrechnungsfaktor zu Grunde gelegt, um Inokula mit definierter Bakterienkonzentration herzustellen.

3.2.14 Bestimmung der koloniebildenden Einheit (CFU)

Die Konzentration der lebensfähigen Bakterien in einer Bakteriensuspension wurde durch die Zählung der koloniebildenden Einheit (CFU, *colony forming unit*) bestimmt. Dafür wurde eine serielle

Verdünnungsreihe der Bakteriensuspension 1 : 10 in PBS angefertigt. Entsprechend der optischen Dichte bei 600 nm Wellenlänge bzw. der erwarteten Bakterienlast wurden mind. drei Verdünnungsstufen ausplattiert: Je 100 µl der Bakteriensuspension wurden mittig auf Blutagarplatten (TSA mit 5 % Schafblut) aufgetragen und mit dem L-Spatel unter Drehen der Platte gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe des aCOLyte Kolonienzählers ausgezählt und aus den Mittelwerten wurde die CFU/ml bzw. CFU/Katheter errechnet.

3.2.15 Bestimmung der Biofilmbildung auf Fragmenten Peripherer Venenkatheter

Der Versuch zur Bestimmung der *in vitro* Biofilmbildung auf Fragmenten Peripherer Venenkatheter (PVK) wurde nach Pätzold *et al.* [101] mit geringen Abweichungen durchgeführt. Ein Inokulum der Konzentration 5×10^8 CFU/ml des entsprechenden Stammes wurde wie beschrieben hergestellt (s. 3.2.13). Der Schlauch eines Peripheren Venenkatheters aus Polyurethan (BD Vialon™) wurde unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell in 1 cm-lange Fragmente geschnitten. Je ein Fragment wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit 1 ml vorgewärmtem TSB überschichtet. Anschließend wurden 20 µl des Inokulums (entspricht 1×10^7 CFU) in das Lumen des Katheterfragmentes gespritzt (Kanüle Sterican® Größe 1, B. Braun SE). Das 2 ml-Reaktionsgefäß wurde fest verschlossen und die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 150 UPM für 5 Tage, wobei das Katheterfragment alle 24 h in frisches TSB überführt und der Überstand verworfen wurde. Zur täglichen fotografischen Dokumentation unter einem Großfeld-Stereomikroskop (ELVAR, Leitz, Wetzlar) wurde ein zusätzlicher Katheter mitgeführt. An Tag 5 wurde das Katheterfragment aus dem Überstand in frisches TSB umgesetzt. Das Katheterlumen wurde mit 12 µl TSB langsam durchgespült und der Katheter in 1 ml frisches TSB abgesetzt. Um am Katheter adhärente Bakterien abzulösen, wurde die Probe auf Eis für 5 min mit Ultraschall (50 W) behandelt und anschließend für 1 min mit Hilfe eines Vortexmischers gemischt. Das Katheterfragment wurde aus der Bakteriensuspension entfernt, die optische Dichte wurde gemessen (s. 3.2.2) und die CFU bestimmt (s. 3.2.14). Die Probe des Überstandes von Tag 5 erfuhr dieselbe Behandlung.

3.2.16 Fremdkörper-assoziiertes Infektionsmodell in der Maus

Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden durch das Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes genehmigt (Antrag auf Tierversuchsvorhaben (TVV) 11/2019) und in Zusammenarbeit mit Linda Pätzold durchgeführt. Das Modell der Fremdkörper-assoziierten Infektion in der Maus orientierte sich an dem Vorgehen von Rupp *et al.* [114] und wurde nach Pätzold *et al.* [101] mit geringen Abweichungen durchgeführt. Als Fremdkörper diente hierbei ein in die Subkutis implantiertes Fragment eines aus Polyurethan (BD Vialon™) bestehenden PVK, das mit einer bestimmten Bakterienzahl inokuliert wurde. Im Folgenden wird das Modell auch als Katheter-Infektionsmodell bezeichnet.

Im Versuchsteil A (Pilotphase) wurde das Katheter-Infektionsmodell für *S. epidermidis* etabliert. Dazu musste zunächst die ideale Infektionsdosis für den Wildtyp *S. epidermidis* 1457 herausgefunden werden. Hierfür wurden an je zwei Tieren die in Tabelle 15 aufgeführten Dosierungen getestet und evaluiert.

Tabelle 15: Konzentrationen der in dieser Arbeit verwendeten Inokula

Dosierung	CFU/ml	Applizierte CFU pro 20 µl Inokulum
niedrig	$5,0 \times 10^5$	1×10^4
mittel	$2,5 \times 10^6$	5×10^4
hoch	$5,0 \times 10^8$	1×10^7

Im Versuchsteil B (Hauptversuch) wurde die in der Pilotphase festgelegte Infektionsdosis (hier 1×10^7 CFU) genutzt, um den Einfluss von SpoVG auf die *in vivo* Biofilmbildung in diesem Modell zu untersuchen. Dazu wurden drei Infektionsgruppen zu je acht Tieren gebildet und mit dem Wildtyp bzw. den entsprechenden Mutanten infiziert.

Infektion und Probengewinnung wurden stets unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Zur Herstellung der Inokula wurden bakterielle Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase gesammelt und auf eine bestimmte optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge verdünnt (s. 3.2.13). Die Infektion der Tiere und der weitere Versuchsablauf ist im Folgenden beschrieben.

3.2.16.1 Infektion

Mäuse wurden mit einer Injektionsnarkose (Fentanyl 0,05 mg/kg Körpergewicht (KG), Midazolam 5 mg/kg KG, Medetomidin 0,5 mg/kg KG) intraperitoneal betäubt. Die Tiere wurden bei Einsetzen der Narkosewirkung auf Wärmematten gelegt und die Augen mit Bepanthen® vor Austrocknung geschützt, ggf. erfolgte eine Markierung des Tieres mittels Ohrstanze. Jedes Tier erhielt eine Schmerzmittelgabe (Carprofen 5 mg/kg KG) subkutan. Beide Flanken wurden mittels Haartrimmer und Enthaarungscreme asid-med® von Fell befreit. Nachdem der Zwischenzehenreflex als Zeichen des gewünschten mittleren Toleranzstadiums erloschen war, wurde die enthaarte, getrocknete Haut mit 70 % (v/v) Ethanol desinfiziert. Mit einer Präparierschere und Pinzette wurde pro Flanke ein Schnitt in die Kutis gesetzt. Durch Einführen und Spreizen der Schere wurde eine Tasche zwischen Kutis und Subkutis geformt. In diese wurde ein 1 cm-langes Fragment eines sterilen PVK gelegt und mit 20 µl des Inokulums (s. 3.2.13) beimpft. Der Hautschnitt wurde mittels Wundklammer verschlossen (vgl. Abbildung 4).

Die Infektionsstelle wurde mit Hilfe eines digitalen Messschiebers ausgemessen und unter dem Großfeld-Stereomikroskop (ELVAR, Leitz, Wetzlar) fotografiert. Die Tiere wurden nach Infektionsgruppen bzw. Dosisgruppen in separate Käfige gesetzt, nachdem die Narkosewirkung durch subkutane Injektion des Antidots (Naloxon 1,2 mg/kg KG, Flumazenil 0,5 mg/kg KG, Atipamezol 2,5 mg/kg KG) aufgehoben wurde.

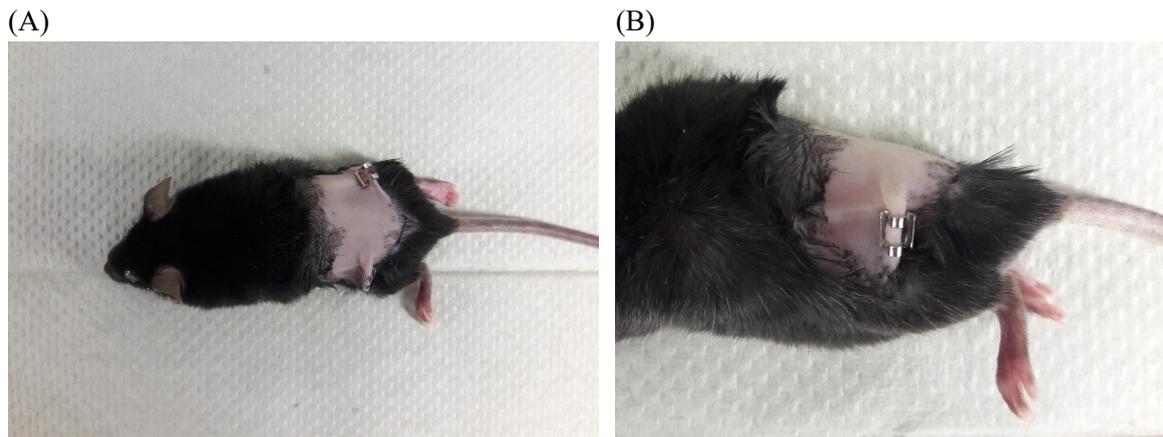


Abbildung 4: Versuchstier im Fremdkörper-assoziierten Infektionsmodell

(A) Übersicht einer narkotisierten Maus kurz nach Implantation der Katheter in beide Flanken. (B) Detailansicht der linken Flanke: das Katheterfragment (rechtwinklig zur Wundklammer) ist durch die Haut zu erkennen

3.2.16.2 Überwachung und Dokumentation über den Infektionszeitraum

Über einen Zeitraum von 10 Tagen wurden die Versuchstiere täglich gewogen und ihr Belastungsgrad (s. Tabelle 16) mithilfe eines Score Sheets (s. Tabelle 17) ermittelt. Jeden zweiten Tag wurde die an der Infektionsstelle entstehende Schwellung (Ödem) fotografiert und vermessen. Hierzu wurden die Tiere einzeln in einer mit Inhalationsnarkotikum (initial 5 % Isofluran bei einer Sauerstoffflussrate von 1 l/min, dann 2 % Isofluran bei gleicher Sauerstoffflussrate) gefluteten Box narkotisiert. Nach Erreichen des mittleren Toleranzstadiums wurde die Maus aus der Box genommen und das Gasgemisch wurde über eine Gesichtsmaske weiter zugeführt, um die Narkose aufrechtzuerhalten. Die Infektionsstellen wurden fotografiert und die darum entstandenen Ödeme vermessen. Die Ödemgröße wurde als Flächeninhalt A einer Ellipse nach folgender Formel berechnet:

$$A = a \times b \times \pi$$

Hierbei entsprechen a und b der großen und kleinen Halbachse des Ödems bezogen auf die Lage des Katheterfragmentes.

Tabelle 16: Belastungsgrade im Fremdkörper-assoziierten Infektionsmodell gemäß TVV 11/2019

Belastungsgrad	Score Sheet	Bewertung und Maßnahmen
Belastungsgrad 0	Gesamtpunktzahl 0	keine Belastung, keine Maßnahme erforderlich
Belastungsgrad 1	Gesamtpunktzahl 1 – 10	geringe Belastung, weitere Beobachtung
Belastungsgrad 2	Gesamtpunktzahl 11 – 19	mittelgradige Belastung, weitere genaue Beobachtung (2× täglich), medizinische Versorgung einleiten
Belastungsgrad 3	Gesamtpunktzahl ≥ 20	hochgradige Belastung, Tier aus dem Versuch nehmen

Tabelle 17: Score Sheet im Fremdkörper-assoziierten Infektionsmodell gemäß TVV 11/2019

Punkte- wertung	0	1	5	10	20
Körper- gewicht	Gleich- bleibend oder Anstieg	Abnahme < 5 %	Abnahme 5 – 10 %	Abnahme 11 – 20 %	Abnahme > 20 %
Allgemein- zustand	Fell glatt, glänzend, Körper- öffnungen sauber, Augen klar, glänzend	Felldefekte (verminderte oder über- steigerte Körperpflege)	Fell stumpf, ungeordnet, ungepflegte Körper- öffnungen, erhöhter Muskeltonus	Schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöff- nungen, unnatürliche Körperhaltung, hoher Muskel- tonus	Verkrampfung, Lähmungs- erscheinungen, Atemgeräusch, Tier fühlt sich kalt an
Spontan- verhalten	Normales Verhalten (Schlafen, Neugier, Sozial- kontakte, Reaktion auf Berührung)	Geringe Ab- weichung vom Normal- verhalten	Ungewöhn- liches Ver- halten, z. B. eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik	Selbstisolation, Lethargie, ausgeprägte Hyperkinetik, Verhaltens- stereotypien, Koordinations- störungen	Schmerzlaute beim Ergreifen, Automutilation
Klinischer Befund	Atmung normal, Extremitäten warm, Schleimhäute gut durch- blutet	Geringe Ab- weichung von der Normal- situation	Geringe Ab- weichung von der Normal- situation, Ödem/Abszess ≥ 6 mm, leicht nässende Wunde	Atmung deutlich überhöht (30 %), Ödem/Abszess ≥ 8 mm, eiternde Wunde	Atmung deut- lich erhöht (50 %), stark eiternde Wunde

3.2.16.3 Probengewinnung und Aufarbeitung

Am 10. Tag nach Infektion wurden die Tiere durch intraperitoneale Gabe von 250 mg/kg KG Ursotamin und 25 mg/kg KG Rompun getötet. Die Tiere wurden gewogen und die Ödeme der Infektionsstellen wurden vermessen und fotografiert. Nach Prüfung des erloschenen Zwischenzehenreflexes wurde ein Tier auf dem Rücken liegend auf einer Korkplatte fixiert. Der Brust- und Bauchbereich wurde mit 70 % (v/v) Ethanol desinfiziert. Der Thorax wurde eröffnet und die Lungen zum Kollabieren gebracht. Das freigelegte Herz wurde punktiert und das entnommene Blut auf Eis gelagert. Die Bauchhöhle wurde eröffnet und das Peritoneum wurde unter sterilen Kautelen von den restlichen Gewebeschichten der lateralen Bauchwand gelöst. Das nun freiliegende Katheterfragment wurde mitsamt dem umliegenden Gewebe exzidiert. Gewebe und Katheter wurden vorsichtig voneinander getrennt, in jeweils 1 ml PBS gegeben und auf Eis gelagert. Die Tierkadaver wurden bis zur fachgerechten Entsorgung eingefroren (–20 °C). Die auf Kathetern gewachsenen Bakterien wurden abgelöst, indem die Katheterproben auf Eis für 5 min mit Ultraschall (50 W) behandelt und für 1 min mit Hilfe eines Vortexmischers gemischt wurden. Der Katheter wurde aus der Zellsuspension entfernt und die CFU wie zuvor beschrieben

bestimmt (s. 3.2.14). Die Gewebeproben wurden zunächst gewogen, um nach der Bestimmung der CFU/ml mit Hilfe des individuellen Gewichtungsfaktors die CFU/g Gewebe berechnen zu können. Das Gewebe wurde homogenisiert (POLYTRON® PT 1200 E, Kinematica AG, Eschbach) und die CFU bestimmt (s. 3.2.14). Gewebehomogenate wurden bei 2 500 UPM und 4 °C für 10 min zentrifugiert, Überstände entnommen und bis zur weiteren Analyse bei – 70 °C gelagert. Bei einzelnen Proben der Infektionsstellen (21/112) wurden nach CFU-Bestimmung deutliche Co-Infektionen mit anderen Bakterienspezies festgestellt. Die Daten der entsprechenden Infektionsstellen wurden von der Arbeit ausgeschlossen und in der Datenanalyse nicht berücksichtigt. Zur Testung auf Bakteriämie wurden 25 µl Blut mit 25 µl PBS vermischt, als Streifen auf eine Blutagarplatte (TSA mit 5 % Schafblut) aufgetragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert („Sepsis-Test“). Eine Sepsis mit Bakteriämie wurde bei > 20 Kolonien angenommen. Zur Ermittlung der Gesamt-Leukozytenzahl im Blut wurden 3 µl Blut 1 : 10 mit Essigsäure 5 % (v/v) vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. 20 µl dieser Suspension wurden in ein Raster eines Fast-Read® 102 Objektträgers pipettiert und am Mikroskop (Axiostar plus, Carl Zeiss AG, Oberkochen) manuell ausgezählt. Die Gesamt-Leukozytenzahl pro ml Blut wurde nach Herstellerangaben berechnet.

3.2.17 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Konzentrationsbestimmung von Zytokinen an der Infektionsstelle wurden die Überstände der Gewebehomogenate (s. 3.2.16.3) langsam aufgetaut und 1 : 2 mit Reagent Diluent (s. Tabelle 18) verdünnt. Der DuoSet® ELISA Mouse TNF- α , DuoSet® ELISA Mouse IL-6 und DuoSet® ELISA Mouse CXCL1/KC von R&D Systems Inc. wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurde je eine 96 well Mikrotiterplatte (immunoGrade™, Brand GmbH + Co. KG, Wertheim) mit Fängerantikörpern gegen Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-6 (IL-6) bzw. *keratinocyte-derived chemokine* (KC) beschichtet und durch Bovines Serumalbumin (BSA) blockiert. Die Proben wurden als Doppelbestimmung auf die vorbereitete Platte aufgetragen, zusammen mit einer Verdünnungsreihe einer Standardlösung bekannter Konzentration zur Erstellung einer Standardkurve. Die Platte wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert. Ein mit Biotin markierter Nachweisantikörper wurde zu jeder Probe hinzugefügt, der anschließend mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase überschichtet wurde. Die Substratlösung (TMB-Lösung) wurde zugegeben und deren Umsetzung nach 20 min Reaktionszeit durch Zugabe von Schwefelsäure (3 mol/l) gestoppt.

Tabelle 18: Zusammensetzung der Gemische und Puffer für ELISA

Bezeichnung	Zusammensetzung
Reagent Diluent	1 % BSA in PBS
Waschpuffer	0,05 % Tween® 20 in PBS

Die Absorption wurde bei 450 nm und 540 nm Wellenlänge mit Hilfe des FLUOstar® Omega Microplate Reader gemessen. Aus deren Differenz konnte mit Hilfe der Standardkurve die

Konzentration des Zytokins in pg/ml errechnet werden. Der individuelle Gewichtungsfaktor der Probe (s. 3.2.16.3) wurde genutzt, um die Konzentration in ng/g Gewebe anzugeben.

3.2.18 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism Version 6.04 für Windows (Microsoft, Redmond (USA)). Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney Test verwendet, beim Vergleich von mehreren Gruppen der Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test. Zur Auswertung der Daten aus *in vivo* Versuchen wurde beim Vergleich von mehreren Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten der 2way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparisons Test eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Ergebnisse ab einem p -Wert von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet, ab $p < 0,01$ als sehr signifikant und ab $p < 0,001$ als hochsignifikant [7].

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors SpoVG in *S. epidermidis* 1457 auf die Biofilmbildung *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dazu wurde sowohl der Wildtyp *S. epidermidis* 1457, ein 1457 Derivat mit Deletion des Gens *spoVG* ($1457 \Delta spoVG$) als auch dessen *cis*-komplementierter Stamm ($1457 \Delta spoVG::spoVG$) in den Versuchen eingesetzt. So sollte sichergestellt werden, dass phänotypische Unterschiede mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die An- bzw. Abwesenheit des Transkriptionsfaktors SpoVG zu erklären sind.

4.1 Bestätigung der *cis*-Komplementation von *S. epidermidis* $1457 \Delta spoVG$

Die Deletionsmutante *S. epidermidis* $1457 \Delta spoVG$ lag bereits durch die Arbeit von Beate Fresenborg an der Universität Lübeck vor. Die Konstruktion der Deletionsmutante ist in ihrer Dissertation [54] ausführlich beschrieben. Hierbei wurde *spoVG* durch eine Erythromycin-Resistenzkassette ausgetauscht. Durch die Vorarbeit von Mohamed I. Elhawy aus der AG Bischoff standen zudem mehrere Bakterienstämme zur Verfügung, bei denen eine *cis*-Komplementation von *spoVG* vermutlich gelungen war [4]. Aus diesen Stämmen musste zunächst derjenige Stamm gefunden werden, der als Zeichen einer erfolgreichen Komplementation ein zum Wildtyp vergleichbares Transkriptionslevel von *spoVG* aufwies. Zum besseren Verständnis der vorangegangenen Komplementation ist das Vorgehen hier zusammengefasst: Aus der genomischen DNA des Wildtyps *S. epidermidis* 1457 wurde ein Fragment von etwa 3 000 Basenpaaren (bp) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert, das sowohl den *yabJ-spoVG*-Lokus als auch etwa 1 000 bp strangaufwärts und 1 000 bp strangabwärts enthielt. Dieses Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *BglIII* verdaut und in das ebenso verdaute und dephosphorylierte Plasmid pBASE6 [39] kloniert. Der dabei entstandene, temperatursensitive Shuttle-Vektor pBASE6_*spoVG*_comp wurde in chemisch kompetente *E. coli* Zellen des Stammes IM08B [88] transformiert, vervielfältigt und anschließend isoliert. Durch Elektroporation wurde der aus IM08B isolierte Vektor pBASE6_*spoVG*_comp in elektrokompetente Zellen von *S. epidermidis* $1457 \Delta spoVG$ eingebracht. Transformanten mit aufgenommenem Plasmid wurden auf TSA-Platten mit Antibiotikasupplementation (Chloramphenicol 10 µg/ml) bei 30 °C selektioniert. Die anschließende *cis*-Komplementation durch homologe Rekombination orientierte sich an dem Vorgehen von Bae *et al.* [1]. Hierbei wurde die Integration des temperaturempfindlichen Plasmids in die chromosomale DNA durch Inkubation bei der nicht-permissiven Temperatur von 42 °C gefördert. Zur Gegenselektion auf Verlust des Plasmids durch Doppel-Crossover wurden die Zellen Anhydrotetracyclin ausgesetzt, welches die *secY* Antisense-RNA [53] induziert und somit bei Plasmid enthaltenden Zellen das Wachstum verhindert [87]. So erhaltene Klone wurden mittels Resistenztestung überprüft. Auf diese Weise konnten drei Stämme identifiziert werden, die die gewünschte Sensibilität gegen Chloramphenicol (Marker des Vektors pBASE6) und Erythromycin (Marker der Mutante $1457 \Delta spoVG$) aufwiesen.

Als erster Schritt dieser Arbeit sollte durch Transkriptionsanalysen festgestellt werden, ob die *cis*-Komplementation in einem dieser Stämme erfolgreich war und somit eine Expression von *spoVG* wieder auf Wildtyp-Niveau war. Für diesen Versuch wurde zunächst ein vermeintlich komplementierter Stamm ausgewählt, der in Bezug auf Biofilmbildung in Vorversuchen (vgl. 3.2.11 und 3.2.12) den vielversprechendsten Phänotyp aufwies. Die relativen Transkriptionslevel von *spoVG* nach der Komplementation wurden mit den Transkriptionslevel im Wildtyp *S. epidermidis* 1457 und in der Mutante 1457 $\Delta spoVG$ verglichen (vgl. Abbildung 5).

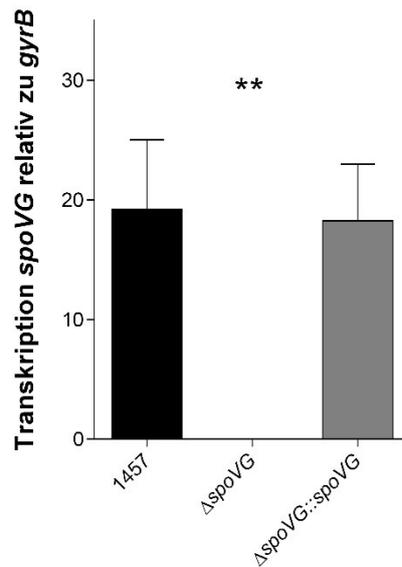


Abbildung 5: Transkription von *spoVG*

Transkription von *spoVG* relativ zu *gyrB* in *S. epidermidis* 1457 (schwarz), 1457 $\Delta spoVG$ (weiß) und 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ (grau) nach 3 h Wachstum, ermittelt durch qRT-PCR. Dargestellt sind Mittelwert + SD der Kopienzahl von *spoVG* pro Kopie *gyrB* von fünf in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten; **, $p < 0,01$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

Hierzu wurden Kulturen der zu untersuchenden Bakterienstämme bei 37 °C in TSB inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde aus Zellen der exponentiellen Wachstumsphase isoliert, da bekannt war, dass das Transkript in dieser Phase in großer Menge vorliegt [2]. Die aus der RNA erstellte cDNA wurde mittels qPCR untersucht, um mit spezifischen Primer-Paaren gegen *spoVG* dessen Translationslevel relativ zum Haushaltsgen *gyrB* zu ermitteln. Die relative Transkription von *spoVG* im Wildtyp *S. epidermidis* 1457 erreichte Transkriptionslevel von $19,24 \pm 5,78$ Kopien *spoVG* pro Kopie *gyrB*, während in der Deletionsmutante erwartungsgemäß kein Transkript von *spoVG* nachweisbar war ($p < 0,01$, Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test). Nach Komplementation ließ sich in dem ausgewählten Stamm ein zum Wildtyp vergleichbares Transkriptionslevel von $18,26 \pm 4,74$ Kopien *spoVG* pro Kopie *gyrB* feststellen. Da *yabJ*, welches zusammen mit *spoVG* ein Operon bildet [2,54], durch die Deletion von *spoVG* ebenfalls auf Expressionsebene betroffen sein könnte, wurde in zusätzlichen Versuchen der AG Bischoff untersucht, ob die Transkription von *yabJ* durch die Mutagenese beeinflusst worden war. Dabei zeigte sich in allen drei Stämmen ein vergleichbares relatives

Transkriptionslevel von *yabJ* in der exponentiellen Wachstumsphase [4]. Der untersuchte Stamm nach Komplementation wies demnach alle gewünschten Eigenschaften auf: Die relative Transkription von *spoVG* konnte auf Wildtyp-Niveau gebracht werden, während die Transkription von *yabJ* unbeeinflusst blieb [4]. Die *cis*-Komplementation dieses Stammes stellte sich somit als erfolgreich dar, weshalb er unter der Bezeichnung *S. epidermidis* 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ in den folgenden Versuchen dieser Arbeit eingesetzt wurde.

4.2 Einfluss von SpoVG auf das Wachstumsverhalten unter aeroben Bedingungen

Als nächstes wurde das Wachstumsverhalten von *S. epidermidis* 1457, der Mutante 1457 $\Delta spoVG$ und deren *cis*-komplementierter Stamm 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ untersucht, um etwaige Wachstumsdefizite der gentechnisch modifizierten 1457 Derivate zu identifizieren. Hierzu wurden bakterielle Kulturen in vorgewärmtem TSB unter aeroben Bedingungen bei 37 °C inkubiert. Diese Bedingungen sollten später auch zur Herstellung bakterieller Inokula gewählt werden und waren daher von Interesse. Über einen Zeitraum von 12 h wurde stündlich die optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge bestimmt (vgl. Abbildung 6). Alle drei Stämme zeigten einen exponentiellen Anstieg der optischen Dichte bis zum Zeitpunkt 3 h. Bis zu diesem Zeitpunkt ließ sich kein Unterschied im Wachstum zwischen den Stämmen beobachten. Dies spiegelte sich in den Generationszeiten während der exponentiellen Wachstumsphase wider (vgl. Tabelle 19). Die Generationszeit ist hierbei die Zeit, in der sich die Zelldichte einer Bakterienkultur verdoppelt.

