

**Morphologische und funktionelle Untersuchungen  
zur Biofilmbildung bei dem humanen Pathogen**

*Neisseria meningitidis*

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Martin Lappann**

aus Schleiz

Würzburg, 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Vogel

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## **Erklärungen**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Arbeit hat bisher in gleicher oder ähnlicher Form keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

2003 habe ich den akademischen Grad eines Diplom-Biologen erworben.

Martin Lappann

Würzburg, 20.04.2007

# Gliederung

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Summary.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
3.1. Was ist ein Biofilm.....	5
3.2. Techniken zum Studium von Laborbiofilmen.....	5
3.3. Die Schritte der Biofilmbildung.....	7
3.3.1. Die Anlagerung an die Oberfläche.....	8
3.3.2. Die Mikrokoloniebildung.....	9
3.3.3. Die Biofilmreifung.....	10
3.3.4. Die Biofilmablösung (Detachment).....	11
3.4. Die Biofilmmatrix und die Rolle von Oberflächenstrukturen.....	12
3.5. Der Biofilm und Stress.....	15
3.6. Der Biofilm und Pathogenese.....	17
3.6.1. Die Resistenz bzw. Toleranz von Biofilmen gegenüber Antibiotika.....	17
3.6.2. Biofilme und das Immunsystem .....	20
3.7. Das Trägertum von Meningokokken.....	21
3.8. Tiermodelle bei Meningokokken.....	24
3.9. Das Typ IV-Pilus-System bei Meningokokken.....	25
3.10. Ziele dieser Arbeit.....	28
<b>4. Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
4.1. Geräte und Ausrüstung.....	29
4.2. Verbrauchsmaterialien.....	30
4.3. Chemikalien, Enzyme und Reaktionskits.....	30
4.4. Stammsammlung, Nährmedien, Wachstumsbedingungen, Oligonukleotide und Plasmide.....	32
4.4.1. Nährmedien.....	32
4.4.2. Wachstumsbedingungen.....	34
4.4.3. Bakterienstämme.....	35
4.4.4. Plasmide.....	38
4.4.5. Oligonukleotide.....	40
4.5. Lösungen und Puffer.....	42
4.6. Mikrobiologische und genetische Methoden.....	44

4.6.1. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektroporation.....	44
4.6.2. Elektroporation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	44
4.6.3. Transformation von Meningokokken.....	45
4.6.4. Antibiotische Behandlungen.....	45
4.6.5. Stammkonstruktionen.....	47
4.6.5.1. Inaktivierung von Kapselgenen durch Insertion.....	47
4.6.5.2. Inaktivierung des <i>pilX</i> -Gens durch Insertion.....	48
4.6.5.3. Inaktivierung des <i>pilE</i> -Gens durch Insertion.....	48
4.6.5.4. Markierung von Meningokokken mit Fluoreszenzproteinen.....	49
4.7. Molekularbiologische Methoden.....	50
4.7.1. Isolation von Plasmid-DNA.....	50
4.7.2. Isolation chromosomaler DNA.....	50
4.7.3. Quantifizierung von DNA mittels Absorptionsspektrometrie.....	50
4.7.4. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese.....	50
4.7.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen.....	51
4.7.6. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	51
4.7.7. Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	51
4.7.8. Auffüllen überhängender 5`-DNA-Enden und Abbau überhängender 3`- DNA-Enden.....	52
4.7.9. Glätten von PCR-Produkten.....	52
4.7.10. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren.....	53
4.7.11. Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter DNA-Sonden.....	53
4.7.12. Southern Blot.....	53
4.7.13. DNA-Hybridisierung.....	54
4.7.14. Nachweis DIG-markierter DNA mittels Chemilumineszenz.....	54
4.7.15. PCR.....	55
4.7.16. DNA-Sequenzierung.....	55
4.7.17. RNA-Isolierung.....	56
4.7.18. Qualifizierung von RNA mittels denaturierender Gelelektrophorese.....	56
4.7.19. RT-PCR von NMB0889.....	57
4.8. Proteinbiochemische Methoden.....	57
4.8.1. ELISA.....	57
4.8.2. Immunfluoreszenz von Typ IV-Pili.....	58
4.8.3. Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE.....	60

4.8.4. Western-Blot.....	60
4.8.5. Färbung von Proteinen mit Coomassie-Blau.....	61
4.8.6. Elektroelution von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen mit dem BIOTRAP-System.....	61
4.8.7. Produktion von Antikörpern in Hasen.....	62
4.9. Phänotypische Tests.....	63
4.9.1. Aggregationstest.....	63
4.9.2. Kristallviolett-Test.....	63
4.9.3. Biofilmbildung im Flusszellensystem.....	64
4.9.3.1. Vorbereitung und Inokulation des Flusszellensystems.....	64
4.9.3.2. Konfokal-Mikroskopie und Verarbeitung der Bilder.....	64
4.9.3.3. Statistische Analyse von strukturellen Biofilmparametern.....	65
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>67</b>
5.1. Die Biofilmbildung unter statischen Bedingungen.....	67
5.1.1. Die Biofilmbildung in einem Komplexmedium.....	67
5.1.2. Die Biofilmbildung in Minimalmedien.....	68
5.2. Die Biofilmentwicklung in einem Biofilm-Flusszellensystem.....	69
5.2.1. Die Untersuchung der Biofilmentwicklung mit GFP-markierten Meningokokken.....	69
5.2.2. Die Untersuchung der Biofilmentwicklung mit CFP- und YFP-markierten Meningokokken.....	73
5.3. Die Funktion von PilX für die Biofilmentwicklung und Biofilmarchitektur.....	74
5.3.1. PilX-Mutation, Komplementation und Autoaggregation.....	74
5.3.2. Der Einfluss der PilX-Mutation auf die Architektur der Meningokokkenbiofilme.....	77
5.3.3. Statistische Auswertung des Effekts von PilX auf die Biofilmentwicklung und Biofilmarchitektur.....	77
5.3.4. Die Rolle der <i>Twitching Motility</i> für die Mikrokoloniebildung.....	81
5.3.5. Bestimmung der Anzahl Pili-tragender Diplokokken durch Immunfluoreszenz.....	83
5.3.6. Der Austausch von PilX-Allelen.....	85
5.3.7. Die Biofilmbildung von <i>pilE</i> -Knock-out-Mutanten.....	85
5.4. Die Bestimmung der Suszeptibilität von Meningokokkenbiofilmen gegenüber der Wirkung von Penicillin, Ciprofloxacin und Rifampicin.....	87

5.5. Die DNase-Sensitivität von Meningokokkenbiofilmen.....	92
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>93</b>
6.1. Methodische Voraussetzungen für die Etablierung eines Biofilmmodells für Meningokokken unter Flussbedingungen.....	93
6.2. Die Rolle der Kapsel für die Biofilmbildung.....	95
6.3. Die Biofilmbildung unbekapelter Meningokokken in einem Flusssystem.....	96
6.4. Die Rolle von PilX für die Biofilmarchitektur.....	100
6.5. Die Suszeptibilität von Meningokokkenbiofilmen gegenüber Penicillin, Ciprofloxacin und Rifampicin.....	104
6.6. Die Rolle extrazellulärer DNA für die Biofilmbildung von Meningokokken....	108
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>126</b>
8.1. Abkürzungsverzeichnis.....	126
8.2. Lebenslauf.....	128
8.3. Publikationen.....	129
8.4. Danksagung.....	130

## 1. Zusammenfassung

*Neisseria meningitidis* ist weltweit ein bedeutender Erreger invasiver Infektionen bei Kindern und Heranwachsenden. Der in vielen Ländern niedrigen Inzidenz stehen hohe Raten asymptomatischer Kolonisation des menschlichen Nasopharynx mit Meningokokken gegenüber. Während die Pathogenese durch Meningokokken ausführlich untersucht ist, wurde dem Trägertum von Meningokokken bisher wenig Aufmerksamkeit geschenkt, nicht zuletzt auch wegen des Fehlens eines geeigneten Tiermodells. Kürzlich publizierte Daten lassen die asymptomatische Persistenz von Meningokokken in einem Biofilm-ähnlichen Stadium auf und innerhalb des Tonsillengewebes vermuten. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Etablierung eines Biofilmodells für Meningokokken als ein Modell für asymptomatisches Trägertum. Es wurde zudem die Biofilmbildung von Meningokokken unterschiedlichster klonaler Linien mit dem Ziel untersucht, auf molekularer Ebene die Biofilmbildung bei Meningokokken zu verstehen.

In statischen Biofilmtests konnte gezeigt werden, dass Biofilmbildung eine ubiquitäre Eigenschaft von Meningokokken ist, solange diese keine Kapsel exprimieren. Hierbei war es unerheblich, ob Trägerisolate oder Isolate aus invasiven Meningokokkenerkrankungen untersucht wurden. Durch die Konstruktion fluoreszierender Meningokokkenstämme und die Etablierung eines Minimalmediums konnte für Meningokokken ein standardisiertes Biofilmodell unter Flussbedingungen erstellt werden. Das Flussmodell für Meningokokkenbiofilme erwies sich als äußerst robust und reproduzierbar. Es wurde deutlich, dass Meningokokken Biofilme unterschiedlicher Struktur ausbildeten, die teilweise über 120 Stunden in vitalem Zustand gehalten werden konnten. Die Mehrzahl der Stämme bildete heterogene Biofilme mit distinkten Mikrokolonien aus, während andere Stämme homogene Biofilme ohne Mikrokolonien ausbildeten. Diese strukturellen Unterschiede hatten keinen Effekt auf die Antibiotika-Empfindlichkeit der Biofilme. Es konnte gezeigt werden, dass Meningokokkenbiofilme durch Ciprofloxacin und Rifampicin, nicht aber durch Penicillin im Wachstumsmedium abgetötet werden konnten. Diese Ergebnisse passen zu *in vivo*-Befunden, die zeigen, dass Ciprofloxacin und Rifampicin im Gegensatz zu Penicillin sehr zuverlässig das Trägertum von Meningokokken eradizieren können. Durch die Untersuchung der Biofilmbildung von PilX- und PilE-Mutanten konnte die Bedeutung der *Twitching Motility* für die Mikrokoloniebildung im Meningokokkenbiofilm aufgezeigt werden. Ausgeprägte Motilität führte zu Mikrokoloniebildung, während weitgehend unbewegliche Stämme flache unstrukturierte Biofilme bildeten. In der vorliegenden Arbeit konnte der Verlust der

Mikrokoloniebildung bei der PilX-Mutante durch Reduktion der Piliierung, die zu verminderter Motilität führte, erklärt werden. Autoaggregation der Zellen spielte für die Mikrokoloniebildung keine Rolle, was im Widerspruch zur kürzlich publizierten Rolle von PilX steht. Initiale Schritte der Biofilmbildung bei Meningokokken könnten von extrazellulärer DNA (exDNA) abhängen, da die Zugabe von DNase zur Vorkultur die Biofilmbildung verhinderte, jedoch bestehende reife Biofilme nicht auflöste. Die Funktion, der Mechanismus der Freisetzung, sowie die Menge und Verteilung dieser exDNA in Meningokokkenbiofilmen wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

## 2. Summary

*Neisseria meningitidis* worldwide contributes significantly to childhood and adolescent morbidity and mortality. The low incidence of disease in many countries is in opposition to the high rates of asymptomatic meningococcal colonization of the human nasopharynx. While meningococcal pathogenesis has been studied extensively, only little attention has been paid to meningococcal carriage so far, not least because of the lack of an appropriate animal model. Recently published data lead to the assumption that meningococci persist asymptotically on top of and within tonsillar tissue in a biofilm-like stage. Therefore, the aim of the present study was the establishment of a biofilm model for meningococci as a model for asymptomatic carriage. Biofilm formation of different clonal lineages was investigated to better understand meningococcal biofilm formation on a molecular level.

First experiments using static biofilm assays revealed that biofilm formation is a ubiquitous property of meningococci, as long as no polysaccharide capsule is expressed. In this regard it was irrelevant whether carriage isolates or isolates from invasive meningococcal disease were investigated. By constructing fluorescent meningococcal strains and by establishing a suitable minimal growth medium, a meningococcal biofilm model under standardized flow conditions could be established. The flow model for meningococcal biofilms turned out to be very robust and reproducible. It became apparent that meningococci formed biofilms with different structures, which could partly be maintained in a vital state for more than 120 hours. The majority of strains formed heterogeneous biofilms with distinct microcolonies, while other strains formed homogeneous biofilms without microcolonies. These structural differences had no impact on the antibiotic susceptibility of the biofilms. All meningococcal biofilms were killed by ciprofloxacin and rifampin, but not by penicillin in the growth medium. These results fit to *in vivo*-findings, where ciprofloxacin and rifampin in contrast to penicillin very reliably eradicated meningococcal carriage. By investigating the biofilm formation of PilX and PilE mutants the impact of twitching motility for microcolony formation could be highlighted. Pronounced motility led to microcolony formation, while almost non-motile strains formed flat unstructured biofilms. In the present work the loss of microcolony formation by reduced motility in the PilX mutant could be explained by a reduction of the piliation status. Autoaggregation had no impact on microcolony formation, which is in conflict to the recently published role of PilX. Early steps of meningococcal biofilm formation might depend on extracellular DNA (exDNA) as a matrix substance, since the addition of DNase prevented biofilm formation, but did not dissolve pre-existing mature

biofilms. The function of this exDNA, the mechanism of release, as well as the amount and distribution on meningococcal biofilms will be the subject to further investigations.

### 3. Einleitung

#### 3.1. Was ist ein Biofilm?

Die heutige Definition von Biofilmen hat sich über 30 Jahre lang entwickelt. Zuerst wurde von der Beteiligung „sehr feiner extrazellulärer Polymerfibrillen“, die Bakterien an Oberflächen verankerten, gesprochen (Marshall, 1976). Costerton *et al.* (1978) beobachteten, dass Gemeinschaften angehefteter Bakterien in eine „Glykokalyx“-Matrix eingekapselt waren, die aus Polysacchariden bestand und Adhärenz vermittelte. Dann stellte man fest, dass Biofilme aus Einzelzellen und Mikrokolonien bestehen, die in eine hoch hydratisierte, vorzugsweise anionische Exopolymermatrix eingebettet sind (Costerton *et al.*, 1987). Später wurde hervorgehoben, dass Biofilme an Oberflächen und Grenzflächen sowie aneinander adhären, was die Definition mikrobieller Aggregate und Flocken (flocules) beinhaltet (Costerton *et al.*, 1995). Etwa zeitgleich wurde bemerkt, dass die Adhäsion die Expression von Genen auslöst, die für die Kontrolle der Produktion von für die Adhäsion und Biofilmbildung wichtigen Genen nötig sind (Costerton und Lappin-Scott, 1995). Daher sollte eine neue Definition nicht nur leicht zu analysierende Charakteristika berücksichtigen, wie etwa die irreversible Bindung von Zellen an eine Oberfläche oder Grenzfläche oder die Einbettung in eine Matrix extrazellulärer polymerer Substanzen, die die Zellen selbst produzieren, sondern auch physiologische Eigenschaften dieser Organismen, wie veränderte Wachstumsraten, oder aber auch differentielle Genexpression.

Somit wurden Biofilme letztendlich wie folgt definiert (Übersetzung aus: Donlan und Costerton, 2002): Ein Biofilm ist eine aus Mikroorganismen entstandene sessile Gemeinschaft, die von irreversibel an Oberflächen oder Grenzflächen oder aneinander gebundenen Zellen charakterisiert wird, die in eine von den Zellen selbst produzierte Matrix extrazellulärer polymerer Substanzen eingebettet ist, und die einen veränderten Phänotyp hinsichtlich der Wachstumsrate und der Transkription zeigt.

#### 3.2. Techniken zum Studium von Laborbiofilmen

Biofilmbildung ist schon seit etwa 100 Jahren ein bekannter und beschriebener Aspekt mikrobieller Physiologie, aber Wissenschaftler haben erst seit etwa 30 Jahren begonnen, die molekularen und genetischen Hintergründe zu verstehen. Gründe dafür sind die Fortschritte in

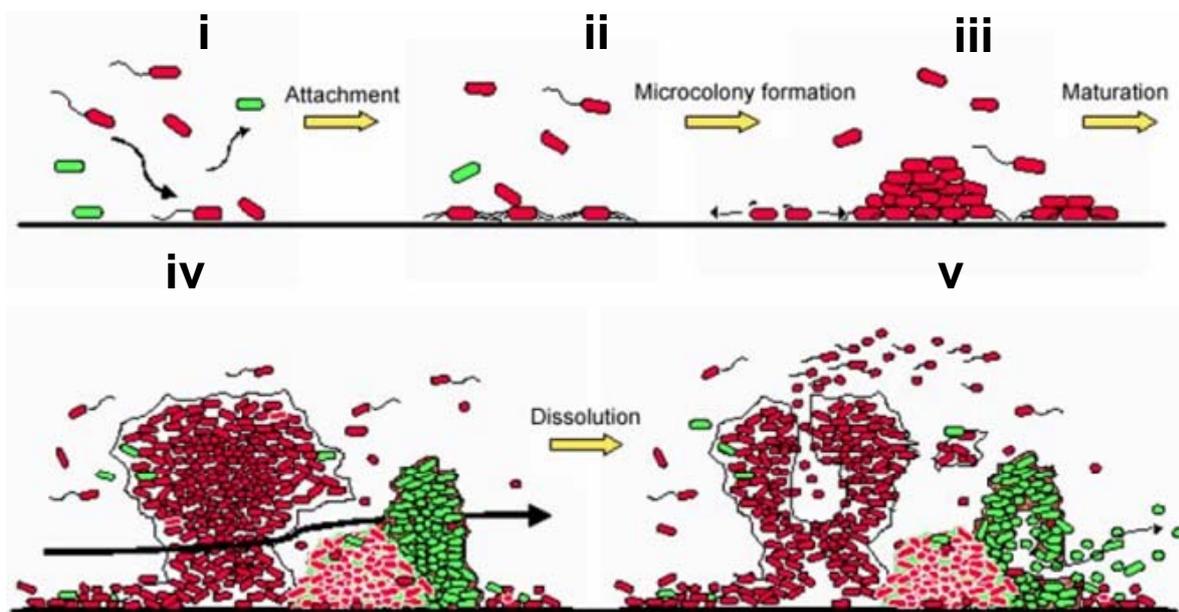
der Molekularbiologie und Mikroskopie, die eine detaillierte *in situ*-Analyse von Biofilmgemeinschaften ermöglichen. Etwa vor 15 Jahren konnten mit dem Einsatz der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) erstmals lebende, vollständig hydratisierte Biofilme dreidimensional dargestellt werden. Diese Analysen zeigten die komplexe Struktur der Biofilme mit „Towers“ und „Mushrooms“, sowie Wasserkanälen und Viadukten zur Nährstoff- und Sauerstoffversorgung (Lawrence *et al.*, 1991). Verschiedenste Biofilm-erzeugende experimentelle Systeme wurden und werden gebraucht, um die Biologie von Biofilmen zu studieren. Ein weit verbreitetes Modell zum Studium von Biofilmen im kontinuierlichen Mediumsfluss ist das Flusszellen-System, in dem die Bakterien an einer Glasoberfläche wachsen (Christensen *et al.*, 1999). Der große Vorteil dieses Systems ist, dass es in Kombination mit Fluoreszenz-Techniken und CLSM eine nicht-destruktive Beobachtung und Bildgebung der Biofilme erlaubt. Ein weiteres nützliches wie einfaches System ist der Mikrotiterplatten-Test, der prinzipiell eine Flüssigkultur ohne Fluss oder andere Scherkräfte darstellt (O'Toole *et al.*, 1999). Dieses System ist für Hochdurchsatz-Experimente zur Identifikation der an der Biofilmbildung beteiligten Gene geeignet. Hierbei wird suspendierten Zellen die Ansiedlung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten ermöglicht. Die nicht adhärennten Zellen werden entfernt, und die angeheftete Biomasse kann mittels Kristallviolett gefärbt werden. Der Pellicle (Pellikula)-Biofilm, der an der Grenzfläche zu Luft in Flüssigkultur wächst, ist ein weiteres Biofilmmodellsystem (Branda *et al.*, 2001; Friedman und Kolter, 2001). Das Fehlen einer festen Oberfläche, auf der der Biofilm initiiert wird, verlangt ein höheres Maß an Selbstorganisation der beteiligten Zellen. Das Fehlen eines schnellen Flüssigkeitsflusses erlaubt die Bildung komplexerer Strukturen. Bakterienkolonien auf durch Agar verfestigten Nährmedien, die eigentlich die bekanntesten Biofilme im Labor darstellen, werden gerade erst als die praktischste Form zur Untersuchung von Biofilmen erkannt. Diese Kolonien variieren sehr stark in ihren Morphologien, mit einer sehr hohen Sensitivität gegenüber Veränderungen der Zelloberfläche und der Produktion von für die Biofilmbildung relevanten Oberflächenkomponenten (Branda *et al.*, 2005; Kjaergaard *et al.*, 2000; Römling *et al.*, 1998). Einer der wichtigsten Fortschritte in der Erforschung von Biofilmen war die Einbeziehung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) in Kombination mit CLSM, die die Identifizierung und Visualisierung individueller Spezies in komplexen Gemeinschaften ermöglichte (Christensen *et al.*, 2002; Möller *et al.*, 1998). Die Expression von Fluoreszenzproteinen, wie das grün, rot, blau oder gelb fluoreszierende Protein (GFP, RFP, CFP, YFP) in Bakterien erlaubt die nicht-destruktive Beobachtung bakterieller Interaktionen und Dynamik (Chalfie *et al.*, 1994; Klausen *et al.*, 2003; Prigent-

Combaret *et al.*, 1999; Tolker-Nielsen *et al.*, 2000). Fluoreszenzprotein-basierte molekulare Reporter können für die *in situ*-Darstellung der Aktivität einzelner Promotoren auf Einzelzellniveau verwendet werden (Andersen JB *et al.*, 2001; Bagge *et al.*, 2004; Hentzer *et al.*, 2002; Sternberg *et al.*, 1999). Es wurden GFP-Moleküle mit unterschiedlicher Stabilität konstruiert (Andersen JB *et al.*, 1998). Instabile Varianten des GFP können in Reportersystemen zum Dokumentieren zeitlicher Veränderungen im Wachstumsverhalten in Biofilmen bis auf Einzelzellebene genutzt werden (Christensen *et al.*, 2002, Sternberg *et al.*, 1999).

### 3.3. Die Schritte der Biofilmbildung

Es wurde schon frühzeitig erkannt, dass Biofilmbakterien, verglichen mit planktonisch „frei schwimmenden“ Bakterien, eine fundamental andere Physiologie besitzen, und es wird schrittweise immer deutlicher, dass die meisten Bakterien Biofilme als Teil ihres Lebenszyklus bilden (Übersicht in: Costerton *et al.*, 1995; Davies *et al.*, 1993; Übersicht in: Kolter, 2005). Während gemischte Biofilme mehrerer Spezies in der Natur weit verbreitet sind, stehen Monospezies-Biofilme eher im Mittelpunkt des Interesses, da diese beim Menschen durch die Besiedlung von Geweben, Kathetern und Implantaten persistierende und schwierig zu behandelnde Infektionen hervorrufen (Übersicht in: Costerton *et al.*, 1999). Zudem reduziert das Studium nur einer Spezies die Komplexität des Systems. Die prominentesten Modellorganismen zur Erforschung von Monospezies-Biofilmen sind die gramnegativen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* und *Escherichia coli* und die grampositiven Bakterien *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Bacillus subtilis*. Der am besten studierte gramnegative Biofilmbildner ist *Pseudomonas aeruginosa*, ein weit verbreitetes opportunistisches Pathogen, das meist immunsupprimierte Menschen oder Patienten mit zystischer Fibrose (CF) befällt, bei denen die Besiedlung der Lunge einen negativen prognostischen Faktor darstellt (Gilligan, 1991; Tümmler und Kowitz, 1999). Eine der heute noch nicht geklärten Streitfragen ist, ob Biofilmbildung einen Entwicklungsprozess darstellt, ähnlich der Fruchtkörperentwicklung bei *Myxococcus xanthus* (Übersicht in: Kaiser, 2004) oder der Sporenbildung bei *Bacillus subtilis* (Übersicht in: Piggot und Hilbert, 2004), mit einer Kaskade von nacheinander exprimierten Genen, oder nur eine Anpassung an gerade vorliegende (Stress-) Bedingungen ist (Übersicht in: Kolter, 2005; O'Toole *et al.*, 2000). Nichtsdestotrotz ist durch die Untersuchung der Modellorganismen klar geworden, dass an Oberflächen gebundene Populationen von Bakterien eine phänotypische Akklimatisierung

zeigen: Das bedeutet, dass ein Organismus als Antwort auf die ihn umgebenden Einflüsse Aspekte seines Verhaltens oder seines Metabolismus ändert. Es hat sich ein weithin akzeptiertes Modell der Biofilmbildung etabliert, das die schrittweise Differenzierung erklärt, die zur Biofilmbildung führt. Dieser Prozess umfasst 5 diskrete Schritte (Abb. 1): (i) Die initiale reversible Anlagerung an eine Oberfläche, (ii) die irreversible Anlagerung, (iii) die Proliferation und Bildung von Mikrokolonien, (iv) die Biofilmreifung und (v) die Loslösung (Detachment) und Streuung (Dispersal) von Zellen des Biofilms (Übersicht in: Davey *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2002; Stoodley *et al.*, 2002; Abbildung 1)



**Abb. 1.** Schritte der Biofilmbildung (mit freundlicher Erlaubnis von Susse Kirkelund Hansen, DTU, Lyngby, Dänemark).

### 3.3.1 Die Anlagerung an die Oberfläche

Die reversible Bindung planktonischer Zellen an ein Substratum kann durch zufällige Kollision oder durch aktive Bewegung hervorgerufen werden. Beide Prozesse müssen die Abstoßungskräfte überwinden, die zwischen den Zelloberflächen und der Oberfläche des Substratums herrschen. Entweder eine Zelle exprimiert kompatible adhäsive Oberflächenkomponenten, die zu einer sofortigen irreversiblen Bindung an die Oberfläche führen, oder nach Wahrnehmung der Oberfläche oder spezifischer Umweltbedingungen führt eine regulatorische Kaskade zur Expression extrazellulärer Faktoren oder Organellen, die eine irreversible Bindung ermöglichen (Beloin *et al.*, 2004; Prigent-Combaret *et al.*, 2001; Stanley und Lazazzera, 2004). Ein Beispiel ist das Zweikomponentensystem EnvZ/OmpR in *E. coli*,

das eine Rolle bei der stabilen Zell-Oberfläche-Bindung als Antwort auf erhöhte Osmolarität spielt. Durch eine regulatorische Kaskade unterstützt der phosphorylierte OmpR-Regulator eine verbesserte Bindung durch die Aktivierung von für die Bildung von Curlies und Zellulose benötigten Genen (Prigent-Combaret *et al.*, 1999; 2000; 2001). Gen- und Proteinexpressionsanalysen bei *Pseudomonas putida* demonstrierten globale Änderungen der Genexpression und Physiologie sechs Stunden nach Anheftung an eine Silikonoberfläche. Interessanterweise waren Gene nach der initialen Anheftung herunterreguliert, die in die Flagellumsynthese involviert sind, während Gene hochreguliert waren, die in die Typ IV-Pilus- und Lipopolysaccharidbiosynthese involviert sind (Sauer und Camper, 2001). Typ IV-Pili werden von Bakterien zur Anheftung und für die so genannte *Twitching Motility* genutzt. Bisher wurden zahlreiche Oberflächenstrukturen zur Anheftung an Oberflächen gefunden. Beispielhaft sind hier Flagellen, Fimbrien, Pili, Curli-Fibern, Membranproteine und das Lipopolysaccharid (LPS) zu nennen (Davey und O'Toole, 2000; Donlan und Costerton, 2002; Makin und Beveridge, 1996; Pratt und Kolter, 1998). Die Umweltbedingungen variieren zwischen verschiedenen Organismen erheblich, die die Transition von planktonischem zu oberflächengebundenem Leben induzieren. Einige Umweltsignale, die die Anheftung an Oberflächen beeinflussen, sind die Art der Oberfläche (biotisch, abiotisch), die Osmolarität, der pH-Wert, die Verfügbarkeit von Eisen, der Sauerstoffpartialdruck und die Temperatur (Fletcher, 1996; Nyvad und Kilian, 1990; O'Toole und Kolter, 1998a; O'Toole und Kolter, 1998b; Pratt und Kolter, 1998). Es scheint, dass jede Spezies eigene Mechanismen abhängig von der Spezialisierung und dem bevorzugten Habitat entwickelt hat. Zudem scheint eine Spezies in der Lage zu sein, verschiedene Strategien für die initiale Anheftung, je nach Art der zu besiedelnden Oberfläche, zu nutzen (O'Toole und Kolter, 1998; Watnick *et al.*, 1999).