Tabelle 19: Generationszeit in der exponentiellen Wachstumsphase

^a Mittelwert \pm SD von sechs unabhängigen Experimenten, ^b Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

Bakterienstamm	Generationszeit t_G in min ^a	<i>p</i> -Wert ^b
<i>S. epidermidis</i> 1457	46,64 \pm 6,33	
1457 $\Delta spoVG$	42,94 \pm 2,06	0,96
1457 $\Delta spoVG::spoVG$	43,31 \pm 6,67	0,72

Der Wildtyp benötigte 46,64 \pm 6,33 min zur Verdopplung, während die Deletionsmutante 1457 $\Delta spoVG$ dafür eine vergleichbare Zeit von 42,94 \pm 2,06 min benötigte ($p = 0,96$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test). Die Komplementation führte nicht zu einer signifikanten Änderung der Generationszeit im Vergleich zum Wildtyp. Zum Zeitpunkt 4 h veränderte sich das Wachstum der Stämme: nur bei 1457 $\Delta spoVG$ setzte sich die Zunahme der OD_{600+err.}-Werte bis zum Zeitpunkt 5 h gleichbleibend fort. Nach einer Übergangsphase erreichte das Wachstum aller Stämme nach etwa 9 h ein Plateau und die OD_{600+err.} änderte sich nur noch geringfügig. Während dieses gesamten Zeitraumes blieben die OD_{600+err.}-Werte von *S. epidermidis* 1457 und 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ weiterhin hinter denen der Deletionsmutante zurück.

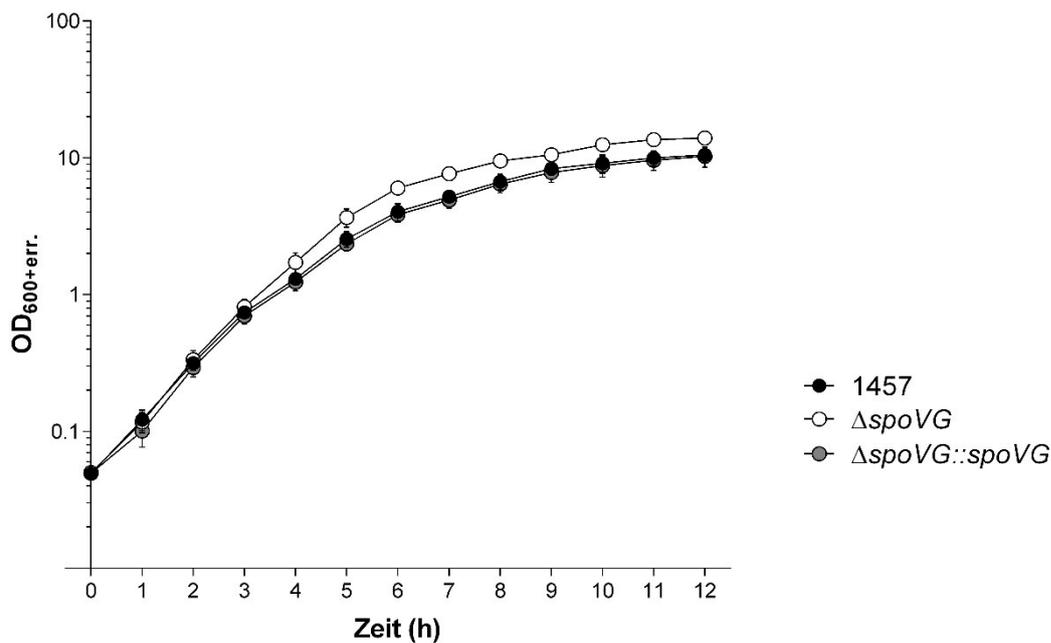


Abbildung 6: Bakteriellies Wachstum unter aeroben Bedingungen

Kulturen von *S. epidermidis* 1457 (schwarz), 1457 $\Delta spoVG$ (weiß) und 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ (grau) wurden in TSB auf eine $OD_{600+err.}$ von 0,05 eingestellt und bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die OD_{600} wurde stündlich bestimmt, wobei die entnommene Probe entsprechend des linearen Messbereichs des Photometers verdünnt und der Messwert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert wurde. Es ist je der Mittelwert \pm SD der Daten als $OD_{600+err.}$ von sechs unabhängigen Experimenten in halblogarithmischer Darstellung präsentiert

Zusätzlich kam es nach 4 h bis 5 h Wachstum bei den Kulturen von *S. epidermidis* 1457 und 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ zu einer sichtbaren Ablagerung von Bakterien an der Luft-Medium-Grenze in Form einer Ringbildung am Glaskolben. Hingegen blieben die Kulturen von 1457 $\Delta spoVG$ durchgehend frei von einer makroskopisch sichtbaren Ablagerung am Glaskolben.

Um diesen bereits erkennbaren Unterschied im Wachstum zu verdeutlichen, sind ausgewählte Zeitpunkte im Folgenden nochmals dargestellt und statistisch ausgewertet (vgl. Abbildung 7). Zum Zeitpunkt 3 h in der exponentiellen Wachstumsphase war, wie bereits beschrieben, kein Unterschied zwischen den Stämmen feststellbar. Nach 4 h Wachstum war bereits ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Deletionsmutante zu sehen. Dieser signifikante Unterschied setzte sich bis in die post-exponentielle Phase nach 6 h fort. Auch in der früh-stationären Phase nach 9 h Wachstum war dieser signifikante Unterschied weiterhin nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt erreichte 1457 $\Delta spoVG$ mediane $OD_{600+err.}$ -Werte von 10,59 im Vergleich zum Wildtyp mit 8,68. In der stationären Phase nach 12 h Wachstum ließ sich sogar ein sehr signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen nachweisen (mediane $OD_{600+err.}$ von 13,84 bei 1457 $\Delta spoVG$ gegenüber 11,21 beim Wildtyp). Zu den beobachteten Zeitpunkten erreichte 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ stets zum Wildtyp ähnliche $OD_{600+err.}$ -Werte.

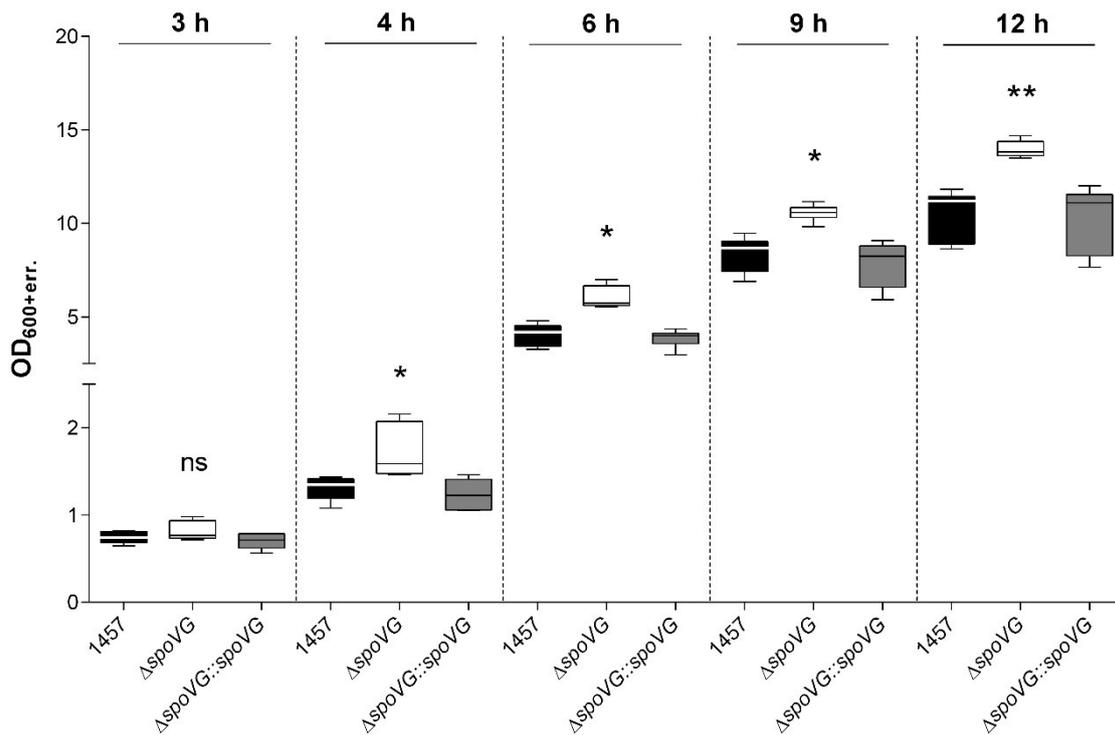


Abbildung 7: Optische Dichte des aeroben Wachstums zu ausgewählten Zeitpunkten

Daten sind als $OD_{600+err.}$ im Box-Plot dargestellt mit Median (Horizontale), 25 % – 75 % Perzentile (Box), Minimum bis Maximum (Whiskers) von sechs unabhängigen Experimenten mit *S. epidermidis* 1457 (schwarz), 1457 $\Delta spoVG$ (weiß) und 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ (grau). ns, nicht signifikant; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

Durch die Beobachtungen konnte ein durch die Mutagenese verursachtes Wachstumsdefizit während der exponentiellen Wachstumsphase ausgeschlossen werden. Zur Herstellung bakterieller Inokula für nachfolgende Versuche wurden Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Dafür wurde keine Auswirkung durch ein verändertes Wachstumsverhalten erwartet, denn die Deletion von *spoVG* führte unter den gegebenen Bedingungen erst nach der exponentiellen Phase zu einer signifikanten Veränderung der $OD_{600+err.}$ -Werte der Kulturen.

4.3 Einfluss von SpoVG auf die Biofilmbildung *in vitro*

Aus früheren Studien war bereits bekannt, dass der Verlust von SpoVG in *S. epidermidis* 1457 zu einer stark reduzierten Fähigkeit zur *in vitro* Biofilmbildung führt [54,76]. Dieses phänotypische Verhalten sollte im eigenen Versuchsaufbau reproduziert und durch die Verwendung des neu erzeugten, in *cis* komplementierten Stammes *S. epidermidis* 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ ergänzt werden.

4.3.1 Biofilmbildung in Glasröhrchen unter dynamischen Bedingungen

S. epidermidis 1457, 1457 $\Delta spoVG$ und deren *cis*-komplementierter Stamm 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, an abiotischen Oberflächen Biofilme zu bilden. Zur ersten

Einschätzung dieser Fähigkeit diente ein Assay in Glasröhrchen, bei dem Bakterienkulturen einer $OD_{600+err.}$ von 0,05 in Kulturröhrchen aus Glas in TSB bei 37 °C für 18 h inkubiert wurden.

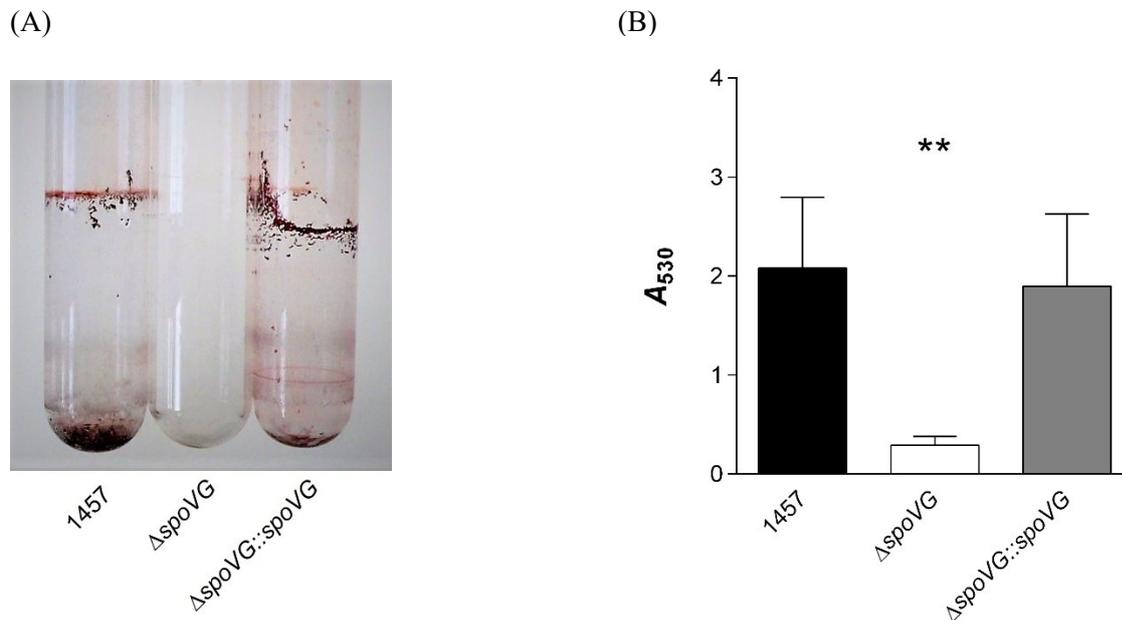


Abbildung 8: Einfluss von SpoVG auf die Biofilmbildung in Glasröhrchen

(A) Repräsentatives Foto des mit Safranin gefärbten Biofilms an der Luft-Medium-Grenze sowie am Boden der Glasröhrchen (B) Kulturen von *S. epidermidis* 1457 (schwarz), $1457 \Delta spoVG$ (weiß) und $1457 \Delta spoVG::spoVG$ (grau) wurden in Glasröhrchen für 18 h unter dynamischen Bedingungen inkubiert. Adhärenz Biofilme wurden mit Safranin gefärbt und die A_{530} gemessen. Der Mittelwert + SD von sechs unabhängigen Experimenten (durchgeführt in Duplikaten) ist dargestellt; **, $p < 0,01$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

Nach 18 h Wachstum unter dynamischen Bedingungen zeigte sich sowohl beim Wildtyp als auch bei $1457 \Delta spoVG::spoVG$ ein klarer Biofilm an der Luft-Medium-Grenze, außerdem blieben am Boden der Kulturröhrchen nach zweimaligem Waschen ebenfalls mit Safranin färbbare Zellagglomerate zurück (vgl. Abbildung 8 A). Demgegenüber war die Mutante $1457 \Delta spoVG$ nicht fähig, einen sichtbaren Biofilm an der Glasoberfläche zu produzieren. Diese Beobachtungen ließen sich durch Messung der Absorption bei 530 nm Wellenlänge (A_{530}) objektivieren (vgl. Abbildung 8 B): Der Wildtyp wies mit einem Mittelwert von $2,08 \pm 0,72$ eine sehr signifikant erhöhte A_{530} und damit Biofilmbildung im Vergleich zu $1457 \Delta spoVG$ auf, die nur einen Mittelwert von $0,29 \pm 0,09$ erreichte (7,2-facher Unterschied zwischen Wildtyp und $1457 \Delta spoVG$). Durch die Komplementation von *spoVG* konnte die Fähigkeit zur Biofilmbildung wieder hergestellt und nahe an das Wildtyp-Niveau gebracht werden (Mittelwert $1,90 \pm 0,73$; 1,1-facher Unterschied zwischen Wildtyp und $1457 \Delta spoVG::spoVG$). Diese Beobachtungen zeigen, dass das *S. epidermidis* Isolat 1457 bei fehlendem SpoVG nur sehr eingeschränkt dazu in der Lage ist, einen Biofilm unter diesen Bedingungen zu bilden.

4.3.2 Biofilmbildung in 96 well Flachboden-Platten unter statischen Bedingungen

Um den Effekt von SpoVG auf die Biofilmbildung in *S. epidermidis* 1457 eingehender zu untersuchen, wurde ein Assay zur Biofilmbildung in Mikrotiterplatten durchgeführt. Pro Kavität einer 96 well Flachboden-Platte mit Nunclon™ Delta Oberfläche wurde TSB mit dem entsprechenden Bakterienstamm auf eine $OD_{600+err.}$ von 0,05 inokuliert und anschließend bei 37 °C ohne Schütteln für 18 h inkubiert.

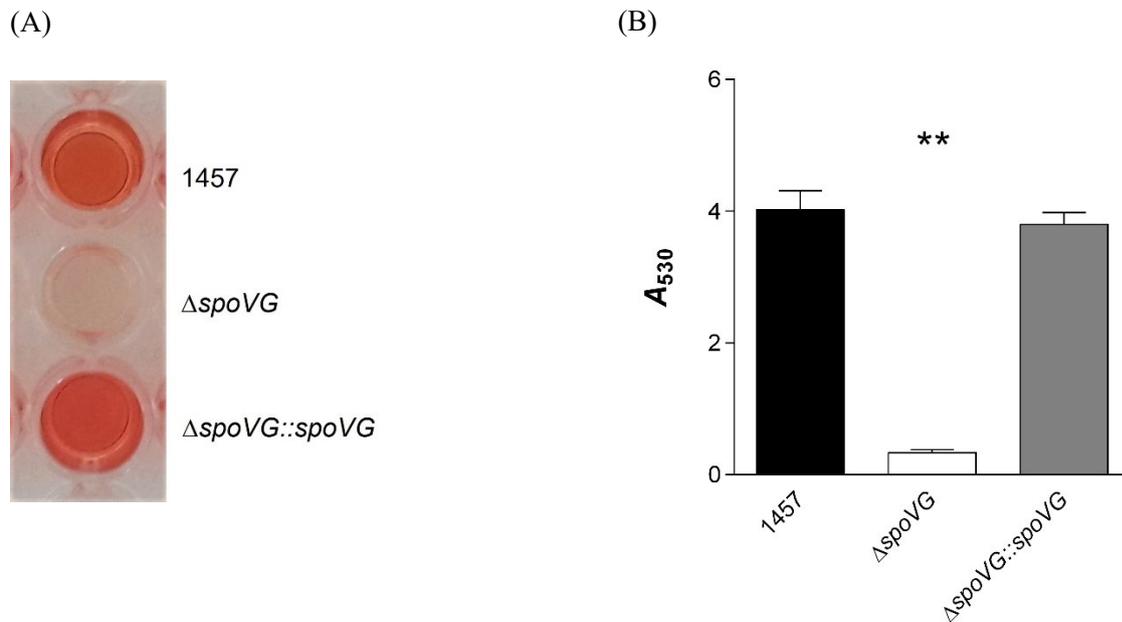


Abbildung 9: Einfluss von SpoVG auf die Biofilmbildung in 96 well Flachboden-Platten

(A) Ausschnitt eines repräsentativen Fotos einer 96 well Flachboden-Platte, auf dem Boden der wells ist der mit Safranin gefärbte Biofilm des jeweiligen Bakterienstammes zu sehen. (B) Kavitäten einer 96 well Flachboden-Platte wurden mit Kulturen von *S. epidermidis* 1457 (schwarz), 1457 $\Delta spoVG$ (weiß) oder 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ (grau) inokuliert und für 18 h ohne Schütteln inkubiert. Biofilme wurden mit Safranin gefärbt und die A_{530} wurde bestimmt. Messwerte wurden mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor verrechnet. Der Mittelwert + SD von sechs unabhängigen Experimenten (durchgeführt in Triplikaten) ist dargestellt; **, $p < 0,01$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

Am nächsten Tag wurden die im well entstandenen Biofilme vorsichtig gewaschen, um möglichst alle planktonischen Zellen zu entfernen. Nach dem Färben mit Safranin war sowohl beim Wildtyp *S. epidermidis* 1457 als auch bei 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ am Boden des wells ein kräftig gefärbter Biofilm zu sehen (vgl. Abbildung 9 A). Im Gegensatz dazu war 1457 $\Delta spoVG$ kaum dazu in der Lage, einen sichtbaren Biofilm zu erzeugen. Dieser optische Eindruck spiegelte sich in den gemessenen A_{530} -Werten wider (vgl. Abbildung 9 B): *S. epidermidis* 1457 zeigte mit einem Mittelwert von $4,02 \pm 0,29$ hohe Absorptionswerte, ebenso wie 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ mit $3,80 \pm 0,18$. Die Mutante 1457 $\Delta spoVG$ wies dem gegenüber eine sehr signifikant geringere Biofilmbildung mit entsprechenden A_{530} -Werten von $0,34 \pm 0,04$ auf (11,95-facher Unterschied zwischen Wildtyp und 1457 $\Delta spoVG$). Somit konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *spoVG* unter den gegebenen Bedingungen ebenfalls zu einer signifikant geringeren Biofilmbildung *in vitro* führt.

Um das Ausmaß des Verlustes der Biofilmbildung und damit die hier erhobenen semiquantitativen Ergebnisse besser interpretieren zu können, wurde der Versuchsaufbau zusätzlich mit dem Wildtyp *S. epidermidis* 1457 als Positivkontrolle und der isogenen Mutante 1457-M10 durchgeführt (vgl. Abbildung 10). In 1457-M10 ist die Transkription des *ica*-Operons durch die Insertion des Transposons Tn917 in *icaA* gestört und der Stamm verliert dadurch die Fähigkeit zur PIA-Produktion [54,61,75]. 1457-M10 wurde nach Testung seiner *in vitro* Fähigkeit zur Biofilmbildung schon mehrfach als Biofilmnegativ beschrieben [28,54,61,75] und diente somit hier als Negativkontrolle.

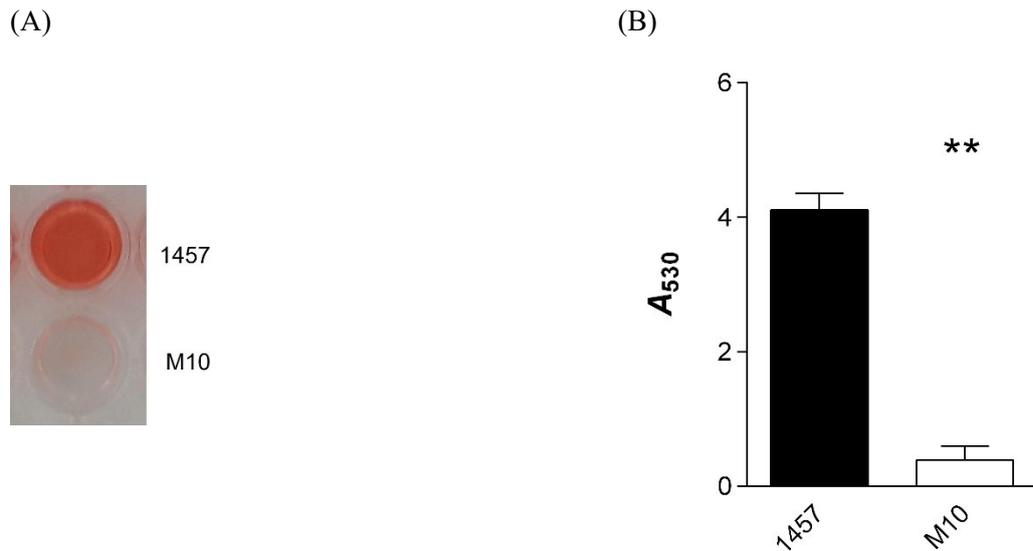


Abbildung 10: Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457 und 1457-M10 in 96 well Flachboden-Platten

(A) Ausschnitt eines repräsentativen Fotos einer 96 well Platte, am Boden der Kavität ist der mit Safranin gefärbte Biofilm von *S. epidermidis* 1457 (oben) und 1457-M10 (unten) zu sehen. (B) Kulturen von *S. epidermidis* 1457 (schwarz) und der PIA-negativen 1457-M10 (weiß) wurden in 96 well Flachboden-Platten für 18 h ohne Schütteln inkubiert. Adhärente Biofilme wurden mit Safranin gefärbt und durch Messung der A₅₃₀ quantifiziert, wobei die Messwerte mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor verrechnet wurden. Der Mittelwert + SD von sechs unabhängigen Experimenten (durchgeführt in Triplikaten) ist dargestellt; **, $p < 0,01$; Mann-Whitney Test

S. epidermidis 1457 war erneut in der Lage, einen kräftig anfärbbaren Biofilm auf der Oberfläche einer 96 well Platte zu produzieren. Die ermittelte A₅₃₀ lag bei dieser Versuchsserie bei $4,11 \pm 0,24$. Die PIA-negative Mutante 1457-M10 erreichte hingegen A₅₃₀-Werte von $0,39 \pm 0,21$ (10,55-facher Unterschied), was einem statistisch sehr signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen entsprach. Hierbei fiel auf, dass das durch Safranin färbbare Material am Boden einer mit 1457-M10 inokulierten Kavität (vgl. Abbildung 10 A) mit einer mit 1457 $\Delta spoVG$ inokulierten Kavität (vgl. Abbildung 9 A) vergleichbar erschien. Auch die A₅₃₀-Werte dieser beiden 1457 Mutanten unterschieden sich statistisch nicht signifikant voneinander ($p = 0,79$; Mann-Whitney Test). Demzufolge unterschied sich 1457 $\Delta spoVG$ phänotypisch nicht von der PIA-negativen, als Biofilm-negativ beschriebenen Mutante 1457-M10 in dem hier gewählten Versuchsaufbau.

4.3.3 Biofilmbildung auf Fragmenten Peripherer Venenkatheter

Aufgrund die vielversprechenden Ergebnisse zum Einfluss von SpoVG auf die Biofilmbildung *in vitro* sowohl unter dynamischen als auch unter statischen Bedingungen, wurden weitere Experimente zur Vorbereitung auf geplante *in vivo* Versuche durchgeführt. Von Interesse war hierbei, ob sich nach mehrtägiger Inkubation ein Unterschied in der Biofilmbildung auf Fragmenten eines im Klinikalltag verwendeten PVK aus Polyurethan zeigen würde. Hierbei wurden ähnliche Bedingungen gewählt, wie sie später auch im Mausmodell umgesetzt wurden. So wurde sowohl das gleiche Modell des PVK als auch die gleiche Infektionsdosis genutzt. 1 cm-lange Fragmente des PVK-Schlauches wurden in TSB mit 1×10^7 Zellen des entsprechenden Bakterienstammes per Injektion in das Lumen des PVK-Fragmentes inokuliert. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln bei 37 °C unter relativem Luftabschluss über 5 Tage, während derer die Katheterfragmente täglich in frisches TSB-Medium überführt wurden, um Nährstofflimitationen zu reduzieren. An Tag 5 wurden die Katheterfragmente nochmals fotografiert (vgl. Abbildung 11).

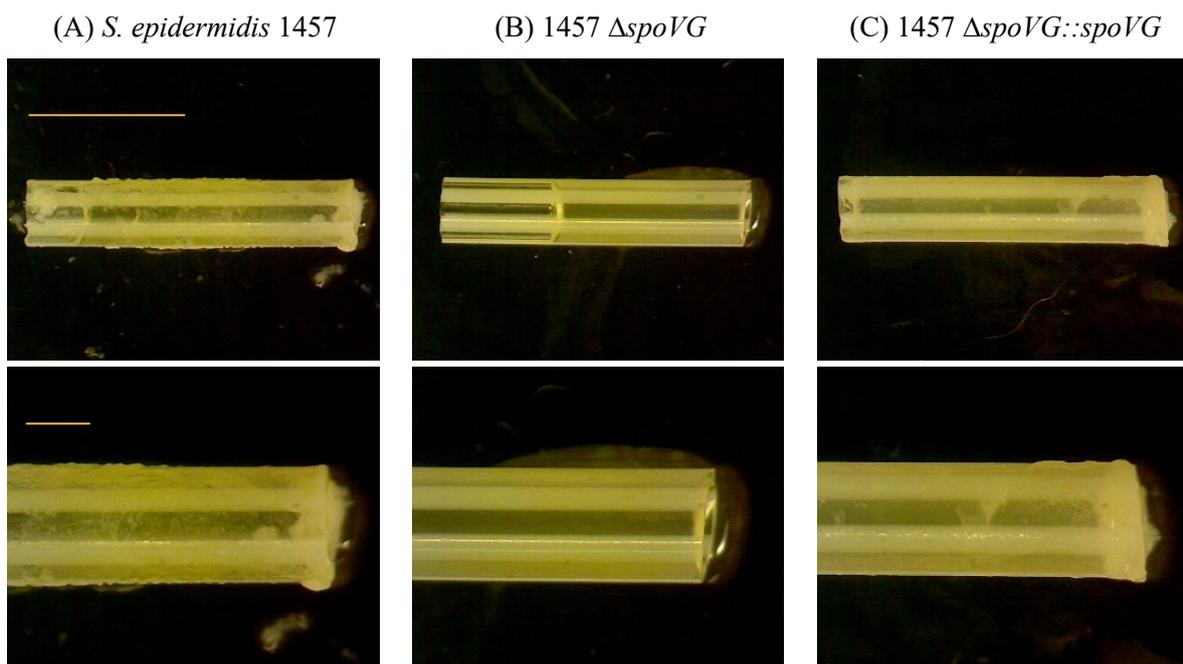


Abbildung 11: Einfluss von SpoVG auf die Biofilmbildung auf Schlauchfragmenten Peripherer Venenkatheter

Katheterfragmente wurden mit (A) *S. epidermidis* 1457, (B) *1457 ΔspoVG* oder (C) *1457 ΔspoVG::spoVG* inokuliert und in TSB-Medium unter Schütteln inkubiert. Das Nährmedium wurde täglich ersetzt. An Tag 5 wurde das bakterielle Wachstum auf der Katheteroberfläche beurteilt (obere Reihe: 6,3-fache Vergrößerung, Maßstab 5 mm; untere Reihe: 12,5-fache Vergrößerung, Maßstab 1 mm)

Auf dem Katheter, der mit *S. epidermidis* 1457 inokuliert wurde, war deutlich eine Schleimschicht im Sinne eines Biofilms auf der Außenfläche des Katheters zu sehen. Dies ließ den Katheter insgesamt trüb erscheinen. Auch war die rechte Katheteröffnung durch Biomasse zugestopft. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei dem Katheter, der mit *1457 ΔspoVG::spoVG* inokuliert wurde: trübes Erscheinen mit Biomasse

auf der Katheteraußenfläche. Demgegenüber sah der mit 1457 $\Delta spoVG$ inokulierte Katheter weiterhin klar aus, auch schien er auf der Außenfläche frei von Biomasse zu sein. Zur Quantifizierung und Objektivierung dieser Beobachtungen wurden die Katheter zunächst gewaschen, sodass möglichst alle nicht-adhären Zellen von Oberfläche und Lumen entfernt wurden. Die auf den Kathetern gewachsenen Biofilme wurden durch Ultraschallbehandlung als Teil einer in der AG Bischoff etablierten Methode [101] von der Oberfläche gelöst. Die Überstände von Tag 5 erfuhren dieselbe Behandlung. Danach wurde die $OD_{600+err.}$ bestimmt (vgl. Abbildung 12).

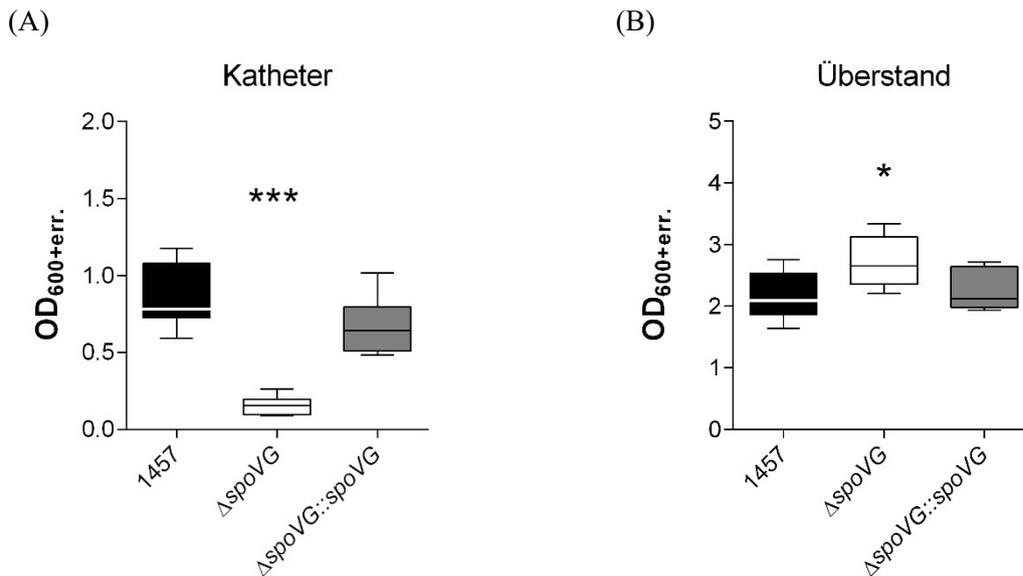


Abbildung 12: Optische Dichte bei Biofilmbildung auf Katheterfragmenten *in vitro*

Die optische Dichte der (A) von Kathetern gelösten Bakterien im Biofilm und im (B) Überstand wurde 5 Tage nach Inokulation mit *S. epidermidis* 1457 (schwarz), 1457 $\Delta spoVG$ (weiß) oder 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ (grau) gemessen, wobei die Messwerte mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert wurden ($OD_{600+err.}$). Daten sind als Box-Plot dargestellt mit Median (Horizontale), 25 % – 75 % Perzentile (Box) und Minimum zu Maximum (Whiskers) ($n = 9$). *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

Hier zeigte sich bei den von den Kathetern abgelösten Bakterien ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den hohen $OD_{600+err.}$ -Werten des Wildtyps und den niedrigen $OD_{600+err.}$ -Werten der Mutante 1457 $\Delta spoVG$ (4,99-facher Unterschied). Dieser Unterschied konnte in 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ komplementiert werden. Die medianen $OD_{600+err.}$ -Werte der Überstände wiesen einen signifikanten Unterschied zwischen dem Wildtyp mit $OD_{600+err.}$ -Werten von 2,08 und 1457 $\Delta spoVG$ mit $OD_{600+err.}$ -Werten von 2,65 auf, in diesem Fall zugunsten der Mutante ($p = 0,02$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test). Zusätzlich wurden die CFU-Werte aller Proben ermittelt, wobei die von Kathetern abgelösten Bakterien als zuvor in einem Biofilm gewachsene Bakterien interpretiert wurden (vgl. Abbildung 13). Die Ergebnisse zeigten, dass die Deletion von *spoVG* zu einer signifikant verminderten Zellzahl auf der Katheteroberfläche führte. So war *S. epidermidis* 1457 dazu in der Lage, CFU-Raten von etwa $5,75 \times 10^7$ CFU/Katheter im Median zu erreichen. Die CFU-Raten von 1457 $\Delta spoVG$ war demgegenüber um eine \log_{10} -Stufe niedriger, was einem hochsignifikanten Unterschied zum Wildtyp entsprach. Die Biofilmbildungsrate von 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ erreichte mit $2,80 \times 10^7$ CFU/Katheter

wieder ein mit dem Wildtyp weitestgehend vergleichbares Niveau (2,05-facher Unterschied, $p = 0,47$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test). Ähnlich wie schon bei den zuvor beschriebenen *in vitro* Biofilm-Assays, zeigte sich für 1457 $\Delta spoVG$ erneut eine stark verminderte Biofilmbildungskapazität der Mutante in diesem Assay-Typ. Die für 1457 $\Delta spoVG$ in diesem Biofilm-Assay ermittelten CFU-Raten von $6,80 \times 10^6$ CFU/Katheter verdeutlichen aber zugleich, dass der Verlust von SpoVG in *S. epidermidis* nicht mit einem kompletten Verlust der Biofilmbildung auf Katheterfragmenten einhergeht. In den CFU-Raten der Überstände zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen. Dennoch lag 1457 $\Delta spoVG$ mit medianen CFU-Raten von $1,24 \times 10^9$ CFU/ml erneut über den medianen CFU-Raten des Wildtyps mit $6,20 \times 10^8$ CFU/ml.

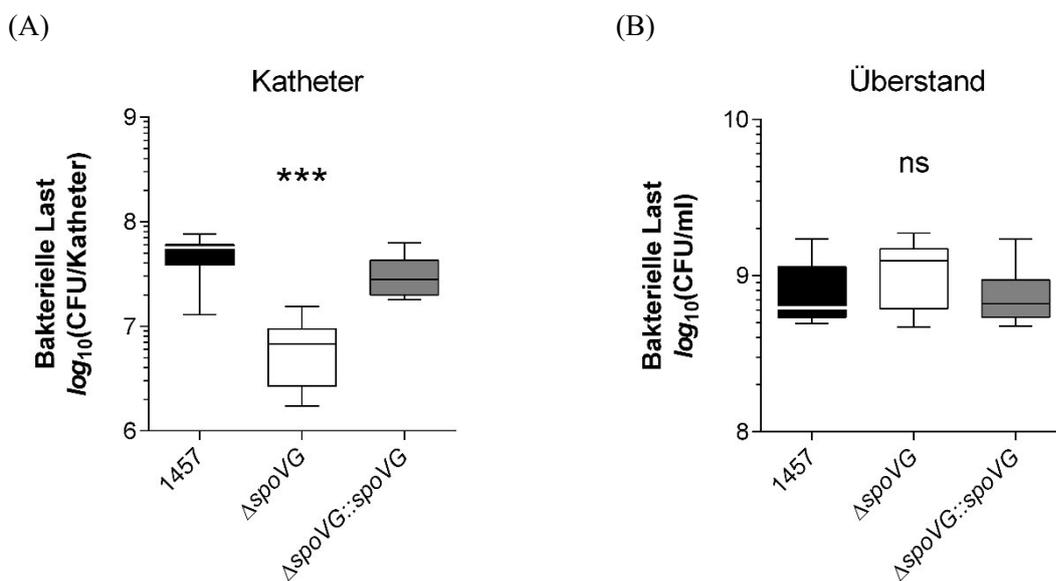


Abbildung 13: Bakterielle Last bei Biofilmbildung auf Katheterfragmenten *in vitro*

Die bakterielle Last der (A) von Kathetern abgelösten Biofilme und der (B) Überstände wurde 5 Tage nach Inokulation mit *S. epidermidis* 1457 (schwarz), 1457 $\Delta spoVG$ (weiß) oder 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ (grau) mittels CFU-Bestimmung ermittelt. Daten sind als Box-Plot dargestellt mit Median (Horizontale), 25 % – 75 % Perzentile (Box) und Minimum zu Maximum (Whiskers) ($n = 9$). ns, nicht signifikant; ***, $p < 0,001$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

4.4 Einfluss von SpoVG auf die Transkription von *icaD* und *icaR*

S. epidermidis 1457 ist unter *in vitro* Bedingungen ein starker Biofilmbildner, der PIA-abhängige Biofilme erzeugt [73,74]. Zur Biosynthese und Sekretion von PIA sind die Enzyme erforderlich, die im *icaADBC*-Operon codiert sind [94]. Die Deletion von *spoVG* in *S. epidermidis* 1457 hatte einen negativen Einfluss auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung *in vitro* gezeigt (s. 4.3). Nun stellte sich die Frage, über welchen Mechanismus die Deletion von *spoVG* die Biofilmbildung einschränkte. Eine mögliche Erklärung war, dass die PIA-Produktion durch die Deletion beeinträchtigt wurde und somit auch die Biofilmbildung. Wichtig zu erwähnen ist hierbei, dass sich 1457 $\Delta spoVG$ phänotypisch nicht von der PIA-negativen Mutante 1457-M10 unterscheiden ließ, wenn die Fähigkeit zur Biofilmbildung in 96 *well* Flachboden-Platten untersucht wurde (s. 4.3.2). Außerdem war aus früheren Untersuchungen bekannt, dass 1457 $\Delta spoVG$ die Fähigkeit zur PIA-Produktion im selben Umfang verlor wie 1457-M10

[54]. Vor diesem Hintergrund war es von Interesse, ob sich eine Veränderung bereits auf transkriptioneller Ebene beobachten ließ, die durch den Transkriptionsfaktor SpoVG vermittelt sein könnte. Daher wurden Transkriptionsanalysen für *icaD*, einem Strukturgen des *icaADBC*-Operons, und für *icaR*, das für den Repressor IcaR codierende Regulatorgen dieses Operons [22], durchgeführt.

4.4.1 Transkriptionsanalysen zu *icaD*

Die Transkriptionsanalysen zu *icaD* wurden zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums vorgenommen. Hierzu wurden nach 3 h, 6 h und 9 h Wachstum in TSB-Medium Bakterienzellen geerntet, aus diesen Zellpopulationen Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, welche mit Hilfe einer quantitativen Real-Time PCR analysiert wurde. Die Transkription wurde relativ zum Haushaltsgen *gyrB* angegeben (vgl. Abbildung 14).

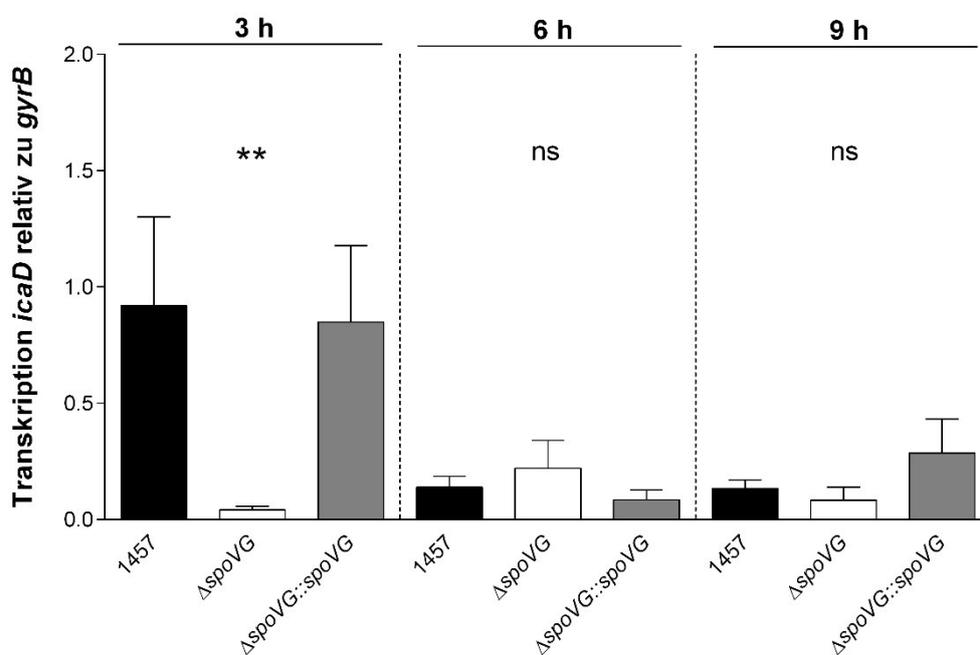


Abbildung 14: Transkription von *icaD*

Transkriptionslevel von *icaD* relativ zu *gyrB* nach 3 h, 6 h und 9 h Wachstum in *S. epidermidis* 1457 (schwarz), 1457 $\Delta spoVG$ (weiß) und 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ (grau), analysiert durch qRT-PCR. Dargestellt sind Mittelwert + SD der Kopienzahl von *icaD* pro Kopie *gyrB* von acht in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten; ns, nicht signifikant; **, $p < 0,01$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

In der exponentiellen Wachstumsphase (3 h) zeigte die Deletion von *spoVG* einen eindeutigen Einfluss auf die Transkription von *icaD*. Im Wildtyp *S. epidermidis* 1457 zeigte sich zu diesem Zeitpunkt ein relatives Transkriptionslevel von $0,92 \pm 0,38$ Kopien *icaD* pro Kopie *gyrB*. In der Deletionsmutante 1457 $\Delta spoVG$ wurde nur eine Kopienzahl von $0,04 \pm 0,02$ Kopien *icaD* pro Kopie *gyrB* erreicht, was einer mehr als 20-fachen Reduktion entsprach und damit im Vergleich zum Wildtyp einem sehr signifikanten Unterschied entsprach. In 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ konnte das *icaD*-Transkriptionslevel mit $0,85 \pm 0,33$ Kopien *icaD* pro Kopie *gyrB* wieder auf ein mit dem Wildtyp vergleichbares Level gebracht

werden. In der post-exponentiellen Wachstumsphase nach 6 h waren die relativen Transkriptionslevel in allen drei Stämmen bereits deutlich niedriger. Der Wildtyp erreichte Level von $0,14 \pm 0,05$ Kopien *icaD* pro Kopie *gyrB*, die Mutante $1457 \Delta spoVG$ erreichte $0,22 \pm 0,12$ Kopien *icaD* pro Kopie *gyrB* und $1457 \Delta spoVG::spoVG$ wies Werte von $0,08 \pm 0,04$ Kopien *icaD* pro Kopie *gyrB* auf. Für die beiden späteren Wachstumszeitpunkte ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp feststellen ($p \geq 0,088$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Beeinträchtigung der Biofilmbildung durch die Deletion von *spoVG* mit der Transkription von *icaADBC* und schließlich mit der Biosynthese von PIA in Zusammenhang steht und dass SpoVG seine Wirkung vor allem während der frühen Wachstumsphasen entfaltet.

4.4.2 Transkriptionsanalysen zu *icaR*

Da das strangaufwärts zu *icaADBC* gelegene und divergent orientierte *icaR* für einen Regulator codiert, der die Transkription von *icaADBC* reprimiert [22], stellte sich die Frage, ob die eingeschränkte Transkription von *icaD* in der Deletionsmutante *S. epidermidis* $1457 \Delta spoVG$ durch die Repression durch IcaR zu erklären ist. Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation auch die Transkription von *icaR* zu verschiedenen Wachstumszeitpunkten analysiert (vgl. Abbildung 15).

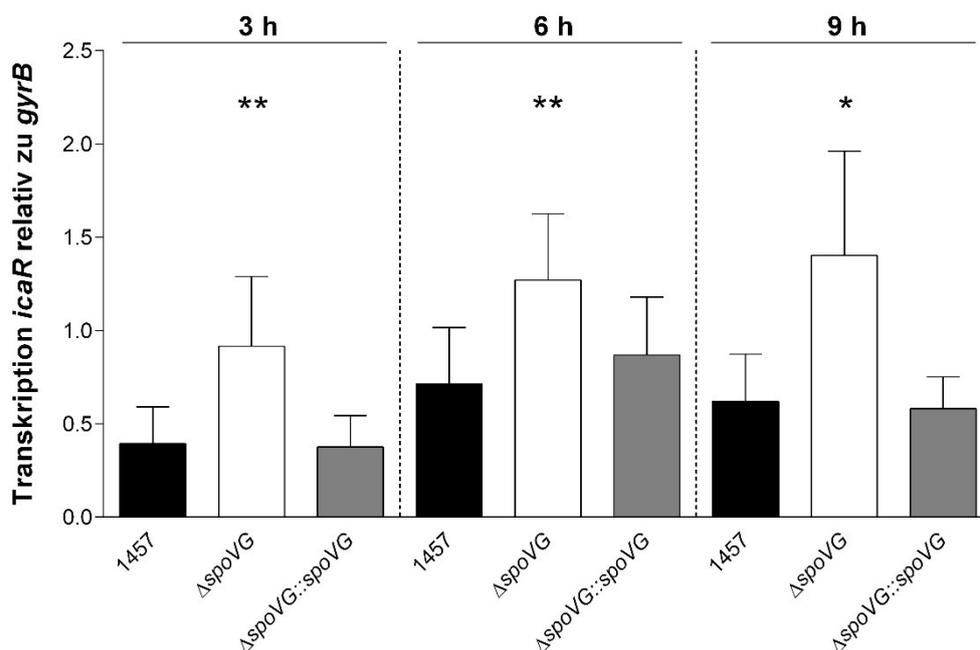


Abbildung 15: Transkription von *icaR*

Transkriptionslevel von *icaR* relativ zu *gyrB* nach 3 h, 6 h und 9 h Wachstum in *S. epidermidis* 1457 (schwarz), $1457 \Delta spoVG$ (weiß) und $1457 \Delta spoVG::spoVG$ (grau) wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert + SD der Kopienzahl von *icaR* pro Kopie *gyrB* von acht in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

Die Deletion von *spoVG* zeigte zu allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikante Auswirkung auf die Transkription von *icaR*. In der exponentiellen Wachstumsphase (3 h) zeigte sich ein relatives Transkriptionslevel von *icaR* von $0,39 \pm 0,20$ Kopien *icaR* pro Kopie *gyrB* im Wildtyp *S. epidermidis* 1457. Ein ähnliches Level konnte in $1457 \Delta spoVG::spoVG$ beobachtet werden, während die Mutante $1457 \Delta spoVG$ ein relatives Transkriptionslevel von $0,92 \pm 0,37$ Kopien *icaR* pro Kopie *gyrB* erreichte. Dies entsprach einem statistisch sehr signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und der Deletionsmutante. Anders als bei *icaD* beobachtet, konnte für *icaR* nach 6 h Wachstum ebenfalls ein sehr signifikanter Unterschied zwischen *S. epidermidis* 1457 und $1457 \Delta spoVG$ nachgewiesen werden: Der Wildtyp erreichte relative Transkriptionslevel von $0,71 \pm 0,30$ Kopien *icaR* pro Kopie *gyrB* im Vergleich zu $1,27 \pm 0,36$ Kopien *icaR* pro Kopie *gyrB* in $1457 \Delta spoVG$. In der früh-stationären Wachstumsphase (nach 9 h) erwies sich die Transkription von *icaR* weiterhin durch die Deletion von *spoVG* als signifikant beeinflusst. $1457 \Delta spoVG$ wies mit $1,40 \pm 0,56$ Kopien *icaR* pro Kopie *gyrB* ein signifikant erhöhtes relatives Transkriptionslevel im Vergleich zum Wildtyp mit $0,62 \pm 0,25$ Kopien *icaR* pro Kopie *gyrB* auf. Die Transkription von *icaR* in $1457 \Delta spoVG::spoVG$ bewegte sich hingegen mit $0,38 \pm 0,17$ Kopien *icaR* pro Kopie *gyrB* nach 3 h Wachstum sowie zu den späteren Wachstumszeitpunkten auf einem zum Wildtyp vergleichbaren Niveau ($p \geq 0,72$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test).

4.5 Fremdkörper-assoziiertes Infektionsmodell in der Maus

Die bisherigen Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen zur Biofilmbildung wiesen stark darauf hin, dass die Deletion von *spoVG* mit einer reduzierten Fähigkeit zur Biofilmbildung auf abiotischen Oberflächen einhergeht. Dies ließ die Hypothese zu, dass SpoVG auch *in vivo* eine Rolle bei der Biofilmbildung spielt und somit für die Infektiosität von *S. epidermidis* 1457 von Bedeutung sein könnte. Daher wurde ein Fremdkörper-assoziiertes Infektionsmodell in der Maus zur Untersuchung dieser Hypothese durchgeführt. In dieser Arbeit wurden als Fremdkörper 1 cm-lange Schlauchfragmente eines sterilen PVK subkutan in beide Flanken der Maus implantiert und mit bakteriellen Inokula infiziert. Die Katheter im Subkutangewebe sollten den Staphylokokken als Oberfläche zur Biofilmbildung dienen. Zur Vereinfachung wird das Modell im Folgenden auch als Katheter-Infektionsmodell bezeichnet.

4.5.1 Ermittlung der idealen Infektionsdosis für *S. epidermidis* 1457

Zunächst erfolgte eine Pilotphase, in der die ideale Infektionsdosis für den Wildtyp *S. epidermidis* 1457 herausgefunden werden sollte. Ideal bedeutete hierbei, dass die applizierte Bakterienanzahl zuverlässig eine lokale bakterielle Infektion mit Biofilmbildung am Fremdkörper auslöst, ohne dass es dabei zu einer fulminanten Entzündung mit starker Belastung der Maus kommt. Eine Bakteriämie sollte ebenfalls nicht auftreten. Für die Infektionsdosis von 1×10^4 CFU war aus der Literatur bereits bekannt, dass in einem ähnlichen Modell eine lokale Infektion ausgelöst werden konnte [117], während bei Infektion mit 1×10^7 CFU bereits über Abszessbildung an der Infektionsstelle berichtet wurde [114]. In diesem

Bereich lagen die getesteten Infektionsdosen für den hier gewählten Versuchsaufbau. Pro Infektionsdosis wurden zwei Tiere infiziert, wobei in beide Flanken ein steriles Fragment eines PVK aus Polyurethan implantiert und entsprechend mit 1×10^4 CFU (niedrig), 5×10^4 CFU (mittel) oder 1×10^7 (hoch) CFU des Wildtyps *S. epidermidis* 1457 inokuliert wurde. Nach 10 Tagen wurde die Last der auf den Kathetern als Biofilm gewachsenen Bakterien bestimmt, sowie die Bakterienlast im umliegenden Gewebe. Hierzu wurden die Katheterfragmente unter sterilen Kautelen der zuvor getöteten Maus entnommen. Die Katheterproben wurden nach der Methode von Pätzold *et al.* [101] aufgearbeitet, das Gewebe homogenisiert und jeweils die CFU/Katheter bzw. CFU/g Gewebe bestimmt (vgl. Abbildung 16).