### **3.3.2. Die Mikrokoloniebildung**

Nach Anlagerung an das Substratum beginnen die Zellen sich zu teilen, wobei die Mikrokolonien meist durch klonales Wachstum entstehen (Klausen *et al.*, 2003; Sauer *et al.*, 2002; Tolker-Nielsen *et al.*, 2000). Mikrokolonien oder Zellcluster können als die Grundeinheit des Biofilms angesehen werden (Übersicht in: Costerton *et al.*, 1995), obwohl das wahrscheinlich eine Vereinfachung ist. Die Bildung stabiler Verbindungen von Zellen mit einer Oberfläche sind nicht ausreichend zur Bildung von Mikrokolonien, es muss auch stabile Zell-Zell-Interaktionen geben, die die Mikrokolonien zusammenhalten (Reisner *et al.*, 2003). Diese Interaktionen können durch Adhäsine in der äußeren Membran, wie z.B.

Adhäsionsproteine oder Zellanhänge, und durch extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), wie etwa Exopolysaccharide oder DNA, hervorgerufen werden. Die Aggregation von Zellen zu Mikrokolonien oder das Streuen von Zellen auf der Oberfläche kann durch Motilität von auf der Oberfläche gebundenen Zellen begünstigt werden. Für *Pseudomonas aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass Typ IV-Pili-getriebene *Twitching Motility* sowohl die Aggregation als auch die Streuung von Zellen, in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen, vermittelt (Heydorn *et al.*, 2002; Klausen *et al.*, 2003; O'Toole und Kolter, 1998). Der globale Kohlenstoff-Metabolismus-Regulator Crc aktiviert die Transkription von *pilA*, das die Pilus-Untereinheit bei *Pseudomonas aeruginosa* darstellt. Crc-Knock-out-Mutanten sind nicht in der Lage, nach der initialen Anheftung Mikrokolonien bilden zu können (O'Toole *et al.*, 2000). Für *Pseudomonas aeruginosa* konnte im Flusssystem mit Glucose als Kohlenstoffquelle gezeigt werden, dass sich die Zellen in eine migrierende und eine nicht migrierende Subpopulation aufspalteten. Die nicht migrierende Subpopulation bildete Mikrokolonien (die Stiele) durch klonales Wachstum. Die migrierende Subpopulation wanderte dann durch *Twitching Motility* auf die Stiele und bildete die „Kappe“ (Klausen *et al.*, 2003). Wenn man anstelle von Glucose Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle verwendete, waren die Biofilme flach, da nun die ganze Population motil war und streute (Heydorn *et al.*, 2002; Klausen *et al.*, 2003). Der Einfluss von Oberflächenstrukturen und Faktoren auf die initiale Anheftung und Mikrokoloniebildung ist für einige Spezies gut untersucht. Die Umweltsignale und die dadurch induzierten regulatorischen Kaskaden sind noch weitestgehend unbekannt, die entweder zu Biofilmbildung führen oder planktonisches Wachstums hervorrufen. Schritt für Schritt wird aber immer ersichtlicher, dass diese Faktoren eine entscheidende Rolle für die Biofilmbildung spielen (Stanley und Lazazerra, 2004).

### 3.3.3. Die Biofilmreifung

Es ist möglich, dass sich die Mikrokolonien mit der Zeit zu sehr komplexen, heterogenen, hoch strukturierten Biofilmen entwickeln. Dieser Prozess wird als Biofilmreifung bezeichnet. Es gibt eine große Diversität in den Biofilmstrukturen. Diese Strukturen reichen von hoch komplexen, heterogenen Strukturen bis zu ebenen, homogenen Strukturen. Die Mikrokolonien können zu einer Reihe von Formen auswachsen, welche dann bildlich als Pilze (Mushrooms), Pfeiler (Pillars) oder Sphären (Spheres) bezeichnet werden und von Wasserkanälen und Poren durchzogen sind (Übersicht in: Costerton *et al.*, 1995; Klausen *et al.*, 2003; Lawrence *et al.*, 1991; Wolfaardt *et al.*, 1994). Die nun Oberflächen-assozierte

Population wird in extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) eingebettet. Diese aus EPS bestehende Matrix ist entscheidend mitverantwortlich für die Bildung und Aufrechterhaltung der Biofilmstrukturen (Übersicht in: Sutherland, 2001). Die resultierende Biofilmstruktur ist außerdem abhängig von den Eigenschaften des sie umgebenden physikochemischen Systems. Hier sind die Flussrate (Scherkräfte), die Temperatur und die Art und Konzentration von Nährstoffen, zusätzlich zum genetischen Repertoire der siedelnden Organismen, zu nennen (Übersicht in: Costerton *et al.*, 1995; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Die Rolle der Poren und Kanäle ist schon recht frühzeitig untersucht worden. Es konnten Konvektionsströme durch diese Kanäle nachgewiesen werden (Stoodley *et al.*, 1994). Diese Konvektionsströme gewährleisten den Transport von Nährstoffen und Sauerstoff in und den Abtransport von Abfallprodukten aus tieferen Schichten des Biofilms. Dieser Prozess ist wesentlich effektiver, als es einfache Diffusion sein kann. Damit kann dieses Verteilungssystem einen tiefgreifenden Einfluss auf die mikrobielle Aktivität und die physikochemischen Verhältnisse der Mikroumwelt ausüben (Stoodley *et al.*, 1999). Nichtsdestotrotz ist oft der Transport von Nährstoffen und Sauerstoff in den sehr dicht gepackten Mikrokolonien durch Diffusion limitiert, was zur Ausbildung von Gradienten und Mikromilieus führen kann (Costerton *et al.*, 1994; Korber *et al.*, 1993; Vroom *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1998).

#### **3.3.4. Die Biofilmablösung (Detachment)**

Der letzte Schritt im Biofilm-„Zyklus“ ist das Ablösen und Streuen von Zellen aus dem Biofilm. Während den initialen Schritten des Anlagerns und des anschließenden Wachstums bisher viel Aufmerksamkeit geschenkt wurde, ist nur wenig über die Ablöseprozesse des Biofilms bekannt. Dieses Phänomen wird als sehr wichtig für das Streuen pathogener Bakterien (Übersicht in: Hall-Stoodley und Stoodley, 2005) im Körper des Wirtes für die Besiedlung neuer Habitate angesehen. Biofilmablösung kann ein unspezifischer Erosionsprozess sein, der von externen Störeinflüssen wie Scherkräften verursacht wird. Die Ablösung kann ein aktives Verlassen des Biofilms darstellen, das man als Streuen (Dispersal) oder Auflösung (Dissolution) bezeichnet (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Parsek und Greenberg, 2005; Sauer *et al.*, 2002). Faktoren der äußeren Membran und extrazelluläre Polysaccharide sind am Zusammenhalt der Zellen beteiligt. Deshalb könnte es notwendig sein, dass diese Komponenten degradiert werden oder sich die Zellen von diesen Bindesubstanzen lösen müssen. Demzufolge konnte eine Beteiligung EPS degradierender Enzyme und endogen produzierter Proteasen an der Biofilmauflösung gefunden werden (Boyd *et al.*, 1994; Kaplan

*et al.*, 2003a; Kaplan *et al.*, 2003b; Lee *et al.*, 1996). Biofilmstreuung ist als Antwort auf Veränderungen in der Umwelt, wie z.B. die Erschöpfung von Nährstoffen oder Veränderungen der Nährstoffzusammensetzung, beschrieben worden (Gjermansen *et al.*, 2005; Hunt *et al.*, 2004; Sauer *et al.*, 2004; Thormann *et al.*, 2005). Für Biofilmpopulationen bei *Pseudomonas fluorescens* konnten Reaktionen auf Sauerstoff-, Stickstoff- und Glucosemangel gezeigt werden (Allison *et al.*, 1998; Delaquis *et al.*, 1989; Wrangstadh *et al.*, 1988). In Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 konnten hohle Zellcluster gezeigt werden, denen basierend auf Computermodellen Nährstoffmangel zugeschrieben wurde (Hunt *et al.*, 2004). Weiterhin war das Streuen in Biofilmen unter kontinuierlichen Flussbedingungen durch eine Erhöhung der Verfügbarkeit der Kohlenstoffquelle induziert worden (Sauer *et al.*, 2004).

### **3.4. Die Biofilmmatrix und die Rolle von Oberflächenstrukturen**

Als einen integralen Bestandteil der Biofilmreifung produzieren die Zellen eine extrazelluläre Matrix, die zur endgültigen Biofilmarchitektur beiträgt. Besonders unter dem Einfluss hoher Scherkräfte, wie etwa unter Flussbedingungen, ist die Produktion von Adhäsion-artigen Faktoren unerlässlich, um eine an Oberflächen gebundene Population von Zellen zu etablieren. Die Schlüsselkomponenten der Biofilmmatrix sind extrazelluläre Polysaccharide oder Proteine (Übersichten in: Stewart und Costerton, 2001; Sutherland, 2001). Es wurde aber auch die Wichtigkeit extrazellulärer DNA als Bestandteil der Biofilmmatrix dargestellt (Nemoto *et al.*, 2003; Whitchurch *et al.*, 2002). Die komplexe Einbettung (Matrix) ist meist sehr stark hydratisiert und kann u. U. auch Überreste lysierter Zellen (Webb *et al.*, 2003) oder Membranvesikel enthalten (Übersicht in: Beveridge *et al.*, 1997), die während des Wachstums von Zellmembranen abgeschnürt (blebbing) wurden. Die Analyse der Komponenten hat eine enorme Komplexität der Matrixzusammensetzung, und somit auch der chemischen und physikalischen Eigenschaften, erkennen lassen. Es ist hervorzuheben, dass die meisten bisher untersuchten Organismen in der Lage sind, über verschiedene Wege EPS produzieren. Dies wurde dadurch deutlich, dass Biofilm-defiziente Phänotypen schon durch subtile Veränderungen der Umweltbedingungen überwunden werden konnten (Kierek und Watnick, 2003; O'Toole und Kolter, 1998; Wang *et al.*, 2004). Es gibt immer mehr genetische Belege, die darauf hindeuten, dass individuelle Stämme mehrere verschiedene Exopolysaccharide, wie im Fall von *Pseudomonas aeruginosa*, produzieren können. Ursprünglich wurde bei dieser Spezies Alginate als Hauptbestandteil der Biofilmmatrix betrachtet. Neuere Befunde

offenbaren zwei Kohlenhydrat-reiche Polymere, das Glucose-reiche PEL (pellicle formation)-Polymer (Friedman und Kolter, 2004a) und das Mannose-reiche PSL (polysaccharide locus)-Polymer (Friedman und Kolter, 2004b; Jackson *et al.*, 2004), die ebenfalls wichtiger Bestandteil der Matrix sein können. Die Biofilmmatrix spielt eine wesentliche Rolle als Rückgrat oder Gerüst des Biofilms. Sie kann aber daneben noch eine ganze Reihe weiterer Funktionen ausüben. Die Matrix kann beispielsweise als Reservoir akkumulierter Nährstoffe oder Enzyme dienen, die zur Abwehr antimikrobieller Angriffe dienen. Letzteres wurde für *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt. Hier konnte sekretierte Katalase den Biofilm vor dem vollständigen Eindringen von Wasserstoffperoxid bewahren (Stewart *et al.*, 2000). Die Biofilmmatrix kann wirksam vor der Wirtsabwehr, wie etwa der Phagozytose durch Polymorphnukleäre Leukozyten, schützen (Vuong *et al.*, 2004). Innerhalb der letzten Jahre wurden Polysaccharide sowohl aus natürlichen als auch aus Laborbiofilmen isoliert und chemisch charakterisiert. Einige dieser Polysaccharide scheinen weiter verbreitet zu sein als ursprünglich angenommen. Beispielhaft ist hier das *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA) zu nennen (Heilmann *et al.*, 1996; Mack *et al.*, 1996). Zusätzlich zu *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* wurden Analoga dieses Polymers auch in einigen anderen gramnegativen Spezies, wie *Escherichia coli* (Wang *et al.*, 2004) und *Yersinia pestis* gefunden (Darby *et al.*, 2002). Die Produktion des PIA, das signifikant zur Virulenz beiträgt, unterliegt der Phasenvariation (Ziebuhr *et al.*, 1999). Dessen Synthese wird aber ebenso durch verschiedene Umweltfaktoren, wie die Art der Kohlenstoffquelle (Mack *et al.*, 1992) oder Stress durch die Limitierung der Verfügbarkeit von Eisen (Deighton und Borland, 1993) oder Sauerstoff (Cramton *et al.*, 2001), bestimmt. Ein weiteres wichtiges Polysaccharid bei der Oberflächenkolonisierung ist Zellulose, das ein Polymer aus  $\beta$ -1,4-glykosidisch verbundenen Glucosemonomeren darstellt. Eine Reihe von Bakterien-Spezies ist in der Lage, Zellulose zu produzieren. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Zellulose eine bedeutende Rolle für die Biofilmbildung oder multizelluläres Verhalten bei *Salmonella typhimurium* (Zogaj *et al.*, 2001), *Salmonella enteridis* (Solano *et al.*, 2002) und *Escherichia coli* (Zogaj *et al.*, 2001) spielt. Bei *Vibrio cholerae* wird das VPS (Vibrio Polysaccharide Synthesis)-Polysaccharid, das Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix ist, durch die *vps*-Gene kodiert, welche durch VpsR reguliert werden (Yildiz *et al.*, 2001; Yildiz *et al.*, 1999). Neben Polysacchariden wurde auch die Bedeutung verschiedenster Proteine für die Integrität des Biofilmmatrixskeletts nachgewiesen. Diese beinhalten Adhäsine der äußeren Membran, wie z.B. verschiedene Arten Pili, Flagellen, Curli und Fimbrien (Danese *et al.*, 2000; Ghigo, 2001; O'Toole *et al.*, 2000; Pratt und Kolter, 1999; Reisner *et al.*, 2003; Römling und Rohde, 1999; Vidal *et al.*, 1998).

Diese Strukturen stabilisieren den Biofilm durch Vermittlung von Zell-Zell- und Zell-Substratum-Interaktionen. Wie bereits erwähnt, existieren oft alternative Wege für die Biofilmbildung innerhalb einer Spezies. Einige Adhäsine könnten somit für bestimmte Bedingungen von Bedeutung sein, während sie für andere Bedingungen keine Rolle spielen (Sheikh *et al.*, 2001). Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass F-Plasmid-Konjugationspili die Funktion anderer für die Biofilmbildung nötiger Faktoren übernehmen konnten (Reisner *et al.*, 2003). In einigen Fällen können diese Proteinfaktoren an Motilität auf dem Substratum und an der strukturellen Koordination beteiligt sein, wie es etwa für *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben wurde (Klausen *et al.*, 2003a Klausen *et al.*, 2003b; O'Toole *et al.*, 1998).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Biofilmmatrix ist das Lipopolysaccharid (LPS). LPS-Moleküle bestehen aus 3 Domänen: (i) dem hydrophoben Lipid A, das das Molekül in der äußeren Membran verankert, (ii) dem Oligosaccharid-Kern und (iii) dem terminalen immunogenen O-Polysaccharid (O-Antigen) (Rocchetta *et al.*, 1999). LPS ist für die Interaktion mit der Umwelt wichtig, besonders als Virulenzdeterminante in Bakterium-Wirt-Interaktionen (Lerouge *et al.*, 2002). Das endständige O-Antigen ist schon viele Jahre in Bezug auf Immunogenität und Serotyp-Spezifität untersucht worden, jedoch wurde dessen Bedeutung für die Biofilmbildung in aquatischen Systemen bisher wenig beleuchtet, obwohl LPS durchaus eine Rolle spielt (Flemming *et al.*, 1998; Kiersek *et al.*, 2003; Rocchetta *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2001; Williams und Fletcher, 1996). *Vibrio cholerae* kann *vps*-unabhängig unter Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  Meerwasserbiofilme bilden (Kiersek und Watnick, 2003), wobei sich das O-Antigen als essentiell herausgestellt hat (Kiersek *et al.*, 2003). In einer Arbeit wurde der pathogene *Pseudomonas aeruginosa*-Serotyp O6 und dessen O-Antigen-Nullmutante untersucht. Diese Spezies besitzt zwei verschiedene Typen von O-Antigenen, die als A-Bande und B-Bande bezeichnet werden, und die zu einem hydrophoberen bzw. hydrophileren Charakter der Zelloberfläche beitragen. Mutanten, denen ein (A+B-) oder beide Antigene (A-B-) (man nennt diese LPS-Mutanten wegen der rauen Koloniemorphologie raue LPS-Phänotypen) fehlten, bildeten voluminösere ausgedehntere Biofilme als der Wildtyp aus (Flemming *et al.*, 1998; Rocchetta *et al.*, 1999). Vermutlich bilden *Pseudomonas aeruginosa*-Zellen Biofilme in den Lungen von CF-Patienten (Lam *et al.*, 1980). Interessanterweise macht *Pseudomonas aeruginosa* während der Infektion in den Lungen von CF-Patienten phänotypische Veränderungen durch, die zumindest teilweise einem Verlust des B-Banden-O-Antigens geschuldet sind, wenngleich der Selektionsvorteil des Fehlens der B-Bande noch unklar ist (Knirel *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 1989).

### 3.5. Der Biofilm und Stress

Während des Biofilmwachstums können Zellen innerhalb von Mikrokolonien bzw. in tieferen Schichten Nährstoffmangel ausgesetzt sein, der durch begrenzte Diffusion in die Mikrokolonien und die metabolische Aktivität der Nachbarzellen entsteht. Das führt zur Ausbildung von chemischen Gradienten und verschiedenen Mikromilieus in Biofilmen (Übersicht in: Costerton *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1998). Sauerstoff ist einer der Faktoren, der oft als limitierend für die Entwicklung aerober Biofilme angenommen wird. Ein heterogenes Biofilmmilieu mit Zonen des Sauerstoffmangels ist schon in verschiedenen Biofilmsystemen beschrieben worden (Borriello *et al.*, 2004; Sauer *et al.*, 2002; Werner *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 1998). In Übereinstimmung damit konnte in globalen Genexpressionsstudien von Biofilmen gezeigt werden, dass Gene differentiell im Biofilm exprimiert wurden, die durch Sauerstoffmangel induziert werden (Prigent-Combaret *et al.*, 1999b; Schembri *et al.*, 2003). Xu *et al.* (1998) konnten für *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilme dokumentieren, dass die aktive Proteinsynthese an die Sauerstoffverfügbarkeit gekoppelt war, und dass der Sauerstoff lokal aufgebraucht war. In letzter Zeit hat sich das Interesse auf die Sauerstoffverfügbarkeit und andere Nährstofflimitierungen gerichtet, die möglicherweise bestimmte Aspekte der Biofilmphysiologie erklären können, wie etwa die reduzierte Suszeptibilität gegenüber antimikrobiellen Substanzen (Anderl *et al.*, 2003; Borriello *et al.*, 2004; Walters *et al.*, 2003). Diese Untersuchungen suggerieren, dass Sauerstofflimitierung zur Toleranz gegen Antibiotika unterschiedlicher Klassen wie Ampicillin, Ciprofloxacin, Tobramycin, Chloramphenicol oder Tetracyclin im verwendeten Koloniebiofilmmodell beiträgt. Die Bildung von Nährstoffgradienten und Mikromilieus während der Biofilmreifung führt unvermeidlich zu metabolischer Differenzierung und zur Bildung von bakteriellen Subpopulationen. Verschiedene Arbeiten haben das räumliche Muster der zellulären Aktivität in Biofilmen durch die Messung des DNA-, RNA- oder rRNA-Gehaltes (Poulsen *et al.*, 1993; Wentland *et al.*, 1996), und durch die Darstellung der *in situ*-Gen- und Proteinexpression untersucht (Huang *et al.*, 1998; Sternberg *et al.*, 1999; Werner *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2000). Globale Genexpressionsstudien suggerieren, dass während des Biofilmwachstums und der Biofilmreifung die Biofilmpopulation in einen Zustand wechselt, der der stationären Phase ähnelt. In *E. coli* beinhaltet ein bedeutender Teil der Biofilm-Reaktion stationäre Phase-induzierte Gene (Beloin *et al.*, 2004; Schembri *et al.*, 2003). Bei *Bacillus subtilis* waren mehr als die Hälfte der Gene mit bekannter Funktion, die durch Biofilmbildung induziert waren, ebenso durch Sporulation aktiviert, die durch Hungern induziert wird (Ren *et al.*,

2004). Es ist schon seit längerem bekannt, dass in Biofilmen lebende Bakterien hartnäckiger gegenüber externem Stress sind, als ihre planktonisch wachsenden Pendanten. Daher hat es große wissenschaftliche Anstrengungen zur Aufklärung dieser Mechanismen gegeben, die zu erhöhter Persistenz führen. Die Stationäre Phase-Biofilmphysiologie ist als ein Mechanismus für erhöhte Resistenz gegenüber manchen Antibiotika erkannt worden, weil planktonisch lebende Zellen der Stationären Phase ebenfalls resistenter gegen manche Antibiotika als vergleichbare planktonisch wachsende Zellen waren (Fux *et al.*, 2004; Fux *et al.*, 2005; Spoering *et al.*, 2001). Bakterien innerhalb des Biofilms entwickeln verschiedenste Stressreaktionen. Diese beinhalten DNA-Reparatur-, SOS-, Hitzeschock- und Oxidationsstress-Reaktion (Beloin *et al.*, 2004; Otto *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2004; Sauer *et al.*, 2002). Die Adaption an eine stressvolle Umwelt ist ein aktiver Prozess, da das Anschalten der Stressreaktionsgene das Umschalten zu einem toleranteren Phänotyp vermittelt (Boaretti *et al.*, 2003; Novick 2003; Rayner *et al.*, 1998).

Die oben dargelegten Ergebnisse demonstrieren, dass das Biofilmmilieu sehr heterogen sein kann. Das beinhaltet die Ausbildung von Nährstoffgradienten und die phänotypische Differenzierung in verschiedene Subpopulationen. Obwohl die Aktivität von Einzelzellen oder Subpopulationen innerhalb des Biofilms variiert, wird trotzdem deutlich, dass der Biofilm ein Leben unter stationäre Phase-Bedingungen darstellt, das mit der Entwicklung von Stress-Antworten als Reaktion auf das sessile Leben auf Oberflächen einhergeht (Xu *et al.*, 2001). Die Konsequenz aus dem Leben der Bakterien unter Stress- und Hungerbedingungen im Biofilm könnte eine höhere Mutationsrate sein, die schlussendlich zu einer schnellen Bildung und Selektion genetischer Varianten führen kann. Es gibt Modellsysteme, die Stressbedingungen nachahmen sollen, denen Bakterien in natürlichen, strukturierten Umwelten ausgesetzt sind. Hierzu wird die Mutagenese in alternden Bakterienkolonien (MAC) von *E. coli* bestimmt, indem die Mutationsraten von jungen und alten Kolonien gemessen werden (Bjedov *et al.*, 2003). Als induzierende Faktoren der MAC wurden oxidativer Stress und Nährstofflimitierungen identifiziert, die zur Hochregulation der SOS-Reaktion (RecA) und der stationäre Phase-Reaktion (RpoS) führten. RpoS kann zur Runterregulation des Mismatch Repair (MMR)-Systems führen, das in dieser Arbeit substantiell zur MAC substantiell beitrug (Bjedov *et al.*, 2003). Eine weitere große Fraktion der Mutationen in alternden Kolonien war abhängig von *polB*, das eine fehleranfällige DNA-Polymerase (Pol II) kodiert. *PolB* wurde durch die SOS-Reaktion induziert (Bjedov *et al.*, 2003). Auch in einer anderen Arbeit mit *E. coli* wurde gezeigt, dass die MAC (oder adaptive Mutationen) von der Induktion des SOS-Systems abhing (McKenzie *et al.*, 2000). Die SOS-

Reaktion von *E. coli* beinhaltet die Regulation von mindestens 40 Genen, die zumeist Faktoren mit DNA-Reparaturfunktion kodieren, und wird durch Stress induziert, der die DNA schädigt oder die DNA-Replikation blockiert (Courcelle *et al.*, 2001).

### **3.6. Der Biofilm und Pathogenese**

Es wird zunehmend die wichtige Rolle von Biofilmen bei chronischen Infektionen erkannt. Der bekannteste und häufigste humane Biofilm ist dentaler Plaque (Übersicht in: Marsh, 2003). Es ist allgemein akzeptiert und auch im Tiermodell gezeigt worden, dass Streptokokken der Mutans-Gruppe Verursacher von dentalem Karies sein können (Fitzgerald und Keyes, 1960). Als weitere Biofilm-assoziierte chronische Infektionen werden respiratorische Infektionen der CF-Lunge durch *Pseudomonas aeruginosa* (Übersicht in: Boucher, 2004), primär durch *Haemophilus influenzae* verursachte rezidivierende Otitis media (Post, 2001), Bakteriämien bzw. Sepsis durch die Freisetzung von Staphylokokken aus Biofilmen des Endokards (Marrie *et al.*, 1982; Fowler *et al.*, 1997) oder Katheter-assoziierte Infektionen des Urogenitaltraktes durch z.B. *Proteus mirabilis* (Sabbuba *et al.*, 2003) angesehen. Diese mit Infektionen assoziierten Biofilme sind selbst nicht notwendigerweise hoch pathogen, obwohl ihre Anwesenheit letztendlich schädlich für den Wirt ist. Es ist eher davon auszugehen, dass planktonische Zellen von Biofilmen losgelöst werden, die dann wiederum systemische Erkrankungen hervorrufen können (Fowler *et al.*, 1997). Der Biofilm kann eine dauerhafte Quelle systemischer Infektionen durch das stetige Ablösen planktonischer Zellen sein, wie in einem *in vitro*-Katheter-Infektionsmodell gezeigt werden konnte (Fux *et al.*, 2004). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Biofilme offensichtlich trotz eines intakten Immunsystems und der Gabe von Antibiotika im Körper des Menschen persistieren können. Nachfolgend wird detailliert die Resistenz von Biofilmen gegen antimikrobielle Substanzen und das Immunsystem besprochen.

#### **3.6.1. Die Resistenz bzw. Toleranz von Biofilmen gegenüber Antibiotika**

Biofilme erlangen zunehmende Bedeutung für das Verständnis menschlicher Infektionsprozesse. Erhöhte antibiotische Resistenz bzw. Toleranz stellt ein generelles Problem dar, das mit Biofilmbakterien assoziiert ist. Biofilmzellen können 10- bis 1000-fach weniger empfindlich gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Substanzen sein, als vergleichbare planktonische Zellen. Beispielsweise benötigt man für das Abtöten von

*Staphylococcus aureus*-Biofilmen die 600-fache Konzentration an Natriumhypochlorit, welches eines der effektivsten antibakteriellen Biozide darstellt, als für das Abtöten planktonischer Zellen (Luppens *et al.*, 2002). Um Zellen in Mikrokolonien von *Staphylococcus aureus*-Biofilmen zu töten benötigt man bis zu 1000-fach höhere Oxacillin-Konzentrationen als zur Tötung von planktonisch wachsenden Zellen (Fux *et al.*, 2004).

Bisher gibt es vier verschiedene Hypothesen zur Erklärung der erhöhten Resistenz von Biofilmbakterien. (i) Das Antibiotikum dringt verzögert oder nur teilweise in Biofilm ein, (ii) ein Konzentrationsgradient von Nährstoffen bzw. Sauerstoff führt zu Zonen langsam oder nicht wachsender Bakterien, (iii) eine adaptive Stressantwort wird von einigen Zellen exprimiert oder (iv) eine kleine Fraktion der Zellen differenziert zu einem hoch geschützten Persister-Stadium.

Die bekannten Schutzmechanismen von planktonischen Bakterien gegen Antibiotika, wie etwa Zielmolekülmutation, niedrige Zellpermeabilität, Effluxpumpen oder modifizierende Enzyme, können keine hinreichende Erklärung für die reduzierte antimikrobielle Suszeptibilität in Biofilmen bieten. Beispielweise werden Bakterien, die weder protektive Mutationen, noch Plasmide oder andere genetische Elemente besitzen, die Resistenzgene tragen, weniger empfindlich gegenüber Antibiotika, wenn sie im Biofilm wachsen (Anderl *et al.*, 2000). Die antibiotische Suszeptibilität ist dann schnell wieder hergestellt, wenn die Zellen aus dem Biofilm gelöst werden, was adaptive Resistenzmechanismen wahrscheinlicher als genetische Resistenzmechanismen macht.

Biofilme bestehen überwiegend aus Wasser. Gelöste Stoffe der Größe von Antibiotika diffundieren schnell in die Biofilmmatrix. Diffusionsmessungen von gelösten Stoffen mit einem Molekulargewicht von 100-1000 Da in Biofilmen haben gezeigt, dass der Diffusionskoeffizient im Biofilm etwa 40% des entsprechenden Koeffizienten in reinem Wasser entspricht (Stewart *et al.*, 1998). Damit kann diese nur leicht verzögerte antibiotische Motilität das Resistenzniveau in Biofilmen nicht erklären. Möglicherweise kann die Interaktion von Matrixkomponenten mit Antibiotika eine verminderte Diffusion in das Innere des Biofilms bewirken. In *Klebsiella pneumoniae*-Biofilmen konnten Ampicillin und Ciprofloxacin frei diffundieren (Anderl *et al.*, 2000). Andererseits konnte für die positiv geladenen Aminoglykoside eine verminderte Diffusion in Biofilme, durch die wahrscheinliche Bindung an negativ geladene Matrixkomponenten, nachgewiesen werden (Nichols *et al.*, 1988).