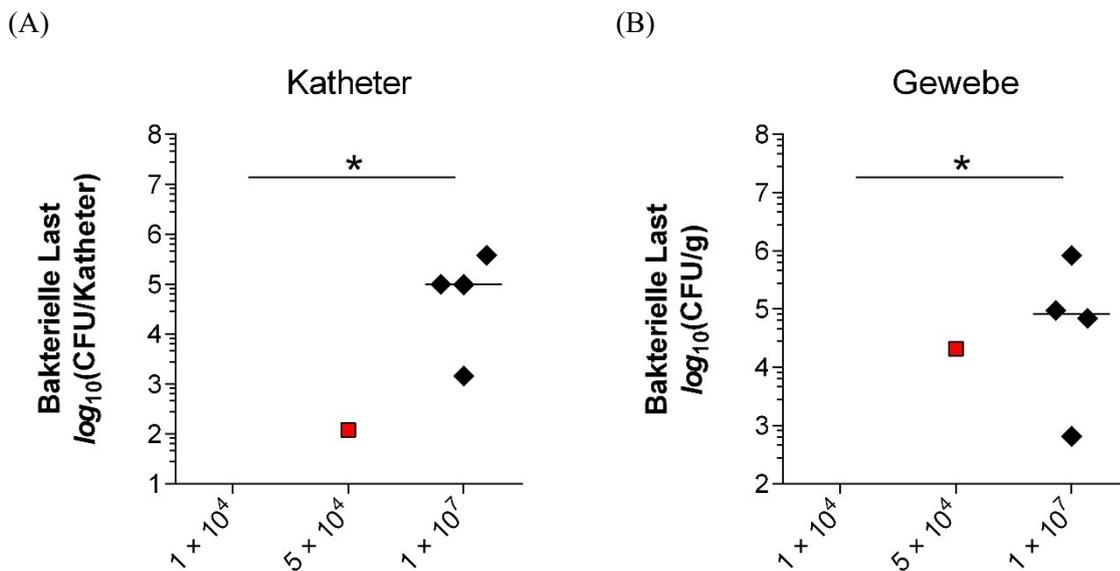


Abbildung 16: Bakterielle Last an der Infektionsstelle (Pilotphase)

Sterile Katheterfragmente wurden subkutan in beide Flanken einer Maus implantiert und mit 1×10^4 (kein Wert), 5×10^4 (rotes Quadrat) oder 1×10^7 (schwarze Raute) CFU *S. epidermidis* 1457 infiziert. Nach 10 Tagen wurde die bakterielle Last auf den (A) Katheterfragmenten und im (B) umliegenden Gewebe der Infektionsstelle festgestellt. Jedes Symbol stellt eine individuelle Infektionsstelle mit Median (Horizontale) dar ($n = 3 - 4$ pro Dosisgruppe). *, $p < 0,05$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparinsons Test

Im Vergleich der Dosisgruppen zeigte sich, dass nur mit der hohen Dosis von 1×10^7 CFU zuverlässig eine Biofilmbildung bzw. Besiedlung des den Biofilm umgebenden Gewebes ausgelöst werden konnte. In dieser Gruppe konnte nach 10 Tagen an allen vier Infektionsstellen *S. epidermidis* 1457 nachgewiesen werden, was für eine Persistenz der Staphylokokken mit einhergehender bakterieller Infektion sprach. Allerdings wiesen die Werte eine hohe Streuung auf: Drei Werte der Katheterproben befanden sich im Bereich von $9,8 \times 10^4$ CFU/Katheter bis $3,8 \times 10^5$ CFU/Katheter, während ein Wert zwei Log₁₀-Stufen darunter lag. Eine ähnliche Streuung wiesen die entsprechenden Werte im umliegenden Gewebe auf. Andererseits konnte in der niedrigen und mittleren Dosisgruppe von 1×10^4 und 5×10^4 CFU eine Infektion nicht zuverlässig hervorgerufen werden. An den Infektionsstellen konnte nur einmal bzw. gar keine CFU/Katheter bzw. CFU/g nachgewiesen werden. Dadurch ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der niedrigen und hohen Dosisgruppe. Im Hinblick auf Zu-

verlässigkeit einer ausgelösten Infektion schien daher die Dosis 1×10^7 CFU für diesen Versuchsaufbau trotz großer Streuung der Werte am besten geeignet.

Die zuverlässige Entstehung einer bakteriellen Infektion am Katheterfragment war zwar von großer Bedeutung, aber gleichzeitig durfte das Versuchstier durch die Infektion keine zu starke Belastung erfahren. Daher war es ebenso von Interesse zu untersuchen, inwieweit die Höhe der Infektionsdosis eine Auswirkung auf die Belastung der Tiere hatte. Dazu wurde täglich der Belastungsgrad (s. Tabelle 16) der Versuchstiere bestimmt (vgl. Abbildung 17).

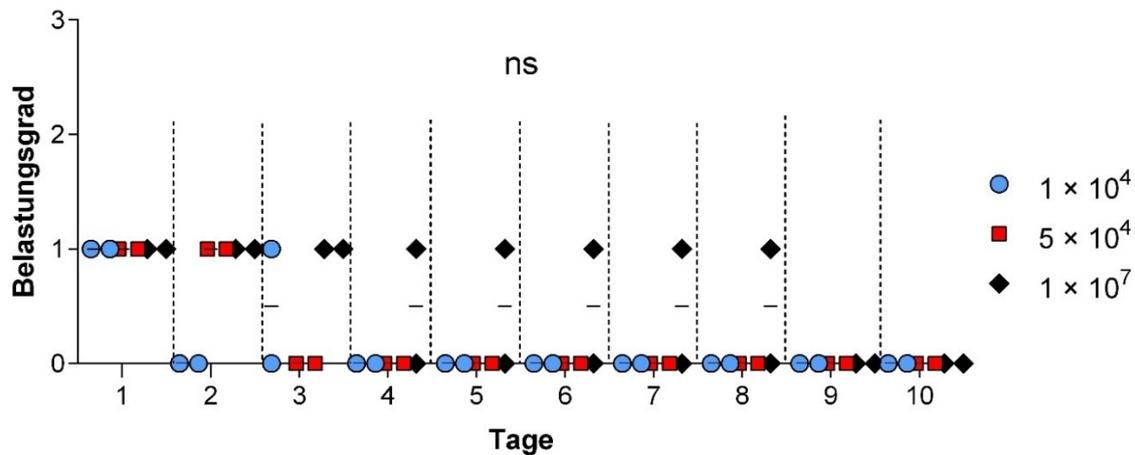


Abbildung 17: Belastungsgrad der Versuchstiere (Pilotphase)

Nach Infektion mit 1×10^4 (blauer Punkt), 5×10^4 (rotes Quadrat) oder 1×10^7 (schwarze Raute) CFU *S. epidermidis* 1457 wurde der Belastungsgrad der Tiere täglich ermittelt. Jedes Symbol stellt ein individuelles Tier mit Median (Horizontale) dar ($n = 2$ pro Dosisgruppe). ns, nicht signifikant; 2way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparisons Test

Am ersten Tag nach Infektion wiesen alle Versuchstiere eine geringe Belastung (Belastungsgrad 1) auf, was vermutlich auf die Nachwirkungen der Narkose vom Vortag zurückführbar ist und in vergleichbaren Tierversuchen aus der AG Bischoff regelmäßig beobachtet wurde (Linda Pätzold, mündliche Mitteilung). An Tag 2 wiesen die Tiere der niedrigen Dosisgruppe keine Belastung auf. Die Tiere der mittleren Dosisgruppe hatten sich ab dem dritten Tag bereits vollständig erholt. Ab Tag 4 war die Mehrheit der Tiere (5/6) nicht mehr belastet (Belastungsgrad 0). Nur ein Tier der hohen Dosisgruppe zeigte sich über die folgenden vier Tage weiterhin gering beeinträchtigt. Ab Tag 9 bis zum Ende des Beobachtungszeitraums waren alle Versuchstiere unbeeinträchtigt, unabhängig der Dosisgruppe. Somit zeigte sich insgesamt kein signifikanter Unterschied zwischen den Infektionsgruppen im Hinblick auf die Belastung durch die Infektion mit unterschiedlich hohen Infektionsdosen.

Das Gewicht ist ein guter Surrogatparameter für die Schwere einer Infektion, da es Veränderungen im Fress- oder Trinkverhalten etwa durch Wundschmerz oder Fatigue [25] bzw. Flüssigkeitsverlust oder -retention im Rahmen einer systemischen Reaktion aufzeigen kann. Daher wurde der Gewichtsverlauf der Tiere über den Versuchszeitraum im Rahmen dieser Arbeit auch unabhängig vom Gesamtbelastungsgrad betrachtet (vgl. Abbildung 18).

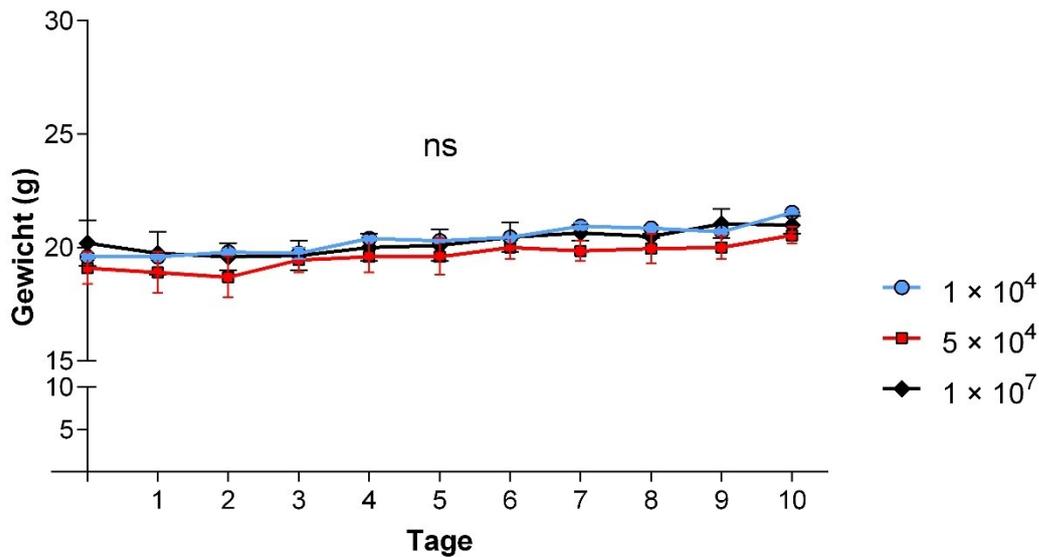


Abbildung 18: Gewichtsverlauf der Versuchstiere (Pilotphase)

Die Versuchstiere wurden nach Infektion mit 1×10^4 (blauer Punkt), 5×10^4 (rotes Quadrat) oder 1×10^7 (schwarze Raute) CFU *S. epidermidis* 1457 täglich gewogen. Der Median einer Dosisgruppe mit Interquartilsabstand ist dargestellt (n = 2 Tiere pro Dosisgruppe). ns, nicht signifikant; 2way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparisons Test

Das Ausgangsgewicht der Tiere lag im Median in der niedrigen Dosisgruppe bei 19,6 g, in der mittleren Dosisgruppe bei 19,1 g und in der hohen Dosisgruppe bei 20,2 g. An den ersten Tagen nach Infektion ließ sich in der mittleren und hohen Dosisgruppe eine geringe Gewichtsreduktion beobachten. Das Gewicht in der niedrigen Dosisgruppe blieb währenddessen weitestgehend konstant. Spätestens ab Tag 4 wies die Gewichtsentwicklung aller Tiere eine steigende Tendenz auf, sodass am Ende des Versuches alle Tiere über ihrem individuellen Ausgangsgewicht lagen.

Weiterhin ließ sich bei keinem der Tiere eine Bakteriämie nachweisen (0/6), sodass sich hier keine Präferenz für eine bestimmte Infektionsdosis ableiten ließ.

Basierend auf diesen Daten wurde für die weiterführenden Versuche eine Infektionsdosis von 1×10^7 CFU/ml gewählt, da einzig bei dieser getesteten Dosis eine stabile Besiedlung des Katheters hervorgerufen werden konnte, ohne dabei einen starken Belastungsgrad bei der Maus zu induzieren.

4.5.2 Einfluss von SpoVG auf das Fremdkörper-assoziierte Infektionsmodell in der Maus

In der Folge wurde das Fremdkörper-assoziierte Infektionsmodell dazu genutzt, um der Fragestellung nachzugehen, ob SpoVG eine Rolle für die *in vivo* Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457 spielt. Hierfür wurden Fragmente eines sterilen PVK aus Polyurethan in beide Flanken einer Maus implantiert. Das Lumen des Katheters wurde jeweils mit der in der Pilotphase (s. 4.5.1) festgelegten Infektionsdosis von 1×10^7 CFU der Stämme *S. epidermidis* 1457, 1457 Δ spoVG oder 1457 Δ spoVG::spoVG infiziert. Die Tiere wurden täglich gewogen und deren Belastungsgrad ermittelt. Das an der Infektionsstelle entstehende Ödem wurde jeden zweiten Tag vermessen und fotografisch dokumentiert. Nach 10 Tagen

wurden die Tiere getötet. Die implantierten Katheter wurden unter sterilen Kautelen mitsamt dem umliegenden Gewebe entnommen, um die bakterielle Last am Infektionsort zu ermitteln. Zusätzlich wurde bei jeder Maus ein Test auf Bakteriämie („Sepsis-Test“) durchgeführt und die Leukozytenzahl im Blut bestimmt.

4.5.2.1 Bakterielle Last am Infektionsort

Die entnommenen Katheterfragmente wurden nach der Methode von Pätzold *et al.* [101] aufgearbeitet, wobei die vom Katheter gelösten Bakterien als im Biofilm gewachsene Bakterien angesehen wurden. Die Gewebeproben wurden homogenisiert und die bakterielle Last aller Proben wurde durch CFU-Zählung ermittelt (vgl. Abbildung 19). Die bakterielle Last der Katheterfragmente als Maß für die Biofilmbildung und somit für die Infektiosität war hierbei von besonderem Interesse.

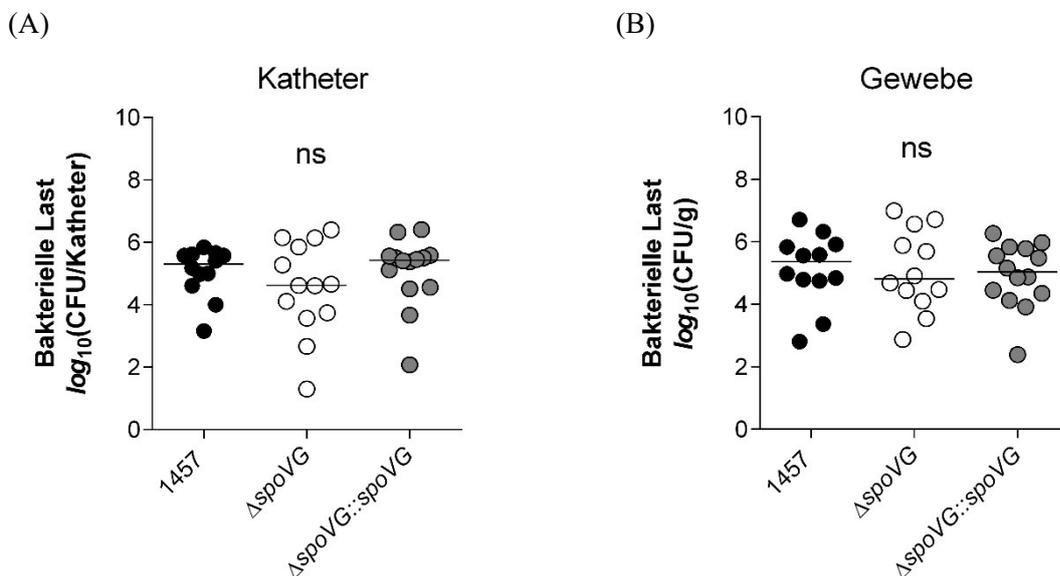


Abbildung 19: Bakterielle Last an der Infektionsstelle (Hauptversuch)

Fragmente eines sterilen PVK wurden subkutan in beide Flanken einer Maus implantiert und mit 1×10^7 CFU *S. epidermidis* 1457 (schwarz), 1457 $\Delta spoVG$ (weiß) oder 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ (grau) infiziert. Nach 10 Tagen wurde die bakterielle Last am (A) Katheter und im (B) umliegenden Gewebe ermittelt. Jeder Punkt stellt eine individuelle Infektionsstelle mit Median (Horizontale) dar ($n = 12 - 14$ pro Infektionsgruppe). ns, nicht signifikant; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

Katheterproben der mit *S. epidermidis* 1457 infizierten Infektionsstellen wiesen eine mediane bakterielle Last von $2,05 \times 10^5$ CFU/Katheter auf. Die bakterielle Last der Infektionsstellen, die mit 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ infiziert worden waren, war mit CFU-Raten von $2,70 \times 10^5$ CFU/Katheter auf einem vergleichbaren Niveau. Demgegenüber lag die bakterielle Last der mit 1457 $\Delta spoVG$ infizierten Katheter mit einem Median von $4,16 \times 10^4$ CFU/Katheter zwar um einen Faktor von 4,92 niedriger als die mediane bakterielle Last an den Kathetern der mit dem Wildtyp infizierten Tiere. Doch dieser Unterschied zwischen den bakteriellen Lasten der mit *S. epidermidis* 1457 oder 1457 $\Delta spoVG$ infizierten Tieren erwies sich statistisch als nicht signifikant ($p = 0,89$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's

multiple comparisons Test). Dies mag dem Umstand geschuldet sein, dass die CFU-Werte innerhalb der beiden Infektionsgruppen eine große Streuung aufwiesen. Besonders ausgeprägt war dies in der Gruppe von 1457 $\Delta spoVG$, in der der niedrigste Wert drei Log_{10} -Stufen unterhalb des Medians lag. Ein ähnliches Verteilungsbild wiesen die Werte der Gewebeprobe auf. Hier lag die bakterielle Last im Median pro Infektionsgruppe bei $2,30 \times 10^5$ CFU/g für *S. epidermidis* 1457, $6,50 \times 10^4$ CFU/g für 1457 $\Delta spoVG$ und $1,10 \times 10^5$ CFU/g für 1457 $\Delta spoVG::spoVG$. Auch wenn die mediane bakterielle Last im Gewebe der mit der Mutante 1457 $\Delta spoVG$ infizierten Tiergruppe im Vergleich zu der mit dem Wildtyp infizierten Gruppe erneut um einen Faktor von 3,54 variierte, zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Infektionsgruppen. Die Deletion von *spoVG* hatte somit keinen signifikanten Einfluss auf die bakterielle Last am Infektionsort ausgeübt. 1457 $\Delta spoVG$ war fähig, ähnlich hohe CFU-Raten am Infektionsort zu erzeugen wie der Wildtyp.

4.5.2.2 Lokale Ödembildung am Infektionsort

Über den Versuchszeitraum wurde das am Infektionsort entstehende Ödem jeden zweiten Tag vermessen und fotografisch dokumentiert. In Abbildung 20 ist jeweils ein Tier pro Infektionsgruppe mit repräsentativem Verlauf der Ödementwicklung dargestellt.

Zunächst ließ sich an Tag 2 die Entstehung eines Ödems um das subkutan implantierte Katheterfragment feststellen, bei dem kein makroskopischer Unterschied zwischen den drei Infektionsgruppen auffiel. An Tag 4 erschienen die Ödeme der mit *S. epidermidis* 1457 infizierten Tiere im Vergleich zur 1457 $\Delta spoVG$ -Gruppe bereits mit bloßem Auge größer. Ab Tag 6 begann sich die Größe der Ödeme der mit 1457 $\Delta spoVG$ infizierten Tiere zu verringern. Demgegenüber stiegen die Ödemgrößen in der Wildtyp-Infektionsgruppe über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich an. Die Ödemgrößen der mit 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ infizierten Tiere nahmen bis zum Ende des Versuchs ebenfalls tendenziell zu. An Tag 10 war somit ein deutlicher Unterschied zwischen den Infektionsgruppen makroskopisch erkennbar. Die statistische Evaluierung der Ödemgrößen zwischen den Infektionsgruppen wiesen zudem einen hochsignifikanten Unterschied zwischen der Wildtyp-Gruppe und der 1457 $\Delta spoVG$ -Gruppe auf (vgl. Abbildung 21).

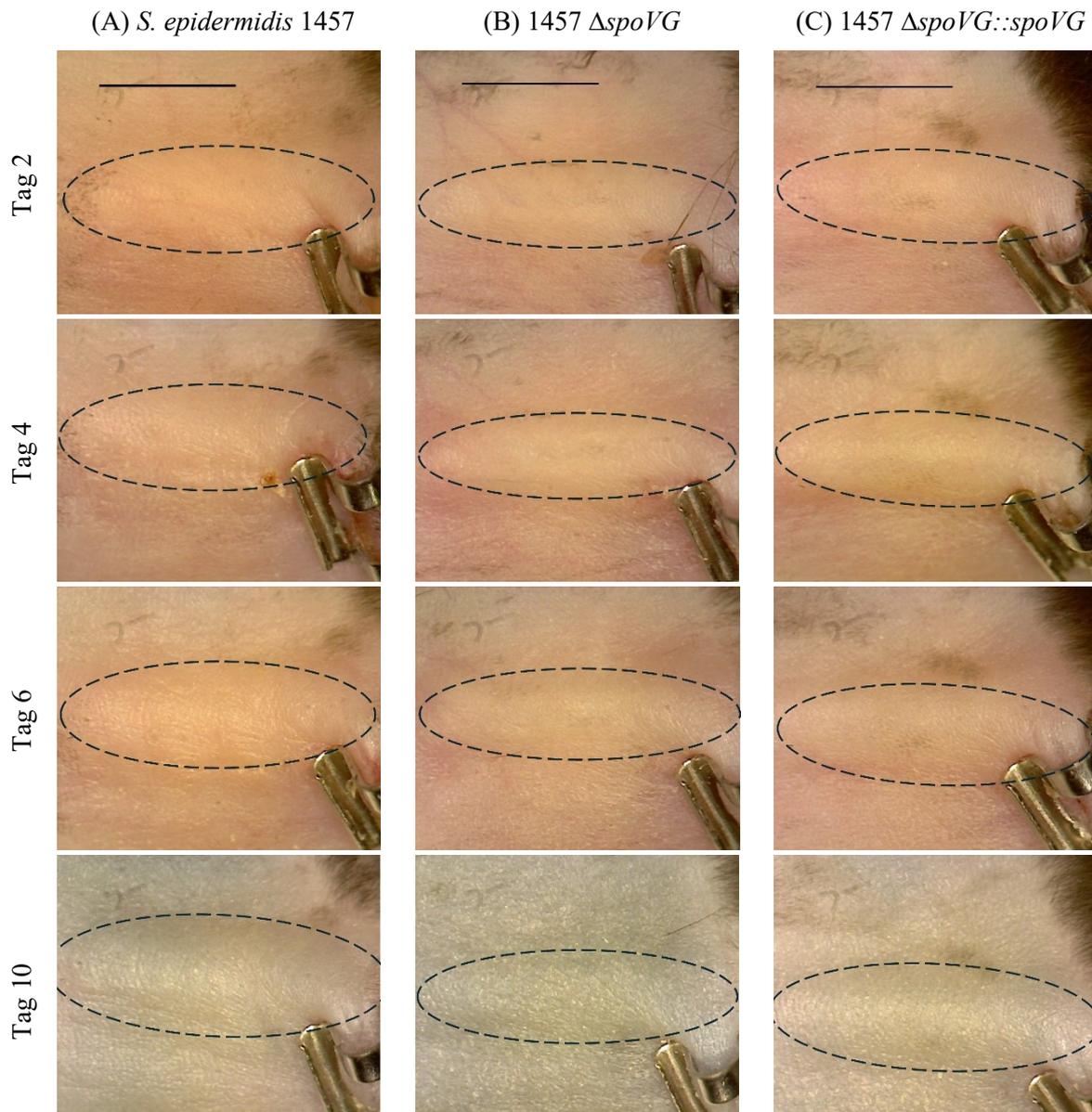


Abbildung 20: Entstehung von Ödemen an der Infektionsstelle

Nach Infektion mit (A) *S. epidermidis* 1457, (B) $1457 \Delta spoVG$ oder (C) $1457 \Delta spoVG::spoVG$ des subkutan implantierten Fragmentes eines PVK wurde die Infektionsstelle jeden zweiten Tag fotografiert (jede Spalte: 6,3-fache Vergrößerung, Maßstab 5 mm). Je Infektionsgruppe ist ausschnittsweise ein repräsentativer Verlauf (Tag 2, 4, 6, 10) dargestellt, die Ödemfläche ist jeweils umrandet

An Tag 10 hatten Tiere der Wildtyp-Gruppe im Median Ödeme mit einer Fläche von $41,27 \text{ mm}^2$ entwickelt, während die Ödemgrößen in der $1457 \Delta spoVG$ -Infektionsgruppe im Median $31,14 \text{ mm}^2$ betragen. Das entsprach einem hochsignifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen. Bei Tieren, die mit $1457 \Delta spoVG::spoVG$ infiziert wurden, konnte an Tag 10 eine mediane Ödemfläche von $37,58 \text{ mm}^2$ ermittelt werden ($p = 0,17$; Wildtyp gegen $1457 \Delta spoVG::spoVG$, Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test). Zusammengefasst konnte ein signifikanter Unterschied in der Ödemfläche zwischen den Infektionsgruppen des Wildtyps und von $1457 \Delta spoVG$ beobachtet werden, obwohl ähnliche bakterielle Lasten am Infektionsort ermittelt wurden (s. 4.5.2.1).

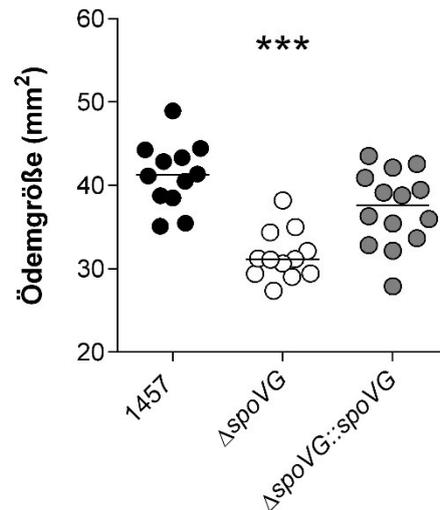


Abbildung 21: Ödemgröße an der Infektionsstelle 10 Tage nach Infektion

Daten sind dargestellt als individuelle Infektionsstelle (Punkt) mit Median (Horizontale) der Infektionsgruppen *S. epidermidis* 1457 (schwarz), 1457 $\Delta spoVG$ (weiß) und 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ (grau) ($n = 12 - 14$ pro Infektionsgruppe). ***, $p < 0,001$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

Dies lässt die Vermutung zu, dass das Immunsystem des Wirtes unterschiedlich auf den jeweiligen Bakterienstamm reagiert und SpoVG daran beteiligt sein könnte, die Immunantwort des Wirtes zu verändern.