Reife Biofilme zeigen eine komplexe dreidimensionale Struktur mit zahlreichen Mikromilieus, die sich in Hinsicht auf Osmolarität, Nährstoffversorgung und Zelldichte

unterscheiden. Diese Heterogenität produziert eine Reihe von Phänotypen innerhalb des individuellen Biofilms. Ein einzelner Biofilmphänotyp scheint nicht zu existieren (Xu *et al.*, 2001). Diese Heterogenität scheint ebenfalls die antibiotische Suszeptibilität der in den Biofilm eingebetteten Bakterien zu beeinflussen. In mikroskopischen Arbeiten konnten zwei Muster der Zerstörung erkannt werden. Zum einen gibt es bei den Zellen des Biofilms einen Gradienten sinkender antibiotischer Suszeptibilität von der Oberfläche zum Substratum (bzw. zum Inneren des Biofilms), der durch einen nahezu vollständigen Verbrauch der Nährstoffe und von Sauerstoff in den Oberflächenschichten zu erklären ist, was zu anaeroben nährstoffarmen Nischen sehr begrenzter metabolischer Aktivität in den tieferen Schichten des Biofilms führt (Anderl *et al.*, 2003; Walters *et al.*, 2003). Zum anderen ist eine sehr uneinheitliche Verteilung bakteriellen Überlebens in mutmaßlich identischen Mikromilieus zu beobachten (Huang *et al.*, 1995). Beide Phänomene wurden anhand von Experimenten mit planktonischen Zellen zu erklären versucht. Die Physiologie von Bakterien in der Tiefe von Biofilmen zeigt auffällige Ähnlichkeiten zu planktonischen Zellen in der stationären Phase. Sowohl Biofilmzellen als auch planktonische Zellen der stationären Phase, die Nährstoffmangel und hohen Zelldichten ausgesetzt sind, zeigten ähnliche Muster der antibiotischen Toleranz (Spoering *et al.*, 2001; Fux *et al.*, 2004). Diese Experimente zeigten, dass die antibiotische Toleranz durch Nährstoffmangel induziert werden kann, und dass hohe Zelldichten, die möglicherweise zur Akkumulation von Abfallstoffen und Signalmolekülen führen, für die antibiotische Toleranz ebenfalls wichtig sein können. Planktonische Zellen der stationären Phase können ähnlich ihren Pendanten im Biofilm durch Passagierung in frisches Medium sehr schnell die antibiotische Suszeptibilität zurückerhalten (Anderl *et al.*, 2003). Das Überleben kleiner Taschen von Bakterien an der Oberfläche des antibiotisch behandelten Biofilms ist möglicherweise mit unregelmäßig verteilten Wachstumsraten innerhalb einer Kultur zu erklären (Fux *et al.*, 2005). Sufya *et al.* demonstrierten mit Hilfe eleganter Schüttelkultur-Versuche, dass Wachstumsraten innerhalb identischer Mikromilieus außerordentlich heterogen sein können. In diesen Experimenten zeigte eine bestimmte Subpopulation von Zellen (so genannte Persister-Zellen) zwischen der Lag- und der Stationären Phase sehr niedrige Wachstumsraten, die unter dem Schwellenwert für antibiotische Suszeptibilität lagen (Sufya *et al.*, 2003). Dieser Schwellenwert ist für jedes Antibiotikum spezifisch und hängt vom Wirkmechanismus dieses Antibiotikums ab. In den planktonischen Kulturen war eine exponentielle Zunahme der Persister-Zellen über die Zeit zu beobachten. Es wird spekuliert, dass die Zunahme dieser Persister-Zellen, die von einer steigenden Zelldichte und von wachsender Nährstoffknappheit begleitet wird, die Zunahme

ruhender Zellen in tieferen Schichten des Biofilms erklären kann (Fux *et al.*, 2005). So zeigten Experimente, dass stationäre Phase-Bakterien zu annähernd 100% die Behandlung mit  $\beta$ -Laktamen und zu 0,1% die Behandlung mit Quinolonen überlebten (Keren *et al.*, 2004; Spoering *et al.*, 2001). In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass Antibiotika mit hoher Effektivität *in vitro* gegen Bakterien der stationären Phase auch effektiver bei der Bekämpfung von Biofilminfektionen *in vivo* waren (Zimmerli *et al.*, 1998).

Zusätzlich zum passiven Schutz gegen Antibiotika durch metabolische Inaktivität können sich Bakterien auch aktiv an Stress anpassen. Bakterien in Biofilmen und planktonischen Kulturen können Stress-Response-Gene als Antwort auf Umweltstress, wie etwa Nährstoffmangel, Zelldichte, Temperatur, pH oder Osmolarität, anschalten und in einen toleranteren Phänotyp wechseln (Novick, 2003). Antimikrobielle Substanzen wie Fluroquinolone können Doppelstrangbrüche in der Bakterien-DNA hervorrufen (Malik *et al.*, 2006), wodurch das SOS-System aktiviert wird (Newmark *et al.*, 2005). Mutagene SOS-Polymerasen können die Überlebensrate von Zellen mit geschädigter DNA erhöhen, während gleichzeitig die Mutationsrate dieser überlebenden Zellen steigt (Runyen-Janecky *et al.*, 1999). In einem Mausinfektionsmodell konnte gezeigt werden, dass *E. coli*-Wildtypstämme unter Antibiotikabehandlung der Mäuse Resistenzen gegen Ciprofloxacin und Rifampicin entwickelten, während Mutanten, die keine SOS-Antwort mehr ausbilden konnten, keine Resistenzen entwickelten (Cirz *et al.*, 2005).  $\beta$ -Lactam-Antibiotika können durch ihre Wirkung auf die Zellwandsynthese ebenfalls die SOS-Antwort induzieren (Miller *et al.*, 2004). Diese Aktivierung des SOS-Systems hatte eine transiente Stilllegung der Zellteilung zur Folge, was diesen Bakterien das Überleben trotz der Anwesenheit des sonst letalen  $\beta$ -Lactams ermöglichte.

### 3.6.2. Biofilme und das Immunsystem

Da Biofilme im Blutgefäßsystem des Menschen über längere Zeit persistieren können, muss es Mechanismen in Biofilmen geben, der Wirtsabwehr widerstehen zu können. Über die Interaktion von Biofilmen mit dem Immunsystem ist sehr wenig bekannt. Nachfolgend sind einige Befunde zur Resistenz von Biofilmen gegen Faktoren der Wirtsabwehr aufgelistet. Bei *E. coli* waren Zellen aus dem Biofilm weniger sensibel als planktonische Zellen gegenüber Wasserstoffperoxid, einem wichtigen Effektor von phagozytischen Zellen (Yasuda *et al.*, 1994). *Pseudomonas aeruginosa*-Zellen im Biofilm waren verglichen mit planktonischen Zellen vor Phagozytose durch Neutrophile geschützt (Jesaitis *et al.*, 2003). Ebenfalls konnte

bei *Pseudomonas aeruginosa* eine verminderte Komplementaktivierung durch Biofilme und durch aus Biofilmen herausgelöste Zellen festgestellt werden, als durch planktonische Zellen (Jensen *et al.*, 1993). Bei Staphylokokken scheint das für die Biofilmbildung bedeutsame PIA einen wichtigen Schutzmechanismus gegen das angeborene Immunsystem zu sein. Bei PIA-freien Mutanten von *Staphylococcus epidermidis* war, verglichen mit PIA-exprimierenden Stämmen, die Phagozytose statistisch signifikant erhöht. Die PIA-freie Mutante war ebenfalls sensibler gegen wichtige antibakterielle Peptide der Haut, wie etwa das kationische humane  $\beta$ -Defensin, LL-37 und das anionische Dermcidin (Vuong *et al.*, 2004). Bei *Pseudomonas aeruginosa* wurden Zellen in Alginat-freien Biofilmen durch Interferon-gamma vermittelte Makrophagenaktivität wesentlich effektiver getötet wurden als Zellen in Alginat-haltigen Biofilmen (Leid *et al.*, 2005). Möglicherweise können sich Bakterien auch den Effektoren des Immunsystems aktiv durch Biofilmbildung entziehen. In einer Studie waren *Pseudomonas aeruginosa*-Zellen unter der Anwesenheit von Neutrophilen in der Lage, initial mehr Biofilm zu bilden als vergleichbare Zellen ohne Neutrophile (Walker *et al.*, 2005).

### 3.7. Das Trägertum von Meningokokken

*Neisseria meningitidis* trägt substantiell zur Morbidität und Mortalität bei Kindern und Heranwachsenden bei (Rosenstein *et al.*, 2001). Asymptomatisches nasopharyngeales Trägertum wird bei 10-30% der gesunden Menschen in Abhängigkeit vom Alter der Probanden und von der Methode zur Bestimmung des Trägertums beobachtet (Cartwright *et al.*, 1987; Sim *et al.*, 2000). Die Rate des nasopharyngealen Trägertums von Meningokokken ist bei Kleinkindern am niedrigsten und bei Heranwachsenden und jungen Erwachsenen am höchsten (Claus *et al.*, 2005). Das Trägertum kann über längere Zeit (mehr als 90 Tage) bei etwa 25% der Träger bestehen, bei etwa einem Drittel der Träger besteht das Trägertum zeitweise, und bei den restlichen 40% findet Trägertum transient oder selten statt (Andersen *et al.*, 1998). Die Besiedlung eines Trägers gleichzeitig mit mindestens 2 verschiedenen Klonen scheint ein seltenes Ereignis zu sein. In einer Trägerstudie in Norwegen 2003 waren von 78 Trägern (Trägerrate 61,9%) nur 2 Träger parallel mit 2 Klonen besiedelt, während die restlichen 76 Träger nur mit einem Klon besiedelt waren (Caugant *et al.*, 2007). Phänotypische und genotypische Untersuchungen haben ergeben, dass Meningokokken gesunder Träger (Caugant *et al.*, 1988; Jolley *et al.*, 2000) wesentlich diverser als mit Krankheit assoziierte Meningokokken sind (Caugant *et al.*, 1987; Maiden *et al.*, 1998). Meningokokken können entweder bekapselt oder unbekapselt sein. In einer sehr breit

angelegten Studie zum Trägertum bei Kindern und jungen Erwachsenen wurde gezeigt, dass etwa 45% der Meningokokkenisolate keine Kapsel exprimierten (Claus *et al.*, 2005). In dieser Studie waren 20% der Isolate dadurch unbekapselt, weil sie anstelle des Kapselgenclusters (*cps*) den Kapsel-Null-Locus [(*cnl*) (Claus *et al.*, 2002)] trugen. 139 von 541 der den Kapselgencluster tragenden Isolate exprimierten ebenfalls keine Kapsel, was auf reversible Mechanismen (slipped strand DNA-mispairing, Insertionselemente) und irreversible Mechanismen (Insertionen, Deletionen, Basenaustausche) zurückzuführen war (Weber *et al.*, 2006). Bekapselte Meningokokken exprimieren ein von 13 verschiedenen Kapsel-Polysacchariden, die sich jeweils mit einer bestimmten Serogruppe decken (Vedros, 1987). Die Mehrheit der mit Krankheit assoziierten Isolate exprimieren ein Polysaccharid aus den Serogruppen A, B, C, W-135 und Y (Peltola, 1987). Die Analyse der Genotypen von Meningokokken durch Multilocus Enzymelektrophorese [(MLEE) (Caugant *et al.*, 1987)] und durch Multilocus Sequenztypisierung [(MLST) (Maiden *et al.*, 1998)] hat gezeigt, dass nur relativ wenige klonale Linien, die auch als hyperinvasive Linien bezeichnet werden, für die meisten Krankheitsfälle verantwortlich sind. Beispielhaft sei hier der ST-11-Komplex (früher ET-37) genannt (Maiden *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1993), der bei Krankheitsisolaten relativ zur Trägerprävalenz überrepräsentiert ist (Caugant *et al.*, 1988). Insgesamt betrachtet ist jedoch die Erkrankungshäufigkeit mit etwa 1/100000/Jahr in Deutschland verglichen mit den hohen Trägerraten äußerst gering. Warum nur ein sehr kleiner Teil der Träger überhaupt eine Meningokokkenerkrankung entwickelt, ist nur unzureichend verstanden. Eine natürlich erworbene Immunität gegen Meningokokken durch asymptomatisches Trägertum von Meningokokken oder auch kommensale Neisserien-Spezies scheint von zentraler Wichtigkeit bei der Vermeidung von invasiven Meningokokkenerkrankungen zu sein (Goldschneider *et al.*, 1969). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Antikörper-vermittelte bakterizide Aktivität des Serums von Probanden nach dem Verschwinden der Leihimmunität durch die Mutter nach etwa 12 Lebensmonaten am niedrigsten war und ab dann stetig mit zunehmendem Alter anstieg. Die Erkrankungshäufigkeit war im Zeitraum der niedrigsten bakteriziden Aktivität des Serums am größten und nahm sehr schnell mit höherem Alter ab. Durch Claus *et al.* (2005) konnte ein stetiger Anstieg der Meningokkenträgerrate mit steigendem Alter, ähnlich dem Anstieg der bakteriziden Aktivität des Serums, festgestellt werden. Welche Antigene und immunologischen Mechanismen letztendlich zur Induktion dieser natürlichen Immunität führen, ist weitgehend unbekannt. Schon vor einigen Jahren wurde das Vorkommen von Meningokokkenmikrokolonien auf der Oberfläche und in tieferem Gewebe der Tonsillen beschrieben (Sim *et al.*, 2000). Bis jetzt gibt es noch keinerlei

Daten zum physiologischen Zustand oder zur Antigenexpression dieser Mikrokolonien. Der Nasopharynx wird als ein sauerstoffarmes Milieu angesehen, von dem routinemäßig sowohl strikte Aerobier als auch strikte Anaerobier isoliert werden können (Brook, 2003). *Neisseria meningitidis* ist als aerobes Bakterium klassifiziert, jedoch konnte gezeigt werden, dass Meningokokken bei Anwesenheit von Nitrit, das im Nasopharynx in Konzentrationen von größer 1 mM vorliegen kann (Lundberg *et al.*, 2004), auch bei sehr geringen Sauerstoffkonzentrationen wachsen können (Rock *et al.*, 2005). Möglicherweise unterstützt der Verlust der Kapselexpression durch eine Reihe phasenvariabler und irreversibler Mechanismen (Claus *et al.*, 2002; Hammerschmidt *et al.*, 1996a; Hammerschmidt *et al.*, 1996b; Dolan-Livengood *et al.*, 2003) die Bildung nasopharyngealer Biofilme auf der Mucosa bzw. auch in tieferem Gewebe. Unbekapselte Meningokokken können häufig aus dem Nasopharynx isoliert werden (Claus *et al.*, 2005). Zudem können nur unbekapselte Meningokokken Mikrokolonien auf Zellen ausbilden, um in diese invadieren zu können (Morand *et al.*, 2001). Weiterhin wurde die Biofilmbildung unbekapselter Meningokokken auf Plastikoberflächen berichtet (Yi *et al.*, 2005). Diese Eigenschaft unbekapselter Meningokokken intime Kontakte mit Zellen bzw. artifiziellen Oberflächen einzugehen und dort Mikrokolonien bzw. *in vitro*-Biofilm zu bilden, lässt auch die *in vivo*-Biofilmbildung unbekapselter Meningokokken auf der Mucosa bzw. auch im tieferen Gewebe der Tonsillen vermuten, zumal Meningokokken bei Anwesenheit von Nitrit auch bei sehr geringen Sauerstoffkonzentrationen vital sein können. Diese multizellulären Strukturen könnten eine erhöhte Toleranz gegen Penicillin offenbaren, das sich als ineffizient für die Eradikation des Meningokokkenträgertums erwiesen hat (Abramson und Spika, 1985). Zudem könnte ein anhaltendes Trägertum bestimmter Stämme, trotz der Induktion einer Typ-spezifischen humoralen Immunität (Jordens *et al.*, 2004), durch Biofilmbildung bedingt sein. Das mucosale Trägertum von Meningokokken führt zum Erwerb einer T-Zell-vermittelten mucosalen Immunität, die ebenfalls mit steigendem Alter zunimmt (Davenport *et al.*, 2003). Diese T-Zell-vermittelte mucosale Immunität wird durch regulatorische T-Zellen (Treg) reguliert (Davenport *et al.*, 2007). Bei Kleinkindern wird die mucosale Immunität dahingehend reguliert, dass sie die Besiedlung der Mucosa toleriert (T<sub>H</sub>2-dominierte Immunantwort). Mit steigendem Alter lenken die Treg die mucosale Immunität in Richtung Effektorfunktion, d.h. dass eine T<sub>H</sub>2-dominierte Immunantwort die mucosale Besiedlung mit Meningokokken eliminiert (Davenport *et al.*, 2006). Daten von Patienten mit CF lassen vermuten, dass die Chronifizierung der Pneumonie mit einer T<sub>H</sub>2-dominierten Immunantwort assoziiert war (Moser *et al.*, 2000). Inwiefern ein Biofilm- oder Biofilm-ähnliches Stadium bei

Meningokokken immunmodulierend wirkt, oder benötigt wird, um sich der Immunantwort zu entziehen, ist eine spannende Frage.

### 3.8. Tiermodelle bei Meningokokken

Zum Studium des Kommensalismus von Meningokokken wären geeignete Tiermodelle der nasopharyngealen Kolonisation höchst wünschenswert. Allerdings ist der Mensch der einzige natürliche Wirt von *Neisseria meningitidis*. Die Virulenz- und Kolonisationsstrategien von Meningokokken sind sehr stark an den Menschen adaptiert und sind bisher nur schwer in Tiermodellen zu untersuchen (Tauber und Zwahlen, 1994). Die Verfügbarkeit von Eisen ist der bestimmende Faktor einer erfolgreichen Meningokokkeninfektion bzw. Kolonisation, da Eisen von Eisenbindeproteinen sehr effektiv gebunden wird, und somit nur sehr geringe Eisenkonzentrationen im Serum und auf der Mucosaoberfläche gefunden werden können (Schryvers und Stojiljkovic, 1999). Die Unfähigkeit von Meningokokken in Mäusen und anderen Tieren Krankheit auszulösen, konnte mit dem Bedürfnis der Meningokokken korreliert werden, humanes Transferrin und Lactoferrin als Eisenquelle zu nutzen (Schryvers und Stojiljkovic, 1999). Die Wirtsspezifität der Meningokokken ist teilweise mit der Spezifität von Rezeptoren zum Erwerb von Eisen auf der Bakterienoberfläche zu erklären, weil die Rezeptoren zur Bindung von Transferrin und Lactoferrin spezifisch für diese humanen Substrate sind (Schryvers und Gonzales, 1989; Schryvers und Stojiljkovic, 1999). Zudem sind für die Wirtsspezifität spezifische Bindungen von Meningokokkenoberflächenproteinen mit Rezeptoren oder anderen Oberflächen der Wirtszellen verantwortlich. Beispielsweise bindet das Opacity-Protein Opa verschiedene Mitglieder aus der CEACAM (CD66)-Rezeptorfamilie (Dehio *et al.*, 1998), während das Opacity-Protein Opc das Serum-Glykoprotein Vitronectin bindet, das als molekulare Brücke an  $\alpha\beta 3$ -Integrine fungiert (Unkmeir *et al.*, 2002). Weiterhin wurde eine spezifische Interaktion von Neisserien-Pili mit CD46 (Membrane Cofactor Protein) beschrieben (Kallström *et al.*, 1997). Die meisten bisher publizierten Daten deuten aber darauf hin, dass die Pilus-vermittelte Infektion von Wirtszellen unabhängig von CD46 erfolgt (Kirchner *et al.*, 2005). Diese Spezifität für den Eisenerwerb und die Rezeptorbindung hat die Entwicklung geeigneter Tiermodelle zur Untersuchung der Pathogenese bzw. des Trägertums stark eingeschränkt. Der Focus bei der Entwicklung von Tiermodellen bei Meningokokken lag bisher auf Entwicklung von Krankheitsmodellen, nicht aber auf der Entwicklung von Modellen zur Untersuchung des Trägertums. Zur Untersuchung des Krankheitsgeschehens

wurden zum einen adulte Mäuse intraperitoneal mit Bakterien infiziert (Newcombe *et al.*, 2004), wobei bei paralleler Gabe von Eisen (humanes Holotransferrin, Eisendextran) die Virulenz der Bakterien wesentlich gesteigert werden konnte (Holbein *et al.*, 1980). Die Meningokokkenerkrankung wurde auch mit neugeborenen Nagetieren modelliert, da diese aus bisher unverstandenen Gründen anfälliger für Meningokokken sind. Die intranasale Applikation von Meningokokken in neugeborenen Mäusen resultierte in einer invasiven Infektion, die den natürlichen Verlauf einer Meningokokkenerkrankung nachahmt (Salit und Tomalty, 1986). Auch in diesem Modell verstärkte die Zugabe von Eisen die Infektion (Mackinnon *et al.*, 1993). Yi *et al.* entwickelten ein Tiermodell mit adulten Mäusen, denen täglich Eisendextran systemisch zugeführt wurde (2003). In diesem Modell konnten adulte Mäuse unter zeitgleicher Verabreichung von Eisendextran intranasal kolonisiert werden. Diese Kolonisation konnte bei 50% der Tiere über mehr als zwei Wochen aufrechterhalten werden. Für die Kolonisierung in diesem Modell war die Expression der Meningokokken-Kapsel unumgänglich. Studien mit neugeborenen Ratten haben die Wichtigkeit der Kapsel für die Ausbildung einer Bakteriämie gezeigt (Vogel *et al.*, 1996). Unlängst wurde ein transgenes Tiermodell mit CD46-exprimierenden Mäusen vorgestellt (Johansson *et al.*, 2003). Es wurde ebenfalls mit bekapselten Meningokokken gearbeitet. Zudem mussten die Mäuse mit Antibiotika vorbehandelt werden, um die natürliche Flora im Nasalbereich zu eliminieren. Diese Arbeit gab keine Auskunft über die Dauer einer möglichen asymptomatischen Kolonisierung bei nicht erkrankten Tieren. Um Mikrokolonien, wie sie durch immunhistochemische Methoden in humanen Tonsillen gefunden wurden (Sim *et al.*, 2000), *in vivo* in Tiermodellen untersuchen zu können, müssten diese Modelle das Trägertum von bekapselten als auch unbekapselten Meningokokken über längere Zeiträume ermöglichen. Oben beschriebene Tiermodelle erlauben nur die Besiedlung des Nasalraumes mit bekapselten Meningokokken und sind daher für die Modellierung des Trägertums mit unbekapselten Meningokokken absolut ungeeignet.

### **3.9. Das Typ IV-Pilus-System bei Meningokokken**

Unter den bakteriellen Faktoren, die zur Pathophysiologie der Meningokokkeninfektion oder zum asymptomatischen Trägertum beitragen, sind Typ IV-Pili (TfP) von zentraler Wichtigkeit. Neben anderen Virulenzfaktoren, wie den Opa-Proteinen oder der Kapsel, können TfP beständig bei klinischen Isolaten gefunden werden (Harrison *et al.*, 2002). TfP

bei Meningokokken sind zudem an bakterieller Motilität, Transformationskompetenz, Induktion multipler Signalwege in den Wirtszellen und an bakterieller Aggregation beteiligt. Tfp findet man in einer Vielzahl gramnegativer Bakterien. Sie sind extrem dünne flexible Filamente (50-80 Å), die mehrere Millimeter lang sein können und erheblichem mechanischen Stress widerstehen können (Craig *et al.*, 2004). Das Tfp-System von Meningokokken ist sehr komplex. Eine systematische Suche nach Genen, die für die Tfp-Biogenese benötigt werden, ergab 15 verschiedene Gene (Carbonnelle *et al.*, 2005). Zusätzlich zu den für die Biogenese wichtigen Genen sind weitere Gene (*pilT*, *pilU*, *pilC*, *pilX*) an der Funktionsfähigkeit der Pili beteiligt (Carbonnelle *et al.*, 2005). Im Folgenden werden die Gene bzw. Faktoren dargestellt, die für das Verständnis der Arbeit von Bedeutung sind. Die Hauptuntereinheit der Pili bei Neisserien ist das Pilin und wird durch das *pilE*-Gen kodiert (Perry *et al.*, 1987). Meist gibt es nur eine intakte Kopie des *pilE* auf dem Chromosom. Neben dem *pilE* gibt es auf dem Chromosom bis zu acht Loci, die stille Kopien des Pilin-Gens, genannt *pilS* (pilin, silent), enthalten. *PilS*-Kopien werden nicht exprimiert, können aber gelegentlich mit *pilE* rekombinieren, und führen somit zur Expression von *PilE*-Varianten (Perry *et al.*, 1987). Bei *Neisseria meningitidis* gibt es zwei Klassen des Pilins, die sich in ihrer Antikörperreaktivität unterscheiden. Klasse I-Piline bei Meningokokken sind den Gonokokken-Pilinen sehr ähnlich und werden durch den monoklonalen Antikörper SM1 erkannt. Klasse II-Piline bei Meningokokken werden nicht von diesem Antikörper erkannt und werden von einem anderen Locus als das Klasse I-Pilin kodiert (Virji *et al.*, 1989). Klasse II-Piline sind geringfügig kürzer als Klasse I-Piline, und es fehlen ihnen einige Domänen, die bei Klasse I-Pilin gefunden werden (Virji *et al.*, 1989). Bis jetzt geben die Forschungsergebnisse keinen Aufschluss über eine differentielle Funktion beider Pilintypen in der Pathogenese. PilD ist eine Leader-Peptidase, die an der inneren Membran lokalisiert ist, und spezifisch den N-terminalen Teil des Präpilins erkennt und abspaltet, wodurch das Pilin entsteht (Freitag *et al.*, 1995). PilG ist ein Protein der inneren Membran, das für Tfp-Bildung und Transformationskompetenz essentiell ist (Tonjum *et al.*, 1995). PilQ bildet eine Pore in der äußeren Membran, durch die der Pilus nach außen an die Oberfläche geschleust wird (Drake und Koomey 1995). In Neisserien führt der Verlust der PilQ-Funktion zum Verlust der Pilusexpression (Drake und Koomey, 1995). PilT ist ein Nukleotid-Bindeprotein, das zur Familie der AAA-ATPasen (ATPasen associated with various cellular activities) gehört (Vale, 2000). PilT ist für die Assemblierung und Expression der Tfp auf der Zelloberfläche abkömmlich, ist aber essentiell für die Pilusretraktion, und somit auch für die Motilität (*Twitching Motility*) der Neisserien (Merz *et al.*, 2000). PilT wurde ursprünglich als ein

Effektor für Transformationskompetenz und *Twitching Motility* beschrieben (Wolfgang *et al.*, 1998). PilT spielt außerdem eine Schlüsselrolle für die Interaktion mit Wirtszellen (Pujol *et al.*, 1999), da sein Fehlen die Entstehung der intimen Adhäsion verhindert. Somit bleiben die zwar Pili tragenden aber nicht motilen Bakterien als Aggregate an die Zellen gebunden (lokalisierte Adhärenz). PilU besitzt eine 33%-ige Sequenzhomologie zu PilT, ist aber im Gegensatz zu PilT für Transformationskompetenz und *Twitching Motility* abkömmlich. PilU-Mutanten adhären stärker an humane Zellen, zeigen aber kein erhöhtes Autoaggregationsvermögen wie PilT-Mutanten. Da PilT die Tfp-assoziierte Aggregation zu inhibieren scheint, während PilU die Aggregation begünstigt, könnte PilU ein Antagonist von PilT sein (Park *et al.*, 2002). Neben den eben beschriebenen Proteinen, die für die Biogenese und Funktionalität der Pili wichtig sind, gibt es die PilC-Proteine, über deren Funktion kontrovers diskutiert wird. PilC-Proteine sind sowohl mit der bakteriellen Membran als auch mit den Pili assoziiert (Rudel *et al.*, 1995; Rahman *et al.*, 1997). PilC ist weiterhin als Adhäsion der Pilusspitze bei Gonokokken beschrieben worden (Rudel *et al.*, 1995). PilC-Nullmutanten zeigen eine verminderte Pilusexpression, und es fehlt ihnen die Transformationskompetenz. Das PilC1 von Meningokokken ist äquivalent zu den beiden funktionell nicht unterscheidbaren PilC-Proteinen der Gonokokken und ist für die Adhäsion erforderlich. Das unabhängig von PilC1 exprimierte PilC2 hat keine adhäsiven Eigenschaften, trotz gleicher Funktion für die Piliierung und die Transformationskompetenz (Nassif *et al.*, 1994; Morand *et al.*, 2001). Die Inaktivierung des *pilT* in PilC-negativem Hintergrund stellt die Piliierung der Bakterien wieder her. Somit könnte PilC, durch die Verhinderung der PilT-vermittelten Pilusretraktion, als Antagonist des PilT wirken (Wolfgang *et al.*, 1998; Morand *et al.*, 2004). PilX wurde als ein weiteres Pilus-assoziiertes Protein beschrieben (Helaine *et al.*, 2005), das auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist. *PilX* kodiert ein durchschnittlich 162 Aminosäuren (AS) langes, etwa 18 kDa schweres Präpilin, dessen 10 AS langes Leader-Peptid sehr wahrscheinlich durch die Präpilinpeptidase (PilD) (Nunn und Lory, 1991) prozessiert wird. Das daraus resultierende reife, 16,9 kDa schwere Protein besitzt eine 52 AS lange helikale Domäne am N-Terminus und eine 100 AS lange globuläre Domäne am C-Terminus. Es wurde beschrieben, dass das PilX intrinsisch aggregative Eigenschaften besitzt, die zu verstärkter Autoaggregation der Bakterien führen. Weiterhin wurde gefunden, dass das PilX keinerlei Einfluss auf die Menge und Funktionalität der Pili, auf die Adhärenz und auf die Motilität der Bakterien hat (Helaine *et al.*, 2005).

### 3.10. Ziele dieser Arbeit

*Neisseria meningitidis* besiedelt sehr häufig den Nasopharynx des Menschen, löst aber dabei nur selten eine Erkrankung aus. Es konnte gezeigt werden, dass die Meningokokken auf bzw. im Gewebe der Tonsillen als Mikrokolonien vorkommen, wobei unklar war, von welcher Dauer diese Besiedlungsform ist, welche metabolischen Eigenschaften mit diesen Mikrokolonien verbunden sind und welche Antigene exprimiert werden. Da Mikrokolonien als Grundbaustein von Biofilmen gelten, hatte die vorliegende Arbeit die Etablierung eines *in vitro*-Biofilmmodells für Meningokokken und die anschließende Charakterisierung von Meningokokkenbiofilmen zum Ziel. Biofilmflusssysteme in Kombination mit Konfokal-Mikroskopie gelten als der Goldstandard in der Biofilmforschung. Deshalb sollte ein Biofilmmodell für Meningokokken unter Flussbedingungen etabliert werden. Als Voraussetzung für die Nutzung eines solchen Systems waren die Etablierung eines Minimalmediums und die Markierung der Meningokokken mit Fluoreszenzproteinen von zentraler Bedeutung. Durch die Testung von Stämmen verschiedenster Herkunft und Serogentypen sollte bestimmt werden, wie weit verbreitet Biofilmbildung innerhalb der Meningokokkenpopulation ist. Daran anschließend war es das Ziel, durch die Untersuchung von Wildtypen und isogenen Mutanten Faktoren und Mechanismen zu finden, die die Biofilm- bzw. Mikrokoloniebildung beeinflussen. Die Antibiotikaresistenz von Biofilmen stellt wahrscheinlich den wichtigsten Phänotyp von Biofilmen dar. Deshalb sollte das Resistenzverhalten von *in vitro*-Biofilmen und planktonischen Zellen gegen die drei Antibiotika Penicillin, Ciprofloxacin und Rifampicin, die therapeutisch oder prophylaktisch gegen Meningokokken eingesetzt werden, getestet werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Geräte und Ausrüstung

**Tabelle 1.** Verwendete Geräte und Ausrüstung

Gerät	Hersteller (Modell)
Analysewaagen	Mettler
Automatikpipetten	Gilson, Eppendorf
Blotkammer für PAA-Gele	BioRad
Brutschrank	Heraeus Instruments (BB 6220)
DNA-Sequenzierer	Applied Biosystems ABI377
Elektrophoresekammer für Agarosegele	BioRad; MWG Biotech
Elektrophoresekammer für PAA-Gele	BioRad
Elektrophoresekammer zur Elektroelution (BIOTRAP-System)	Schleicher und Schüll, Dassel
Elektroporationsgerät	BIORAD (Gene Pulser™)
ELISA-Reader	ThermoLabsystems (Multi Scan Ex)
Entwickler	AGFA (Carix 60)
Feinwaage	Sartorius (R 160 P)
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Jena (Zeiss Imager Z1)
Geldokumentationsanlage	Herolab (UVT 28 MP)
Hybridisierungsöfen	Biometra (OV5)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Carl Zeiss Jena (Zeiss LSM510)
Kühlzentrifugen	Sorvall (RC5B und RC5B Plus)
Magnetrührer	Janke und Kunkel (IKAMAG®RH)
Mikrowelle	Bauknecht (MWS 1820 Duo)
Peristaltische Pumpe	Watson Marlow (Modell 2005S)
pH-Meter	WTW (pH530)
Photometer	Hitachi (U-2000)
Schüttelinkubator	Certomat® H, New Brunswick Scientific (innova 4300)
Spannungsgeräte	Biometra (Standard Power Pack P25)
Thermoblock	Eppendorf (Thermomixer 5436)
Thermocycler	MWG Biotech Primus 96plus, Biometra TRIO-Thermoblock™
Tischzentrifuge	Heraeus (Biofuge 15)
UV-Lampe	Heraeus (UVT-20LP)
UV-Stratalinker	Stratagene (Stratalinker 1800)
Vakuumverdampfer	Savant (SpeedVac Plus SC110A)
Vitek-Densicheck-Gerät	bioMerieux, Marcy l'Étoile, France
Vortexer	Scientific Industries (Vortex Genie 2), Hartenstein Mixer
Wasserbad	Julabo (SW20)
Zellaufschluß	ThermoSavant (Fast Prep 120)

## 4.2. Verbrauchsmaterialien

Elektroporationsküvetten	Eurogentec, Seraing, Belgien
RNAse- und DNase-freie 1,5 ml Mikrotubes	Ambion, Inc. RNA Company, Austin, Texas, USA
15 ml und 50 ml BD Falcon™ Röhren	Becton Dickinson, Heidelberg
12 ml sterile Plastikröhren	Greiner Labortechnik, Essen
0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
96-well-Zellkulturschale	
24-well-Zellkulturschale	Nunclon, Wiesbaden
Deckgläser: 24x50, 24x60 und 15 mm rund	A.Hartenstein, Würzburg
Objektträger für Immunfluoreszenz: 75x25x1 mm, 2 Mattrand 20 mm, mit 12 Feldern	
Blotting-Papier	Schleicher&Schüll, Dassel
Nitrocellulose	
positiv geladene Nylonmembran <i>parablot NY plus</i>	Macherey&Nagel, Düren
Röntgenfilm Hyperfim™-MP	Amersham, Braunschweig
Spritzen und Kanülen, steril	Braun Melsungen AG, Melsungen

## 4.3. Chemikalien, Enzyme und Reaktionskits

Etest®-Streifen	AB Biodisk, Solna, Schweden
GST Gene Fusion System	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
EDTA (Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure)	Applichem, Darmstadt
CH <sub>3</sub> NO (Formamid)	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Magnesiumsulfat-Heptahydrat)	
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat)	
NaCl (Natriumchlorid)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (Di-Natrium-Hydrogencarbonat-Mono-Hydrat)	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O Natrium-Di-Hydrogencarbonat-Mono-Hydrat)	
NaOH (Natriumhydroxid)	
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	
Müller-Hinton-Blutagarplatten	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg
Proteose-Pepton	
PolyViteX	bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Fluoprep	
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
30%-ige Acrylamid-Lösung	
dNTPs lyophilisiert	
Natriumhypochlorit	
Tris	
Baktotrypton	Difco Laboratories, Augsburg
Hefeextrakt	

Kristallviolett

Smart-Ladder, DIG III- und DIG IIV-Marker	Eurogentech, Seraing, Belgien
FeN <sub>3</sub> O <sub>9</sub> x9H <sub>2</sub> O (Eisen(III)-nitrat-Nonahydrat)	Fluka-Chemie-GmbH, Buchs, Schweiz
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Benchmark <sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder TOPO-TA Cloning <sup>®</sup> KIT	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat NH <sub>4</sub> Cl (Ammoniumchlorid)	Merck-Schuchart, Darmstadt
Bacto-Agar	
BH <sub>3</sub> O <sub>3</sub> (Borsäure)	
Bromphenolblau	
CoCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O (Kobalt(II)-Chlorid-Hexahydrat)	
CuCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O (Kupfer(II)-Chlorid-Dihydrat)	
C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O (Di-ethyl-ether)	
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> [(Essigsäure) (96%)]	
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH( Ethanol, absol.)	
Ethidiumbromid	
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> xH <sub>2</sub> O (D-(+)-Glucose-Monohydrat)	
C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> (Glycerin) (87%)	
KCl (Kaliumchlorid)	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kalium-Dihydrogenphosphat)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Di-Kalium-Hydrogenphosphat)	
LB-Agar	
C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> (Maleinsäure)	
β-Mercaptoethanol	
Methanol	
MnSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O (Mangan(II)-sulfat-Monohydrat)	
Natriumacetat	
NaHCO <sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat)	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Natriumsulfat)	
HCl (Salzsäure)	
TEMED	
Tween 20	
ZnCl (Zinkchlorid)	
SDS (Natrium-dodecyl-sulfat) (ultrapure)	MP Biomedicals, Eschwege
Restriktionsenzyme Taq-Polymerase DNA modifizierende Enzyme T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
BugBuster <sup>®</sup> Master Mix	Novagen, Darmstadt
Pierce BCA Protein Assay	Pierce, Rockford, IL, USA

1 kb DNA-Ladder	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	
QIAquick PCR Purification Kit	
QIAgen Gelextraction Kit	
Qiagen Genomic-tip 100/G	
Qiagen OneStep RT-PCR Kit	
Rneasy Midi Kit	
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (Natriumsulfit)	Riedel de Häen, Seelze
ABTS-Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
Blockierungsreagenz	
DIG Luminescent Detection Kit	
DNase I	
ECL Chemiluminescence Kit	
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	
Coomassie Brilliant Blue	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
L-Arginin	Sigma, Taufkirchen
L-Cystein	
DEPC (Di-ethyl-pyrocbonat)	
L-Glutaminsäure	
Glutardialdehyd	
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Magnesiumchlorid-Hexahydrat)	
N-Lauryl-sarkosin	
Poly-D-Lysin	
Uracil	

#### 4.4. Stammsammlung, Nährmedien, Wachstumsbedingungen, Oligonukleotide und Plasmide

##### 4.4.1. Nährmedien

Neisseria Defined Medium (NDM) (Archibald und DeVoe, 1978)

<u>Komponente</u>	<u>Endkonzentration (mM)</u>
L-Glutaminsäure	10
D-Glucose	10
L-Cystein	1
Uracil	1
L-Arginin	1
Tris-HCl	40
NaCl	140

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	1
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,3
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,5
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,2
KCl	2,0
NH <sub>4</sub> Cl	10,0
Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> (als Chloride)	0,00002
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	variabel

Das Medium wird mit rauchender Salzsäure auf pH 7,6 eingestellt.

Folgende Modifikationen wurden vorgenommen, um „modifiziertes NDM“ zu erhalten: Anstatt Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O wurde 1 mg/l FeNO<sub>3</sub> verwendet. Es wurden zudem 5 mM NaHCO<sub>3</sub> und PolyViteX<sup>®</sup> (nach Gebrauchsanweisung) hinzugefügt.

### MCDA (Catlin, 1973)

<u>Komponente</u>	<u>Endkonzentration (mM)</u>
NaHCO <sub>3</sub>	5
NaCl	100
KCl	2,5
NH <sub>4</sub> Cl	7,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> x2H <sub>2</sub> O	2,2
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	2,5
MnSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	0,0075
L-Arginin	1,4
L-Cystein	0,057
Glycin	1,3
Natrium-Glutamat	1
Natrium-Lactat oder D-Glucose	3,8 mg/ml
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,5

Das Medium wird auf mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

### Proteose-Pepton-Medium (PPM)

#### PPM:

- 1,5% Proteose-Pepton
- 0,5% NaCl
- 0,05% Stärke
- 0,4% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 0,1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Das Medium wird mit HCl auf pH 7,8 mit KOH

PPM+ (supplementiert):

50 ml PPM  
250 µl 2 M MgCl<sub>2</sub>  
250 µl 8,4% NaHCO<sub>3</sub>  
500 µl PolyViteX

LB-Medium:

1% Baktotrypton  
0,5% Hefeextrakt  
1% NaCl  
1,5% Bacto-Agar (bei Agarplatten)

SOB-Medium:

2% Baktotrypton  
0,5% Hefeextrakt  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl

SOC-Medium:

SOB-Medium  
20 mM Glucose  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>

#### **4.4.2. Wachstumsbedingungen**

Für alle Standard-Kultivierungen wurde mit PolyViteX supplementierter GC-Agar verwendet. Wenn erforderlich, wurde Erythromycin (7 mg/l), Kanamycin (100 mg/l), Chloramphenicol (7 mg/l) bzw. Spectinomycin (125 mg/l) dem entsprechenden Nährmedium zugesetzt. Für Flüssigkulturen und Biofilmexperimente wurde eine Modifikation des NDM (Archibald und DeVoe, 1978) benutzt. Das modifizierte NDM wurde mit 5 mM NaHCO<sub>3</sub> und PolyViteX supplementiert, um ein reproduzierbares Wachstum der Biofilme unter Flussbedingungen zu erreichen. Trotz der Tatsache, dass die pEG2-Ery-Derivate über mehrere Tage stabil in den Biofilmkulturen auch ohne Zugabe des Antibiotikums waren, wurden allen Biofilmmedien, mit Ausnahme der Medien für die Experimente mit antibiotischer Behandlung, 7 mg/l Erythromycin zugesetzt. Nur für GC-Agar-Kulturen wurde eine mit 4,5% CO<sub>2</sub> angereicherte Atmosphäre verwendet.

#### 4.4.3. Bakterienstämme

**Tab. 2a (I).** Verwendete *Neisseria meningitidis*-Stämme

Stamm*	Serogruppe	Sequenztyp (Elternstamm)	Genotyp	Plasmidgehalt
2135 (syn. MC58)	B	ST-74	WT (invasives Isolat)	-
3240	unkapselt	(MC58)	<i>siaD</i> -	-
2344	unkapselt	(MC58)	<i>lst</i> -	
2516	unkapselt	(MC58)	<i>siaD</i> -, <i>lst</i> -	
3349	unkapselt	(MC58)	<i>siaD</i> -, <i>gfp</i> <sup>+</sup>	pEG2-Ery
3618	unkapselt	(MC58)	<i>siaD</i> -, <i>gfp</i> <sup>+</sup> , <i>pilX</i> -	pEG2-Ery
3641	unkapselt	(MC58)	<i>siaD</i> -, <i>cfp</i> <sup>+</sup>	pGH53
3644	unkapselt	(MC58)	<i>siaD</i> -, <i>yfp</i> <sup>+</sup>	pGH52
3704	unkapselt	(MC58)	<i>siaD</i> -, <i>gfp</i> <sup>+</sup> , <i>pilX</i> -, <i>pilX</i> <sub>MC58</sub> <sup>+</sup>	pEG2-Ery, pHC33
3663	unkapselt	(MC58)	<i>siaD</i> -, <i>gfp</i> <sup>+</sup> , <i>pilX</i> -, <i>pilX</i> <sub>2120</sub> <sup>+</sup>	pEG2-Ery, pHC34
3847	unkapselt	(MC58)	<i>siaD</i> -, <i>gfp</i> <sup>+</sup> , <i>pilX</i> -, <i>pilX</i> <sub>2594</sub> <sup>+</sup>	pEG2-Ery, pHC35
3854	unkapselt	(MC58)	<i>siaD</i> -, <i>gfp</i> <sup>+</sup> , <i>pilE</i> -	pEG2-Ery
3861	unkapselt	(MC58)	<i>siaD</i> -, <i>gfp</i> <sup>+</sup> , <i>pilE</i> -, <i>pilE</i> <sub>MC58</sub> <sup>+</sup>	pEG2-Ery, pHC36
2120	C	ST-11	WT (invasives Isolat)	-
2517	unkapselt	(2120)	<i>siaD</i> -	-

Anmerkung: \*Nummern gemäß der Stammsammlung des IHM Würzburg; \*\* CM, Chloramphenicol; Ery, Erythromycin; Kana, Kanamycin; Spc, Spectinomycin

**Tab. 2a (II).** Verwendete *Neisseria meningitidis*-Stämme

Stamm*	Serogruppe	Sequenztyp (Elternstamm)	Genotyp	Plasmidgehalt
3379	unbekapselt	(2120)	<i>siaD</i> <sup>-</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup>	pEG2-Ery
3620	unbekapselt	(2120)	<i>siaD</i> <sup>-</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup> , <i>pilX</i> <sup>-</sup>	pEG2-Ery
3772	unbekapselt	(2120)	<i>siaD</i> <sup>-</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup> , <i>pilX</i> <sup>-</sup> , <i>pilX</i> <sub>MC58</sub>	pEG2-Ery, pHc33
3773	unbekapselt	(2120)	<i>siaD</i> <sup>-</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup> , <i>pilX</i> <sup>-</sup> , <i>pilX</i> <sub>2120</sub>	pEG2-Ery, pHc34
2594	A	ST-5	WT (invasives Isolat)	-
2668	unbekapselt	(2594)	<i>mynB</i> <sup>-</sup>	-
2677	unbekapselt	(2594)	<i>lst</i> <sup>-</sup>	
3380	unbekapselt	(2594)	<i>mynB</i> <sup>-</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup>	pEG2-Ery
3623	unbekapselt	(2594)	<i>mynB</i> <sup>-</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup> , <i>pilX</i> <sup>-</sup>	pEG2-Ery
α14	unbekapselt ( <i>cnl</i> )	ST-53	WT (Trägerisolat)	-
α62	unbekapselt ( <i>cnl</i> )	ST-845	WT (Trägerisolat)	-
α710	B	ST-136	WT (Trägerisolat)	-
α724	unbekapselt ( <i>cnl</i> )	ST-845	WT (Trägerisolat)	-
α111	Y	ST-23	WT (Trägerisolat)	-
3494	unbekapselt	(α111)	<i>siaD</i> <sup>-</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup>	pEG2-Ery

Anmerkung: \*Nummern gemäß der Stammsammlung des IHM Würzburg; \*\* CM, Chloramphenicol; Ery, Erythromycin; Kana, Kanamycin; Spc, Spectinomycin

**Tab. 2a (III).** Verwendete *Neisseria meningitidis*-Stämme

Stamm*	Serogruppe	Sequenztyp (Elternstamm)	Genotyp	Plasmidgehalt
α171	Y	ST-60	WT (Trägerisolat)	-
2220	Y	ST-23	WT (Trägerisolat)	-
3870	Y	(2220)	<i>gfp</i> <sup>+</sup>	pEG2-Ery
3871	unbekapselt	(2220)	<i>siaD</i> <sup>-</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup>	pEG2-Ery
α278	29E	ST-60	WT (Trägerisolat)	-
3492	unbekapselt	(α278)	<i>Cap29eA</i> <sup>-</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup>	pEG2-Ery
α425	B	ST-32	WT (Trägerisolat)	-
3350	unbekapselt	(α425)	<i>siaD</i> <sup>-</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup>	pEG2-Ery
H44/76	B	ST-32	WT (invasives Isolat)	-
3335	unbekapselt	(H44/76)	<i>siaD</i> <sup>-</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup>	pEG2-Ery
DE8797	B	ST-41	WT (invasives Isolat)	-
3490	unbekapselt	(DE8797)	<i>siaD</i> <sup>-</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup>	pEG2-Ery
DE8823	C	ST-8	WT (invasives Isolat)	-
3488	unbekapselt	(DE8823)	<i>siaD</i> <sup>-</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup>	pEG2-Ery

Anmerkung: \*Nummern gemäß der Stammsammlung des IHM Würzburg; \*\* CM, Chloramphenicol; Ery, Erythromycin; Kana, Kanamycin; Spc, Spectinomycin

**Tab. 2b.** Weitere verwendete Stämme

Stamm*	Spezies	weitere Stammbezeichnung	isoliert aus
3080	<i>S. aureus</i>	ATCC Nr. 12228	-
3054	<i>S. epidermidis</i>	K 18803/01**	Isolat von Katheterinfektion
3055	<i>S. epidermidis</i>	K 18779/01**	Isolat von Katheterinfektion
2087	<i>P. aeruginosa</i>	VB 812/97 CF**	mukoides Isolat aus CF-Lunge

Anmerkung: \*Nummern gemäß der Stammsammlung des IHM Würzburg; \*\*Nummern gemäß der Routinediagnostik des IHM Würzburg

#### 4.4.4. Plasmide

**Tab 3. (I).** Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pNT3	PCR-Produkt der Primer NT2/NT4, das <i>mynB</i> (putative Kapselpolymerase der Serogruppe A) überspannt, wurde in pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO kloniert	diese Arbeit
pNT5	Insertion des CAT-Gens von pTn <i>Max5</i> in die <i>HincII</i> -Restriktionsschnittstelle von <i>mynB</i> in pNT3	diese Arbeit
pGH15	Insertion des CAT-Gens von pTn <i>Max5</i> in die <i>SpeI</i> -Restriktionsschnittstelle des Serogruppe B <i>siaD</i> -Gens ( $\alpha$ -2,8-Polysialyltransferase) von pUE3 (Frosch <i>et al.</i> , 1991)	Kurzai <i>et al.</i> , 2005
pHC10	Insertion des Mini-Transposons Tn <i>Max5</i> , das das CAT-Gen an Position 370 des Serogruppe C <i>siaD</i> -Gens trägt, in das Plasmid pHC1	Ram <i>et al.</i> , 2003
pEG2-Ery	Neisserien-Expressionsvektor für das rs-GFP aus pEG2 (Christodoulides <i>et al.</i> , 2000). Die Ampicillin-Resistenzkassette ( <i>bla</i> ) in pEG2 wurde durch eine Erythromycin-Resistenzkassette ( <i>ermC</i> ) ersetzt.	Christodoulides und van der Ley, unveröffentlicht
pAP1	Durch Deletion des <i>rs-gfp</i> aus pEG2 entstandener Neisserien-Expressionsvektor	diese Arbeit
pAP2-1	Von pAP1 abgeleiteter Expressionsvektor. Die Erythromycin-Resistenzkassette wurde durch eine Spectinomycin-Resistenzkassette ersetzt	diese Arbeit

**Tab 3. (II).** Verwendete Plasmide

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
pSM236.1	Plasmid, das das <i>ecfp</i> von pECFP (Clontech) enthält	Lambertsen <i>et al.</i> , 2004
pSM236.2	Plasmid, das das <i>eyfp</i> von pEYFP (Clontech) enthält	Lambertsen <i>et al.</i> , 2004
pGH52	Neisserien-Expressionsplasmid für YFP, das von pAP1 und pSM236.2 abgeleitet wurde	diese Arbeit
pGH53	Neisserien-Expressionsplasmid für CFP, das von pAP1 und pSM236.1 abgeleitet wurde	diese Arbeit
pHC31	PCR-Produkt HC488/HC489, das das <i>pilX</i> -Gen überspannt, in pCR-Script <sup>®</sup> Amp SK(+) kloniert	diese Arbeit
pHC32	Insertion der Kanamycin-Resistenzkassette von pUC4K in das <i>pilX</i> nach inverser PCR mit HC492/493 des Plasmids pHC31	diese Arbeit
pHC33	PCR-Produkt mit HC511/512, das das MC58 <i>pilX</i> überspannt, wurde in die <i>SpeI-EcoRI</i> -Restriktionsschnittstellen von pAP2-1 kloniert	diese Arbeit
pHC34	PCR-Produkt mit HC511/512, das das 2120 <i>pilX</i> überspannt, wurde in die <i>SpeI-EcoRI</i> -Restriktionsschnittstellen von pAP2-1 kloniert	diese Arbeit
pHC35	PCR-Produkt mit HC511/512, das das 2594 <i>pilX</i> überspannt, wurde in die <i>SpeI-EcoRI</i> -Restriktionsschnittstellen von pAP2-1 kloniert	diese Arbeit
pHC36	PCR-Produkt mit HC530/HC531, das das MC58 <i>pilE</i> überspannt, wurde in die <i>SpeI-EcoRI</i> -Restriktionsschnittstellen von pAP2-1 kloniert	diese Arbeit
pHC37	PCR-Produkt mit HC526/527, das das MC58 <i>pilE</i> abdeckt, wurde in das Plasmid pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO kloniert	diese Arbeit
pHC38	Insertion der Kanamycin-Resistenzkassette von pUC4K in das <i>pilE</i> nach inverser PCR von pHC37 mit HC539-540	diese Arbeit
pTnMax5	Plasmid, das ein Minitransposon enthält, welches das CAT-Gen mit einem Gonokokken- <i>opa</i> -Promotor und einem fd-Terminator auf einem <i>HindIII</i> DNA-Fragment trägt.	Kahrs <i>et al.</i> , 1995
pUC4K	Vektor, der ein Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase-Gen enthält, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht	GE Healthcare
pHP45Ω	Vektor, der ein <i>aadA</i> -Gen tragendes Omega-Fragment, welches Spectinomycin-Resistenz verleiht, des Plasmids R100.1 enthält.	Prentki & Krisch, 1984
pCR-Script <sup>®</sup> Amp SK(+)	Klonierungsvektor für PCR-Produkte	Stratagene
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO	Klonierungsvektor für PCR-Produkte	Invitrogen

## 4.4.5. Oligonukleotide

Tabelle 4. (I). Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')*	Zielsequenz	Position in Bezug auf die Accession-Nr. oder NMB-Nr.	Accession-Nr.
NT2	ATGATGGTAATGGGAAAAGAGT	<i>mynB</i>	3222-3201	AF019760
NT4	ATACTTAATAACAGAAAATGGCG	<i>mynB</i>	1605-1627	AF019760
HC488	gcgcgc <u>GGATCC</u> AGTCTTACAATACCGAGCAG	NMB0889	118-138	
HC489	gcgcgcGGTACCCTCTGCCGATACTGCTTATC	NMB0892	146-165	
HC492	gcgcgcATGCATGACTATCATCATCTCAATCAATG	<i>pilX</i>	57-35	NMB0890
HC493	gcgcgcATGCATGCTGTGAAGCCTTCTCTAATC	<i>pilX</i>	458-478	NMB0890
HC511	gcgcgc <u>ACTAGT</u> CGTCCTTCAATCTTATGTAAGC	NMB0889	558-579	
HC512	gcgcgcGAATTCGGGAATCTAGACCTGTCGG	Intergenische Region	298-280 Bp. downstream von <i>pilX</i>	
HC475	GGTAAGAATGCCAATACCGTG	NMB0889	535-555	
HC487	ATACCCATAAAAATACCGTCTG	Intergenische Region	57-36 Bp. downstream von <i>pilX</i>	
HC475r	GTGCCATAACCGTAAGAATGG	NMB0889	555-535	

\*Restriktionsschnittstellen für anschließende Klonierungen der PCR-Produkte sind unterstrichen.

**Tabelle 4. (II).** Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')*	Zielsequenz	Position in Bezug auf die Accession-Nr. oder NMB-Nr.	Accession-Nr.
HC514	TTTATCGTGCTGATGGTGATG	NMB0889	64-84	
HC526	gcgcgc <u>GAATTC</u> GTACCAACAAGGCTGGATTC	Intergenische Region	545-526 Bp. upstream von <i>pilE</i>	
HC527	gcgcgc <u>GAATTC</u> CGTTGCCTCGGCTTAGCTC	Intergenische Region	572-554 Bp. downstream von <i>pilE</i>	
HC530	gcgcgc <u>ACTAGT</u> GCATTTCTTTCCAATTAGGAG	Intergenische Region	29-8 Bp. upstream von <i>pilE</i>	
HC531	gcgcgc <u>GAATTCT</u> GGAAAATCACTTACCGCTTG	Intergenische Region	51-31 Bp. downstream von <i>pilE</i>	
HC535	gcgcgc <u>GAATTC</u> ATACCATAAAAATACCGTCTG	Intergenische Region	57-36 Bp. downstream von <i>pilX</i>	
HC539	gcgcgc <u>CAATTG</u> AGGGTGTTTCATAAAATTACTCC	<i>pilE</i>	Pos. 11 bezüglich <i>pilE</i> , 11 Bp. upstream von <i>pilE</i>	NMB0018
HC540	gcgcgc <u>CAATTG</u> GCAAGTGATGCCAGCTAAGG	<i>pilE</i>	Pos. 496 bezüglich <i>pilE</i> , 2 Bp. downstream von <i>pilE</i>	NMB0018
ML20	gcgcgc <u>GGATCCT</u> GAAAAATCCCCTGGACGATAA	<i>pilX</i>		NMB0890
ML22	gcgcgc <u>GGATCCT</u> GAAAAATCCACAGGATAGTGA	<i>pilX</i>		NMB0890
ML27	gcgcgc <u>GGATCCT</u> TATTTTTTACGATTAGAGAAGGC	<i>pilX</i>		NMB0890

\*Restriktionsschnittstellen für anschließende Klonierungen der PCR-Produkte sind unterstrichen.