4.5.2.3 Konzentration von Zytokinen am Infektionsort

Um die letztere Hypothese zu adressieren, wurde in der Folge an den Infektionsstellen die Konzentration von Zytokinen als Zeichen für eine veränderte Aktivität des Immunsystems am Infektionsort untersucht. Die Konzentrationen der folgenden pro-inflammatorischen Zytokine wurden ermittelt: Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-6 (IL-6) und *keratinocyte-derived chemokine* (KC). Das am Infektionsort entnommene Gewebe wurde hierzu homogenisiert und zentrifugiert. In den Überständen dieser Gewebehomogenate wurden mit Hilfe eines Sandwich-ELISA-Verfahrens die Konzentrationen der zuvor genannten Zytokine gemessen (vgl. Abbildung 22).

In diesen Assays zeigte sich für TNF ein signifikanter Unterschied in den Gewebekonzentrationen zwischen der *S. epidermidis* 1457-Infektionsgruppe und der 1457 $\Delta spoVG$ -Gruppe (vgl. Abbildung 22 A). In der Wildtyp-Gruppe konnte eine mediane TNF-Konzentration von 33,75 ng/g nachgewiesen werden, mit einem Maximalwert von 75,21 ng/g. In der Gruppe der mit 1457 $\Delta spoVG$ infizierten Tiere wurde hingegen eine mediane TNF-Konzentration von 14,97 ng/g gemessen. In den mit 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ infizierten Proben wurde eine mediane Konzentration von TNF mit 19,42 ng/g festgestellt, mit einem Maximalwert von 31,84 ng/g. Damit lag die mediane Konzentration von TNF nur um den Faktor 1,30 höher als in der 1457 $\Delta spoVG$ -Gruppe und erreichte nicht ein mit dem Wildtyp vergleichbares Niveau. Für die Gewebekonzentrationen von IL-6 und KC konnte hingegen in allen drei Infektionsgruppen vergleichbare Zytokinlevel ermittelt werden, die in der Wildtyp-Gruppe zwar

tendenziell erhöht waren, sich aber statistisch nicht von den beiden anderen Gruppen unterschieden ($p \geq 0,14$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test).

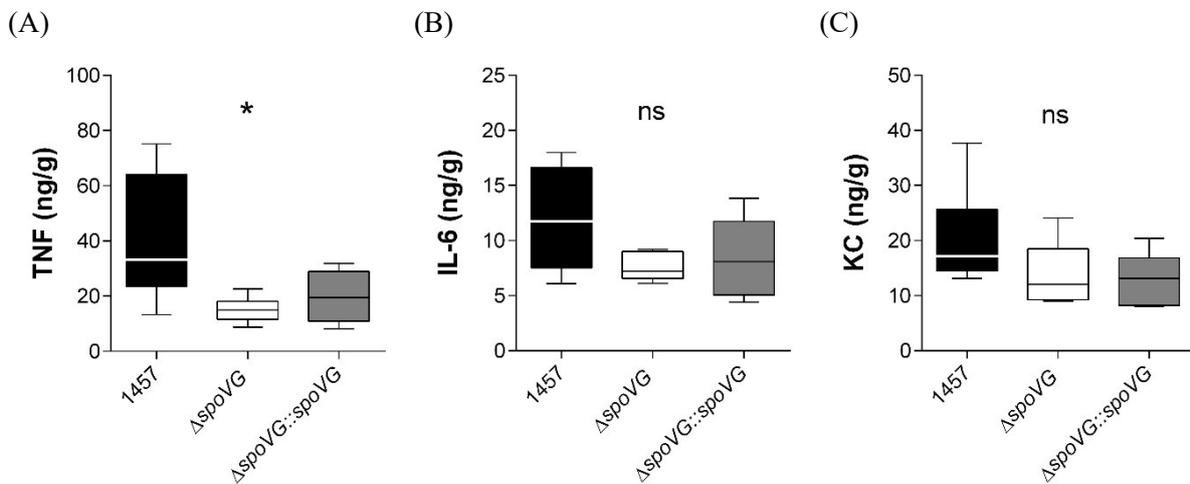


Abbildung 22: Konzentration von TNF, IL-6 und KC im Gewebe der Infektionsstelle

Das Gewebe um die mit *S. epidermidis* 1457 (schwarz), 1457 $\Delta spoVG$ (weiß) oder 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ (grau) infizierte Katheterfragmente wurde 10 Tage nach Infektion entnommen, homogenisiert und zentrifugiert. In den Überständen wurde die Konzentration von (A) Tumornekrosefaktor (TNF), (B) Interleukin-6 (IL-6) und (C) *keratinocyte-derived chemokine* (KC) mittels ELISA gemessen. Daten sind als Box-Plot mit Median (Horizontale), 25 % – 75 % Perzentile (Box), Minimum bis Maximum (Whiskers) dargestellt ($n = 6 - 7$ Tiere pro Infektionsgruppe). ns, nicht signifikant; *, $p < 0,05$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

Zusammenfassend wurden bei den mit *S. epidermidis* 1457 infizierten Tieren die höchsten Konzentrationen der untersuchten Zytokine festgestellt. Dies war insofern zu erwarten, da die Wildtyp-Gruppe auch die größten Ödeme entwickelt hatte und daher von einer hohen Aktivität des Immunsystems an der Infektionsstelle ausgegangen werden konnte. Im Einklang mit den in den drei Infektionsgruppen beobachteten Ödemgrößen waren in den infizierten Geweben der mit der Mutante 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ inokulierten Tiere im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe ebenfalls niedrigere Zytokinwerte zu beobachten, die sich aber auch im Falle von TNF nicht signifikant voneinander unterschieden ($p = 0,103$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test).

4.5.2.4 Systemische Nachweisbarkeit der Infektion

Das Fremdkörper-assoziierte Infektionsmodell sollte bei den Versuchstieren eine lokale Infektion an subkutan implantierten Katheterfragmenten in den Flanken auslösen. Um festzustellen, ob sich die Infektion im Organismus weiter ausgebreitet hatte und systemisch nachweisbar war, wurde das Blut der Tiere auf das Vorhandensein von Bakterien untersucht („Sepsis-Test“). Es wurde bei keinem der Tiere eine Bakteriämie bzw. Bakteriämie mit Sepsis festgestellt (0/24). Zusätzlich wurde für jedes Tier die Leukozytenzahl im Blut bestimmt (vgl. Abbildung 23). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Infektionsgruppen, in allen drei Gruppen lagen die Leukozytenzahlen im Bereich von

3×10^6 Zellen/ml Blut. Die Infektion des im Subkutangewebe liegenden Katheterfragmentes wies somit keine systemische Nachweisbarkeit auf. Die Deletion von *spoVG* hatte weder eine Auswirkung auf die Leukozytenzahl im Blut, noch konnte eine Bakteriämie festgestellt werden.

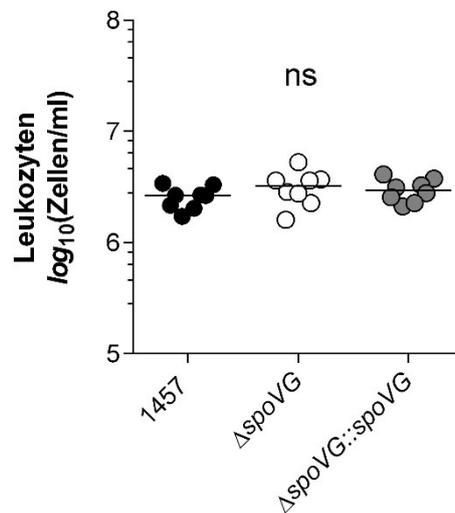


Abbildung 23: Leukozytenzahl im Blut der Versuchstiere

10 Tage nach Infektion mit *S. epidermidis* 1457 (schwarz), 1457 $\Delta spoVG$ (weiß) oder 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ (grau) erfolgte die finale Blutentnahme aus dem Herzen zur Bestimmung der Leukozytenzahl pro ml Blut. Jedes Tier ist individuell als Punkt mit Median (Horizontale) dargestellt ($n = 8$ pro Infektionsgruppe). ns, nicht signifikant; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

4.5.2.5 Belastung der Versuchstiere über den Infektionszeitraum

Nach Infektion des subkutan implantierten Katheterfragmentes mit 1×10^7 CFU/Katheterfragment wurden die Versuchstiere über einen Zeitraum von 10 Tagen beobachtet und der individuelle Belastungsgrad (s. Tabelle 16) täglich ermittelt (vgl. Abbildung 24).

An den ersten beiden Tagen nach Infektion wiesen alle Tiere, unabhängig der Infektionsgruppe, eine geringe Belastung auf (Belastungsgrad 1). Ab dem dritten Tag zeigten sich die ersten Tiere der 1457 $\Delta spoVG$ -Gruppe (2/8) bzw. der 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ -Gruppe (5/8) im Hinblick auf die Bewertungskriterien als nicht mehr beeinträchtigt (Belastungsgrad 0). An Tag 4 stieg diese Zahl in allen Infektionsgruppen bereits auf 5 von 8 Tieren. Die große Mehrheit der Tiere (20/24) erholte sich bis Tag 5 vollständig (Belastungsgrad 0) und wiesen danach im Sinne der Bewertungskriterien keine Auffälligkeiten mehr auf. Ab Tag 9 bis zum Ende des Versuchszeitraums wiesen alle Tiere einen Belastungsgrad von 0 auf. Somit erfuhren die Tiere durch den Eingriff und die Infektion allenfalls eine geringe Belastung und es zeigte sich insgesamt kein signifikanter Unterschied zwischen den Infektionsgruppen.

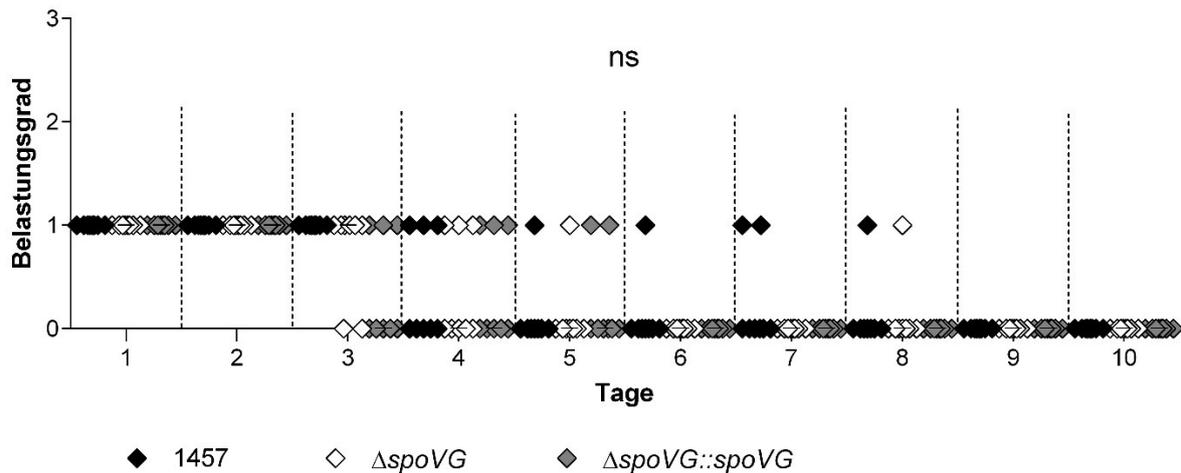


Abbildung 24: Belastungsgrad der Versuchstiere (Hauptversuch)

Die Belastung der Tiere nach Infektion mit *S. epidermidis* 1457 (schwarz), 1457 $\Delta spoVG$ (weiß) oder 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ (grau) wurde über den Infektionszeitraum von 10 Tagen täglich erfasst. Jede Raute stellt ein individuelles Tier mit Median (Horizontale) dar ($n = 8$ pro Infektionsgruppe). ns, nicht signifikant; 2way ANOVA mit Bonferroni's comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

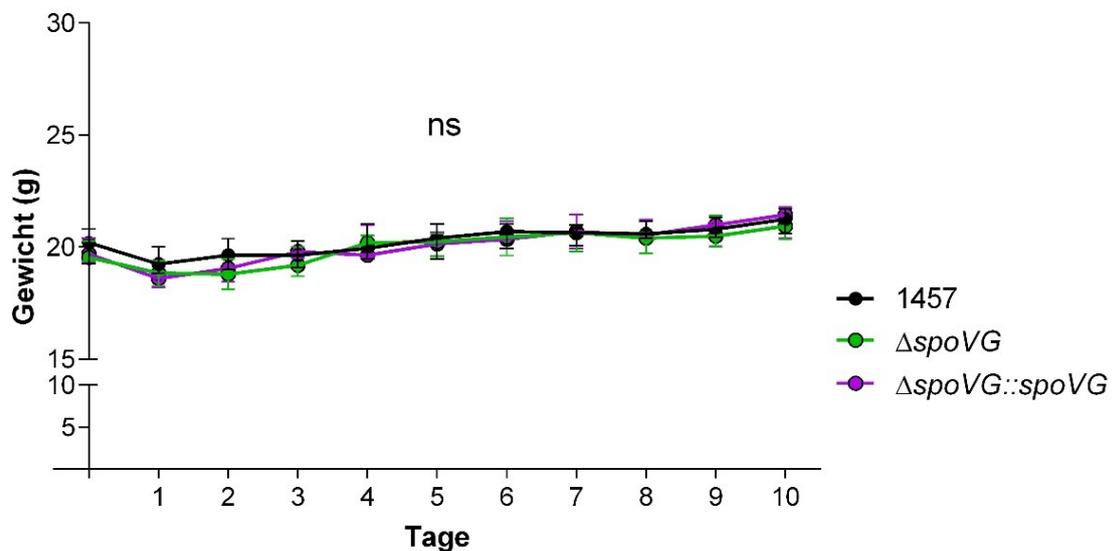


Abbildung 25: Gewichtsverlauf der Versuchstiere (Hauptversuch)

Nach Infektion mit (A) *S. epidermidis* 1457 (schwarz), (B) 1457 $\Delta spoVG$ (grün) oder (C) 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ (lila) wurden die Versuchstiere täglich gewogen. Jeder Kreis stellt den Median einer Infektionsgruppe mit Interquartilsabstand dar ($n = 8$ Tiere pro Infektionsgruppe). ns, nicht signifikant; 2way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparisons Test im Vergleich zum Wildtyp

Die Analyse der Gewichtsveränderungen der infizierten Tiere über den Versuchszeitraum erbrachte ebenfalls keine klaren Unterschiede zwischen den drei Infektionsgruppen (vgl. Abbildung 25). Unmittelbar vor Beginn des Versuches lag das mediane Gewicht in der Wildtyp-Gruppe bei 20,2 g, in der Gruppe von 1457 $\Delta spoVG$ bei 19,6 g und in der Gruppe von 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ bei 19,7 g. Am

ersten Tag nach Infektion wurde, wie schon in der Pilotphase (s. 4.5.1) für den Wildtyp beobachtet, in allen Infektionsgruppen eine Gewichtsabnahme ermittelt. Ab Tag 2 entwickelte sich das mediane Gewicht in allen Infektionsgruppen tendenziell steigend im Vergleich zum Gewicht des jeweiligen Vortags. Diese steigende Tendenz blieb bis auf leichte Schwankungen erhalten, sodass alle Tiere am Ende des Versuchszeitraum an Tag 10 über ihrem individuellen Ausgangsgewicht lagen.

5 Diskussion

5.1 *Cis*-Komplementation von *S. epidermidis* 1457 $\Delta spoVG$

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors SpoVG auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457 *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dazu sollte neben dem Wildtyp auch eine Mutante mit inaktiviertem Gen *spoVG* und deren *in cis* komplementierter Stamm in den Versuchen eingesetzt werden. Eine Deletionsmutante, in der *spoVG* durch eine Erythromycin-Kassette homolog ausgetauscht worden war, stand bereits zur Verfügung. Diese Mutante 1457 $\Delta spoVG$ wurde im Rahmen der Dissertationsarbeit von Beate Fresenborg generiert [54]. Die Konstruktion ist dort ausführlich beschrieben und durch Sequenzierung des betroffenen Bereiches bestätigt. Zusätzlich wurde dort die Expression der manipulierten DNA-Region mit Hilfe von in Kaninchen generierten Antiseren untersucht: SpoVG war in 1457 $\Delta spoVG$ wie zu erwarten nicht nachweisbar, während die Expression von YabJ, dessen Gen gemeinsam mit *spoVG* in einem Operon codiert wird [2], in Western Blot Analysen unbeeinflusst blieb. Aus Vorarbeiten der AG Knobloch (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) war zudem bekannt, dass bei Mutanten mit Verlust von SpoVG eine Komplementation *in trans* nicht zuverlässig zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps führte [2,54]. Daher wurde für die Komplementierung der Deletionsmutante in dieser Arbeit ein anderes Vorgehen gewählt: Durch homologe Rekombination wurde eine Komplementation *in cis* durchgeführt. Dazu wurde das gesamte *yabJ-spoVG*-Operon in den Vektor pBASE6 kloniert, der ein durch Anhydrotetracyclin induzierbares System zur Gegenselektion enthält [106]. Klone, in denen die Komplementierung mutmaßlich erfolgreich war, standen durch die Vorarbeit von Mohamed I. Elhawy aus unserer Arbeitsgruppe zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung [4].

Im ersten Schritt der vorliegenden Arbeit sollte derjenige Klon identifiziert werden, der durch die Komplementierung ein zum Wildtyp vergleichbares Transkriptionslevel von *spoVG* aufwies. Das *yabJ-spoVG*-Operon wird in *S. epidermidis* sowohl in der exponentiellen als auch der stationären Wachstumsphase transkribiert, wobei das bicistronische Transkript in der exponentiellen Wachstumsphase in größerer Menge vorliegt [2]. Daher wurden Zellen des ausgewählten Klons aus der exponentiellen Phase geerntet und mittels qRT-PCR untersucht (vgl. Abbildung 5). Die Transkription von *spoVG* war in 1457 $\Delta spoVG$ nicht nachweisbar und bestätigte damit die erfolgreiche Deletion des Gens in dieser Mutante. Gleichzeitig wies die Transkription von *spoVG* nach Komplementation ein mit dem Wildtyp vergleichbares Niveau auf. In weiteren Versuchen aus der AG Bischoff konnte zudem gezeigt werden, dass die relative Transkription von *yabJ* durch die Komplementation nicht beeinflusst wurde [4]. Der somit erfolgreich komplementierte Klon wurde unter dem Namen *S. epidermidis* 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ in den weiteren Experimenten dieser Arbeit eingesetzt.

Als nächstes wurden die drei Stämme bezüglich ihres Wachstumsverhaltens untersucht. Dadurch sollte ein eventuell während der Mutagenese verursachtes Wachstumsdefizit, welches die Ergebnisse nachfolgender Versuche verzerren könnte, ausgeschlossen werden. Dazu wurden 10 ml TSB-Kulturen

des Wildtyps *S. epidermidis* 1457, der Deletionsmutante 1457 $\Delta spoVG$ und des *cis*-komplementierten Stammes 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ unter aeroben Bedingungen bei 37 °C inkubiert und das bakterielle Wachstum durch manuelle Messung der OD_{600+err.} ermittelt (vgl. Abbildung 6). Bis zum Zeitpunkt 3 h ließ sich bei allen drei Stämmen ein exponentielles Wachstum feststellen. Dabei entwickelten sich die optischen Dichten der verschiedenen Kulturen vergleichbar, was sich in ähnlichen Generationszeiten widerspiegelte (vgl. Tabelle 19). Ab der vierten Stunde wies die Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp und zu 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ signifikant erhöhte OD_{600+err.}-Werte auf, die über den gesamten Versuchszeitraum erhalten blieben (vgl. Abbildung 7). Demgegenüber kam es nach einer Inkubationszeit von 4 h bis 5 h bei den Kulturen des Wildtyps und von 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ zu einer Ablagerung von bakteriellem Material an der Luft-Medium-Grenze in Form einer Ringbildung im Glaskolben. Diese trat zeitgleich mit der relativen Abnahme der OD_{600+err.}-Werte der beiden Kulturen auf. Dass *S. epidermidis* dazu in der Lage ist, auf Glasoberflächen Biofilme auszubilden, wurde bereits mehrfach beschrieben [18,47]. Daher wurde diese Ringbildung am Glaskolben im Sinne einer Biofilmbildung interpretiert. Offenbar waren sowohl der Wildtyp als auch 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ unter den dynamischen Bedingungen dazu in der Lage, von einer planktonischen Lebensform zum Teil in einen Biofilm-Phänotyp zu wechseln.

Diese Beobachtungen stehen in gewissem Widerspruch zu Vorarbeiten der AG Knobloch, die unter anderen Wachstumsbedingungen keinen Wachstumsunterschied zwischen der Deletionsmutante und dem Wildtyp beobachteten [54]. So untersuchte Beate Fresenborg im Anschluss an die Konstruktion von 1457 $\Delta spoVG$ deren Wachstumsverhalten in TSB unter statischen Bedingungen. Das Wachstum wurde automatisiert gemessen, wobei ein wesentlich geringeres Kulturvolumen von 2 ml ohne kontinuierliches Schütteln bei 37 °C inkubiert wurde. Hierbei zeigte sich eine ähnliche Wachstumskinetik zwischen 1457 $\Delta spoVG$ und dem Wildtyp *S. epidermidis* 1457 [54]. Um diese Diskrepanz näher zu beleuchten, wurden in der AG Bischoff nach der Generierung des *cis*-komplementierten Stammes 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ die Wachstumseigenschaften aller drei Stämme auch unter statischen Bedingungen untersucht. Dazu wurden Kulturen in einer 96 *well* Platte bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem oCelloScope-System inkubiert. Im Einklang mit den Beobachtungen von Beate Fresenborg [54] konnte unter diesen mikroaeroben Wachstumsbedingungen über den gesamten Beobachtungszeitraum von 10 h kein signifikanter Unterschied im Wachstum zwischen Wildtyp, 1457 $\Delta spoVG$ und 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ beobachtet werden [4]. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass das Fehlen von SpoVG in *S. epidermidis* unter *in vitro* Bedingungen unter aeroben Bedingungen zu einer relevanten Veränderung des Wachstumsverhaltens führt, nicht aber unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen. Es wurde bereits postuliert, dass in einem Biofilm selbst mikroaerobe bis anaerobe Bedingungen herrschen und sich von der Oberfläche des Biofilms bis zu seiner untersten Schicht, die meist Kontakt zum Substrat hat, Gradienten bezüglich des Nährstoffangebotes, des pH-Wertes und des Sauerstoffgehaltes ausbilden [36]. Es kann vermutet werden, dass diese im Biofilm herrschende Situation des Sauerstoff-Mangels durch den Versuch im oCelloScope-System besser imitiert wurde als

durch eine Schüttelkultur unter aeroben Bedingungen. Für die vorliegende Arbeit waren nachfolgende Versuche zur Biofilmbildung sowohl unter statischen Bedingungen als auch unter relativem Luftabschluss geplant. Unter ähnlichen Bedingungen wurde wie bereits beschrieben kein Unterschied im Wachstum beobachtet [4,54], sodass die Stämme zur weiteren Untersuchung in den Versuchen dieser Arbeit eingesetzt werden konnten, ohne dass dabei eine wachstumsbedingte Verzerrung der Ergebnisse erwartet werden musste.

Es kann weiterhin vermutet werden, dass die hier gewählten Wachstumsbedingungen (aerob, großes Kulturvolumen) das veränderte Wachstumsverhalten zwischen den Stämmen begünstigte. Die in meinen Wachstumsversuchen beobachtete unterschiedliche $OD_{600+err.}$ -Entwicklung zwischen *S. epidermidis* 1457 und $1457 \Delta spoVG::spoVG$ gegenüber $1457 \Delta spoVG$ ist sehr wahrscheinlich auf die beobachtete Biofilmbildung beim Wildtyp und $1457 \Delta spoVG::spoVG$ zurückzuführen: Die teilweise Ansiedlung der wachsenden Bakterienpopulation in dem bereits beschriebenen Biofilm-Ring an der Luft-Medium-Grenze in den Kulturen von *S. epidermidis* 1457 und $1457 \Delta spoVG::spoVG$ ist mit allerhöchster Wahrscheinlichkeit für den im Vergleich zur Mutante $1457 \Delta spoVG$ geringeren Anstieg der optischen Dichte im wässrigen Nährmedium verantwortlich, da ein substanzieller Anteil der neu gebildeten Bakterienzellen so für die optische Dichtemessung der Kultur nicht verfügbar war. Warum diese beiden Stämme in einen sessilen Phänotyp wechseln, kann zu diesem Zeitpunkt nur vermutet werden. Möglicherweise begünstigten die unter den dynamischen Bedingungen auftretenden Scherspannungen eine Biofilmbildung, denn für diese wurde bereits eine Biofilm-induzierende Wirkung *in vitro* beschrieben [139].

Prinzipiell deuten die hier beschriebenen Beobachtungen unter aeroben Wachstumsbedingungen bereits an, dass SpoVG eine Rolle bei der Biofilmbildung in *S. epidermidis* 1457 spielen könnte.