## 4.5. Lösungen und Puffer

### DEPC-Wasser:

250 ml H<sub>2</sub>O  
250 µl DEPC  
Inkubation ÜN bei 37°C, anschließend autoklavieren

### 10x MOPS:

0,4 M MOPS  
0,1 M Natriumacetat  
10 mM EDTA pH 8,0  
Einstellung auf pH 7,0 mit 2N NaOH

### 10x TAE:

400 mM Tris/HCl, pH 8,0  
200 mM Natriumacetat  
20 mM EDTA, pH 8,0

### 1x TBE:

100 mM Tris-HCl  
100 mM Borsäure  
2,5 mM EDTA  
pH 8,3

### GEBS:

20% Glycerin  
50 mM EDTA  
0,05% Bromphenolblau  
0,5% N-Lauroylsarkosin

### PBS:

10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4  
140 mM NaCl oder PBS Dulbecco ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>

### 20x SSC:

3,0 M NaCl  
0,3 M Natriumcitrat  
pH 7,0 mit 25% HCl

### 20x SSPE:

3,6 M NaCl  
0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O  
0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
20 mM EDTA

Lower Tris-Puffer:

90,85 g Tris in 400 ml dest. H<sub>2</sub>O, mit konz. HCl pH 8,8 einstellen, dann 10 ml 20%-ige SDS-Lösung addieren und auf 500 ml auffüllen

Upper Tris-Puffer:

30,3 g Tris in 400 ml dest. H<sub>2</sub>O, mit konz. HCl pH 6,8 einstellen, dann 10 ml 20%-ige SDS-Lösung addieren und auf 500 ml auffüllen

10x Elektrophorese-Puffer:

30,3 g Tris  
143,7 g Glycin  
5 g SDS  
ad. 1 l, 1:10 verdünnen für Gellauf

1x Sample Solution:

5% β-Mercaptoethanol  
2% SDS  
25% Glycerin in Ampuwa  
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8  
Bromphenolblau (etwa 1 Spatelspitze)

Coomassie-Färbelösung:

500 ml Methanol  
100 ml reine Essigsäure  
2,75 g Coomassie Brilliant Blue  
ad. 1 l dest. H<sub>2</sub>O

Entfärbelösung:

750 ml reine Essigsäure  
2000 ml Methanol  
ad. 10 l dest. H<sub>2</sub>O

Tris-Glycin-SDS (für Elektroelution):

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,025% SDS

Western-Blot-Puffer:

10x-Stammlösung für Blotpuffer:

30 g Tris  
144 g Glycin  
ad. 1 l dest. H<sub>2</sub>O

Blotpuffer:

100 ml 10x-Stammlösung  
200 ml Methanol  
700 ml dest. H<sub>2</sub>O

Block-Puffer:

1x PBS  
0,1% Tween20  
5% Magermilchpulver

Waschpuffer:

1x PBS  
0,1% Tween

## **4.6. Mikrobiologische und genetische Methoden**

### **4.6.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektroporation**

700 ml LB-Medium wurden mit *E. coli*-Zellen (Stamm DH5 $\alpha$ ) einer Übernachtskultur auf OD<sub>600</sub>=0,1 eingestellt und bis OD<sub>600</sub>=0,6 bei 37°C und 200 U/min inkubiert. Nach anschließender sofortiger Kühlung der Kultur im Eisbad (15 min) wurde diese dann für 20 min (5000 g, 4°C) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde zweimal in 250 ml eiskalten sterilen Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet noch einmal mit 10 ml Glycerin gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden abschließend in 1,5 ml 4°C kaltem 10%-igen Glycerin aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bei -70°C gelagert.

### **4.6.2. Elektroporation von *E. coli*-Zellen**

Bei der Elektroporation werden *E. coli*-Zellen durch einen elektrischen Impuls kompetent gemacht, was bedeutet, dass diese Zellen kurzzeitig zur Aufnahme fremder DNA befähigt

sind. Um die zu transformierende Plasmid-DNA zu entsalzen wurden die entsprechenden Ligationsansätze nach der Ligation mit dem PCR-Purifikationkit oder durch Phenolisieren und Etherisieren entsalzt. Plasmid-DNA gewünschter Menge wurden zu 40 µl kompetenter Zellen pipettiert und dann luftblasenfrei in eine gekühlte Elektroporationsküvette mit dem Elektrodenabstand 0,2 cm überführt. Die Transformation erfolgte mit einem Elektroporationsgerät bei folgenden Einstellungen: 2,5 kV, 25 µF und 400 Ω. Nach der Transformation wurde dieser Ansatz 1 h in 1 ml SOC-Medium bei 37°C und 200 U/min inkubiert, auf Antibiotika-haltigem LB-Agar ausplattiert und anschließend ÜN bei 37°C inkubiert.

#### **4.6.3. Transformation von Meningokokken**

Meningokokken sind natürlich kompetent, d.h. sie können DNA aus dem Medium aufnehmen, solange diese DNA-Aufnahmesequenzen (DUS, DNA-uptake sequence) besitzt. Bakterien einer ÜN-Kultur wurden in PPM+ auf OD<sub>600</sub>=0,1 eingestellt und 1 h bei 37°C und 200 U/min inkubiert. Anschließend wurde diese Suspension wieder auf OD<sub>600</sub>=0,1 eingestellt, mit dem entsprechenden Transformationsplasmid versehen und 5-6 h bei 37°C und 200 U/min inkubiert. Aliquots dieses Ansatzes wurden auf Antibiotika-haltigem GC-Agar ausgestrichen und ÜN bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bebrütet.

#### **4.6.4. Antibiotische Behandlungen**

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Penicillin G, Ciprofloxacin und Rifampicin wurde für die Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*siaD*- mit Hilfe des Etest<sup>®</sup>-Methode bestimmt. Meningokokken, die ÜN auf Columbia-Agarplatten wuchsen, wurden mit einem sterilen Wattestäbchen geerntet und in steriles 0,9%-iges PBS eingerieben. Die optische Dichte der Bakteriensuspension wurde auf 0,5 der McFarland-Einheit eingestellt. Dazu wurde ein Vitek-Denscheck-Gerät verwendet. Anschließend wurden die Bakterien auf mit 5% Schafblut supplementierten Müller-Hinton-Agar ausgestrichen und für 18-24 h bei 37°C inkubiert, um ein sub-konfluentes Wachstum der Bakterien zu erreichen. Die Etest-Resultate wurden den Anweisungen des Herstellers entsprechend ausgewertet. Die antibiotische Suszeptibilität wurde sowohl für Biofilme unter statischen und unter Flussbedingungen, als auch für planktonische Zellen bestimmt. Die Suszeptibilität der Biofilme im Flusssystem gegenüber Penicillin, Ciprofloxacin und Rifampicin wurde getestet, indem das

Biofilmmedium (modifiziertes NDM) mit der 10-fachen MHK des jeweiligen Antibiotikums ergänzt wurde. 24 h alte Biofilme wurden für 4 h bzw. 24 h unter Flussbedingungen mit dem jeweiligen Antibiotikum behandelt. Die Vitalität der Bakterien im Biofilm wurde durch die Zugabe von 1 µM Propidiumiodid (PI), das selektiv tote Zelle anfärbt, zum Medium getestet. PI in Verbindung mit GFP-markierten Bakterien ist schon erfolgreich bei *Pseudomonas aeruginosa* als Färbemethode für tote Zellen verwendet worden (Hentzer *et al.*, 2001). Lebende GFP-markierte und tote PI-markierte Bakterien wurden durch CLSM visualisiert. Die antibiotische Empfindlichkeit statischer Biofilme wurde in 24-well-Zellkulturschalen bestimmt, in denen jeweils ein 15 mm im Durchmesser großes Glasdeckgläschen als Substratum diente. Jeweils 1 ml Bakteriensuspension mit etwa  $1 \times 10^8$  Bakterien pro ml wurde pro Vertiefung der Zellkulturplatte eingesetzt, um das Biofilmwachstum zu veranlassen. Das Medium 24 h alter Biofilme wurde abgenommen und durch frisches Medium ersetzt, das die 10-fache MHK des jeweiligen Antibiotikums enthielt. Nach weiteren 24 h wurden die Biofilme zweimal mit 1 ml Antibiotikum-freiem Medium gespült. Dann wurde der Biofilm mit Wattestäbchen abgelöst und grob zerkleinert. Weiteres Vortexen für 1 min sorgte für eine weitere Zerkleinerung des Biofilms in möglichst Einzelzellen. Die Menge noch lebender Biofilmzellen wurde durch serielle Verdünnungen, anschließendes Ausplattieren auf GC-Agar und Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) ermittelt. In demselben Satz an Experimenten wurde ebenfalls die antibiotische Suszeptibilität planktonischer Zellen bestimmt. Hierzu wurden statische Biofilme wie oben beschrieben kultiviert. Das Biofilmmedium 24 h alter Biofilme wurde durch frisches Medium ersetzt, das die 10-fache MHK entweder von Penicillin, Ciprofloxacin oder Rifampicin enthielt. Wiederum wurden die Biofilme mit Wattestäbchen abgelöst und durch 1-minütiges Vortexen vollständig zerkleinert. Diese nun planktonischen Zellen wurden für weitere 24 h und 37°C bei 200 U/min geschüttelt. Anschließend wurden die planktonischen Zellen zweimal mit 1 ml Antibiotikum-freiem Medium gewaschen, seriell verdünnt und die KBE zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen ermittelt.

**Tab. 5.** Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration mit Hilfe des Etest<sup>®</sup>-Methode

Stamm	MHK Penicillin (µg/ml)	MHK Ciprofloxacin (µg/ml)	MHK Rifampicin (µg/ml)
MC58 <i>siaD</i> -	0,032	0,003	0,004
2120 <i>siaD</i> -	0,047	0,003	0,004
2594 <i>mynB</i> -	0,047	0,003	0,012

## 4.6.5. Stammkonstruktionen

### 4.6.5.1. Inaktivierung von Kapselgenen durch Insertion

Plasmide und Primer, die für die Konstruktion der Kapselmutanten bei Meningokokken gebraucht wurden, sind in den Tabellen 3 und 4 aufgelistet. Um eine Kapsel-defiziente Mutante der Serogruppe A zu konstruieren, wurde das *mynB*-Gen durch Insertion inaktiviert, welches höchstwahrscheinlich die Kapselpolymerase der Serogruppe A darstellt (Swartley *et al.*, 1998). Das *mynB*-Gen des Stammes 2594 wurde mit den Primern NT2 und NT4 mittels PCR amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert, wodurch das Plasmid pNT3 entstand. Nach der Deletion eines durch Restriktionsverdau mit HincII erzeugten 253 bp langen Fragments (Position 477-729) aus pNT3 wurde ein aus dem Plasmid pTNMax5 (Kahrs *et al.*, 1995) durch HindIII-Verdau erzeugtes Fragment mit stumpfen Enden inseriert, welches die Chloramphenicol-Resistenzkassette einschließt. Das daraus entstandene Plasmid wurde pNT5 genannt. Anschließend wurde der Stamm 2594 mit pNT5 transformiert. Die Inaktivierung der Kapsel wurde durch PCR und ELISA mit dem Antikörper mAb 932 (eine freundliche Gabe von D. Bitter-Suerbaum, Medizinische Hochschule Hannover), der spezifisch für das Kapselpolysaccharid der Serogruppe A ist (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen. Um eine Kapsel-defiziente Mutante der Serogruppe B zu konstruieren, wurde der Stamm MC58 mit dem Plasmid pGH15 transformiert. pGH15 enthält eine Chloramphenicol-Resistenzkassette im offenen Leserahmen (ORF) des *siaD*-Gens, das die  $\alpha$ -2,8-Polysialyl-transferase kodiert. Die Inaktivierung des *siaD*-Gens wurde durch ELISA mit dem Antikörper mAb 735 bestätigt, der das Kapselpolysaccharid der Serogruppe B detektiert (Frosch *et al.*, 1985). Um eine Kapsel-defiziente Mutante der Serogruppe C zu konstruieren, wurde der Stamm 2120 mit dem Plasmid pHC10 transformiert. Das Plasmid pHC1, das ein 3 kB langes EcoRI-Fragment mit dem Serogruppe C *siaD*-Gen enthält, wurde wie kürzlich beschrieben konstruiert (Claus *et al.*, 1997). Durch Transposon-Insertion mit dem pTNMax5-System wurde die Chloramphenicol-Resistenzkassette an Position 370 des *siaD*-Gens eingefügt. Das resultierende Plasmid wurde pHC10 genannt. Die Inaktivierung des *siaD*-Gens wurde durch ELISA mit dem Antikörper mAb 924 bestätigt, der das Kapselpolysaccharid der Serogruppe C detektiert (Vogel *et al.*, 1998). Die Inaktivierung des *siaD*-Gens der Serogruppe Y erfolgte wie unlängst beschrieben (Ram *et al.*, 2003). Um eine Kapsel-defiziente Mutante der Serogruppe 29E zu konstruieren,

wurde der entsprechende Stamm mit dem Plasmid pNB10 transformiert. Das pNB10-Plasmid enthält das durch Insertion mit einer Kanamycin-Resistenzkassette unterbrochene Gen *cap29eA* (Accession-Nr. AJ576117).

#### 4.6.5.2. Inaktivierung des *pilX*-Gens in Meningokokken durch Insertion

Um das *pilX*-Gen zu klonieren, wurde ein 2,9 kB langes DNA-Fragment mit Primern HC488 und HC489 von chromosomaler DNA des Stammes MC58 durch PCR amplifiziert. Dieses Fragment wurde in das Plasmid pCR-Script<sup>®</sup> (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) ligiert, was zur Bildung des Plasmids pHC31 führte. Mit pHC31 als Template wurde eine inverse PCR mit den Primern HC492 und HC493 durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit NsiI verdaut und mit dem PstI-verdauten DNA-Fragment des Plasmids pUC4K ligiert, das eine Kanamycin-Resistenzkassette beinhaltet. Das daraus entstandene Plasmid wurde pHC32 genannt. Die unbekapselten GFP-exprimierenden Stämme 3349, 3379 und 3380 wurden mit dem Plasmid pHC32 transformiert, um eine *pilX*-Inaktivierung zu bewirken. Die Komplementierung der *pilX*-Inaktivierung wurde durch Klonierung des *pilX*-Gens in ein von pAP1 abgeleitetes Plasmid erreicht. Zuerst wurde die Erythromycin-Resistenzkassette aus pAP1 mit SacI und NsiI herausgeschnitten. Das entstandene DNA-Fragment wurde mit T4 DNA-Polymerase inkubiert, um die 3'-Enden aufzufüllen, und wurde dann mit dem 2,2 kB großen SmaI-Restriktionsfragment des Plasmids pHP45Ω ligiert, das das Spectinomycin-Resistenzgen *aadA* enthält. Dieses neue Plasmid wurde pAP2-1 genannt. Anschließend wurde das *pilX*-Gen des Stammes MC58 mit den Primern HC511 und HC512 amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde mit dem SpeI-EcoRI-verdauten DNA-Fragment des Plasmids pAP2-1 ligiert. Dieses Plasmid wurde pHC33 genannt. Die Inaktivierung des *pilX*-Gens und die anschließende Komplementation der *pilX*-Inaktivierung wurden mit PCR und Southern Blot-Hybridisierung bestätigt. Indirekt wurde die *pilX*-Inaktivierung auch durch einen Aggregationstest bestätigt (Helaine *et al.*, 2005).

#### 4.6.5.3. Inaktivierung des *pilE*-Gens in Meningokokken durch Insertion

Das *pilE*-Gen (NMB0018) des Stammes MC58, mit jeweils 0,5 kB Upstream- und Downstream-Sequenz, wurde mit den Primern HC526 und HC527 amplifiziert und in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO kloniert, was zur Bildung des Plasmids pHC37 führte. Um das *pilE*-Gen von dem Plasmid pHC37 zu entfernen, wurde eine inverse PCR mit den Primern HC539

und HC540 durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde dann mit MfeI verdaut und mit dem 1,2 kB großen EcoRI-Fragment des Vektors pUC4K ligiert, das eine Kanamycin-Resistenzkassette enthält. Das daraus entstandene Plasmid, in dem das *pilE*-Gen durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt wurde, wurde zur Transformation des Stammes 3349 verwendet. Die Komplementation der *pilE*-Mutation durch die Pile-Expression *in trans* konnte nur dadurch erreicht werden, dass das Expressionsplasmid vor der *pilE*-Inaktivierung in die Zelle geschleust wurde, da die *pilE*-Mutation die natürliche Kompetenz vernichtete. Die Pile-Expression *in trans* wurde durch die Transformation der Meningokokken mit dem Expressionsplasmid pHC36 erreicht. Für die Konstruktion von pHC36 wurde das *pilE*-Gen des Stammes MC58 mit den Primern HC530 und HC531 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde nun mit SpeI und EcoRI geschnitten und in die entsprechende Restriktionsschnittstelle von pAP2-1 kloniert, wodurch das Plasmid pHC36 entstand.

#### 4.6.5.4. Markierung von Meningokokken mit Fluoreszenzproteinen

Der Hybrid-Shuttle-Vektor pEG2 trägt das red-shifted *gfp* (*rs-gfp*)-Gen unter der Kontrolle eines PorA-Promotors (Christodoulides *et al.*, 2000). Aus diesem Plasmid wurde die Ampicillin-Resistenzkassette (*bla*) entfernt und durch eine Erythromycin-Resistenzkassette (*ermC*) ersetzt. Das daraus resultierende Plasmid wurde pEG2-Ery genannt (eine freundliche Gabe von M. Christodoulides und P. van der Ley, unpubliziert). Die unbekapselten Stämme 3240 (MC58*siaD*-), 2517 (2120*siaD*-) und 2668 (2594*mynB*-) wurden zur Erzeugung grün fluoreszierender Meningokokken mit dem Plasmid pEG2-Ery transformiert. Um blau und gelb fluoreszierende Meningokokken zu erzeugen, wurde das *rs-gfp*-Gen aus dem Plasmid pEG2-Ery deletiert, indem zuerst ein Verdau mit KpnI und anschließend mit SacII erfolgte. Das verbleibende DNA-Fragment wurde nach Inkubation mit T4-DNA-Polymerase religiert, wodurch das Plasmid pAP1 entstand. Die Gene, die für das blau fluoreszierende Protein (*ecfp*) bzw. für das gelb fluoreszierende Protein (*eyfp*) kodieren, wurden mit XbaI und HindIII aus den Plasmiden pSM236.1 bzw. pSM236.2 (Lambertsen *et al.*, 2004) herausgeschnitten und jeweils in das mit SpeI und EcoRV geschnittene Plasmid pAP1 kloniert. Daraus entstanden die Plasmide pGH53 und pGH52. Anschließend wurden die unbekapselten Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*- mit den Plasmiden pGH53 und pGH52 transformiert. Die dauerhafte Expression des rs-GFP, CFP und YFP wurde durch Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss LSM510 Konfokales Laser Scanning-Mikroskop, Carl Zeiss Jena, Deutschland) bei 508 nm, 483 nm bzw. 542 nm in Lyngby bestätigt.

## **4.7. Molekularbiologische Methoden**

### **4.7.1. Isolation von Plasmid-DNA**

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde entweder das QIAprep Spin Miniprep Kit oder das Qiagen Plasmid Midi Kit verwendet. Die Plasmidpräparation erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

### **4.7.2. Isolation chromosomaler DNA**

ÜN gewachsene Bakterien von 2 GC-Agarplatten wurden in 5 ml PBS eingerieben. Von dieser Suspension wurde die  $OD_{600}$  bestimmt.  $1,5 \times 10^{10}$  Zellen wurden für die DNA-Isolation verwendet, wobei 1 ml Zellsuspension mit  $OD_{600}=1$  etwa  $1 \times 10^9$  Zellen entspricht. Die Bakteriensuspension wurde für 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Die chromosomale DNA wurde mit dem Qiagen Genomic-tip 100/G Kit den Herstellerangaben entsprechend isoliert. Das DNA-Pellet wurde bei  $37^\circ\text{C}$  getrocknet und anschließend in 100  $\mu\text{l}$  TE resuspendiert. Die Menge und die Qualität der DNA wurde mittels Gelelektrophorese und Messung der  $OD_{260}$  bestimmt.

### **4.7.3. Quantifizierung von DNA mittels Absorptionsspektrometrie**

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgt über die Messung der  $OD_{260}$ . Dazu wurde die DNA 1:50 verdünnt. Die Nukleinsäurekonzentration errechnete sich aus der  $OD_{260}$ , der Verdünnung und einem für DNA spezifischen Multiplikationsfaktor. Aus dem Verhältnis der  $OD_{260}$  und der  $OD_{280}$  erhielt man außerdem eine Aussage über den Verunreinigungsgrad der isolierten DNA mit Proteinen.

### **4.7.4. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese**

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit ihrer Größe wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für die Herstellung der Agarosegele wurden 0,8% Agarose in TBE verwendet. Als Laufpuffer diente ebenfalls TBE. Zur Größenbestimmung wurde die SmartLadder<sup>TM</sup> oder der  $\lambda$ -Hind III-Marker verwendet. Die

Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 220 V. Nach der Gelelektrophorese wurde die DNA im Gel in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt und im UV-Licht analysiert.

#### **4.7.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen**

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraktion Kit* durchgeführt. Die Aufreinigung amplifizierter DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen erfolgte mittels *QIAquick PCR Purification Kit*. Beide Prozeduren wurden entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

#### **4.7.6. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern eingesetzt. Jeweils 1-2 Units Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden verwendet, um  $1\mu\text{g}$  DNA in einer Stunde zu schneiden.

##### Restriktionsansatz:

1  $\mu\text{g}$  DNA  
2  $\mu\text{l}$  Restriktionsendonuklease  
2  $\mu\text{l}$  Puffer

Dieser Ansatz wurde mit Wasser auf ein Volumen von 30  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und für einen Zeitraum von 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Spaltung chromosomaler DNA wurden 2-3  $\mu\text{g}$  mit 30-40 U Restriktionsendonuklease pro  $\mu\text{g}$  DNA ÜN bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

#### **4.7.7. Dephosphorylierung von Vektor-DNA**

Schneidet man den Vektor nur mit einem Restriktionsenzym entstehen zwei kompatible Enden, die wieder miteinander ligieren können. Die Hydrolyse der 5'- Phosphatreste durch CIP (calf intestine alkaline phosphatase) verringert die Religationsrate des Vektors. Das Enzym ist mit den meisten Puffern kompatibel, die für die Restriktionsverdau verwendet wurden. Daher fand die Dephosphorylierung parallel zum und nach dem Restriktionsverdau

statt. Zu dem Restriktionsansatz wurde 1  $\mu\text{l}$  CIP gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme bei 80°C für 20 min deaktiviert. Zuletzt wurde noch einmal 1  $\mu\text{l}$  CIP zum Restriktionsansatz gegeben, der dann 45 min bei 37°C inkubiert wurde. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

#### **4.7.8. Auffüllen überhängender 5'-DNA-Enden und Abbau überhängender 3'-DNA-Enden**

Um Restriktionsfragmente mit klebrigen Enden in geschnittene Vektoren mit glatten Enden klonieren zu können, müssen die Überhänge beseitigt werden. Die 5'-Überhänge werden durch die Polymerasefunktion der T4-Polymerase aufgefüllt. Die 3'-Überhänge werden durch die 3', 5'-Exonukleasefunktion der T4-Polymerase entfernt.

##### Ansatz:

x  $\mu\text{l}$  DNA  
x  $\mu\text{l}$  dNTPs (100  $\mu\text{M}$  Endkonzentration je dNTP)  
2  $\mu\text{l}$  T4-Polymerase  
7  $\mu\text{l}$  Puffer  
Auffüllen mit Wasser auf 70  $\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde für 12 min bei 20°C inkubiert und anschließend das Enzym durch 10-minütiges Erhitzen auf 75°C deaktiviert.

#### **4.7.9. Glätten von PCR-Produkten**

Das Glätten von PCR-Produkten ist notwendig, um zusätzliche Basen wieder zu entfernen, die durch die PCR an das Template angehängt wurden. Generell führt dieser Schritt zu einer erhöhten Ausbeute von DNA-Molekülen mit glatten (blunt) Enden, die für die Klonierungsreaktionen benötigt werden.

##### Ein Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

1  $\mu\text{g}$  PCR-Produkt  
1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP-Mix (2,5 mM)  
1  $\mu\text{l}$  10x Polishing-Puffer  
1  $\mu\text{l}$  Pfu DNA-Polymerase (0,5 U)  
ad. 10  $\mu\text{l}$

Dieser Ansatz wurde vorsichtig gemischt, mit Mineralöl überschichtet und für 30 min bei 70°C inkubiert.

#### **4.7.10. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren**

Die Ligation wurde bei 16°C ÜN in 1x Ligase-Puffer in einem Reaktionsvolumen von 10 µl mit 1 µl T4-Ligase (400 U/µl) unter der Anwesenheit von 500 µM ATP durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert sollte 1:3 bis 1:5 betragen.

#### **4.7.11. Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter DNA-Sonden**

Die DNA-Fragmente zur Herstellung spezifischer Sonden wurden mittels PCR amplifiziert und mit dem Qiagen PCR-Purification Kit aufgereinigt. Jeweils 3 µg der aufgereinigten DNA wurden in eine Markierungsreaktion eingesetzt. Die Methode beruht auf der Anlagerung von kurzen Zufallsprimern an einzelsträngige DNA, gefolgt von einer Verlängerung dieser Primer durch das Klenow-Enzym, wobei etwa alle 25 Nukleotide DIG-markiertes dUTP in den Komplementär-Strang eingebaut wird.

Die zur Markierung vorgesehene aufgereinigte DNA wurde auf ein Gesamtvolumen von 15 µl aufgefüllt, für 10 min bei 95°C denaturiert (in Einzelstränge) und sofort auf Eis abgekühlt. Zu diesen 15 µl wurden 2 µl Hexanukleotidgemisch (10x), 2 µl dNTP-Markierungsgemisch und 1 µl Klenow-Enzym gegeben. Dieser Ansatz wurde dann ÜN bei 37°C inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde mit 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8) gestoppt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 2,5 µl Natriumacetat (3 M, pH 4,5) und 75 µl eiskaltem Ethanol sowie durch anschließende Inkubation bei -70°C für 30 min. Dieser Ansatz wurde dann zentrifugiert, das DNA-Pellet mit kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl 1x TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Die Qualität der Markierung wurde mit einem Standard DIG-markierter DNA verglichen. Hierzu wurden verschiedene Verdünnungsstufen der markierten und der Referenz-DNA auf eine Nylonmembran getropft, mit UV-Licht irreversibel an die Membran gebunden und mittels Chemilumineszenz quantifiziert.

#### **4.7.12. Southern Blot**

Genomische DNA wurden mit den gewünschten Restriktionsendonklusasen geschnitten und anschließend elektrophoretisch in einem 0,8%-igen Agarosegel aufgetrennt. Um die DNA

effizienter an die Nylonmembran zu binden, wurde das Agarosegel nach dem Gellauf 20 min in 0,25 M HCl schüttelnd inkubiert, wodurch die DNA teilweise depuriniert wurde, was die Bindungsfähigkeit der DNA erhöht. Anschließend wurde das Gel 30 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und weitere 30 min in Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl pH 7, 3 M NaCl) schüttelnd inkubiert. Der Kapillartransfer der DNA aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran erfolgte unter Verwendung eines Hochsalzpuffers (10x SSPE) ÜN bei RT.

#### **4.7.13. DNA-Hybridisierung**

##### “High SDS”-Hybridisierungslösung:

10,5 g SDS  
75 ml Formamid  
37,5 ml 20x SSC  
7,5 ml 1 M Natriumpuffer ( $\frac{3}{4}$  NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und  $\frac{1}{4}$  Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,5)  
1,5 ml Sarkosin (10%)  
30 ml Blocking-Reagenz

Alle Reagenzien wurden bei ca. 60°C gelöst.

Die Nylonmembran wurde 1 h bei 42°C in 10 ml High SDS-Puffer vorhybridisiert, um unspezifische Bindungen der Sonden-DNA zu verhindern. Anschließend wurden 10 ml Hybridisierungslösung 100 ng Sonden-DNA zugesetzt, dieser Ansatz 10 min bei 95°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Dann wurde die Vorhybridisierungslösung durch die Hybridisierungslösung ersetzt und die Membran ÜN bei 42°C inkubiert.

#### **4.7.14. Nachweis DIG-markierter DNA mittels Chemilumineszenz**

Die DIG-markierte Sonden-DNA wurde mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Hierbei wandelt die Alkalische Phosphatase, die an DIG-spezifische Antikörper gekoppelt ist, ein Substrat (hier CSPD) in ein luminisierendes Substrat um, dessen Lichtemission mit Röntgenfilmen nachgewiesen wird.

Die Nylonmembran wurde zweimal 5 min in 2x SSC und 0,1% SDS bei RT gewaschen. Anschließend wurde nochmals 2x 15 min in 0,1x SSC und 0,1% SDS bei 68°C gewaschen.

Anschließend wurde mit folgendem Protokoll weiter verfahren:

1. 1-5 min in Waschpuffer [0,1 M Maleinsäure, 0,1 M NaCl (pH 7,5), 0,3% Tween20]
2. 30 min in Puffer 2 [1% Blocking-Reagenz, 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl (pH 7,5)]
3. 30 min anti-DIG-Antikörper (gekoppelt an alkal. Phosphatase) in Puffer 2 (1:10000)
4. 2x 15 min in Waschpuffer
5. 5 min in Puffer 3 [0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl (pH 9,6)]
6. 5 min CSPD in Puffer 3 (1:100)

Abschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie gewickelt und für 15 min bei 37°C inkubiert, bevor der Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt wurde.

#### **4.7.15. PCR**

Die PCR wurde mit AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase oder Taq-Polymerase unter Beachtung der Herstellerangaben durchgeführt. In einen 50 µl-PCR-Ansatz wurde 10 ng chromosomale DNA, jeweils 10 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 10 nmol dNTPs und Polymerase den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. Ein PCR-Zyklus bestand aus 10 sec Denaturierung bei 94°C, 1 min Primeranlagerung bei 52°C und 1 min Primerverlängerung (für ein 1 kb großes Fragment) bei 72°C. Die Anzahl der Zyklen betrug 35. Die Primeranlagerungstemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der Primer-DNA-Komplexe, wobei für jedes hybridisierende AT-Paar 2°C und für jedes hybridisierende GC-Paar 4°C angenommen wurden. Von dieser Summe wurden 4°C für die endgültige Anlagerungstemperatur subtrahiert.

#### **4.7.16. DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA basierte auf der „Kettenabbruch“-Methode von Sanger (Sanger, 1975). Die Sequenzreaktionen wurden unter Verwendung von BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kits (Applied Biosystems) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Als Template diente entweder 400 ng Plasmid-DNA oder 100 ng lineare DNA (PCR-Produkte). Dazu wurden 10 pmol des jeweiligen Sequenzierprimers gegeben und mit dest. H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 8 µl aufgefüllt. Die Sequenzierung mit dem ABI Prism 377 DNA-Sequenzierautomat wurde vom zentralen DNA-Labor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie durchgeführt und die Sequenzen als Computerdateien zur Verfügung gestellt.

#### 4.7.17. RNA-Isolation

15 ml PPM+ wurden mit Meningokokken einer ÜN-Kultur auf  $OD_{600}=0,1$  beimpft und unter Schütteln auf  $OD_{600}=0,5$  wachsen gelassen. Dann wurden die Bakterien pelletiert (10 min bei 4000 g und 4°C) und wieder in 1 ml RLT-Puffer plus 0,1% 2-Mercaptoethanol resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann in FastRNA Blue-Röhrchen überführt. Der mechanische Aufschluss erfolgte durch in den Röhrchen befindliche Glaskügelchen in einem FastPrep FP120 Schüttler für 45 s bei einer Geschwindigkeit von 6,5. Die Röhrchen wurden anschließend für 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Die anschließende RNA-Isolation wurde mit dem RNeasy Midikit entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde mit 50 µl RNase-freiem Wasser bei 8000 g für 1 min eluiert. Um DNA aus der RNA-Präparation zu eliminieren erfolgte eine DNase I-Behandlung. Den 50 µl-Ansätzen wurden jeweils 5 µl 5 mM  $MgSO_4$ , 5 µl 0,1 M Na-Acetat und 1 µl 10 U/µl DNase I hinzugefügt. Der Gesamtansatz wurde nun 1 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Aufreinigung der RNA-Präparation nach Herstellerangaben des RNeasy Midikits. Der Erfolg des DNase-Verdaus wurde mit einer Kontroll-PCR überprüft. 0,5 µl RNA-Präparation dienten hierbei als Template. 10 ng genomische DNA wurden als Positivkontrolle für diese PCR eingesetzt. Die Qualität der RNA-Präparation wurde auch durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Quantität der RNA wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt.

#### 4.7.18. Qualifizierung von RNA mittels denaturierender Gelelektrophorese

##### 5x RNA-Gelladungspuffer:

5 ml 50% Formamid  
1,65 ml 2,2 M Formaldehyd  
500 µl 1x MOPS  
1 ml 1/10 Volumen Ficoll 1-10%  
2 ml 0,02% Bromphenolblau

Für ein 1%-iges Gel wurden 72 ml DEPC- $H_2O$  und 5 ml MOPS bis zum vollständigen Schmelzen der Agarose erhitzt. Nachdem die Mischung auf etwa 50°C abgekühlt war, erfolgte die Zugabe von 40 µl 1 M Guanidinthiocyanat, 8,7 ml DEPC- $H_2O$  und 7,5 µl Ethidiumbromid. Jeweils 1 Volumen 5x RNA-Gelladungspuffer wurde mit 4 Volumen RNA-Präparation gemischt, für 15 min bei 65°C erhitzt, anschließend kurz auf Eis gestellt und dann auf das Gel aufgetragen. Als Gellauf-Puffer diente 1x MOPS-Puffer.

#### 4.7.19. RT-PCR von NMB0889

Die Gesamt-RNA der Stämme MC58*siaD*-/*gfp*+, MC58*siaD*-/*gfp*+/*pilX*-, MC58*siaD*-/*gfp*+/*pilX*-/*pHC33*, 2120*siaD*-/*gfp*+, 2120*siaD*-/*gfp*+/*pilX*-, 2594*mynB*-/*gfp*+ und 2594*mynB*-/*gfp*+/*pilX*- wurde mit dem Qiagen RNeasy Midi Kit entsprechend den Instruktionen des Herstellers isoliert und anschließend mit DNase I verdaut. Die Expression von NMB0889 mRNA wurde durch RT-PCR mit dem Qiagen OneStep RT-PCR Kit mit den Primern HC475r und HC514 nachgewiesen. Die reverse Transkription wurde für 30 min bei 50°C durchgeführt, gefolgt von der Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 15 min bei 95°C. Gleichzeitig wurde durch die Inkubation bei 95°C das cDNA-Template denaturiert und die HotStart *Taq* DNA-Polymerase aktiviert. Die Parameter der anschließenden PCR waren folgendermaßen: Denaturierung für 1 min bei 94°C, Anlagerung der Primer für 1 min bei 55°C, Primerverlängerung für 2 min bei 72°C. Die Anzahl der Zyklen betrug 35. In einer Standard-PCR wurden die Primer der RT-PCR und chromosomale DNA zur Kontrolle der korrekten Fragmentlänge genutzt. Das Fehlen von DNA in der RNA-Präparation wurde durch negative Resultate in PCRs gezeigt, in denen die RNA-Präparation als Template diente.

### 4.8. Protein-biochemische und immunologische Methoden

#### 4.8.1. ELISA

Ein ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) ist ein Mikrotiterplattentest, bei dem z.B. Antigene in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten gebunden werden. Anschließend erfolgt die Beschichtung des Antigens mit einem Antikörper, der wiederum von einem zweiten enzymkonjugierten Antikörper gebunden wird. Der Nachweis des Antigens erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion.

##### Material:

ELISA-Platten (hohe Bindungskapazität)

Waschpuffer: 1x PBS

Block-Puffer: 1% BSA/PBS

ABTS: 5 ml 10x Pufferkonzentrat plus 1 Substrattablette (50 mg)

0,05% Glutardialdehyd/PBS

Durchführung:

20 µl Poly-D-Lysin (PDL) (25 µg/ml) wurden in eine Vertiefung pipettiert, für 30 min inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. ÜN gewachsene Meningokokken wurden in PBS eingerieben und auf eine  $OD_{600}=0,1$  eingestellt. Davon wurden 20 µl in eine Vertiefung gegeben und 1 h inkubiert. Anschließend wurden die angelagerten Bakterien durch die Zugabe von 100 µl 0,05% Glutardialdehyd/PBS an die Oberfläche fixiert. Nach 10 min wurde die Platte dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 150 µl 1% BSA/PBS pro Vertiefung die Blockierung möglicher freier Antikörperbindungsstellen. Nach 30 min wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Bindung des Kapsel-spezifischen Antikörpers (Verdünnung je Kapselspezifität in 1% BSA/PBS) durch Zugabe von 20 µl Antikörperlösung pro Vertiefung.

Kapselpolysaccharid der Serogruppe:Kapsel-spezifischer Antikörper

A	Maus mAb 932 (Vogel <i>et al.</i> , 1998)
B	Maus mAb 735 (Frosch <i>et al.</i> , 1985)
C	Maus mAb 924 (Vogel <i>et al.</i> , 1998)
W	Maus mAb 1509 (Vogel <i>et al.</i> , 1998)
Y	Maus mAb 1938 (Vogel <i>et al.</i> , 1998)

Nach 1 h wurde die Platte dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper (anti-Maus IgG+M Pox) 1:2500 in 1% BSA/PBS verdünnt und je 20 µl der Verdünnung in eine Vertiefung gegeben. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl ABTS (1 mg/ml) pro Vertiefung. Nach 10 und 20 min wurde die  $OD_{414}$  photometrisch bestimmt.

**4.8.2. Immunfluoreszenz von Typ IV-Pili**

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde an einem Zeiss Axio Imager Z1 Fluoreszenz-Mikroskop (Carl Zeiss Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Mikroskopie erfolgte nach Standardprotokollen (Hammerschmidt *et al.*, 1996). Zur Färbung von Pili der Klasse I bzw. der Klasse II wurden die monoklonalen Antikörper SM1 bzw. AD211 verwendet. Zur Detektion wurden Alexa Fluor 488 nm Ziegen-Anti-Maus-Antikörper (Molecular Probes®) verwendet. Die Immunfluoreszenz zur Visualisierung der Pili wurde wie folgt durchgeführt:

Material:

Objekträger für Immunfluoreszenz: 75x 25x 1 mm, 2 Mattrand 20 mm, mit 12 Feldern (6 mm Durchmesser)  
Feuchte Kammer  
Deckgläschen 24x 60 mm  
Methanol (-20°C)  
1xPBS  
New York Sac (NYS) (Gebrauchslösung: 0,2% in PBS)  
Fluoprep

Durchführung

ÜN auf GC-Agar gewachsene Meningokokken aus dem 3. Ausstrich (3-Ösen-Ausstrich) wurden in PPM+ auf  $OD_{600}=0,1$  eingestellt und für 1 h bei 37°C und 200 U/min inkubiert. Diese Kultur wurde nun wieder auf  $OD_{600}=0,01$  eingestellt und für 2 h bei 37°C und 200 U/min inkubiert. Anschließend wurde diese Kultur auf  $OD_{600}=0,1$  eingestellt, und 1 ml dieser Kultur wurden für 5 min bei 13000 U/min bei RT pelletiert. Das Pellet wurde nun in 1 ml 0,2% NYS/PBS sorgfältig resuspendiert und Portionen von 10 µl pro Feld aufgebracht. Anschließend wurde dieser Objekträger luftgetrocknet. Die angehefteten Bakterien wurden nun für 10 min mit Methanol (-20°C) fixiert. Die Antikörper wurden in 0,2% NYS/PBS verdünnt. 10 µl der Verdünnung wurden pro Feld eingesetzt.

Primärantikörper:

Anti-Klasse I-Pili: Maus mAb SM1: (freundliche Gabe von M. Virji, Bristol, UK)  
Anti-Klasse II-Pili: Maus mAb AD211: (freundliche Gabe von M. Achtman, Berlin)

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37°C für 1 h. Anschließend wurden 3x 5 min mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus IgG gekoppelt an Alexa Fluor 488) wurde 1:400 in 0,2% NYS/PBS verdünnt. 10 µl der Verdünnung wurden pro Feld eingesetzt. Die Inkubation mit dem 2. Antikörper erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37°C für 1 h. Anschließend wurden die Felder 2x 5 min mit PBS gewaschen und mit destilliertem Wasser gespült. Die nun Fluoreszenz-markierten Bakterien wurden mit Fluoprep versiegelt.

### 4.8.3. Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

In Polyacrylamid-Gelen unter denaturierenden Bedingungen werden Proteine hauptsächlich aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Das Proteingemisch wird zunächst in SDS-haltiger Sample Solution gelöst. SDS bewirkt eine negative Ladung der Proteine, wobei hier meist das Molekulargewicht und die Ladung des Proteins proportional sind. Um eine optimale Auftrennung der Proteine zu erhalten, werden zweischichtige Gele verwendet, wobei sich die Schichten in ihrem pH und der Acrylamidkonzentration unterscheiden. Die untere Schicht wird als Trenngel und die obere Schicht als Sammelgel bezeichnet.

#### Sammelgel:

0,375 ml 30% Acrylamid  
0,625 ml Upper Tris  
1,625 ml H<sub>2</sub>O  
10 µl TEMED  
17,5 µl 10% APS

#### Trenngel (12,5%):

2,5 ml 30% Acrylamid  
1,5 ml Lower Tris  
2 ml H<sub>2</sub>O  
10 µl TEMED  
30 µl 10% APS

$4 \times 10^8$  Bakterien einer ÜN-Kultur wurden in 25 µl Sample Solution resuspendiert. Die Proben wurden 5 min bei 100°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. 5 µl Probe wurden pro Spur aufgetragen.

### 4.8.4. Western-Blot

Die in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden in Blot-Puffer mit Hilfe eines elektrischen Feldes an eine Nitrozellulose-Membran gebunden. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulose-Membran 1 h bei RT in 1xPBS + 0,1% Tween20 + 5% Magermilchpulver inkubiert. Dann erfolgte für 1 h bei RT die Inkubation mit dem Primärantikörper, der in 1xPBS + 0,1% Tween20 + 1% Magermilch aufgenommen wurde. Nach 10-minütigem Waschen mit 1xPBS + 0,1% Tween20 erfolgte 1 h bei RT die Inkubation mit dem an Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper,

der ebenfalls in 1xPBS + 0,1% Tween20 aufgenommen wurde. Nach 15-minütigem Waschen mit 1xPBS + 0,1% Tween20 erfolgte die Entwicklung des Blots mit dem ECL-Chemilumineszenz-Detektionssystem entsprechend des Herstellerangaben.

#### **4.8.5. Färbung von Proteinen mit Coomassie-Blau**

##### Coomassie Färber:

200 mg Coomassie Brilliant Blue<sup>®</sup>-250  
200 ml Ethanol  
40 ml Eisessig  
160 ml Aqua dest.

##### Entfärber:

100 ml Eisessig  
200 ml Methanol (reinst)  
Auffüllen mit Aqua dest. auf 1 l

Mit der Coomassie-Färbung werden die Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel fixiert und gefärbt. Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

1. Gel für 10 min in Coomassie-Färbelösung
2. Gel in Entfärber bis Banden klar erkennbar sind

Anschließend wurde das Gel in mit 5% Glycerin versetztem dest. Wasser geschrumpft, in Einmachfolie eingeschlagen und zum Trocknen in einem Trockenrahmen aufgezogen.

#### **4.8.6. Elektroelution von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen mit dem BIOTRAP-System**

Nach Induktion und Zellyse mit dem BugBuster<sup>™</sup> Master Mix-System wurde die Löslichkeit der Fusionsproteine getestet, indem die erhaltenen löslichen und unlöslichen Fraktionen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf ihren Gehalt an den gewünschten Fusionsproteinen überprüft wurden. Da die Fusionsproteine unlöslich waren, mussten diese mittels Elektrophorese eluiert werden. Hierzu wurde die nicht lösliche Fraktion der Proteinextraktion aus 500 ml Kultur in 1,5 ml 1x Sample Solution resuspendiert. Es wurden 40 präparative SDS-Polyacrylamidgele mit jeweils 50 µl Proteinextrakt beladen,

elektrophoretisch aufgetrennt und Coomassie-Blau gefärbt. Die Proteinbande der zu erwartenden Größe wurde ausgeschnitten und in etwa 5 mm große Stücke geschnitten. Die Elektroelutionsapparatur wurde den Herstellerangaben entsprechend zusammengebaut, mit Elutionspuffer gefüllt und die Gelstücke in den dafür vorgesehenen Raum gefüllt. Die Elektroelution wurde nun für 4 h bei 200 V und anschließend ÜN bei 100 V durchgeführt. Das eluierte Protein (etwa 500 µl) wurde mit einer Pasteurpipette entnommen. Verschiedene Mengen des eluierten Proteins und verschiedene Mengen BSA wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie-gefärbt, um die Konzentration des elektroeluierten Proteins abschätzen zu können. Außerdem wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Pierce-System vorgenommen. In diesem Test werden proteinhaltige Proben gegen BSA-Standards gemessen.

Dafür werden 50 µl Puffer in dem das Protein gelöst ist (Blank-Kontrolle), jeweils 50 µl der verschiedenen BSA-Verdünnungen und 1:2, 1:5 und 1:10 Verdünnungen der zu bestimmenden Proteinprobe in Elisa-Platten pipettiert, mit 200 µl Working Reagenz gemischt (siehe Kit-Beschreibung) und 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 562 nm gemessen. Nach Abzug des Wertes der Blank-Kontrolle kann eine Standardkurve erstellt werden (Absorption gegen Proteinkonzentration) und darüber die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden.

#### **4.8.7. Produktion von Antikörpern in Hasen**

Für die Produktion von PilX-Fusionsproteinen mit der Glutathion S-Transferase (GST) wurde das GST Gene Fusion-System verwendet. Zu diesem Zweck wurde das *pilX*-Gen der Stämme MC58 und 2120 mittels einer PCR amplifiziert, die die für die ersten 62 AS kodierende Proteinsequenz des Präproprotein auslöst. Für den Stamm MC58 wurden die Primer ML20 und ML27 und für den Stamm 2120 wurden die Primer ML22 und ML27 verwendet. Diese enthielten eine Restriktionsschnittstelle für BamHI. Die PCR-Produkte wurden mit BamHI geschnitten und in das mit BamHI geschnittene Plasmid pGEX-3X kloniert. Die Proteine wurden in *E. coli* DH5α bei 27°C durch die vierstündige Induktion mit 1 mM Isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) exprimiert. Die Bakterien wurden mit dem BugBuster™ Master Mix-System den Instruktionen des Herstellers folgend lysiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Coomassie-Blau-Färbung der unlöslichen Proteine, wurden diese aus Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelen geschnitten und anschließend mittels

des BIOTRAP-Systems elektroeluliert. Die Hasen wurden von der immunoGlobe Antikörpertechnik GmbH (Himmelstadt, Deutschland) immunisiert.

## **4.9. Phänotypische Tests**

### **4.9.1. Aggregationstest**

Um bakterielles Aggregationsvermögen testen zu können, wurde ein Aggregationstest verwendet (Helaine *et al.*, 2005). Dieser Test basiert darauf, dass autoaggregative Bakterien in einer statischen Flüssigkultur effektiv verklumpen, anschließend sedimentieren und sich dadurch die OD dieser Kultur verringert, die in bestimmten Zeitabständen gemessen wird. Nicht autoaggregierende Bakterien hingegen bleiben in Suspension, wodurch sich die OD über die Zeit nicht ändert. Bakterien, die weniger als 10 Stunden auf GC-Agarplatten inkubierten, wurden sorgfältig in modifiziertem NDM bzw. PPM+ resuspendiert und auf  $OD_{600}=0,1$  in 10 ml eingestellt. Die Bakterien wurden dann bei 37°C und konstanter Bewegung von 200 U/min in 50 ml-Glaskölbchen wachsen gelassen, bis eine  $OD_{600}=0,9$  erreicht wurde. Danach wurden die Suspensionen bei Raumtemperatur völlig bewegungsfrei inkubiert, und es wurde in Abständen von 30 min die  $OD_{600}$  sehr nahe an der Grenzfläche von Flüssigkeit zu Luft bestimmt.

### **4.9.2. Kristallviolett-Test**

Das Biofilmwachstum in einem statischen Modell wurde mittels eines Kristallviolett-Tests (O'Toole und Kolter, 1998) bestimmt, der für diese Arbeit abgewandelt wurde. Es wurden 96-well-Zellkulturschalen und PPM+ als Medium bzw. 24-well-Zellkulturschalen mit runden 15 mm durchmessenden Glasdeckgläschen als Substratum und modifiziertem NDM als Medium verwendet. 100 µl bzw. 1 ml Bakteriensuspension mit  $1,0 \times 10^8$  Zellen pro ml wurden pro Well eingesetzt, um das Biofilmwachstum zu initiieren. Nach 24 h wurde der Biofilm mit 200 µl bzw. 1 ml dest. Wasser pro Well gewaschen. Anschließend wurden die adhärenenten Bakterien mit 50 µl bzw. 250 µl 0,05% Kristallviolett (CV) für 10 min gefärbt. Nach zwei Waschungen mit jeweils 200 µl bzw. 1 ml destilliertem Wasser wurde das Kristallviolett aus dem Biofilm durch die Zugabe von 100 µl bzw. 400 µl Ethanol (96%) gelöst und durch die Messung der  $OD_{570}$  quantifiziert.

### 4.9.3. Biofilmbildung im Flusszellensystem

#### 4.9.3.1. Vorbereitung und Inokulation des Flusszellensystems

Die Experimente mit dem Biofilm-Flusszellensystem wurde am Zentrum für Biomedizinische Mikrobiologie der Dänischen Technischen Universität in Lyngby vorgenommen. Das Flusszellensystem wurde in einem Raum mit konstant 37°C kultiviert. Die Biofilme wurden in Drei-Kanal-Flusszellen (Kanalabmessung: 1x 4x 40 mm) kultiviert. Das System wurde, wie von Christensen *et al.* beschrieben (1999), montiert und vorbereitet. Ein 24x 50 mm großes Glasdeckgläschen diente als Substratum für die Biofilme. Vor jedem Experiment wurde das System sterilisiert, indem eine 0,5%-ige (wt/vol) Hypochlorit-Lösung 4 h durch das System gepumpt wurde. Anschließend wurde das System mit 2 l sterilen Wassers bei höchster Flussrate mehrfach befüllt und wieder geleert. Dann wurde das System mit sterilem Wasser ÜN und für einen weiteren Tag mit modifiziertem NDM bei geringer Flussrate und 37°C gespült. Die Vorbereitung eines Inokulums wurde wie folgt vorgenommen: Meningokokkenkulturen, die möglichst weniger als 8 h auf GC-Agarplatten wuchsen, wurden in frischem, modifiziertem NDM auf eine Zelldichte von  $1,0 \times 10^8$ /ml eingestellt und für 5-6 h bei 37°C geschüttelt. Portionen zu je 200 µl mit  $1,0 \times 10^8$  Zellen pro ml wurden pro Flusszellenkanal injiziert. Anschließend wurden die Flusszellen ohne Mediumfluss (mit der Seite des Deckgläschens nach unten) 1 h inkubiert, um den Bakterien die Adhäsion an das Glas zu ermöglichen. Danach wurden die Flusszellen um 180° (Glasseite jetzt oben) gedreht und der Mediumfluss wieder aufgenommen. Während des Biofilmwachstums wurde das Medium von einer peristaltischen Pumpe (Modell 205S; Watson Marlow, Calmough, UK) mit der konstanten Flussrate von 0,2 mm/s durch die Flusszellen bewegt.

#### 4.9.3.2. Konfokal-Mikroskopie und Verarbeitung der Bilder

Alle mikroskopischen Beobachtungen und erworbenen Bilder wurden mit einem Zeiss LSM510 Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop (Carl Zeiss Jena, Deutschland) gemacht. Die Bilder wurden durch den Gebrauch eines 40x/1.3 Plan Neofluar-Öbobjektivs erzielt. Multi-Kanal-simulierte Fluoreszenz-Projektion-Bilder sowie vertikale und horizontale Schnittbilder durch den Biofilm wurden mit dem IMARIS Software-Paket (Bitplan AG, Zürich, Schweiz) erzeugt, das auf einer Indigo2-Workstation (Silocon Graphics, Mountain View, USA) läuft.

Die Bilder wurden mittels Photoshop (Adobe, Mountain View, USA) einzeln für Abbildungen weiterbearbeitet.

#### 4.9.3.3. Statistische Analyse von strukturellen Biofilmparametern

In dieser Arbeit wurden verschiedene strukturelle Parameter von dem Computer-Programm COMSTAT (Heydorn *et al.*, 2000) berechnet. Dieses Programm wurde entwickelt, um strukturellen Parametern von Biofilmen eine mathematische und statistische Grundlage zu geben. Das Programm ist in der Lage, visuell sehr ähnlich wirkende Biofilmstrukturen unterschiedlicher Stämme, Spezies oder auch unterschiedlicher Nährstoffbedingungen diskriminieren zu können (Heydorn *et al.*, 2000). Für die Analyse der Entwicklung von Meningokokkenbiofilmen wurden die strukturellen Parameter „durchschnittliche Biofilmdicke“, „maximale Biofilmdicke“, „Biovolumen“, „Roughness“, „relativer Bedeckungsgrad des Substrats“ und das „Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis“ berechnet. Im Folgenden sind diese Parameter erklärt: Die durchschnittliche Biofilmdicke in  $\mu\text{m}$  beschreibt die räumliche Größe des Biofilms und ist die am häufigsten verwendete Variable der Biofilmliteratur. Die maximale Biofilmdicke beschreibt den Maximalwert der Biofilmdicke in  $\mu\text{m}$ . Das Biovolumen bezeichnet den Quotienten aus dem Biomassevolumen und Fläche des Substrats und wird in der Einheit  $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  angegeben. Das Biovolumen repräsentiert das Gesamtvolumen des Biofilms und bietet damit eine Abschätzung der Biomasse des Biofilms. Der Roughness-Koeffizient beschreibt, wie stark die Dicke eines Biofilms variiert und ist somit ein Indikator der Biofilmheterogenität. Der relative Bedeckungsgrad des Substrats ist die Arealbedeckung im ersten Bild des Bildstapels, also des Substrats. Der Bedeckungsgrad des Substrats reflektiert, wie effizient das Substrat durch die Bakterien der Population kolonisiert wird. Das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis berechnet sich aus dem Verhältnis der Biofilmoberfläche zum Biofilmvolumen. Das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis reflektiert, welcher Anteil des Biofilms tatsächlich dem Mediumfluss ausgesetzt ist. Es könnte somit also anzeigen wie sich der Biofilm an die Umwelt adaptiert.

Die zu analysierenden Stämme wurden in 3 getrennten Kanälen kultiviert. Von jedem Kanal wurden 6 Bildstapel zu unterschiedlichen Zeitpunkten wahllos an irgendeiner Stelle des Kanals erworben. Die Bildstapel jedes Zeitpunktes wurden aus unabhängigen Experimenten gewonnen, da der experimentelle Ablauf zur Gewinnung der Bildstapel für die COMSTAT-

Analyse stark die Entwicklung der Meningokokkenbiofilme zu frühen Zeitpunkten behinderte.

Diese strukturellen Parameter wurden mit Microsoft Excel analysiert. Die statistische Auswertung wurde mit dem zweiseitigen gepaarten Student's t-Test vorgenommen. Von den COMSTAT-Daten von 6 CLSM-Aufnahmen eines Flusszellenkanals wurden die Mittelwerte gebildet, die dann in den t-Test eingingen.

## 5. Ergebnisse

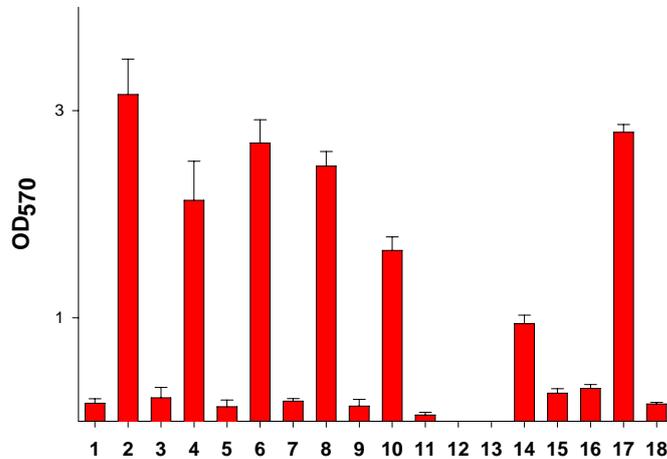
### 5.1. Die Biofilmbildung unter statischen Bedingungen

#### 5.1.1. Die Biofilmbildung in einem Komplexmedium

Meningokokken sind genetisch äußerst heterogen. Ziel dieser ersten Experimente war es, herauszufinden, welche Meningokokken Biofilme bilden können, und ob die Biofilmbildung an bestimmte Sequenztypen oder Serogruppen gekoppelt ist. Hierzu wurde sich des Kristallviolett-Tests bedient, der die einfachste und am besten etablierte Methode zur quantitativen Bestimmung der Biofilmbildung im Hochdurchsatzverfahren darstellt (O'Toole und Kolter, 1998).