5.2 Regulation der Biofilmbildung durch SpoVG *in vitro*

Zur weiteren Untersuchung der Hypothese, ob SpoVG in *S. epidermidis* 1457 einen positiven Einfluss auf die Fähigkeit zur *in vitro* Biofilmbildung hat, wurden in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Versuchsmodelle zur Biofilmbildung durchgeführt. Staphylokokken sind in der Lage, eine Vielzahl von Oberflächen aus unterschiedlichstem Material zu besiedeln [36], wobei die interzelluläre Adhäsion in Biofilmen von *S. epidermidis* 1457 *in vitro* vorrangig durch das Exopolysaccharid PIA vermittelt wird [38,73,74]. Für die Deletionsmutanten *S. epidermidis* $1457 \Delta spoVG$ und $1457 \Delta yabJ$ konnte bereits gezeigt werden, dass deren Deletion zu einem Verlust bzw. einer Reduktion der Biofilmbildung auf Polystyrol führt und mit einer reduzierten PIA-Produktion einhergeht [54]. Entsprechend wurden sowohl SpoVG als auch YabJ, welche zusammen in einem Operon codiert sind [2], als positive Regulatoren der Biofilmbildung beschrieben, wobei SpoVG dafür maßgeblich erschien [54]. Weitere Versuche zur Biofilmbildung auf anderen Oberflächen zum Einfluss von SpoVG waren daher von Interesse. Dazu wurden der Wildtyp *S. epidermidis* 1457 und dessen isogene Deletionsmutante $1457 \Delta spoVG$ in den Versuchen untersucht. Zusätzlich konnte der neu generierte, *in cis*

komplementierte Stamm 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ eingesetzt werden. Dabei zeigte sich ein eindeutig positiver Einfluss von SpoVG auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung *in vitro*. Bei der Untersuchung der Biofilmbildung in Glasröhrchen unter dynamischen Bedingungen konnte ein sehr signifikanter Unterschied zwischen *S. epidermidis* 1457 und 1457 $\Delta spoVG$ festgestellt werden (vgl. Abbildung 8). Hierbei kam es bei den Kulturen des Wildtyps, ähnlich wie bei den Wachstumsanalysen unter aeroben Bedingungen (s. 4.2), zu einer starken Biofilmbildung an der Luft-Medium-Grenze und am Boden der Glasröhrchen. Im Gegensatz dazu blieben die mit 1457 $\Delta spoVG$ inokulierten Kulturröhrchen frei von makroskopisch sichtbarem Biofilm. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung auf Polystyrol wurde ähnlich zum bereits erwähnten Experiment [54] auch im eigenen Versuchsaufbau untersucht, wobei bakterielle Kulturen in 96 well Flachboden-Platten mit Nunclon™ Delta Oberfläche ohne Schütteln inkubiert wurden. Der Vorteil eines Mikrotiter-basierten Assays besteht darin, dass er einfach zu realisieren ist und wegen des möglichen hohen Durchsatzes auch als Screening-Methode eingesetzt werden kann [71]. Gleichzeitig bringt die Methode den Nachteil mit sich, dass je nach Durchführung des erforderlichen Waschvorgangs zur Entfernung planktonischer Zellen unvorhersehbar stark ausgeprägte Artefakte entstehen können [21]. Beispielsweise können locker-adhärenente Anteile eines Biofilms abgespült werden, sodass die Fähigkeit zur Biofilmbildung unter- oder durch zu vorsichtiges Waschen überschätzt wird. Da diese Methode also stark von der Anwendung abhängt, erschien die zusätzliche Durchführung des Experiments mit einem Referenzstamm zur besseren Interpretation der ermittelten semiquantitativen Messwerte angezeigt. Dafür eignete sich der PIA-negative Stamm *S. epidermidis* 1457-M10, der nach Testung seiner Fähigkeit zur *in vitro* Biofilmbildung bereits mehrfach als Biofilm-negativ beschrieben wurde [28,54,61,75]. Die Deletionsmutante 1457 $\Delta spoVG$ zeigte sich hier im Mikrotiter-basierten Assay mit einem 11,95-fachen Unterschied der Absorptionswerte im Vergleich zum Wildtyp in der Fähigkeit zur Biofilmbildung sehr signifikant eingeschränkt (vgl. Abbildung 9). Zusätzlich fiel auf, dass 1457 $\Delta spoVG$ seine Fähigkeit zur Biofilmbildung im selben Ausmaß verlor wie die PIA-negative Mutante 1457-M10 (vgl. Abbildung 10). Daraus kann abgeleitet werden, dass die Deletion von *spoVG* zu einem Biofilm-negativen Phänotyp unter den hier gewählten Bedingungen führt. Da in den bisher diskutierten Biofilmversuchen mit dem *cis*-komplementierten Stamm 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ zudem eine Biofilmbildung beobachtet werden konnte, die mit der Biofilmbildung des Wildtyps jeweils vergleichbar war, kann des Weiteren darauf geschlossen werden, dass SpoVG für die beobachteten phänotypischen Veränderungen verantwortlich ist. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit vorherigen Studien, die ebenfalls einen Biofilm-negativen Phänotyp durch den Verlust von SpoVG beschreiben [54,76]. Selbst der Zusatz von NaCl oder Ethanol zum Nährmedium, die bekannte Induktoren der Biofilmbildung sind [59], konnte in *S. epidermidis* 1457 $\Delta spoVG$ keine Biofilmbildung hervorrufen, während das in dem *in trans* komplementierten Stamm wieder möglich war [54]. Somit scheint SpoVG auch für die Induktion der Biofilmbildung durch NaCl und durch Ethanol von wesentlicher Bedeutung zu sein [54].

Um der Situation im Klinikalltag näher zu kommen, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Biofilmbildung auf Peripheren Venenkathetern aus Polyurethan untersucht. Über die *in vitro* Fähigkeit zur Anhaftung und Biofilmbildung von *S. epidermidis* auf Kathetern aus Polyurethan wurde bereits positiv berichtet [66,104]. Der hier durchgeführte Versuchsaufbau wurde dabei auch in Vorbereitung auf etwaige *in vivo* Experimente gewählt. Im Detail wurden ca. 1 cm-lange Katheterschlauchfragmente mit dem entsprechenden Bakterienstamm inokuliert und unter dynamischen Bedingungen, relativem Luftabschluss und unbegrenztem Nährstoffangebot nach der Methode von Pätzold *et al.* [101] kultiviert. Nach 5 Tagen hatte sich auf den mit *S. epidermidis* 1457 und 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ inokulierten Kathetern eine deutlich sichtbare Schleimschicht gebildet, was als Bildung eines Biofilms interpretiert wurde. Demgegenüber blieben die Katheter der 1457 $\Delta spoVG$ -Gruppe weitestgehend frei von sichtbarem Biofilm (vgl. Abbildung 11). Dieser makroskopische Eindruck konnte durch die Messung der $OD_{600+err.}$ der abgelösten Biofilme in wässriger Lösung (vgl. Abbildung 12 A) und die Bestimmung der CFU (vgl. Abbildung 13 A) objektiviert werden. Es wurde eine statistisch hochsignifikant reduzierte Biofilmbildung von 1457 $\Delta spoVG$ im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen, die in 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ komplementiert werden konnte. Bemerkenswerterweise verlor die Deletionsmutante die Fähigkeit zur Kolonisation der Katheterfragmente nicht vollständig: Trotz des makroskopisch so gut wie Biofilm-freien Erscheinungsbildes des Katheterfragmentes erreichte 1457 $\Delta spoVG$ mediane CFU-Raten von $6,80 \times 10^6$ CFU/Katheter, was in etwa 1/10 der CFU-Raten entsprach, die mit dem Wildtyp in diesem Assayformat beobachtet wurden. Die Deletion von *spoVG* führt demnach nur zu einer signifikanten Reduktion der *in vitro* Biofilmbildung auf Polyurethan-basierten Kathetern und nicht zu deren komplettem Verlust. In den Proben der Überstände von Tag 5 zeigte sich, dass 1457 $\Delta spoVG$ im Vergleich zum Wildtyp signifikant höhere $OD_{600+err.}$ -Werte entwickeln konnte (vgl. Abbildung 12 B). Auch die ermittelte mediane CFU-Rate der Deletionsmutante war im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 2,0 erhöht (vgl. Abbildung 13 B). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Erkenntnissen aus den Versuchen zum Wachstumsverhalten unter dynamischen Bedingungen in TSB (s. 4.2). Dort zeigte sich, dass 1457 $\Delta spoVG$ nach der exponentiellen Wachstumsphase im wässrigen Nährmedium signifikant höhere $OD_{600+err.}$ -Werte entwickeln konnte. Wie in 5.1 diskutiert, könnte das mit der herabgesetzten Fähigkeit der *spoVG*-Deletionsmutante zur Biofilmbildung in Zusammenhang stehen.

Zusammengefasst zeigten die hier durchgeführten Experimente, dass die Deletion von *spoVG* zu einer signifikant geringeren Biofilmbildung *in vitro* führte und dass die *cis*-Komplementation in Bezug auf die Fähigkeit zur *in vitro* Biofilmbildung erfolgreich war. Insbesondere zeigte sich durch die Deletion von *spoVG* eine reduzierte *in vitro* Biofilmbildung auf Polyurethan-basierten Katheterfragmenten. Daher stellte sich nun die Frage, ob SpoVG die Biofilmbildung auf Katheterfragmenten auch *in vivo* beeinflusst. Insgesamt lassen die Beobachtungen die Schlussfolgerung zu, dass der Transkriptionsfaktor SpoVG in *S. epidermidis* 1457 unter einer Vielzahl von Bedingungen als positiver Regulator der *in vitro* Biofilmbildung wirkt.

Im Folgenden sollte weiter charakterisiert werden, über welchen Mechanismus SpoVG die Biofilmbildung in *S. epidermidis* positiv reguliert. Durch Arbeiten von Beate Fresenborg [54] war bereits bekannt, dass die Deletion von *spoVG* zu einer drastischen Reduktion der PIA-Produktion führt: Im extrazellulären Überstand von statischen Kulturen der Mutante 1457 $\Delta spoVG$ war das PIA-Signal im Dot Blot vergleichbar mit dem der PIA-negativen Mutante 1547-M10, in dem nur eine unspezifische Hintergrund-Reaktion detektiert werden konnte [54]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Transkriptionsfaktors SpoVG auf die Transkription der für die PIA-Synthese erforderlichen Enzyme untersucht, welche im *icaADBC*-Operon codiert sind [46,94]. Dazu wurde die Transkription von *icaD* in verschiedenen Wachstumsphasen mittels qRT-PCR ermittelt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob durch die Deletion von *spoVG* die Transkription des Gens des *icaADBC*-spezifischen Repressors IcaR [22] verändert ist.

Die relative Transkription von *icaD* zeigte sich in der exponentiellen Wachstumsphase signifikant verändert (vgl. Abbildung 14). Hier führte die Deletion von *spoVG* zu einer mehr als 20-fachen Reduktion der *icaD*-Transkription im Vergleich zum Wildtyp, während sie in 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ auf Wildtyp-Niveau gebracht werden konnte. Zu den später untersuchten Zeitpunkten fiel die relative Transkription aller Stämme im Vergleich zur exponentiellen Phase drastisch ab, ohne dass ein signifikanter Unterschied in der Transkription von *icaD* festgestellt werden konnte. Über einen Abfall der *ica*-Transkription nach der exponentiellen Wachstumsphase in Glucose-haltigem Nährmedium, wie es hier in den Versuchen ebenfalls eingesetzt wurde, wurde bereits mehrfach berichtet [29,117]. Dobinsky *et al.* [29] kamen durch Versuche mit dem Wildtyp *S. epidermidis* 1457 in Nährmedium mit und ohne Zusatz von Glucose zu der Schlussfolgerung, dass eine kontinuierliche Transkription von *ica* für eine zunehmende Synthese von PIA nicht erforderlich sei. Dies spricht dafür, dass es sich bei IcaA, IcaD, IcaC und IcaB um sehr stabile Proteine mit langer Halbwertszeit handelt [36] und dass die Transkription von *icaADBC* für die Ausbildung eines Biofilms in Glucose-haltigem Nährmedium zu einem frühen Zeitpunkt während der exponentiellen Wachstumsphase ausschlaggebend ist. Außerdem unterliegt die Transkription von *icaADBC* zusätzlich weiterer Kontrolle durch direkte Regulatoren wie SarA oder TcaR, was die Dynamik der Transkriptionsanalysen von *icaD* erklären könnte [24,36]. Bei den Transkriptionsanalysen zu *icaR* zeigte sich, dass die Deletion von *spoVG* die *icaR*-Transkription zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant veränderte (vgl. Abbildung 15). In 1457 $\Delta spoVG$ kam es zu einer gesteigerten relativen Transkription von *icaR*, die zu den untersuchten Zeitpunkten etwa doppelt so hoch war wie die *icaR*-Transkription im Wildtyp.

In früheren Studien konnte beobachtet werden, dass der Verlust von SpoVG auch mit einer stark reduzierten Transkription von *icaA* in sessilen Zellen einherging [50,54]. Gleichzeitig ließ sich in statischen Kulturen von 1457 $\Delta spoVG$ ebenfalls eine gesteigerte Transkription von *icaR* im Vergleich zum Wildtyp beobachten, allerdings ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen [54].

Unter Berücksichtigung dessen lassen die hier ermittelten Ergebnisse der Transkriptionsanalysen zu *icaD* und *icaR* die Annahme zu, dass SpoVG die Transkription von *icaADBC* über die Repression von

icaR indirekt fördert und somit die PIA-Synthese und Biofilmbildung ermöglicht. In 1457 $\Delta spoVG$ wäre die Transkription von *icaR* somit de-reprimiert und IcaR könnte über seine Funktion als *icaADBC*-spezifischer Repressor zu einem Biofilm-negativen Phänotyp führen. Vor diesem Hintergrund könnte SpoVG den gesuchten Mediator einer σ^B -abhängigen Regulation der Biofilmbildung darstellen. Der alternative Sigma-Faktor σ^B fungiert in *S. epidermidis* als positiver Regulator der Biofilmbildung [50,59,62,76]. Die σ^B -abhängige Regulation der Biofilmbildung erfolgt mutmaßlich indirekt über die Repression von *icaR* durch ein unbekanntes Intermediat, sodass die *icaADBC*-Transkription gefördert wird [43,50,51,62]. In *S. epidermidis* 1457 befindet sich strangaufwärts des *yabJ-spoVG*-Operons eine σ^B -Konsensussequenz [2,4] und die Funktionalität dieses σ^B -abhängigen Promotors konnte mittels Primer Extension und RACE nachgewiesen werden [54]. SpoVG zeigte hier sowohl einen negativen Einfluss auf die *icaR*-Transkription als auch einen positiven Einfluss auf die *icaD*-Transkription, weshalb SpoVG als mögliches Intermediat der σ^B -abhängigen Regulation der Biofilmbildung infrage kommt. Eine alternative Interpretation der hier erzielten Ergebnisse ist, dass SpoVG sowohl eine reprimierende Wirkung auf die Transkription von *icaR* als auch eine positive Wirkung auf die Transkription von *icaADBC* ausübt. Um der Frage nachzugehen, ob SpoVG direkt mit den Promotoren von *icaADBC* bzw. *icaR* interagieren kann, wurden im Rahmen dieses Projektes Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Virginie Molle (Montpellier, Frankreich) angefertigt. In den Versuchen wurde rekombinantes SpoVG und Doppelstrang-DNA der *icaA-icaR* intergenischen Region eingesetzt, die entweder einen Bereich von 80 Basenpaaren vor dem Startcodon von *icaA* (*icaA*-Probe) oder *icaR* (*icaR*-Probe) umfasste und entsprechend deren Transkriptionsstartpunkte enthielt [43,46]. Hierbei zeigte sich, dass SpoVG sowohl mit der *icaA*-Probe als auch mit der *icaR*-Probe interagieren kann, da die Zugabe von SpoVG auf eine Dosis-abhängige Weise in beiden Fällen zu einem Shift führte [4]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass SpoVG direkt mit den Promotoren von *icaADBC* und *icaR* interagieren kann. Berücksichtigt man die dynamische Wirkung von SpoVG auf die Transkription von *icaD*, die nur in der exponentiellen Wachstumsphase beobachtet werden konnte, und die kontinuierliche Wirkung auf die Transkription von *icaR*, erscheint es als wahrscheinlich, dass mindestens ein weiterer Faktor in diesem Regulationsweg eine Rolle einnimmt.

SpoVG besitzt als globaler Transkriptionsfaktor [55] Auswirkungen auf die Transkription von *icaADBC* und *icaR* in *S. epidermidis*. Dabei zeigte SpoVG eine positive Wirkung auf die Transkription von *icaD* während der exponentiellen Wachstumsphase, die für die Ausbildung eines Biofilms in Glucose-haltigem Nährmedium maßgeblich zu sein scheint [29]. Die Transkription von *icaR* wurde durch SpoVG zu allen untersuchten Zeitpunkten negativ beeinflusst. Diese Ergebnisse können für 1457 $\Delta spoVG$ die Einschränkungen der PIA-Produktion [54] und den daraus resultierenden weitestgehend Biofilm-negativen Phänotyp erklären und belegen, dass die Regulation bereits auf transkriptioneller Ebene beginnt. Die im Rahmen dieses Projektes gewonnen Erkenntnisse legen nahe, dass SpoVG sowohl mit dem Promotor von *icaADBC* als auch mit dem Promotor von *icaR* direkt interagieren kann [4] und somit

seine Wirkung auf deren Transkription unter Einbeziehung eines putativen, zusätzlichen Faktors direkt entfaltet.

5.3 Regulation der Biofilmbildung durch SpoVG *in vivo*

Die Ergebnisse der *in vitro* Versuche zum Einfluss von SpoVG auf die Biofilmbildung zeigten einen positiven Einfluss dieses Transkriptionsfaktors auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung in *S. epidermidis* 1457. Diese Ergebnisse ließen die Vermutung zu, dass SpoVG auch für die *in vivo* Biofilmbildung von Bedeutung sein könnte. *In vitro* führt die Deletion von *spoVG* zu einer eingeschränkten Synthese des Exopolysaccharids PIA [54], welches den interzellulären Zusammenhalt in *in vitro* Biofilmen von *S. epidermidis* 1457 vermittelt [38,74]. Unter *in vivo* Bedingungen wurde PIA schon mehrfach als wichtiger Virulenzfaktor in *S. epidermidis* 1457 beschrieben [114,115]. Rupp *et al.* [114] untersuchten die Auswirkung von PIA auf die Pathogenese in einem murinen Fremdkörper-assoziierten Infektionsmodell, wobei Fragmente eines Venenkatheters subkutan in die Flanken männlicher Swiss Albino Mäuse implantiert und entsprechend infiziert wurden. Sie konnten zeigen, dass der Wildtyp *S. epidermidis* 1457 im Vergleich zu der isogenen PIA-negativen Transposonmutante 1457-M10 [75] an der Infektionsstelle signifikant höhere bakterielle Lasten hervorrief und signifikant häufiger einen subkutanen Abszess an der Infektionsstelle verursachte [114]. SpoVG als hoch konservierter Transkriptionsfaktor in einer Vielzahl von Bakterien [55], der eine Auswirkung auf die *in vitro* Produktion von PIA gezeigt hatte [54], erschien daher als interessanter Regulator, um die Rolle von PIA in der *in vivo* Biofilmbildung weiter zu erforschen. Ergebnisse aus *in vitro* Studien können allerdings nicht ohne Weiteres auf die *in vivo* Situation übertragen werden [99]. Die Bedingungen, die im Tiermodell herrschen, sind zu denjenigen *in vitro* grundlegend verschieden. So ist die Verfügbarkeit von Nährstoffen wie Kohlenhydrate oder Aminosäuren im hier verwendeten Nährmedium TSB ausgezeichnet und für ein schnelles bakterielles Wachstum optimal, während dies *in vivo* nicht der Fall ist [130]. Man kann also davon ausgehen, dass die Regulationsmechanismen einer bakteriellen Zelle unter *in vivo* Bedingungen anders ablaufen als im Reagenzglas unter optimierten Bedingungen. Hinzukommt, dass mit dem Immunsystem des Wirtes neben den bakteriellen Zellen und dem Fremdkörper eine zusätzliche Komponente auftritt, die in den bisher durchgeführten *in vitro* Versuchen komplett fehlte. Um die physiologische Bedeutung des Transkriptionsfaktors SpoVG umfassender verstehen zu können, war daher die Untersuchung von SpoVG im Tiermodell unerlässlich.

Die hier gewählte Durchführung des Katheter-Infektionsmodells orientierte sich an dem oben beschriebenen Vorgehen von Rupp *et al.* [114]. Dieses Modell ähnelt am ehesten einer Tunnel-Infektion eines subkutan getunnelten Katheters, wie sie bei Hickman-Kathetern [84] oder getunnelten Dialyse-kathetern [86] vorkommen kann. Als Erstes musste das Infektionsmodell, das in der Arbeitsgruppe für *S. aureus* bereits etabliert war [101], für *S. epidermidis* erarbeitet werden. Dazu erfolgte eine Pilotphase, um die ideale Infektionsdosis von *S. epidermidis* 1457 zur Infektion von C57BL/6 Mäusen festzustellen. Es wurde eine niedrige Dosis von 1×10^4 CFU [117], eine mittlere Dosis von 5×10^4 CFU und eine

hohe Dosis von 1×10^7 CFU [65,114] *S. epidermidis* 1457 getestet. Die Versuchstiere der unterschiedlichen Dosisgruppen unterschieden sich weder in Belastung noch Gewichtsentwicklung signifikant voneinander, wobei die Tiere allenfalls eine geringgradige Belastung erfuhren (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 18). Allein mit der Infektionsdosis 1×10^7 CFU konnte zuverlässig eine lokale bakterielle Infektion hervorgerufen werden (vgl. Abbildung 16). Die ermittelten bakteriellen Lasten an der Infektionsstelle wiesen zwar eine klare Streuung auf, allerdings konnte mit der niedrigen und mittleren Infektionsdosis keine zuverlässige Infektion gewährleistet werden. Daher wurde die Infektionsdosis für den folgenden Hauptversuch auf 1×10^7 CFU festgelegt. Im Hauptversuch wurde die Pathogenität von *S. epidermidis* 1457 mit der Pathogenität der isogenen Mutante 1457 $\Delta spoVG$ und deren *cis*-komplementiertem Stamm 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ verglichen. Hierzu wurden Fragmente eines PVK aus Polyurethan in die Flanken der Maus implantiert und mit Bakterien beimpft. Damit gelang es, eine lokale Infektion ohne systemische Nachweisbarkeit im Sinne einer Bakteriämie hervorzurufen. Auch die Leukozytenzahl im Blut am Ende des Versuches unterschied sich nicht signifikant zwischen den Infektionsgruppen (vgl. Abbildung 23). Nach Infektion wurden die Tiere über den Versuchszeitraum täglich gewogen und bezüglich ihrer Belastung bewertet. Die Tiere der unterschiedlichen Infektionsgruppen unterschieden sich über den Versuchszeitraum weder bezüglich ihres Belastungsgrades noch ihrer Gewichtsentwicklung signifikant voneinander (vgl. Abbildung 24 und Abbildung 25). Die Tiere erfuhren unabhängig der Infektionsgruppe allenfalls eine geringe Belastung durch die Infektion und die Mehrheit der Tiere (15/24) erholte sich davon vollständig bis zum vierten Tag nach Versuchsbeginn. Bis zum Ende des Versuches lag jedes Tier über seinem individuellen Ausgangsgewicht. SpoVG zeigte somit keinen Einfluss auf das Allgemeinbefinden der Versuchstiere im Rahmen einer lokalen subkutanen Infektion. Unter der Annahme, dass der PIA-produzierende Wildtyp *S. epidermidis* 1457 auf dem subkutan implantierten Katheterfragment einen starken Biofilm ausbilden könnte, wurde in diesem Versuchsaufbau erwartet, dass der Wildtyp eine hohe Bakterienlast an der Infektionsstelle ausbilden würde. Entsprechend würde die Mutante 1457 $\Delta spoVG$ eine niedrigere bakteriellen Last auf dem Fragment ausbilden, da sie durch die Deletion von *spoVG* in der Fähigkeit zur PIA- und entsprechend zur Biofilm-Produktion eingeschränkt wäre. Im Gegensatz zu dieser Erwartung konnte zwischen den Infektionsgruppen kein signifikanter Unterschied in den Bakterienlasten festgestellt werden (vgl. Abbildung 19). Auf dem Katheterfragment lag die bakterielle Last der mit Wildtyp *S. epidermidis* 1457 bzw. 1457 $\Delta spoVG::spoVG$ infizierten Tiere zwar mit $2,05 \times 10^5$ CFU/Katheter bzw. $2,70 \times 10^5$ CFU/Katheter im Median um mehr als eine halbe \log_{10} -Stufe über der bakteriellen Last in der 1457 $\Delta spoVG$ -Gruppe mit $4,16 \times 10^4$ CFU/Katheter, doch dieser Unterschied erwies sich durch die hohen Streuungen der Werte als statistisch nicht signifikant ($p = 0,89$; Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparisons Test). Eine ähnliche Verteilung wiesen die Bakterienlasten im umliegenden Gewebe der Infektionsstelle auf, sodass sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Infektionsgruppen zeigte. Allerdings konnte bei den Tieren der Wildtyp-Gruppe die Entwicklung eines größeren periimplantären Ödems im Vergleich zur

1457 $\Delta spoVG$ -Gruppe beobachtet werden (vgl. Abbildung 20). Am Ende des Versuches war die Ödemfläche in der Wildtyp-Gruppe im Median um 10,13 mm² größer und wies dabei einen hochsignifikanten Unterschied zur Mutante 1457 $\Delta spoVG$ auf (vgl. Abbildung 21). Durch die Komplementation konnte dieser Unterschied aufgehoben werden. Da SpoVG die Immunantwort des Wirtes zu beeinflussen schien, wurden die Zytokin-Konzentrationen im Gewebe der Infektionsstellen ermittelt. Erwartungsgemäß konnten in der Wildtyp-Gruppe die höchsten Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine TNF, IL-6 und KC festgestellt werden (vgl. Abbildung 22). In den mit Wildtyp infizierten Gewebeproben ließ sich im Median eine doppelt so hohe Konzentration von TNF nachweisen als in den Gewebeproben der 1457 $\Delta spoVG$ -Gruppe. Dieser Unterschied erreichte eine statistische Signifikanz. Bei den weiteren Zytokinen wies die Wildtyp-Gruppe zwar auch die höchsten Werte auf, doch diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. In Summe lassen diese Beobachtungen aber den Schluss zu, dass SpoVG die pro-inflammatorische Immunantwort des Wirtes erhöht und auf diese Weise zu einer erhöhten Entzündungsreaktion am Infektionsort führt. Allerdings zeigte SpoVG über seine mutmaßliche Wirkung auf PIA keinen signifikanten Einfluss auf die bakterielle Last an der Infektionsstelle und daher vermutlich auch nicht auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung *in vivo*.

Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu vorherigen Studien, die die Bedeutung von PIA für die Virulenz von *S. epidermidis* und die *in vivo* Biofilmbildung betonen. Im selben Jahr, in dem Rupp und Kollegen [114] die Bedeutung von PIA für die Virulenz von *S. epidermidis* 1457 für subkutan implantierte Fremdkörper in der Maus zeigten, veröffentlichte die Arbeitsgruppe von Herrn Rupp eine Studie zur Bedeutung von PIA in einem ZVK-assoziierten Infektionsmodell in der Ratte, welches die dynamischen Bedingungen eines intravasal liegenden Katheters beim Menschen besser imitierte [115]. Hierbei wurden den Tieren Silastikkatheter über die Vena jugularis externa bis in die Vena cava superior eingebracht und entsprechend mit *S. epidermidis* 1457 oder der PIA-negativen Mutante 1457-M10 beimpft. Tiere der Wildtyp-Gruppe entwickelten signifikant öfter ZVK-assoziierte Infektionen als die Tiere, die mit 1457-M10 infiziert wurden (71,4 % gegen 14,3 %). Die Autoren konnten somit zeigen, dass PIA auch für die Pathogenität von ZVK-assoziierten Infektionen eine wichtige Rolle spielt. Vergleichbare Ergebnisse konnte die Arbeitsgruppe für *S. epidermidis* O-47 zeigen [116]. Im gleichen ZVK-assoziierten Infektionsmodell verursachte der Wildtyp O-47 signifikant häufiger eine Infektion am Katheter sowie Bakteriämien im Vergleich zur PIA-defiziten Transposonmutante O-47mut2. Eine andere Studie fand heraus, dass dabei die Deacetylierung von PIA eine wichtige Rolle spielt: In einem murinen Katheter-Infektionsmodell konnte eine *icaB*-Mutante, die zur Deacetylierung von PIA unfähig ist, im Gegensatz zum isogenen Wildtyp nicht an der Infektionsstelle persistieren [135]. Später belegte eine weitere Arbeitsgruppe die Bedeutung von PIA für die Virulenz von *S. epidermidis* bei subkutan implantierten Kathetern im Fremdkörper-assoziierten Infektionsmodell in der Maus [65]. Gleichzeitig liegen viele Studien vor, die den Vorteil eines PIA-abhängigen Biofilms unter *in vivo* Bedingungen betonen und daher vermuten lassen, dass Bakterien, sofern möglich, einen PIA-abhängigen Biofilm als

vorteilhafte Lebensweise ausbilden [70]. Kristian *et al.* [65] konnten zeigen, dass Zellen des PIA-produzierenden Wildtyps *S. epidermidis* 1457 aus dem Biofilm vor Abtötung durch Polymorphonukleäre Leukozyten (PMN) nach Opsonophagozytose geschützt sind im Vergleich zur planktonisch kultivierten PIA-negativen Mutante 1457-M10. Obwohl der Wildtyp das Komplementsystem stärker aktivierte, kam es auf den Zellen des Wildtyps im Biofilm zu weniger Ablagerungen von Opsoninen wie C3b und IgG. Die Autoren vermuten, dass der Wildtyp durch diese herabgesetzte Opsonierung im PIA-abhängigen Biofilm vor Abtötung durch PMN geschützt ist [65]. Vuong *et al.* [136] berichteten ebenfalls, dass PIA beim Vergleich des Wildtyps *S. epidermidis* 1457 und der isogenen PIA-negativen 1457-M10 sowohl vor Phagozytose als auch vor Abtötung durch humane PMN schützt. Hierbei spielte ebenfalls die Deacetylierung von PIA eine wichtige Rolle, denn die Phagozytose einer *icaB*-Mutante war im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht [135]. Zusätzlich waren diese beiden *ica*-Mutanten anfälliger gegenüber Antimikrobiellen Peptiden [135,136]. In einem *ex vivo* Vollblut-Assay konnte beim Vergleich von einem PIA-abhängigen Biofilm aus *S. epidermidis* 1457 und einem Protein- und DNA-basierten Biofilm aus 1457-M10 gezeigt werden, dass PIA zwar das Komplementsystem stärker aktivierte, gleichzeitig aber zu einer geringeren Granulozytenaktivierung und einer geringeren Zytokin-Sekretion führte [37]. Von den Autoren wurde vorgeschlagen, dass PIA so zu einer schwächeren Immunantwort und zur Persistenz einer Biofilm-Infektion durch *S. epidermidis* beitragen kann [37]. Auch Schommer *et al.* [121] berichteten von einer geringeren Zytokin-Induktion in murinen Makrophagen-ähnlichen Zellen durch den Wildtyp im Vergleich zur PIA-negativen Mutante 1457-M10. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings bei den mit Wildtyp infizierten Tieren eine verstärkte Immunantwort mit erhöhten Zytokinen beobachtet. Das lässt die Vermutung zu, dass der Wildtyp relativ zur PIA-defiziten Mutante 1457 $\Delta spoVG$ keine vermehrten PIA-Mengen produzierte. Vielmehr lassen die ähnlich hohen Bakterienlasten an der Infektionsstelle von Wildtyp und Deletionsmutante vermuten, dass 1457 $\Delta spoVG$ ebenfalls in der Lage war, einen Biofilm auf dem Fremdkörper auszubilden. Alternativ ist es möglich, dass eine Notwendigkeit zur Biofilmbildung in diesem Infektionsmodell für die bakteriellen Zellen nicht bestand. In diesem Fall würde die Ähnlichkeit der ermittelten Bakterienlasten dafür sprechen, dass die Fähigkeit zur Biofilmbildung in diesem Modell keine Rolle spielt, wie es bereits Francois *et al.* [35] für das im Weiteren beschriebene *in vivo* Infektionsmodell diskutierten. Andererseits war in einem ähnlichen zum hier durchgeführten Katheter-Infektionsmodell ein Biofilm des Wildtyps *S. epidermidis* 1457 auf dem subkutan implantierten Katheterfragment mittels direkter bildgebender Methodik im Rasterelektronenmikroskop bereits nachweisbar [104].

Es existieren Studien zu Tierversuchen, die im Vergleich eines Wildtyps und der entsprechenden isogenen *ica*-Mutante keinen Vorteil für die Persistenz und Virulenz im Infektionsmodell fanden [16,32,35]. Francois *et al.* [35] untersuchten den Einfluss von PIA in einem Infektionsmodell in Meerschweinchen, wobei den Tieren Gewebekäfige mit darin enthaltenen Deckgläsern subkutan implantiert wurden (im Folgenden Gewebekäfig-Infektionsmodell genannt). Die Autoren konnten weder für den Wildtyp *S. epidermidis* 1457 noch *S. epidermidis* O-47 im Vergleich zu den

entsprechenden *ica*-Mutanten einen Vorteil für die Kolonisation der Fremdkörper bzw. einen Unterschied in den Bakterienlasten feststellen [35]. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Chokr *et al.* [16] bei der Testung von klinischen *S. epidermidis*-Isolaten und Hautkommensalen, die in einem ähnlichen Gewebekäfig-Infektionsmodell eingesetzt wurden. Die Isolate wurden entsprechend ihrer *in vitro* Fähigkeit zur Biofilmbildung, dem Vorhandensein des *ica*-Operons und der Synthese von PIA in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. In der Biofilm- und PIA-positiven Gruppe konnten persistierende Infektionen festgestellt werden. Doch auch die Gruppe der Isolate, die *in vitro* weder Biofilmbildung noch PIA-Produktion aufwies und kein *ica*-Operon enthielten, konnte Infektionen am Gewebekäfig ausbilden und die durchschnittlich ermittelte bakterielle Last unterschied sich nicht signifikant zwischen diesen beiden Gruppen. Die Autoren diskutierten, dass es in der *ica*-negativen Gruppe zur Ausbildung eines PIA-unabhängigen Biofilms gekommen sein könnte [16]. Die Fähigkeit zur Kolonisation von Gewebekäfigen scheint in diesem Modell daher von dem Vorhandensein des *ica*-Operons bzw. der PIA-Produktion nicht zwangsläufig abhängig zu sein. PIA scheint also nicht für alle Arten von Biofilm-assoziierten Infektionen notwendig [77]. Einen weiteren Hinweis dazu lieferten Decker und Kollegen durch Untersuchungen zu Sbp [28]. 16 Jahre nachdem Rupp *et al.* [114] die Bedeutung von PIA für die Virulenz von *S. epidermidis* 1457 postuliert hatten, veröffentlichten Autoren aus derselben Universität erneut Daten zur PIA-negativen Mutante 1457-M10 [28]: Bei Experimenten zur Auswirkung von Sbp auf PIA-unabhängige Biofilmbildung setzten die Autoren 1457-M10 in einem Katheter-Infektionsmodell in der Maus ein, das dem hier durchgeführten Modell sehr stark ähnelte. So wurde sowohl der gleiche Mausstamm C57BL/6 als auch die gleiche Infektionsdosis von 1×10^7 CFU gewählt, um subkutan implantierte 1 cm-lange Katheterfragmente zu infizieren. Die dabei erhobenen Bakterienlasten, die die PIA-negative Mutante 1457-M10 sowohl auf dem Katheter als auch im umliegenden Gewebe ausbildete, sind mit den hier ermittelten Lasten des Wildtyps *S. epidermidis* 1457 fast identisch. 1457-M10 erreichte auf dem Katheterfragment im Median eine bakterielle Last von $1,86 \times 10^5$ CFU/ml [28] im Vergleich zur hier ermittelten Bakterienlast des isogenen Wildtyps mit $2,05 \times 10^5$ CFU/Katheter (entspricht CFU/ml (s. 3.2.16.3)) bei vergleichbar hoher Streuung der Werte. Die Bakterienlasten im umliegenden Gewebe waren mit $3,37 \times 10^5$ CFU/g bei 1457-M10 [28] und $2,30 \times 10^5$ CFU/g bei *S. epidermidis* 1457 ebenfalls vergleichbar. Decker *et al.* [28] konnten somit die von Rupp *et al.* [114] ermittelte niedrige Bakterienlast im Bereich von 10^2 durch 1457-M10 nicht reproduzieren, sie ist vielmehr mit den hier ermittelten Bakterienlasten des Wildtyps und damit auch mit denjenigen der Mutante 1457 $\Delta spoVG$ vergleichbar. Dies deutet an, dass PIA für die Höhe der bakteriellen Last nicht von ausschlaggebender Relevanz ist. Für das Gewebekäfig-Infektionsmodell konnte nachgewiesen werden, dass *S. epidermidis* 1457 in Aspiraten der Gewebekäfigflüssigkeit PIA-positive Zellhaufen ausbildete [32]. Das lässt die Annahme zu, dass der Wildtyp in diesem Versuchsaufbau auch auf den Fremdkörper-Oberflächen einen PIA-abhängigen Biofilm produzierte, auch wenn dies nicht experimentell adressiert wurde. Im Verlauf der Infektion ließ sich bezüglich der Bakterienlast zwischen *S. epidermidis* 1457 und der isogenen *ica*-Mutante allerdings kein Unterschied

feststellen [32], wie es für dieses Modell bereit diskutiert wurde [16,35]. Folglich scheint ein PIA-abhängiger Biofilm gegenüber einem putativ PIA-unabhängigen Biofilm hinsichtlich der bakteriellen Last unter *in vivo* Bedingungen keinen Vorteil zu bringen. Unter diesen Gesichtspunkten könnten auch die erhobenen bakteriellen Lasten der Mutante 1457-M10 von Decker *et al.* [28] im Vergleich zu den hier ermittelten Daten des Wildtyps eingeordnet werden. Nach unserem Kenntnisstand wurde aber für das Katheter-Infektionsmodell bisher noch nie die PIA-Konzentration an den Infektionsstellen nach Entnahme von Katheter und Gewebe *ex vivo* gemessen oder visualisiert. Auch wurde in keiner dieser Studien ein komplementierter Bakterienstamm in den *in vivo* Experimenten eingesetzt. Es kann daher nicht als sicher angesehen werden, dass die PIA-Produktion für die *in vivo* Biofilmbildung des Wildtyps *S. epidermidis* 1457 auf subkutan implantierten Katheterfragmenten eine ausschlaggebende Rolle spielt. Angesichts der erhöhten Zytokin-Konzentrationen bei den mit *S. epidermidis* 1457 infizierten Tieren im hier durchgeführten Katheter-Infektionsmodell und der Assoziation eines PIA-abhängigen Biofilms mit erniedrigten Zytokinleveln [37,121], kann allerdings vermutet werden, dass der Wildtyp hier möglicherweise keinen PIA-abhängigen Biofilm produzierte. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass sowohl der Wildtyp *S. epidermidis* 1457 als auch die PIA-defizite Mutante 1457 $\Delta spoVG$ in dem hier gewählten Infektionsmodell einen PIA-unabhängigen Biofilm auf den Katheterfragmenten ausbildeten und sich daher bezüglich der bakteriellen Lasten nicht unterschieden.

Generell ist zu bedenken, dass nach Implantation eines Fremdkörpers in das Subkutangewebe annähernd statische Bedingungen an der Infektionsstelle herrschen. Aus *in vitro* Versuchen ist bekannt, dass dynamische Bedingungen durch Flüssigkeitsfluss und Scherspannung, wie sie bei intravasal liegenden Kathetern vorherrschen, die Ausbildung eines PIA-abhängigen Biofilms in sonst Biofilm-negativen Isolaten induzieren können [139]. Unter diesem Gesichtspunkt erscheint es schlüssig, dass PIA unter nahezu statischen Bedingungen, wie bei subkutan implantierten Fremdkörpern, keine bedeutende Rolle einnimmt [94].

Epidemiologische Studien liefern ebenfalls weitere Hinweise, dass das Vorliegen des *ica*-Operons und damit die Fähigkeit zur PIA-Produktion für die Virulenz im Menschen nicht ausschlaggebend ist, obwohl dies kontrovers diskutiert wird [94]. Dennoch sind *ica*-negative Isolate häufig als Erreger invasiver Infektionen identifiziert worden: *icaA* war bei Prothesengelenkinfektionen in 38,5 % der Isolate [112] nicht nachweisbar bzw. in 44,1 % bei klinischen Isolaten [92]. Gleichzeitig war bei Katheter-assoziierten Infektionen in 59,3 % der Isolate das gesamte *icaADBC*-Operon nicht vorhanden [13]. Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass das *ica*-Operon je nach Infektionstyp für die Virulenz von *S. epidermidis* teilweise entbehrlich ist und dass das Vorliegen dieses Operons nicht hilfreich ist, um die Invasivität eines Isolates abzuleiten [112].

Seit einiger Zeit häufen sich außerdem Hinweise, dass die Nutzung von künstlichen Labormedien wie TSB die Ergebnisse von *in vitro* Studien stark beeinflusst und somit Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation nur bedingt zulässig sind. So spielt die Wahl des Nährmediums eine entscheidende Rolle für

bakterielles Wachstum, die Lebensfähigkeit als auch für die Genexpression von KoNS [130]. In TSB wird beispielsweise eine PIA-abhängige Biofilmbildung gefördert [20], während der Zusatz von Serum in Biofilm-negativen Isolaten Zellaggregation und Biofilmbildung induzieren kann [19]. Stamm *et al.* [129] erarbeiteten im Zusammenhang mit Prothesengelenkinfektionen eine künstliche Synovialflüssigkeit auf der Basis von humanem Plasma. Wachstum in künstlicher Synovialflüssigkeit induzierte in der PIA-negativen *S. epidermidis* Variante 1457-M10 die Bildung von Oberflächen-adhärenenten Zellaggregaten und diese PIA-unabhängige Biofilmbildung konnte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie visuell nachgewiesen werden [129]. Dies weist erneut darauf hin, dass über die *in vivo* Fähigkeit zur Biofilmbildung in PIA-defizienten Mutanten nur gemutmaßt werden kann und *in vitro* Ergebnisse in Labormedien nur bedingt Rückschlüsse erlauben. Daher wird der Ruf nach alternativen Nährmedien lauter, die das *in vivo* Milieu besser abbilden und somit eine verbesserte Übertragbarkeit ermöglichen [129,130]. Skovdal *et al.* [127] gingen sogar noch weiter und postulierten, dass weder PIA noch das proteinöse Adhäsin Embp für die Biofilmbildung in humanem Plasma nötig sind, da *in vivo* die interzelluläre Adhäsion durch Wirtsfaktoren vermittelt werden kann. Diese These würde die Übertragbarkeit der meisten bisherigen *in vitro* generierten Erkenntnisse in Frage stellen und eröffnet die Möglichkeit, in angepassten Versuchsmodellen, z. B. durch Zugabe von humanen Wirtsfaktoren zum Nährmedium [127], die Mechanismen der Biofilmbildung realitätsnäher abzubilden und die Rolle von PIA dabei möglicherweise neu zu bewerten.

Ungeachtet dieser Problematik zeigte hier die Deletion von *spoVG* eine Auswirkung sowohl auf die Entwicklung eines periimplantären Ödems als auch auf die Zytokin-Konzentration an der Infektionsstelle. Kristian *et al.* [65] berichteten bereits über eine verstärkte Weichteilinfektion im Sinne eines größeren Ödems an der Infektionsstelle in einem murinen Katheter-Infektionsmodell durch den Wildtyp *S. epidermidis* 1457 im Vergleich zu 1457-M10 und vermuteten, dass die Ödementwicklung mit einer stärkeren Aktivierung des Komplementsystems durch den Wildtyp und entsprechend höheren Konzentrationen von C3a und C5a in Zusammenhang stehen. Dieser Mechanismus könnte den hier beobachteten Unterschieden ebenfalls zugrunde liegen. Die Anaphylatoxine C3a und C5a entstehen durch die Aktivierung des Komplementsystems als pro-inflammatorische Mediatoren, die zur Chemotaxis beitragen und Phagozyten an die Infektionsstelle locken [91]. Sie fördern sowohl Vasodilatation als auch Extravasation von Flüssigkeit durch Aktivierung von Immunzellen [79]. So kann C5a die Freisetzung von Reaktiven Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten auslösen, besitzt selbst vasodilatatorische Eigenschaften und trägt dadurch zur Ödementwicklung bei [41,91,118]. Zusätzlich induziert C5a die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1 β und IL-6 in Leukozyten [41,79]. Daher ist die Zersetzung von Komplementfaktoren durch extrazelluläre Proteasen ein weitverbreiteter Mechanismus zur Immunevasion in Bakterien [105,125]. Für *S. aureus* ist dieses Vorgehen ausführlich beschrieben [26,67,103,105]. Die Serinprotease V8 etwa kann Immunglobuline wie IgG abbauen [103], sodass die Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg gedämpft wird. Es mehren sich die Hinweise darauf, dass auch *S. epidermidis* über

ähnliche Mechanismen zur Immunevasion verfügt. *S. epidermidis* produziert als extrazelluläre Proteasen hauptsächlich die Serinprotease Esp, die Cysteinprotease EcpA und die Metalloprotease SepA [80]. Es wurde bereits gezeigt, dass die Serinprotease Esp den Komplementfaktor C5 [90] und die Cysteinprotease EcpA Immunglobuline wie IgM [128] hydrolysieren können, wodurch die pro-inflammatorische Wirkung von C5a bzw. der klassischer Weg der Komplementsystem-Aktivierung beeinträchtigt werden könnte. SpoVG zeigt in *S. epidermidis* neben dem Einfluss auf das *ica*-Operon auch Auswirkungen auf das intra- und extrazelluläre Proteom [54], sodass diese globalen Veränderungen durch die Deletion von *spoVG* ebenfalls zu berücksichtigen sind. In der Deletionsmutante 1457 $\Delta spoVG$ ist die Aktivität der extrazellulären Proteasen als verstärkt beschrieben [54]. Im Einklang damit zeigte sich die Expression der extrazellulären Serinprotease und der Cysteinprotease sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase im Vergleich zum Wildtyp signifikant hochreguliert [54]. Diese erhöhte Expression extrazellulärer Proteasen könnte den Grund dafür darstellen, dass in der SpoVG-negativen Mutante 1457 $\Delta spoVG$ eine verminderte Immunantwort im Katheter-Infektionsmodell beobachtet wurde. Möglicherweise führte die gesteigerte Aktivität der extrazellulären Proteasen zu einer Hemmung des Komplementsystems. Somit wäre sowohl die Entstehung eines periimplantären Ödems beeinträchtigt als auch die Chemotaxis. Infolgedessen käme es insgesamt zu einer schwächeren Immunantwort in 1457 $\Delta spoVG$. Im Gegensatz dazu konnte im SpoVG-exprimierenden Wildtyp eine lang-anhaltende Immunantwort mit stärkerer Ödementwicklung beobachtet werden, obwohl diese verstärkte Immunantwort offenbar nicht ausreichte, um die im Biofilm geschützten Zellen über den Versuchszeitraum von 10 Tagen zu eradizieren.

Zusammenfassend zeigte der Transkriptionsfaktor SpoVG im murinen Katheter-Infektionsmodell keinen messbaren Einfluss auf die Biofilmbildung. Die bakteriellen Lasten sowohl auf den subkutan implantierten Katheterfragmenten als auch im umliegenden Gewebe waren in allen Infektionsgruppen statistisch nicht signifikant unterscheidbar. Daher wird angenommen, dass PIA, dessen Produktion unter *in vitro* Bedingungen durch SpoVG beeinflusst wird, in dem hier durchgeführten *in vivo* Modell keine wesentliche Rolle spielt bzw. in der Deletionsmutante 1457 $\Delta spoVG$ über andere Biofilmbildungsmechanismen kompensiert werden konnte. Zur Bedeutung von PIA unter *in vivo* Bedingungen liegen widersprüchliche Erkenntnisse vor [35,114]. Eine mögliche Erklärung dieser sich zum Teil widersprechenden Ergebnisse liegt in der unterschiedlichen Wahl des genutzten Mausstammes, welcher das Resultat einer Studie erheblich beeinflussen kann [44], oder in der Wahl des durchgeführten Modells der Fremdkörper-assoziierten Infektion [94]. Hinzukommt, dass bisherige *in vivo* Studien die Konzentration von PIA auf dem implantierten Fremdkörper oder unmittelbar an der Infektionsstelle nicht ermittelt haben. Leider standen zum Zeitpunkt der Durchführung der *in vivo* Experimente in der Arbeitsgruppe keine Antikörper gegen PIA zur Verfügung, sodass die Gewebehomogenate nicht auf ihre PIA-Menge hin untersucht werden konnten. Dies sollte in zukünftigen Arbeiten nachgeholt werden, um die Rolle von PIA in der *in vivo* Biofilmbildung zu überprüfen. In dem hier gewählten Katheter-Infektionsmodell ließ sich eine veränderte Immunantwort durch die Deletion von *spoVG* beobachten.

Im SpoVG-exprimierenden Wildtyp *S. epidermidis* 1457 ließ sich eine beständig gesteigerte Immunantwort mit stärkerer Ödementwicklung und höheren lokalen Zytokin-Konzentrationen feststellen. In der Mutante 1457 $\Delta spoVG$ zeigten sich hingegen kleinere periimplantäre Ödeme und erniedrigte Zytokin-Werte. Diese schwächere Immunantwort steht möglicherweise mit einer Induktion der extrazellulären Proteasen in 1457 $\Delta spoVG$ [54] in Zusammenhang, allerdings ohne einen erkennbaren Einfluss auf die bakterielle Last am Ende des Versuchszeitraumes zu verursachen.

5.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein klarer Einfluss des Transkriptionsfaktors SpoVG auf die Biofilmbildung *in vitro* gesehen, während sich dessen Einfluss auf die Biofilmbildung im *in vivo* Katheter-Infektionsmodell in Bezug auf die bakterielle Last als unwesentlich herausstellte. Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob und in welchem Maße SpoVG die PIA-abhängige Biofilmbildung in Infektionsmodellen beeinflusst, in denen die sich bildenden Biofilme einer höheren Scherspannung ausgesetzt sind. Ein Beispiel hierfür wäre die Biofilmbildung in oder auf Kathetern, die in die Blutbahn inseriert sind. Ein diese Rahmenbedingungen simulierendes Modell der Maus wurde 2017 bereits von Van de Vyver und Kollegen [133] für *S. aureus* beschrieben, für die Charakterisierung der Bedeutung von SpoVG für die *in vivo* Infektiosität von *S. epidermidis* bis dato jedoch noch nicht genutzt. Die PIA-Konzentration bzw. die Konzentration weiterer Adhäsine in Biofilmen auf implantierten Fremdkörpern sollte in zukünftigen Arbeiten *ex vivo* bestimmt werden, um den Biofilm-Modus unter *in vivo* Bedingungen weiter zu charakterisieren. Bezüglich Immunevasion in Staphylokokken sind weitere Studien notwendig, um deren Mechanismen zu untersuchen. Wichtige Akteure hierbei sind möglicherweise extrazelluläre Proteasen im Zusammenhang mit dem Komplementsystem. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Biofilmbildung unter *in vivo* Bedingungen grundsätzlich anders abläuft als im *in vitro* Versuchsaufbau [127,129]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Annahme. Obwohl humanes Plasma gespendet werden muss und somit eine knappe Ressource ist, sollten daher in *in vitro* Versuchen künstliche Labormedien durch Alternativen ersetzt werden, welche das *in vivo* Milieu besser abbilden. Inwieweit bakterielle Adhäsine bei der *in vivo* Biofilmbildung von Bedeutung sind oder ob diese unter *in vivo* Bedingungen vollständig durch Wirtsfaktoren ersetzt werden können [127], muss dann Gegenstand weiterer Forschung bleiben.