Die ersten Experimente zur Biofilmbildung von *Neisseria meningitidis* wurden in 96-well-Mikrotiterplatten (Polystyren) mit dem komplexen Proteose-Pepton-Medium (PPM) als Wachstumsmedium vorgenommen. In Abb. 2 ist die Biofilmbildung von konstitutiv bekapselten Meningokokkenstämmen (MC58, 2594,  $\alpha$ 710, 2120,  $\alpha$ 171, 2220), von konstitutiv unbekapselten Meningokokkenstämmen ( $\alpha$ 14,  $\alpha$ 62), die den Kapsel-Null-Lokus (*cnl*) (Claus *et al.*, 2001) tragen, sowie von durch Mutation von Kapselsynthese-Genen unbekapselten Meningokokkenstämmen (MC58*siaD*-, 2594*mynB*-) gezeigt. Die in Abb. 2 getesteten Stämme entstammen verschiedensten MLST-Sequenztypen und Serogruppen (Siehe Tabelle 2). Es gibt verschiedene Arten einen Schwellenwert für die Biofilmbildung festzulegen. Zum Beispiel wird der Schwellenwert (Cut-Off) für die Biofilmbildung mit dem dreifachen Wert der Mediumkontrolle gesetzt (Yi *et al.*, 2004), oder dieser Schwellenwert beträgt die Summe aus dem Mittelwert der Mediumkontrollen und dem Dreifachen der Standardabweichung dieser Mediumkontrollen (Christensen *et al.*, 1985). Werte darüber gelten als Indiz für Biofilmbildung. Nach der ersten Definition bildeten die bekapselten Meningokokkenstämmen keine Biofilme. Die unbekapselten Meningokokkenstämmen wiesen im Kristallviolett-Assay um ein Vielfaches höhere Werte auf als die bekapselten Stämme und die Mediumskontrolle. Somit waren alle unbekapselten Stämme Biofilmbildner. Dabei war es egal, ob der Stamm konstitutiv unbekapselt war oder durch Mutation unbekapselt wurde. Die absolute Menge des gebildeten Biofilms lag dabei auf einem vergleichbaren Niveau mit einem *Pseudomonas aeruginosa*-Isolat aus der Lunge eines CF-Erkrankten, und wesentlich höher, als bei zwei *Staphylococcus epidermidis*-Isolaten aus Katheterinfektionen (Abb. 2). Aus diesem

Experiment ließ sich schließen, dass Biofilmbildung bei Meningokokken eine Eigenschaft unbekapselter Meningokokken ist. Die Expression der Kapsel hingegen scheint die Biofilmbildung zu inhibieren.



**Abb. 2.** Kristallviolett-Test zur quantitativen Bestimmung der Biofilmbildung von bekapselten Meningokokkenstämmen, sowie von natürlich unbekapselten (*cnl*) bzw. durch Mutation von Kapselsynthesegenen unbekapselten Meningokokkenstämmen. Die Prüfung erfolgte in 96-well-Mikrotiterplatten aus Polystyren in PPM nach 24 Stunden. Die Biofilme wurden mit Kristallviolett gefärbt und anschließend die optische Dichte bei 570 nm gemessen. Folgende Stämme wurden getestet: 1: MC58, 2: MC58*siaD*<sup>-</sup>, 3: MC58*lst*, 4: MC58*siaD*<sup>-</sup>/*lst*<sup>-</sup>, 5: 2594, 6: 2594*mynB*<sup>-</sup>, 7: 2594*lst*<sup>-</sup>, 8:  $\alpha$ 14 (*cnl*), 9:  $\alpha$ 710, 10:  $\alpha$ 62 (*cnl*), 11: 2120, 12:  $\alpha$ 171, 13: 2220, 14: *S. aureus* (ATCC 12228), 15: *Staphylococcus epidermidis* (K 18803/01), 16: *Staphylococcus epidermidis* (K 18779/01), 17: *Pseudomonas aeruginosa* (VB 812/97), 18: Mediumkontrolle. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung.

### 5.1.2. Die Biofilmbildung in Minimalmedien

Es ist gut untersucht, dass die Biofilmbildung und die Ausbildung bestimmter Biofilmarchitekturen von verschiedenen Bakterienspezies ganz wesentlich von den Nährstoffbedingungen abhängen, wie etwa von der Art der Kohlenstoff-Quelle (Klausen *et al.*, 2003a, b) oder von der Konzentration von bestimmten Metallionen (Banin *et al.*, 2005). Erste Experimente zur Biofilmbildung mit Meningokokken im Flusssystem wurden mit PPM als Wachstumsmedium durchgeführt. PPM erwies sich hier als vollkommen ungeeignet, da einerseits das Flusssystem rasch mit aus dem Medium präzipitierenden Salzen verstopft wurde, und andererseits dadurch, dass die Biofilmbildung zu rasch ablief, um sie detailliert beschreiben zu können. Verschiedenste Verdünnungen des PPM oder Mischungen mit z.B. RPMI führten ebenfalls zur Präzipitation von Salzen.

Daher sollte die Biofilmbildung von Meningokokken in einem Minimalmedium etabliert werden, das durch seine definierte Zusammensetzung eine hohe Reproduzierbarkeit der Biofilmbildung und der Biofilmstrukturen erlaubt.

In Vorversuchen wurden die 2 Minimalmedien MCDA (Catlin, 1973) und NDM (Neisseria Defined Medium) (Archibald und DeVoe, 1978) in Wachstumsversuchen mit den Stämmen  $\alpha 14$  und MC58 gegeneinander getestet. Die Bakterien wuchsen wesentlich langsamer in MCDA als in NDM und ließen sich nicht über mehrere Tage passagieren, wohingegen sich die Bakterien in NDM über eine Woche (annähernd 30 Verdopplungen) passagieren ließen (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde NDM als synthetisches Wachstumsmedium zur Untersuchung von Meningokokkenbiofilmen ausgewählt.

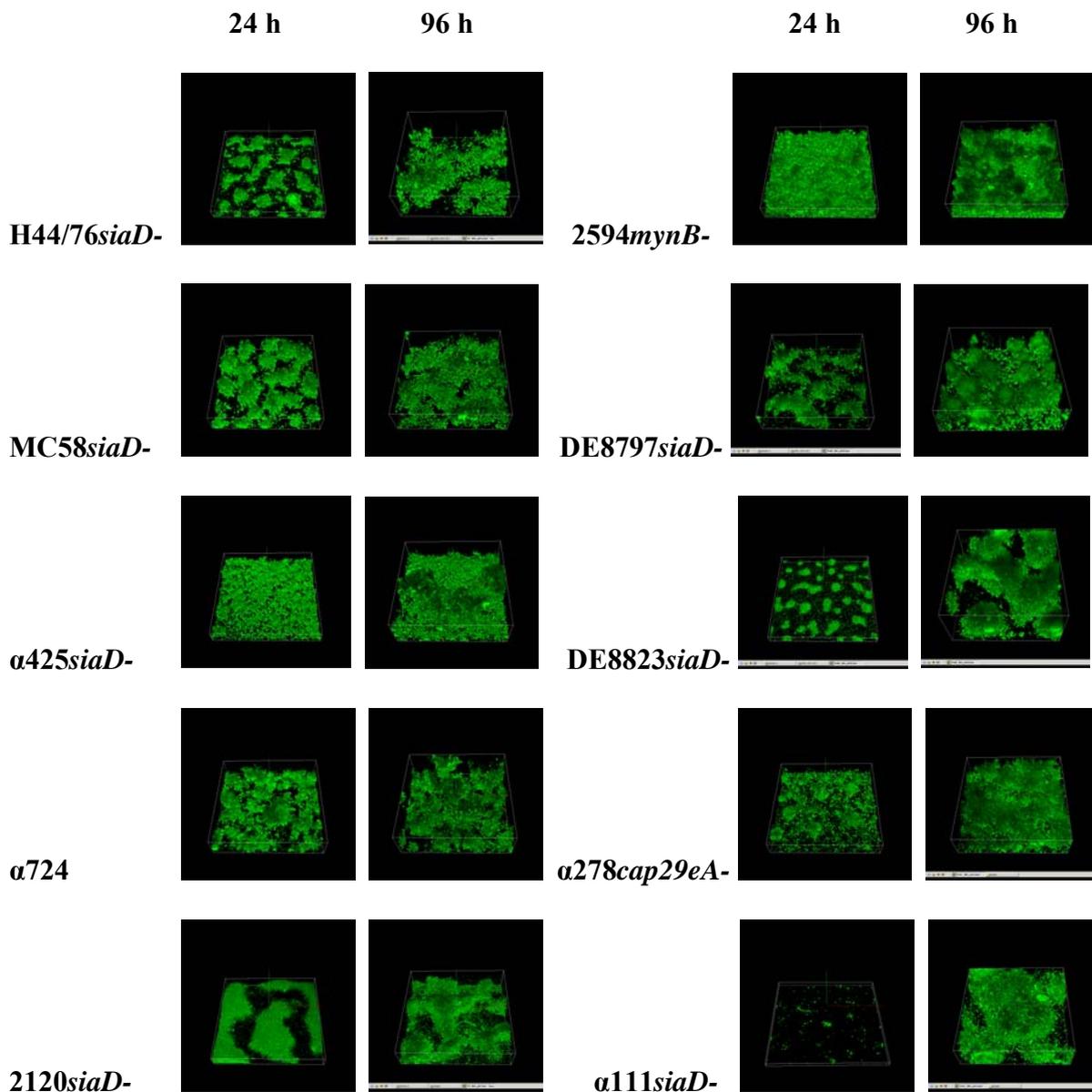
Trotz überzeugender Ergebnisse in statischen Tests, erwies sich das NDM in Vorversuchen im Flusssystem ebenfalls als ungeeignet, da Biofilmbildung im Flusssystem nicht in ausreichender Regelmäßigkeit erfolgte. Aus diesem Grund wurde das NDM durch Zugabe von 5 mM  $\text{NaHCO}_3$  und PolyViteX<sup>®</sup> bzw. Supplement B<sup>®</sup> modifiziert.  $\text{NaHCO}_3$  dient zur Simulation einer  $\text{CO}_2$ -angereicherten Atmosphäre, wie sie im menschlichen Organismus vorzufinden ist. PolyViteX<sup>®</sup> enthält u.a. Aminosäuren, Uracil, Co-Faktoren und Metallionen, die zu besserem Wachstum der Meningokokken führen sollen. Die Zugabe von 5 mM  $\text{NaHCO}_3$  und PolyViteX zu dem NDM erwies sich als essentiell für die Ausbildung reproduzierbarer Biofilme im Flusssystem (Siehe Abschnitt 5.2). Nachfolgend wurden alle statischen und alle Flusseexperimente mit diesem modifizierten NDM durchgeführt.

## **5.2. Die Biofilmentwicklung unbekapselter Meningokokken in einem Biofilm-Flusszellensystem**

### **5.2.1. Die Untersuchung der Biofilmentwicklung mit GFP-markierten Meningokokken**

Biofilmflusszellensysteme gekoppelt mit Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) stellen heute den Gold-Standard bei der Erforschung der Biofilmentwicklung und von Biofilmstrukturen dar (Christensen *et al.*, 1999). Diese Systeme erlauben die Betrachtung von Entwicklungsprozessen in Echtzeit, ohne die Lebendstrukturen zu zerstören. Außerdem übt der genau zu steuernde Mediumfluss im System Scherkräfte auf die Biofilme aus, wie sie auch unter natürlichen dynamischen Bedingungen auf sessile Bakterien einwirken können. Um mit CLSM Biofilme beobachten zu können, ist es hilfreich, die Bakterien fluoreszierende Proteine exprimieren zu lassen. Hierzu wurden die Meningokokken mit Expressionsplasmiden für das grün fluoreszierende Protein (GFP), das gelb fluoreszierende Protein (YFP) bzw. das blau fluoreszierende Protein (CFP) transformiert. Alle Experimente im Flusssystem wurden mit Fluoreszenzprotein-markierten Meningokokkenstämmen

durchgeführt. Um jedoch eine bessere Lesbarkeit zu gewährleisten, wurden im Text und in Abbildungen häufig Stämme, ohne die Fluoreszenzmarkierung zu nennen, aufgeführt.



**Abb. 3.** Räumliche Verteilung der Biofilmbildung der Stämme H44/76*siaD*-/*gfp*+, MC58*siaD*-/*gfp*+,  $\alpha$ 425*siaD*-/*gfp*+,  $\alpha$ 724/*gfp*+, 2120*siaD*-/*gfp*+, 2594*mynB*-/*gfp*+, DE8797*siaD*-/*gfp*+, DE8823*siaD*-/*gfp*+,  $\alpha$ 278*cap29eA*-/*gfp*+, und  $\alpha$ 111*siaD*-/*gfp*+. Die Biofilme wurden in Flusszellen kultiviert. Die Biofilmentwicklung wurde mittels CLSM 24 h und 96 h nach Inokulation dokumentiert. Die Einzelbilder repräsentieren simulierte dreidimensionale Abbildungen der Biofilme.

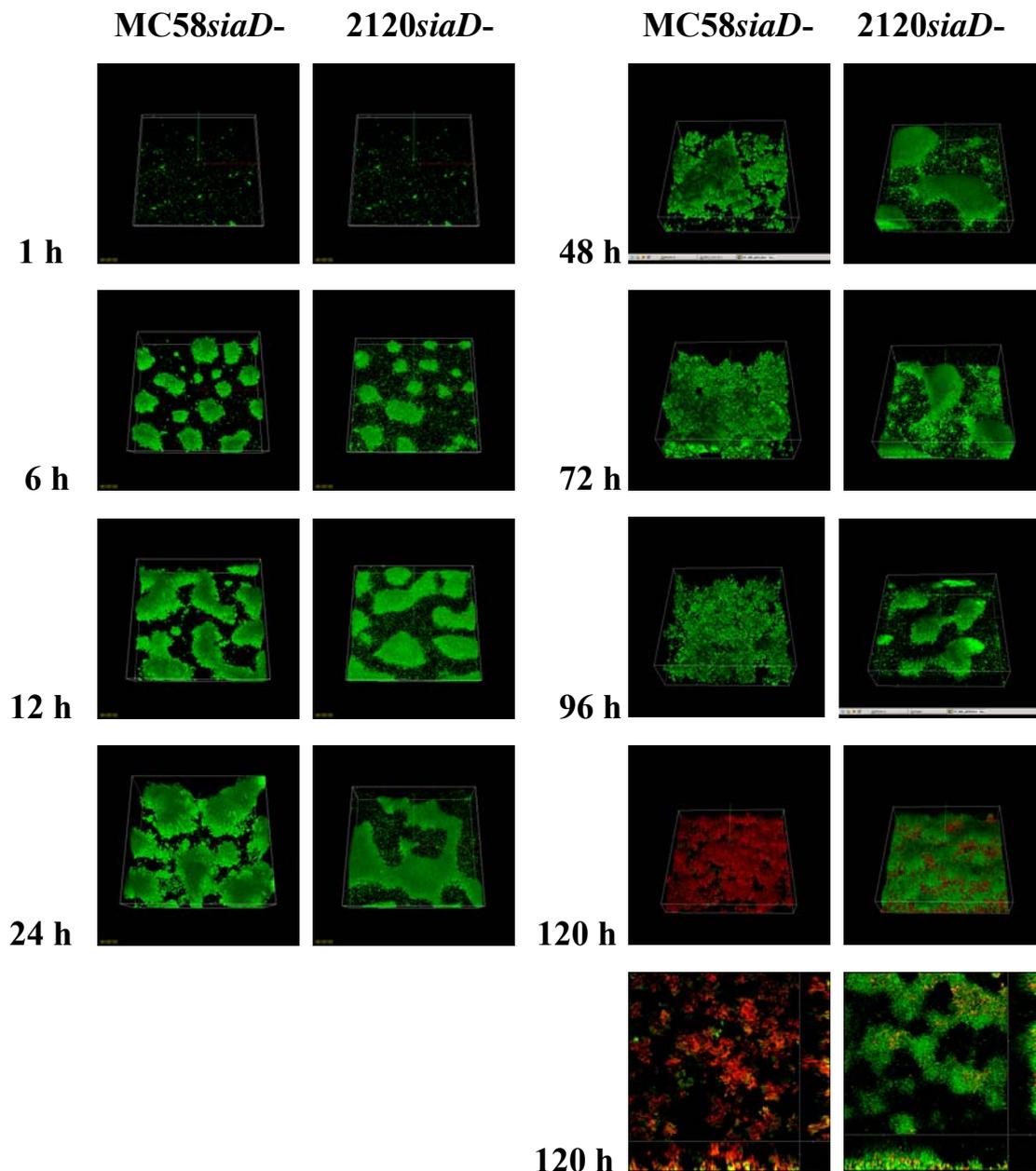
Es wurden 10 unbekapselte Stämme unterschiedlichster Serogenotypen auf ihre Biofilmbildung im Flusssystem getestet. Modifiziertes NDM diente als Wachstumsmedium. Die Biofilmbildung wurde nach 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h mittels CLSM dokumentiert. In Abb. 3 ist exemplarisch die Biofilmbildung nach 24 h und 96 h gezeigt. Die Bilder repräsentieren simulierte dreidimensionale Abbildungen der Biofilme. Wie auch im statischen Biofilm-Test bildeten alle unbekapselten Meningokokkenstämme im Flusssystem

Biofilme aus. Interessanterweise waren dabei unterschiedliche Morphologien zu beobachten. Die Mehrzahl der Stämme, wie z.B. MC58*siaD*- oder  $\alpha$ 724, zeigten distinkte Mikrokolonien, während andere Stämme, wie etwa 2594*mynB*- und  $\alpha$ 425*siaD*-, flächige Biofilme ohne distinkte Mikrokolonien zeigten. Das Erscheinen dieser Mikrokolonien erfolgte bei den Stämmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Während z.B. H44/76*siaD*- und MC58*siaD*- bereits nach 24 h große Mikrokolonien aufwiesen, die aber schon nach 96 h ausfransten oder sich auflösten, bildeten DE8823*siaD*- und  $\alpha$ 111*siaD*- erst später größere Mikrokolonien aus, die nach 96 h noch völlig intakt und vital wirkten.

Abb. 4 zeigt exemplarisch die Biofilmentwicklung für die Stämme MC58*siaD*- und 2120*siaD*-. Eine Stunde nach Inokulation findet man in beiden Stämmen fast ausschließlich einzeln adhärente Bakterien, aber auch schon erste kleine Mikrokolonien auf dem Substratum. Diese kleinen Mikrokolonien sind wahrscheinlich durch Verklumpen oder durch Zellmotilität entstanden. Nach 6 h bildeten beide Stämme distinkte Mikrokolonien aus, die dann bis 24 h beständig wuchsen. Während sich die Mikrokolonien und der Biofilm als Ganzes im Stamm 2120*siaD*- bis 96 h nach Inokulation kaum zu verändern schienen, zeigten die Mikrokolonien im Stamm MC58*siaD*- ein Ausfransen und teilweises Auflösen der Mikrokolonien 48 h bis 96 h nach Inokulation.

Um den Anteil noch lebender Zellen in den Biofilmen von MC58*siaD*- und 2120*siaD*- zu bestimmen, wurden die Biofilme nach 120 h mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. PI als DNA-Farbstoff hat die Eigenschaft, intakte Zellmembranen nicht durchdringen zu können, während es beschädigte Zellmembranen durchdringt und dann an die DNA bindet. Somit indiziert eine Rotfärbung von Bakterien durch PI den Zelltod. Der PI-gefärbte Biofilm von Stamm MC58*siaD*- bestand nach 120 h fast ausschließlich aus roten Zellen, was bedeutet, dass die Zellen dieses Stammes nach 120 h im Biofilm fast gänzlich tot waren. Der PI-gefärbte Biofilm von Stamm 2120*siaD*- hingegen erschien nach 120 h überwiegend grün, was auf einen nur geringen Anteil toter Bakterien schließen lässt. Es ist bemerkenswert, dass sich die Biofilme dieser zwei Stämme unterschiedlicher klonaler Linien trotz relativ gleicher anfänglicher Biofilmmorphologien zu einem späten Zeitpunkt so gegensätzlich hinsichtlich der Vitalität der Bakterien im Biofilm entwickelten. Die unterschiedlichen Entwicklungswege der beiden Stämme lassen auf ein unterschiedliches genetisches Repertoire in beiden Stämmen schließen. Noch unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass der nur kurz im Biofilm vitale Stamm MC58*siaD*- eine funktionelle Kopie des *pldA*-Gens trägt, das das Autolysin OMPLA (Outer membrane phospholipase A) kodiert (Bos *et al.*, 2005),

während der lange im Biofilm vitale Stamm 2120*siaD*- keine funktionelle Kopie dieses Gens besitzt.

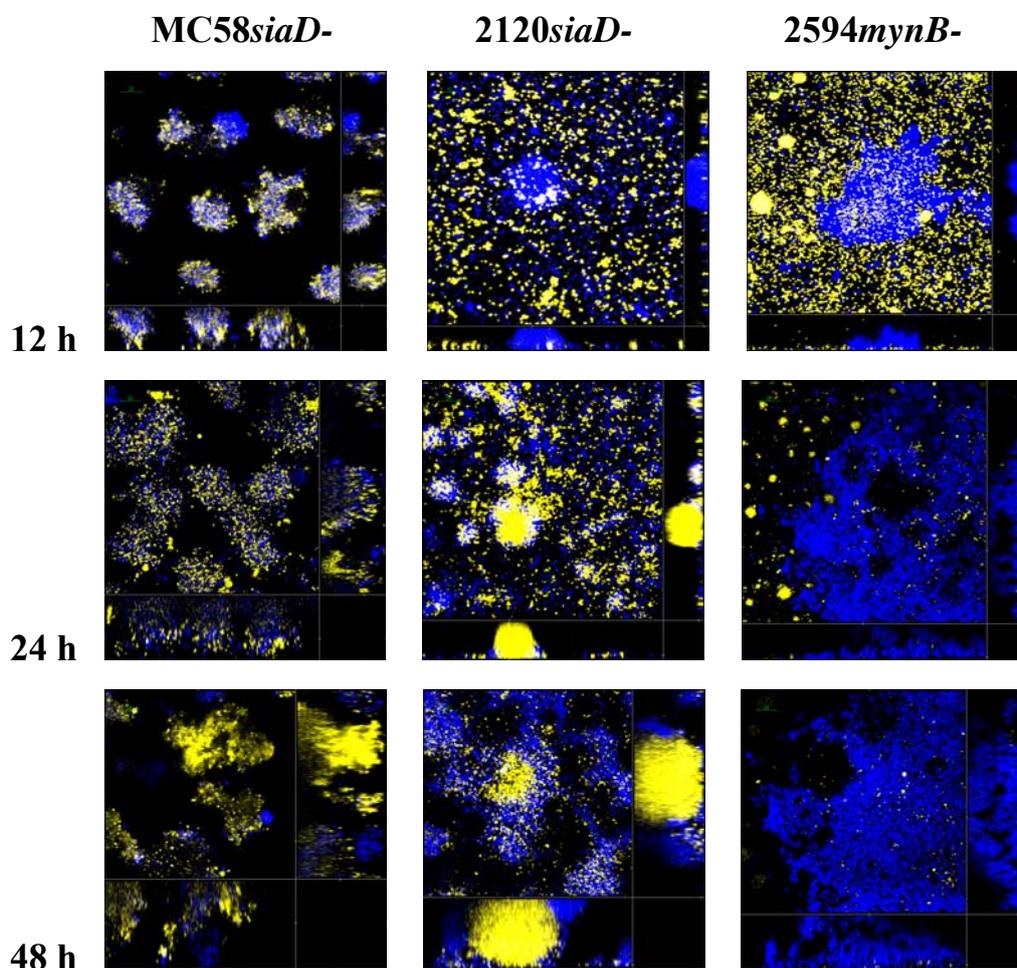


**Abb. 4.** Räumliche Verteilung der Biofilmbildung der Stämme MC58*siaD*-/*gfp*+ und 2120*siaD*-/*gfp*+. Die Biofilme wurden in Flusszellen kultiviert. Die Biofilmentwicklung wurde mittels CLSM 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Inokulation dokumentiert. Die Einzelbilder von 1-96 h repräsentieren simulierte dreidimensionale Abbildungen der Biofilme. Die Einzelbilder für 120 h repräsentieren zudem horizontale und vertikale Schnitte. Die Größe des Areal beträgt 235x 235  $\mu\text{m}$ .

OMPLA wurde als aktiv unter stationäre Phase-Bedingungen beschrieben. Es wäre also denkbar, dass OMPLA das schnelle Absterben der Biofilmzellen des Stammes MC58*siaD*-, die sich im Inneren der Mikrokolonien wahrscheinlich ebenfalls unter stationäre Phase-Bedingungen befinden, verursacht.

### 5.2.2. Die Untersuchung der Biofilmentwicklung mit CFP- und YFP-markierten Meningokokken

Mikrokolonien verschiedener Spezies entstehen durch klonales Wachstum (Klausen *et al.*, 2003; Sauer *et al.*, 2002; Tolker-Nielsen *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob die Mikrokoloniebildung bei Meningokokken ebenfalls klonal erfolgt, wurden CFP- und YFP-markierte Bakterien im Verhältnis 1:1 gemischt und als Einsaat für die Biofilmexperimente benutzt.



**Abb. 5.** Biofilmbildung durch CFP- und YFP-markierte Derivate der Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*-. Die Biofilme wurden jeweils mit einer 1:1-Mischung von gelb und blau fluoreszierenden Bakterien der einzelnen Stämme initiiert. Die Biofilmbildung wurde mittels CLSM 12 h, 24 h und 48 h nach Inokulation dokumentiert. Die Einzelbilder repräsentieren horizontale und vertikale Schnitte. Die Größe des Areal beträgt 235x 235  $\mu\text{m}$ .

Diese Mischexperimente wurden für die Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*- durchgeführt (Abb. 5). Stamm MC58*siaD*- zeigte nach 12 h und 24 h distinkte

Mikrokolonien, die aus homogen vermischten blauen und gelben Zellen bestanden. Nach 48 h hingegen zeigten die Mikrokolonien größere gelbe und blaue Areale. Daraus lässt sich für den Stamm MC58*siaD*- schließen, dass Biofilme dieses Stammes nicht aus einer kleinen Subpopulation von Bakterien entstehen, sondern sich homogen aus einer breiten Basis von Zellen entwickeln, und dass die Mikrokolonien nicht klonalen Ursprungs sind. Stamm 2120*siaD*- zeigte nach 12, 24 und 48 h entweder ausschließlich blaue oder ausschließlich gelbe Mikrokolonien. Gemischte Mikrokolonien aus blauen und gelben Mikrokolonien waren nicht zu beobachten. Somit lässt sich für den Stamm 2120*siaD*- folgern, dass hier die Mikrokolonien klonal aus einer Zelle bzw. der gesamte Biofilm aus nur wenigen Zellen entsteht. Die Biofilme von Stamm 2594*mynB*- waren zu allen Messzeitpunkten flächig ohne distinkte Mikrokolonien (Abb. 5). Außerdem wiesen die Biofilme dieses Stammes große blaue oder gelbe Areale auf, die auch darauf hindeuteten, dass diese Biofilme klonalen Ursprungs sind, oder einer sehr kleinen Subpopulation der eingesetzten Zellen entstammten. Diese ersten Biofilmexperimente im Flusssystem lassen sich wie folgt zusammenfassen: (i) Alle getesteten unbekapselten Meningokokkenstämme bildeten bereitwillig Biofilme aus, die (ii) zumeist über mehr als 96 Stunden aufrechterhalten werden konnten, und die (iii) unterschiedliche Architekturen (und wahrscheinlich unterschiedliche Mechanismen) der Mikrokoloniebildung zwischen verschiedenen Stämmen aufwiesen.