6 Literaturverzeichnis

1. Bae T, Schneewind O (2006) Allelic Replacement in *Staphylococcus aureus* with Inducible Counter-Selection. *Plasmid* 55:58–63
2. Bartscht K (2002) Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* an Oberflächen: Charakterisierung einer Biofilm-negativen Transposonmutante. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften, Fachbereich Biologie. Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg, Universität Hamburg. URL: <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/bitstream/ediss/3217/1/dissertation.pdf>
3. Becker K, Both A, Weißelberg S, Heilmann C, Rohde H (2020) Emergence of coagulase-negative staphylococci. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 18:349–366
4. Benthien H, Fresenborg B, Pätzold L, Elhawy MI, Huc-Brandt S, Beisswenger C, Krasteva-Christ G, Becker SL, Molle V, Knobloch JK, Bischoff M (2022) The Transcription Factor SpoVG Is of Major Importance for Biofilm Formation of *Staphylococcus epidermidis* under In Vitro Conditions, but Dispensable for In Vivo Biofilm Formation. *International Journal of Molecular Sciences* 23:3255
5. Bischoff M, Dunman P, Kormanec J, Macapagal D, Murphy E, Mounts W, Berger-Bächi B, Projan S (2004) Microarray-Based Analysis of the *Staphylococcus aureus* σ B Regulon. *Journal of Bacteriology* 186:4085–4099
6. Bischoff M, Brelle S, Minatelli S, Molle V (2016) Stk1-mediated phosphorylation stimulates the DNA-binding properties of the *Staphylococcus aureus* SpoVG transcriptional factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 473:1223–1228
7. Bortz J, Döring N (2006) Forschungsmethoden und Evaluation: für Human- und Sozialwissenschaftler. 4., überarbeitete Auflage edition. Springer Medizin Heidelberg
8. Bundesinstitut für Risikobewertung (heruntergeladen am 21.04.2024) Bf3R Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren: Über das Bf3R. URL: https://www.bf3r.de/de/ueber_das_bf3r-276226.html
9. Bundesinstitut für Risikobewertung (heruntergeladen am 21.04.2024) Verwendung von Versuchstieren im Berichtsjahr 2022. URL: https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_berichtsjahr_2022-313306.html
10. Bundesministerium der Justiz (heruntergeladen am 02.03.2024) Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG) § 2 Begriffsbestimmungen. URL: https://www.gesetze-im-internet.de/ifsg/_2.html
11. Büttner H, Mack D, Rohde H (2015) Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5:14
12. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA (2018) The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology* 16:143–155
13. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, Selan L, Artini M, Nicoletti G, Stefani S (2004) Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clinical Microbiology and Infection* 10:1081–1088
14. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR (2021) Extracellular DNA (eDNA). A Major Ubiquitous Element of the Bacterial Biofilm Architecture. *International Journal of Molecular Sciences* 22:9100

15. Cheung GYC, Bae JS, Otto M (2021) Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* 12:547–569
16. Chokr A, Leterme D, Watier D, Jabbouri S (2007) Neither the presence of *ica* locus, nor in vitro-biofilm formation ability is a crucial parameter for some *Staphylococcus epidermidis* strains to maintain an infection in a guinea pig tissue cage model. *Microbial Pathogenesis* 42:94–97
17. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology* 22:996–1006
18. Christensen GD, Baddour LM, Simpson WA (1987) Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production in vitro and in vivo. *Infection and Immunity* 55:2870–2877
19. Christner M, Franke GC, Schommer NN, 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
20. Christner M, Heinze C, Busch M, Franke G, Hentschke M, Bayard Dühring S, Büttner 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 1 MDa extracellular matrix binding protein and autolysis-dependent release of eDNA. *Molecular Microbiology* 86:394–410
21. Coenye T, Nelis HJ (2010) In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 83:89–105
22. Conlon KM, Humphreys H, O’Gara JP (2002) *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology* 184:4400–4408
23. Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G (2001) Anaerobic Conditions Induce Expression of Polysaccharide Intercellular Adhesion in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity* 69:4079–4085
24. Cue D, Lei MG, Lee CY (2012) Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2:38
25. Dantzer R, Kelley KW (2007) Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain, Behavior and Immunity* 21:153–160
26. Dasari P, Nordengrün M, Vilhena C, Steil L, Abdurrahman G, Surmann K, Dhople V, Lahrberg J, Bachert C, Skerka C, Völker U, Bröker BM, Zipfel PF (2022) The Protease SplB of *Staphylococcus aureus* Targets Host Complement Components and Inhibits Complement-Mediated Bacterial Opsonophagocytosis. *Journal of Bacteriology* 204:e00184-21
27. Davis MC, Kesthely CA, Franklin EA, MacLellan SR (2017) The essential activities of the bacterial sigma factor. *Canadian Journal of Microbiology* 63:89–99
28. Decker R, Burdelski C, Zobiak M, Büttner H, Franke G, Christner M, Saß K, Zobiak B, Henke HA, Horswill AR, Bischoff M, Bur S, Hartmann T, Schaeffer CR, Fey PD, Rohde H (2015) An 18 kDa Scaffold Protein Is Critical for *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation. *PLOS Pathogens* 11:e1004735

29. Dobinsky S, Kiel K, Rohde H, Bartscht K, Knobloch JK-M, Horstkotte MA, Mack D (2003) Glucose-related dissociation between icaADBC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *Journal of Bacteriology* 185:2879–2886
30. Eppendorf AG (2015) White Paper No. 28: OD 600 Measurements Using Different Photometers. URL: https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/148370/Detection_White-Paper_028_BioPhotometer-D30_BioSpectrometer-family_OD600-Measurements-Different-Photometers.pdf
31. Fluckiger U, Wolz C, Cheung AL (1998) Characterization of a sar Homolog of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity* 66:2871–2878
32. Fluckiger U, Ulrich M, Steinhuber A, Döring G, Mack D, Landmann R, Goerke C, Wolz C (2005) Biofilm formation, icaADBC transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infection and Immunity* 73:1811–1819
33. Formosa-Dague C, Feuillie C, Beaussart A, Derclaye S, Kucharíková S, Lasa I, Van Dijck P, Dufrene YF (2016) Sticky Matrix: Adhesion Mechanism of the Staphylococcal Polysaccharide Intercellular Adhesin. *ACS Nano* 10:3443–3452
34. França A, Gaio V, Lopes N, Melo LDR (2021) Virulence Factors in Coagulase-Negative Staphylococci. *Pathogens (Basel, Switzerland)* 10:170
35. Francois P, Tu Quoc PH, Bisognano C, Kelley WL, Lew DP, Schrenzel J, Cramton SE, Götz F, Vaudaux P (2003) Lack of biofilm contribution to bacterial colonisation in an experimental model of foreign body infection by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 35:135–140
36. François P, Schrenzel J, Götz F (2023) Biology and Regulation of Staphylococcal Biofilm. *International Journal of Molecular Sciences* 24:5218
37. Fredheim EGA, Granslo HN, Flægstad T, Figenschau Y, Rohde H, Sadovskaya I, Mollnes TE, Klingenberg C (2011) *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin activates complement. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 63:269–280
38. Galac MR, Stam J, Maybank R, Hinkle M, Mack D, Rohde H, Roth AL, Fey PD (2017) Complete Genome Sequence of *Staphylococcus epidermidis* 1457. *Genome Announcements* 5:e00450-17
39. Geiger T, Francois P, Liebeke M, Fraunholz M, Goerke C, Krismer B, Schrenzel J, Lalk M, Wolz C (2012) The Stringent Response of *Staphylococcus aureus* and Its Impact on Survival after Phagocytosis through the Induction of Intracellular PSMs Expression. *PLoS Pathogens* 8:e1003016
40. 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. *Journal of Biological Chemistry* 273:18586–18593
41. Haas P-J, van Strijp J (2007) Anaphylatoxins. *Immunologic Research* 37:161–175
42. Haley PJ (2003) Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology* 188:49–71
43. Handke LD, Slater SR, Conlon KM, O'Donnell ST, Olson ME, Bryant KA, Rupp ME, O'Gara JP, Fey PD (2007) SigmaB and SarA independently regulate polysaccharide intercellular adhesin production in *Staphylococcus epidermidis*. *Canadian Journal of Microbiology* 53:82–91

44. Hanke ML, Kielian T (2012) Deciphering mechanisms of staphylococcal biofilm evasion of host immunity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2:62
45. Hartmann T (2015) Regulatoren des Kohlenstoff-Metabolismus in Staphylokokken. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften, Medizinische Fakultät. Saarländische Universitäts- und Landesbibliothek, Universität des Saarlandes. URL: https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/bitstream/20.500.11880/21967/1/Dissertation_TorstenHartmann.pdf
46. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Molecular Microbiology* 20:1083–1091
47. Heilmann C, Gerke C, Perdreau-Remington F, Götz F (1996) Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infection and Immunity* 64:277–282
48. Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K (2019) Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clinical Microbiology and Infection* 25:1071–1080
49. Husain A, Meenakshi DU, Ahmad A, Shrivastava N, Khan SA (2023) A Review on Alternative Methods to Experimental Animals in Biological Testing: Recent Advancement and Current Strategies. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 15:165–171
50. Jäger S (2007) Regulationsmechanismen von Oxacillinresistenz und Biofilmbildung: Generierung und Charakterisierung von Deletionsmutanten des σ B Operons in *Staphylococcus epidermidis*. Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde, Medizinische Fakultät. Zentrale Hochschulbibliothek Lübeck, Universität zu Lübeck. URL: <https://www.zhb.uni-luebeck.de/epubs/ediss376.pdf>
51. Jäger S, Jonas B, Pfanzelt D, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D, Knobloch JK-M (2009) Regulation of biofilm formation by sigma B is a common mechanism in *Staphylococcus epidermidis* and is not mediated by transcriptional regulation of sarA. *The International Journal of Artificial Organs* 32:584–591
52. Jeng W-Y, Ko T-P, Liu C-I, Guo R-T, Liu C-L, Shr H-L, Wang AH-J (2008) Crystal structure of IcaR, a repressor of the TetR family implicated in biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Nucleic Acids Research* 36:1567–1577
53. Ji Y, Zhang B, Van SF, Horn, Warren P, Woodnutt G, Burnham MKR, Rosenberg M (2001) Identification of Critical Staphylococcal Genes Using Conditional Phenotypes Generated by Antisense RNA. *Science* 293:2266–2269
54. Jonas B (2010) Untersuchungen zur Regulation der Biofilmbildung in *Staphylococcus epidermidis*. Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde, Medizinische Fakultät. Zentrale Hochschulbibliothek Lübeck, Universität zu Lübeck. URL: <https://www.zhb.uni-luebeck.de/epubs/ediss789.pdf>
55. Jutras BL, Chenail AM, Rowland CL, Carroll D, Miller MC, Bykowski T, Stevenson B (2013) Eubacterial SpoVG Homologs Constitute a New Family of Site-Specific DNA-Binding Proteins. *PLOS ONE* 8:e66683
56. Kaspar U, Kriegeskorte A, Schubert T, Peters G, Rudack C, Pieper DH, Wos-Oxley M, Becker K (2016) The Culturome of the Human Nose Habitats Reveals Individual Bacterial Fingerprint Patterns. *Environmental Microbiology* 18:2130–2142

57. Kies S, Otto M, Vuong C, Götz F (2001) Identification of the sigB Operon in *Staphylococcus epidermidis*: Construction and Characterization of a sigB Deletion Mutant. *Infection and Immunity* 69:7933–7936
58. Kim HJ, Kwon A-R, Lee B-J (2018) A novel chlorination-induced ribonuclease YabJ from *Staphylococcus aureus*. *Bioscience Reports* 38:BSR20180768
59. Knobloch JK, Bartscht K, Sabottke A, Rohde H, Feucht HH, Mack D (2001) Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of Bacteriology* 183:2624–2633
60. Knobloch JK-M, Horstkotte MA, Rohde H, Kaulfers P-M, Mack D (2002) Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49:683–687
61. Knobloch JK-M, Nedelmann M, Kiel K, Bartscht K, Horstkotte MA, Dobinsky S, Rohde H, Mack D (2003) Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. *Applied and Environmental Microbiology* 69:5812–5818
62. Knobloch JK-M, Jäger S, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D (2004) RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene icaR. *Infection and Immunity* 72:3838–3848
63. Kranjec C, Morales Angeles D, Torrissen Mårli M, Fernández L, García P, Kjos M, Diep DB (2021) *Staphylococcal Biofilms: Challenges and Novel Therapeutic Perspectives*. *Antibiotics* 10:131
64. Krepel SA, Wang JM (2019) Chemotactic Ligands that Activate G-Protein-Coupled Formylpeptide Receptors. *International Journal of Molecular Sciences* 20:3426
65. Kristian SA, Birkenstock TA, Sauder U, Mack D, Götz F, Landmann R (2008) Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *The Journal of Infectious Diseases* 197:1028–1035
66. Kristinsson KG (1989) Adherence of staphylococci to intravascular catheters. *Journal of Medical Microbiology* 28:249–257
67. Laarman AJ, Ruyken M, Malone CL, van Strijp JAG, Horswill AR, Rooijackers SHM (2011) *Staphylococcus aureus* Metalloprotease Aureolysin Cleaves Complement C3 To Mediate Immune Evasion. *The Journal of Immunology* 186:6445–6453
68. Le KY, Dastgheyb S, Ho TV, Otto M (2014) Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4:167
69. Le KY, Otto M (2015) Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Frontiers in Microbiology* 6:1174
70. Le KY, Park MD, Otto M (2018) Immune Evasion Mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Infection. *Frontiers in Microbiology* 9:359
71. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C (2013) From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens* 2:288–356
72. Lerch MF, Schoenfelder SMK, Marincola G, Wencker FDR, Eckart M, Förstner KU, Sharma CM, Thormann KM, Kucklick M, Engelmann S, Ziebuhr W (2019) A non-coding RNA from the

- intercellular adhesion (ica) locus of *Staphylococcus epidermidis* controls polysaccharide intercellular adhesion (PIA)-mediated biofilm formation. *Molecular Microbiology* 111:1571–1591
73. Mack D, Siemssen N, Laufs R (1992) Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infection and Immunity* 60:2048–2057
74. 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. *Journal of Bacteriology* 178:175–183
75. Mack D, Riedewald J, Rohde H, Magnus T, Feucht HH, Elsner HA, Laufs R, Rupp ME (1999) Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infection and Immunity* 67:1004–1008
76. Mack D, Rohde H, Dobinsky S, Riedewald J, Nedelmann M, Knobloch JK, Elsner HA, Feucht HH (2000) Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infection and Immunity* 68:3799–3807
77. Mack D, Becker P, Chatterjee I, Dobinsky S, Knobloch JKM, Peters G, Rohde H, Herrmann M (2004) Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *International Journal of Medical Microbiology* 294:203–212
78. Mack D, Davies AP, Harris LG, Rohde H, Horstkotte MA, Knobloch JK-M (2007) Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387:399–408
79. Markiewski MM, Lambris JD (2007) The Role of Complement in Inflammatory Diseases From Behind the Scenes into the Spotlight. *The American Journal of Pathology* 171:715–727
80. Martínez-García S, Rodríguez-Martínez S, Cancino-Díaz ME, Cancino-Díaz JC (2018) Extracellular proteases of *Staphylococcus epidermidis*: roles as virulence factors and their participation in biofilm. *APMIS* 126:177–185
81. Masopust D, Sivula CP, Jameson SC (2017) Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology. *The Journal of Immunology* 199:383–388
82. Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819–826
83. Meier S, Goerke C, Wolz C, Seidl K, Homerova D, Schulthess B, Kormanec J, Berger-Bächi B, Bischoff M (2007) sigmaB and the sigmaB-dependent arlRS and yabJ-spoVG loci affect capsule formation in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 75:4562–4571
84. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O’Grady NP, Raad II, Rijnders BJA, Sherertz RJ, Warren DK (2009) Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 49:1–45
85. Mestas J, Hughes CCW (2004) Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology* 172:2731–2738

86. Miller LM, Clark E, Dipchand C, Hiremath S, Kappel J, Kiaii M, Lok C, Luscombe R, Moist L, Oliver M, MacRae J (2016) Hemodialysis Tunneled Catheter-Related Infections. *Canadian Journal of Kidney Health and Disease* 3:2054358116669129
87. Monk IR, Shah IM, Xu M, Tan M-W, Foster TJ (2012) Transforming the Untransformable: Application of Direct Transformation To Manipulate Genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *mBio* 3:e00277-11
88. Monk IR, Tree JJ, Howden BP, Stinear TP, Foster TJ (2015) Complete Bypass of Restriction Systems for Major *Staphylococcus aureus* Lineages. *mBio* 6:e00308-15
89. Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G, Giannini S, Arciola CR (2011) Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiology* 6:1329–1349
90. Moon JL, Banbula A, Oleksy A, Mayo JA, Travis J (2001) Isolation and Characterization of a Highly Specific Serine Endopeptidase from an Oral Strain of *Staphylococcus epidermidis*. *Biological Chemistry* 382:1095–1099
91. Murphy K, Weaver C, Janeway C (2017) *Janeway's immunobiology*. 9th edition. Garland Science, New York
92. Najar Peerayeh S, Jazayeri Moghadas A, Behmanesh M (2016) Prevalence of Virulence-Related Determinants in Clinical Isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Jundishapur Journal of Microbiology* 9:e30593
93. Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen (2023) Deutsche nationale Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung 2022 Abschlussbericht. URL: https://www.nrz-hygiene.de/files/Projekte/PPS%202022/PPS_2022_Abschlussbericht_Final_Upload.pdf
94. Nguyen HTT, Nguyen TH, Otto M (2020) The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18:3324–3334
95. Oliveira F, Rohde H, Vilanova M, Cerca N (2021) Fighting *Staphylococcus epidermidis* Biofilm-Associated Infections: Can Iron Be the Key to Success? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11:798563
96. Ommen P, Zobek N, Meyer RL (2017) Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. *Journal of Microbiological Methods* 141:87–89
97. Ortega-Peña S, Martínez-García S, Rodríguez-Martínez S, Cancino-Díaz ME, Cancino-Díaz JC (2020) Overview of *Staphylococcus epidermidis* cell wall-anchored proteins: potential targets to inhibit biofilm formation. *Molecular Biology Reports* 47:771–784
98. Otto M (2009) *Staphylococcus epidermidis* — the „accidental“ pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 7:555–567
99. Otto M (2018) Staphylococcal Biofilms. *Microbiology Spectrum* 6:10.1128/microbiolspec.gpp3-0023–2018
100. Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F (2013) Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità* 25:31–42

101. Pätzold L, Brausch A-C, Bielefeld E-L, Zimmer L, Somerville GA, Bischoff M, Gaupp R (2021) Impact of the Histidine-Containing Phosphocarrier Protein HPr on Carbon Metabolism and Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms* 9:466
102. Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (2019) S2k Leitlinie Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen – Update 2018. URL: https://register.awmf.org/assets/guidelines/082-006l_S2k_Parenterale_Antibiotika_2019-08-verlaengert.pdf
103. Pietrocola G, Nobile G, Rindi S, Speziale P (2017) *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7:166
104. Pintens V, Massonet C, Merckx R, Vandecasteele S, Peetermans WE, Knobloch JK-M, Van Eldere J (2008) The role of σ_B in persistence of *Staphylococcus epidermidis* foreign body infection. *Microbiology* 154:2827–2836
105. Potempa M, Potempa J (2012) Protease-dependent mechanisms of complement evasion by bacterial pathogens. *Biological Chemistry* 393:873–888
106. Prax M, Lee CY, Bertram R (2013) An update on the molecular genetics toolbox for staphylococci. *Microbiology* 159:421–435
107. 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
108. Reimer LC, Sarda Carbasse J, Koblitz J, Podstawka A, Overmann J (2023) *Staphylococcus epidermidis* (Winslow and Winslow 1908) Evans 1916. URL: https://bacdive.dsmz.de/index.php?site=pdf_view&id=14529&doi=doi:10.13145/bacdive14529.20230509.8.1
109. Reiter KC, Sant’Anna FH, d’Azevedo PA (2014) Upregulation of *icaA*, *atlE* and *aap* genes by linezolid but not vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 43:248–253
110. Rodriguez Ayala F, Bartolini M, Grau R (2020) The Stress-Responsive Alternative Sigma Factor SigB of *Bacillus subtilis* and Its Relatives: An Old Friend With New Functions. *Frontiers in Microbiology* 11:1761
111. Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, Knobloch JK-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
112. Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, Scherpe S, Davies AP, Harris LG, Horstkotte MA, Knobloch JK-M, Rangunath C, Kaplan JB, 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* 28:1711–1720
113. Rosenbluh A, Banner CD, Losick R, Fitz-James PC (1981) Identification of a new developmental locus in *Bacillus subtilis* by construction of a deletion mutation in a cloned gene under sporulation control. *Journal of Bacteriology* 148:341–351
114. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Bartscht K, Mack D (1999) Characterization of the Importance of Polysaccharide Intercellular Adhesin/Hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the

- Pathogenesis of Biomaterial-Based Infection in a Mouse Foreign Body Infection Model. *Infection and Immunity* 67:2627–2632
115. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Mack D (1999) Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infection and Immunity* 67:2656–2659
 116. Rupp ME, Fey PD, Heilmann C, Götz F (2001) Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *The Journal of Infectious Diseases* 183:1038–1042
 117. Sadykov MR, Hartmann T, Mattes TA, Hiatt M, Jann NJ, Zhu Y, Ledala N, Landmann R, Herrmann M, Rohde H, Bischoff M, Somerville GA (2011) CcpA coordinates central metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 157:3458–3468
 118. Scallan J, Huxley VH, Korthuis RJ (2010) *Capillary Fluid Exchange: Regulation, Functions, and Pathology*. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA)
 119. Schilcher K, Horswill AR (2020) Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 84:e00026-19
 120. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3:1101–1108
 121. Schommer NN, 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
 122. Schulthess B, Meier S, Homerova D, Goerke C, Wolz C, Kormanec J, Berger-Bächi B, Bischoff M (2009) Functional characterization of the σ B-dependent yabJ-spoVG operon in *Staphylococcus aureus*: role in methicillin and glycopeptide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53:1832–1839
 123. Schulthess B, Bloes DA, François P, Girard M, Schrenzel J, Bischoff M, Berger-Bächi B (2011) The σ B-dependent yabJ-spoVG operon is involved in the regulation of extracellular nuclease, lipase, and protease expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 193:4954–4962
 124. Severn MM, Horswill AR (2023) *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. *Nature Reviews Microbiology* 21:97–111
 125. Sharma S, Bhatnagar R, Gaur D (2020) Complement Evasion Strategies of Human Pathogenic Bacteria. *Indian Journal of Microbiology* 60:283–296
 126. Sinha S, Rappu P, Lange SC, Mäntsälä P, Zalkin H, Smith JL (1999) Crystal structure of *Bacillus subtilis* YabJ, a purine regulatory protein and member of the highly conserved YjgF family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:13074–13079
 127. Skovdal SM, Hansen LK, Ivarsen DM, Zeng G, Büttner H, Rohde H, Jørgensen NP, Meyer RL (2021) Host factors abolish the need for polysaccharides and extracellular matrix-binding protein in *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology* 70:001287
 128. Sloot N, Thomas M, Marre R, Gatermann S (1992) Purification and characterisation of elastase from *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology* 37:201–205

129. Stamm J, Weißelberg S, Both A, Failla AV, Nordholt G, Büttner H, Linder S, Aepfelbacher M, Rohde H (2022) Development of an artificial synovial fluid useful for studying *Staphylococcus epidermidis* joint infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12:948151
130. Steixner SJM, Spiegel C, Dammerer D, Wurm A, Nogler M, Coraça-Huber DC (2021) Influence of Nutrient Media Compared to Human Synovial Fluid on the Antibiotic Susceptibility and Biofilm Gene Expression of Coagulase-Negative *Staphylococci* In Vitro. *Antibiotics* 10:790
131. Stiefel P, Rosenberg U, Schneider J, Mauerhofer S, Maniura-Weber K, Ren Q (2016) Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100:4135–4145
132. Tormo MA, Martí M, Valle J, Manna AC, Cheung AL, Lasa I, Penadés JR (2005) SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *Journal of Bacteriology* 187:2348–2356
133. Van de Vyver H, Bovenkamp PR, Hoerr V, Schwegmann K, Tuchscher L, Niemann S, Kursawe L, Grosse C, Moter A, Hansen U, Neugebauer U, Kuhlmann MT, Peters G, Hermann S, Löffler B (2017) A Novel Mouse Model of *Staphylococcus aureus* Vascular Graft Infection: Noninvasive Imaging of Biofilm Development in Vivo. *The American Journal of Pathology* 187:268–279
134. Vuong C, Götz F, Otto M (2000) Construction and Characterization of an agr Deletion Mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity* 68:1048–1053
135. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, Otto M (2004) A Crucial Role for Exopolysaccharide Modification in Bacterial Biofilm Formation, Immune Evasion, and Virulence. *Journal of Biological Chemistry* 279:54881–54886
136. Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR, Otto M (2004) Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cellular Microbiology* 6:269–275
137. Wang R, Khan BA, Cheung GYC, Bach T-HL, Jameson-Lee M, Kong K-F, Queck SY, Otto M (2011) *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 121:238–248
138. Wang Y, Jiang J, Gao Y, Sun Y, Dai J, Wu Y, Qu D, Ma G, Fang X (2018) *Staphylococcus epidermidis* small basic protein (Sbp) forms amyloid fibrils, consistent with its function as a scaffolding protein in biofilms. *The Journal of Biological Chemistry* 293:14296–14311
139. Weaver WM, Milisavljevic V, Miller JF, Di Carlo D (2012) Fluid flow induces biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intracellular adhesin-positive clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 78:5890–5896
140. Weiner-Lastinger LM, Abner S, Edwards JR, Kallen AJ, Karlsson M, Magill SS, Pollock D, See I, Soe MM, Walters MS, Dudeck MA (2020) Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 41:1–18
141. Zienkiewicz A (2017) Wachstumsabhängige Expressionsmusteranalysen von Regulatoren der Biofilmsynthese in *Staphylococcus epidermidis*. Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde, Sektion Medizin. Zentrale Hochschulbibliothek Lübeck, Universität zu Lübeck. URL: <https://www.zhb.uni-luebeck.de/epubs/ediss1917.pdf>

-
142. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H (2006) The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biology* 7:243

7 Publikationen und Kongressbeiträge

Publikation:

- **Benthien H**, Fresenborg B, Pätzold L, Elhawy MI, Huc-Brandt S, Beisswenger C, Krasteva-Christ G, Becker SL, Molle V, Knobloch JK, Bischoff M (2022) The Transcription Factor SpoVG Is of Major Importance for Biofilm Formation of *Staphylococcus epidermidis* under *In Vitro* Conditions, but Dispensable for *In Vivo* Biofilm Formation. *International Journal of Molecular Sciences* 23:3255

Kongressbeitrag:

- 72. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)/6. Gemeinsame Tagung von DGHM und Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 8. – 11. März 2020, Leipzig (persönliche Teilnahme wegen COVID-19-Pandemie nicht möglich)
Abstract 409-MPP: Impact of the transcription factor SpoVG on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* *in vitro* and *in vivo*.
***H. Benthien**¹, B. Jonas², L. Pätzold¹, M. I. Elhawy¹, S. Becker¹, *M. Bischoff¹, J. Knobloch²;
¹Saarland University, Medical Microbiology and Hygiene, Homburg, Germany; ²University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Medical Microbiology, Virology and Hygiene, Hamburg, Germany

8 Dank

Ich danke Herrn Professor Markus Bischoff für die Bereitstellung des interessanten Themas, die stete Bereitschaft zur Diskussion, unzählige Denkanstöße und die lange Unterstützung.

Ich danke Mohamed Elhawy für die Einarbeitung, die stete Diskussionsbereitschaft und für das Interesse an meiner Arbeit.

Linda Pätzold danke ich für die gute Zusammenarbeit im Tierstall und die Beantwortung all meiner Fragen.

Ich danke Karin Hilgert, die mir inner- und außerhalb des Labors stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe für das tolle Arbeitsumfeld während der gemeinsamen Arbeitsstunden.

Ich danke der AG Bals für die angenehme Kooperation und insbesondere danke ich Anja Honecker für die freundliche Einarbeitung.

Ich danke der Arbeitsgruppe von Virginie Molle (Montpellier, Frankreich) für die Partizipation an diesem Projekt und die interessanten Erkenntnisse, die sie beisteuerte.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken für ihre jahrelange Unterstützung und all ihre Hilfe, die zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen hat.

9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.