### **5.3. Die Funktion von PilX für die Biofilmbildung und Biofilmarchitektur**

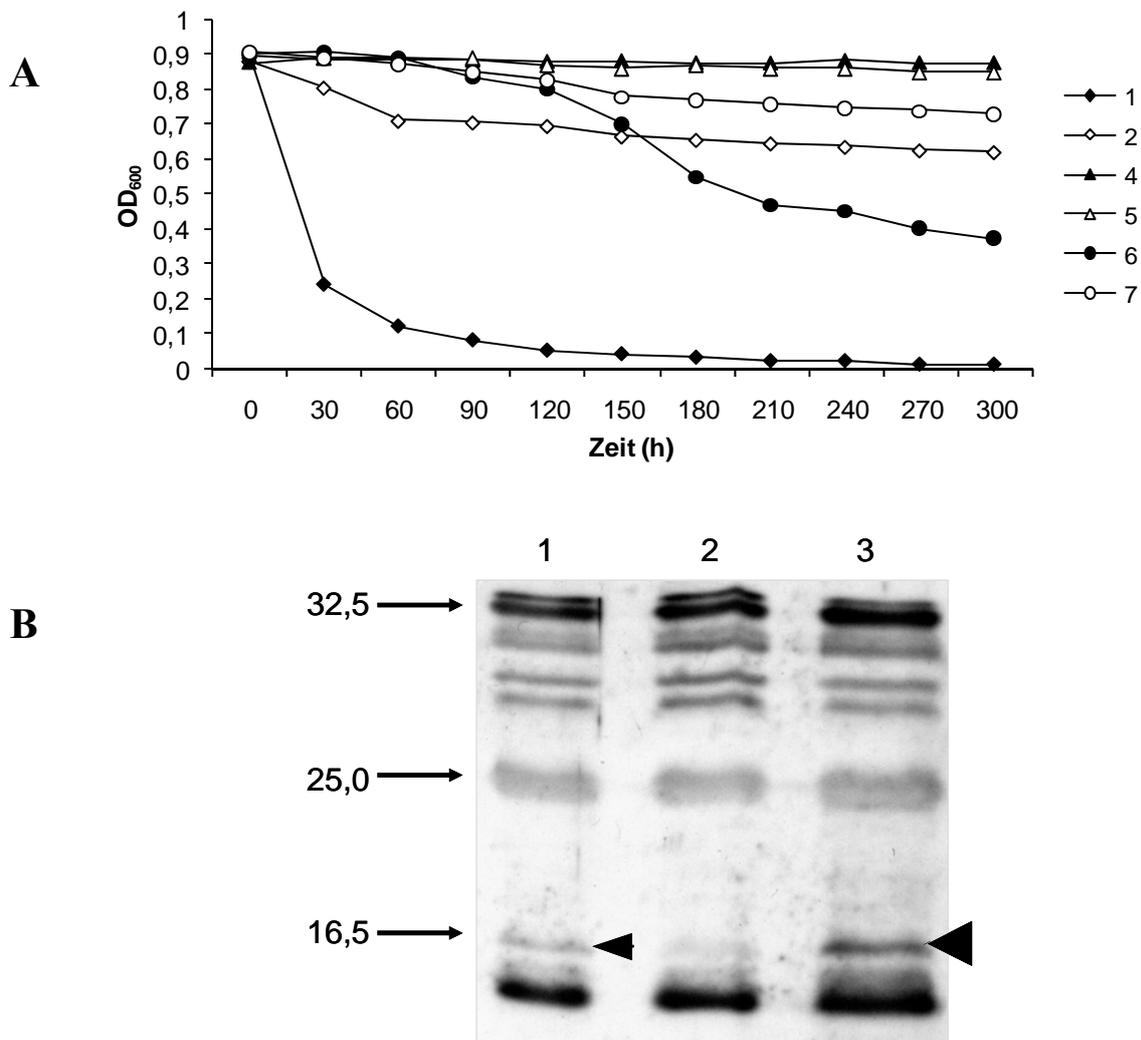
PilX ist unlängst als ein Typ IV-Pilus assoziiertes Pilin-ähnliches Protein beschrieben worden, das Autoaggregation von Meningokokkenzellen in Flüssigkultur und auf Epithelzellen vermittelt, ohne aber dabei die Adhäsionseigenschaften der Zellen untereinander und der Zellen an Epithelzellen zu beeinflussen (Helaine et al, 2005). PilX war für die Aggregation der Meningokokkenzellen in statischen Zellsuspensionen verantwortlich. Zudem bildeten *pilX*-defiziente Mutanten keine Mikrokolonien auf Epithelzellen mehr aus.

Ich untersuchte die Rolle des PilX für die Biofilmbildung und die Biofilmarchitektur bei Meningokokken. Dazu verwendete ich *pilX*-Knock-Out-Mutanten und *pilX*-Komplementanten verschiedener Stämme, die von Dr. rer. nat. Heike Claus erstellt worden waren.

#### **5.3.1. PilX-Mutation, Komplementation und Autoaggregation**

Das *pilX*-Gen der Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*- wurde durch die Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette inaktiviert. Der Knock-out wurde durch Polymerase-

Kettenreaktion (PCR), durch Southern-Blots, durch Reverse Transkription (RT)-PCR und phänotypisch durch einen Aggregationstest (Abb. 6a) (Helaine *et al.*, 2005) bestätigt. Dieser Test macht sich die sinkende optische Dichte (OD) in statischen Flüssigkulturen zu Nutze, die durch das Sedimentieren autoaggregierender Bakterien hervorgerufen wird. Ferner konnte



**Abb. 6.** Phänotypische Testung von *pilX*-Wildtypen, -mutanten und Komplementanten.

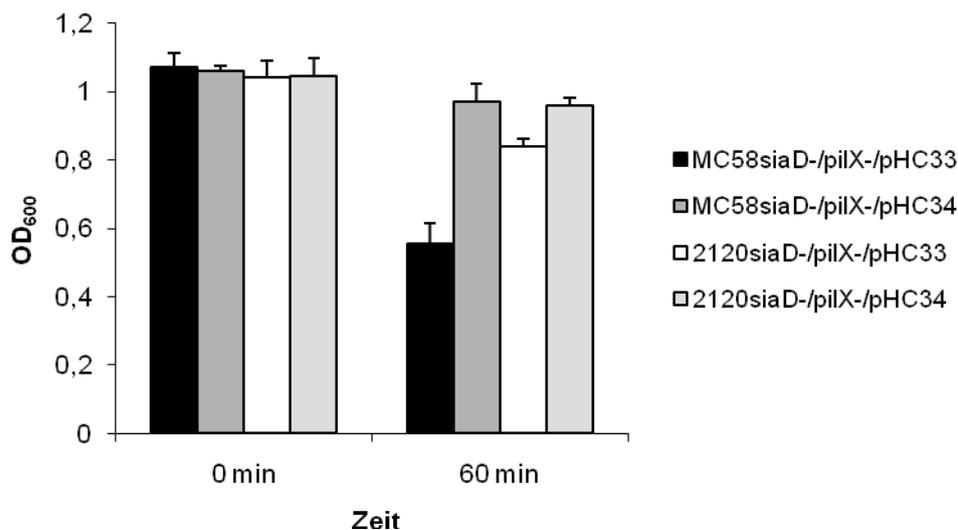
A: Bestimmung des Autoaggregationsvermögens durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm über die Zeit in nicht geschüttelten Flüssigkulturen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus 3 unabhängigen Experimenten.

B: Nachweis des PilX des Stammes MC58 in Ganzzelllysaten mittels eines polyklonalen Antiserums, welches gegen rekombinantes PilX<sub>MC58</sub>-GST-Fusionprotein gerichtet ist.

Die Stämme aus den Abbildungen wurden wie folgt benannt: 1: MC58*siaD*-/*gfp*+, 2: MC58*siaD*-/*gfp*+/*pilX*-, 3: MC58*siaD*-/*gfp*+/*pilX*-/*pHC33*, 4: 2120*siaD*-/*gfp*+, 5: 2120*siaD*-/*gfp*+/*pilX*-, 6: 2594*mynB*-/*gfp*+, 7: 2594*mynB*-/*gfp*+/*pilX*-.

durch Western-Blots mit Pilin-spezifischen Antikörpern gezeigt werden, dass die Pilus-Untereinheit PileE trotz *pilX*-Mutation exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Es wurden

zudem PilX-spezifische Antiseren durch die Immunisierung von Hasen mit aufgereinigtem PilX<sub>MC58</sub>-GST-Fusionsprotein hergestellt. Es konnten nur verkürzte Proteine in ausreichender Menge produziert werden, die die globuläre Domäne des Proteins repräsentieren. His-tag-Fusionsproteine konnten nicht in ausreichender Menge in *E. coli* exprimiert werden. Die GST-Fusionsproteine waren weder bei 37°C noch bei 25°C oder 15°C Inkubationstemperatur der *E. coli*-Kultur löslich. In dem mit dem PilX<sub>MC58</sub> immunisierten Hasen konnten spezifische Antikörper im Serum detektiert werden, nicht aber in dem mit PilX<sub>2120</sub> immunisierten Hasen.



**Abb. 7.** Aggregation von Meningokokken. Die Autoaggregation wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm nach 0 min und 60 min in bewegungsfreien Schüttelkulturen bestimmt. Die Werte sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Es wurden folgende Stämme getestet: MC58siaD-/pilX-/pHC33: unbekapselte PilX-Mutante mit PilX<sub>MC58</sub> (pHC33) komplementiert, MC58siaD-/pilX-/pHC34: unbekapselte PilX-Mutante mit PilX<sub>2120</sub> (pHC34) komplementiert, 2120siaD-/pilX-/pHC33: unbekapselte PilX-Mutante mit PilX<sub>MC58</sub> komplementiert, 2120siaD-/pilX-/pHC34: unbekapselte PilX-Mutante mit PilX<sub>2120</sub> komplementiert.

Eine sehr niedrige PilX-Expression wurde im PilX-Wildtypstamm verzeichnet (Abb. 6b), wohingegen eine PilX-Bande deutlich bei der komplementierten PilX-Mutante sichtbar war, die das *pilX*-Gen von einem *porA*-Promotor kontrolliert trägt. Leider wurden kreuzreaktive Banden festgestellt. Es gab keine Kreuzreaktivität des Serums mit dem PilX der Stämme 2120siaD- und 2594siaD-. Die *pilX*-Knock-out-Mutante des Stammes MC58siaD-/gfp+ zeigte eine deutliche Minderung der Autoaggregation (Abb. 6a). Die Komplementation der PilX-Expression *in trans* stellte die Autoaggregation wieder vollständig her (Abb. 6a). Somit war PilX für den Phänotyp notwendig. Auch der Stamm 2594mynB- wies Autoaggregation auf, die in der isogenen *pilX*-Mutante fehlte (Abb. 6a). Überraschenderweise fand sich beim Stamm 2120siaD- keine Autoaggregation. Möglicherweise wurde das PilX im Stamm 2120siaD- nur schwach exprimiert. Kreuzkomplementationsexperimente der *pilX*-Mutanten

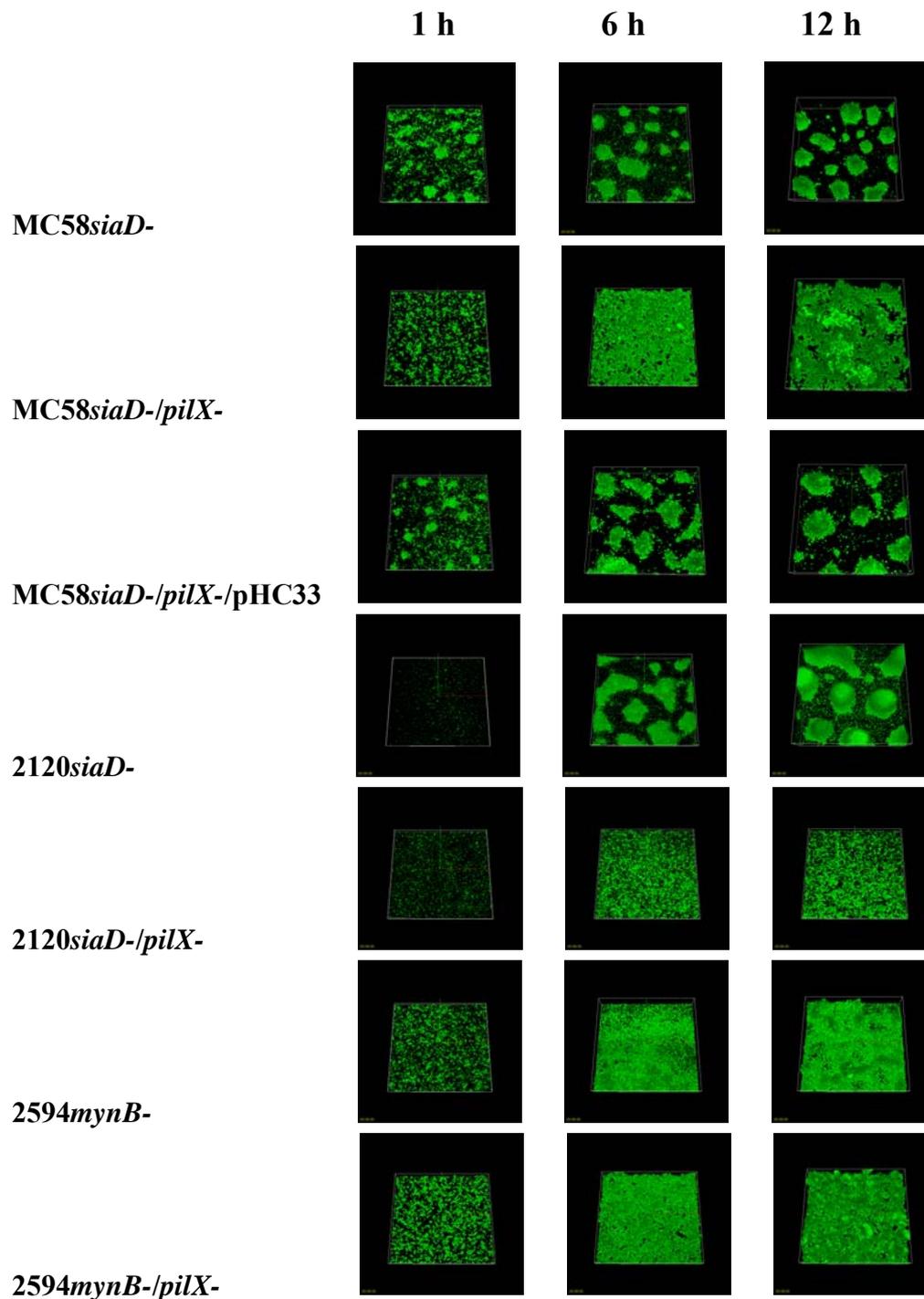
der Stämme MC58*siaD*- und 2120*siaD*- mit dem *pilX*-Gen des jeweils anderen Stammes deuteten aber in eine andere Richtung (Abb. 7). Die Komplementation des Stammes MC58*siaD*-/*pilX*- mit dem *pilX*-Gen des Stammes 2120*siaD*- durch Transformation mit dem Plasmid pH34 konnte die Autoaggregation nicht wiederherstellen, im Kontrast zur Komplementation mit der homologen *pilX*-Variante (Abb. 7, P=0,0006). Im Gegensatz zu Stamm MC58*siaD*- konnte Stamm 2120*siaD*- durch keine der beiden *pilX*-Varianten einen autoaggregativen Phänotyp erlangen, was suggeriert, dass PilX für die Autoaggregation zwar erforderlich, aber als alleiniger Faktor nicht ausreichend ist.

### 5.3.2. Der Einfluss der PilX-Mutation auf die Architektur der Meningokokkenbiofilme

Als nächstes stellte sich die Frage, welchen Einfluss das PilX-Protein der verschiedenen Stämme auf die Biofilmbildung bzw. die Biofilmarchitektur hat. Deshalb wurde die Biofilmbildung der *pilX*-Knock-out-Mutanten unter Flussbedingungen mit CLSM untersucht. Die *pilX*-Mutation des Stammes MC58*siaD*- führte zum Verlust der Mikrokoloniebildung und zur Ausbildung eines flacheren homogenen Biofilms, der augenscheinlich einen größeren Anteil des Substrats bedeckte (Abb. 8). Die Mikrokoloniebildung konnte durch *pilX*-Komplementierung *in trans* wieder hergestellt werden. Die *pilX*-Mutation führte auch im Stamm 2120*siaD*-/*gfp*+ zum Verlust der Mikrokoloniebildung und zur Bildung eines homogenen Biofilms, der einen größeren Anteil des Substrats zu bedecken schien. Die *pilX*-Mutation im Stamm 2594*mynB*-/*gfp*+ schien keinen sichtbaren Effekt auf die Biofilmbildung oder Biofilmarchitektur zu haben. Sowohl der *pilX*-Wildtyp als auch die Mutante bildeten einen homogenen flachen Biofilm ohne sichtbare Mikrokolonien mit einem hohen Bedeckungsgrad des Substrats.

### 5.3.3. Statistische Auswertung des Effekts von PilX auf die Biofilmentwicklung und Biofilmarchitektur

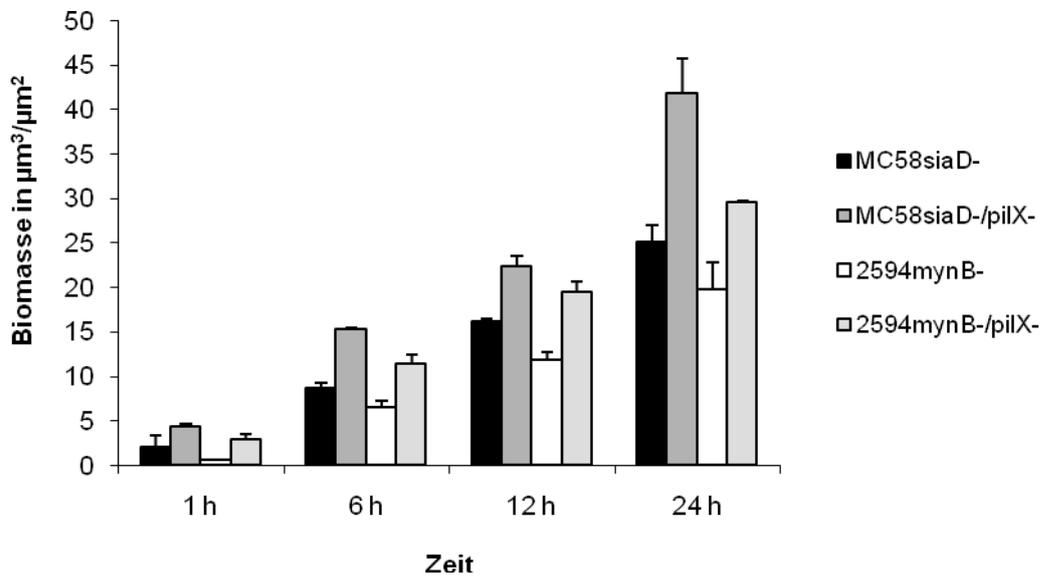
Um den Einfluss der *pilX*-Mutation auf die Biofilmbildung bzw. Biofilmarchitektur quantifizieren zu können, wurde das Computerprogramm COMSTAT (Heydorn *et al.*, 2000) verwendet, das Berechnung und statistische Auswertung von Parametern erlaubt, die für die Beschreibung von Biofilmen verwendet werden, wie Biovolumen, Roughness und relativer Bedeckungsgrad des Substrats.



**Abb. 8.** Räumliche Verteilung der Biofilmbildung der Stämme MC58*siaD*-/*gfp*<sup>+</sup>, 2120*siaD*-/*gfp*<sup>+</sup> und 2594*mynB*-/*gfp*<sup>+</sup> sowie der zugehörigen *pilX*-Mutanten. Die Biofilme wurden in Flusszellen kultiviert. Die Biofilmentwicklung wurde 1 h, 6 h und 12 h nach Inokulation mittels CLSM dokumentiert. Die Einzelabbildungen repräsentieren simulierte dreidimensionale Bilder.

Abbildung 9 zeigt die Biomasse der Stämme MC58*siaD*- und 2594*mynB*- sowie derer isogener *pilX*-Mutanten zu verschiedenen Zeitpunkten. Für die Stämme MC58*siaD*- und 2594*mynB*- war eine lineare Zunahme des Biovolumens zu beobachten. Gleiches gilt auch für die entsprechende *pilX*-Mutante. Die *PilX*-Mutanten der Stämme MC58*siaD*- und 2594*mynB*-

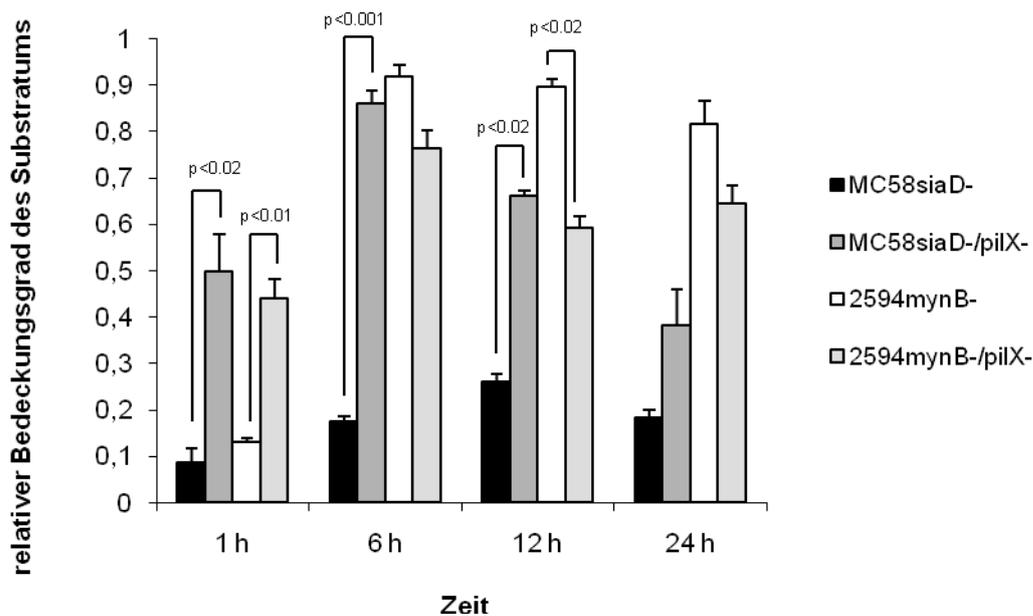
wiesen, verglichen mit dem Wildtyp, eine etwas erhöhte Biomasse auf. Diese Ergebnisse decken sich absolut mit dem visuellen Eindruck.



**Abb. 9.** COMSTAT-Analyse der Biomasse der Stämme *MC58siaD*- und *2594mynB*- sowie der entsprechenden *pilX*-Knock-out-Mutanten zu 4 verschiedenen Zeitpunkten. Die Werte sind die Mittelwerte der Daten aus 18 Bildstapeln (6 Bildstapel aus 3 unabhängigen Kanälen). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Abbildung 10 zeigt den relativen Bedeckungsgrad des Substratums durch die Stämme *MC58siaD*- und *2594mynB*- sowie durch deren isogene *pilX*-Mutanten zu verschiedenen Zeitpunkten. Stamm *MC58siaD*- bedeckte nach 1 h 10% und nach 24 h etwa 20% des Substratums. Stamm *MC58siaD*-/*pilX*- hingegen bedeckte zu jedem Messzeitpunkt (1 h, 6 h, 12 h, 24 h) etwa 2-5 mal so viel Substratum als der *pilX*-Wildtyp, wobei die Differenz im Substratbedeckungsgrad zwischen Wildtyp und Mutante mit zunehmendem Biofilmlalter abnahm und von 1 h bis 12 h statistisch signifikant war (Students t-Test:  $p < 0,02$ ). Diese Ergebnisse korrelieren mit dem visuellen Eindruck, dass die *pilX*-Mutation im Stamm *MC58siaD*- zum Verlust des heterogenen Mikrokolonie-reichen Biofilms, und stattdessen zur Ausbildung eines homogenen flacheren Biofilms führt. Für den Stamm *2594mynB*- konnte visuell kein Unterschied zwischen *pilX*-Wildtyp und -Mutante festgestellt werden. Beide Stämme bildeten einen homogenen flachen Biofilm ohne distinkte Mikrokolonien aus (siehe Abb. 8). Stamm *2594mynB*- bedeckte mit 10% nach 1 h und mit etwa 80% nach 24 h annähernd das vier-fache Areal als der Stamm *MC58siaD*- und etwa das gleiche Areal als der Stamm *MC58siaD*-/*pilX*-. Für die *pilX*-Mutante des Stammes *2594mynB*- war nach 1 h eine erhöhte Substratbedeckung, die sich durch eine ebenso höhere Biomasse (Abb. 9) erklären lässt, nach 6 h, 12 h und 24 h hingegen eine etwas geringere Substratbedeckung zu

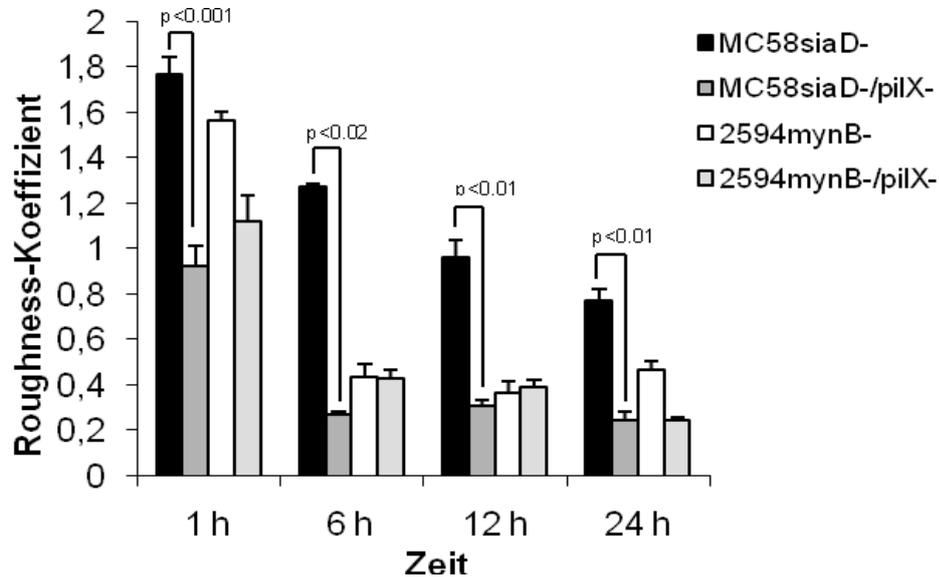
beobachten. Somit ließ sich bei Betrachtung der relativen Substratbedeckung der visuelle Eindruck bestätigen, dass durch die *PilX*-Mutation der heterogene Mikrokolonie-reiche Biofilm des Stammes *MC58siaD*- durch einen homogenen flachen Biofilm ersetzt wurde. Im Stamm *2594mynB*- konnte der *PilX*-Mutation weder durch visuelle Inspektion (beide Stämme mit einem homogenen flachen Biofilm), noch durch die Analyse der Substratbedeckung, ein eindeutiger Effekt zugeschrieben werden.



**Abb. 10.** COMSTAT-Analyse des relativen Bedeckungsgrads des Substrats durch die Stämme *MC58siaD*- und *2594mynB*- sowie durch deren *pilX*-Knock-out-Mutanten zu 4 verschiedenen Zeitpunkten. Die Werte sind die Mittelwerte der Daten aus 18 Bildstapeln (6 Bildstapel aus 3 unabhängigen Kanälen). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Ein Bedeckungsgrad von 1,0 bedeutet, dass das Substrat vollständig mit Bakterien bedeckt ist.

Abbildung 11 repräsentiert die Roughness-Koeffizienten der Stämme *MC58siaD*- und *2594mynB*- sowie derer isogener *pilX*-Mutanten. Der Roughness-Koeffizient ist dimensionslos und beschreibt, wie stark die Dicke eines Biofilms variiert. Somit ist dieser Parameter ein Indikator der Biofilmheterogenität. Für alle vier gezeigten Stämme ist ein Trend zur Abnahme des Roughness-Koeffizienten, also zur Abnahme der Biofilmheterogenität, von 1 h bis 24 h zu beobachten. Stamm *MC58siaD*-/*pilX*- zeigte gegenüber dem Stamm *MC58siaD*- einen deutlich kleineren, statistisch signifikanten Roughness-Koeffizient. Dieses Resultat korreliert mit dem Verlust der Mikrokolonien und einer starken Abnahme der maximalen Biofilmdicke (Daten nicht gezeigt) durch die *pilX*-

Mutation in diesem Stamm. Für den Stamm 2594*siaD*- gab es zwischen dem *pilX*-Wildtyp und der Mutante keine statistisch signifikanten Unterschiede.



**Abb. 11.** COMSTAT-Analyse des Roughness-Koeffizienten der Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*- sowie der entsprechenden *pilX*-Knock-out-Mutanten zu 4 verschiedenen Zeitpunkten. Die Werte sind die Mittelwerte der Daten aus 18 Bildstapeln (6 Bildstapel aus 3 unabhängigen Kanälen). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass COMSTAT ein hilfreiches Werkzeug zur Beschreibung der Dynamik der Biofilmbildung und zur Beschreibung der Strukturen von Meningokokkenbiofilmen ist. COMSTAT war in der Lage, die visuell wahrnehmbaren Unterschiede der Biofilmmorphologien zwischen den verschiedenen Wildtypstämmen und zwischen den *pilX*-Wildtypen und den -Mutanten diskriminieren zu können. Somit konnte mit Hilfe der von COMSTAT berechneten strukturellen Parameter der Effekt des PilX auf die Biofilmbildung und Biofilmstruktur auch statistisch belegt werden.

#### 5.3.4. Die Rolle der *Twisting Motility* für die Mikrokoloniebildung

Die *PilX*-Mutation im autoaggregativen Stamm MC58*siaD*- führte zum Verlust der Mikrokoloniebildung und der Aggregation. Die Biofilmbildung selbst blieb davon unbeeinflusst. Auch im Stamm 2120*siaD*- führte die *pilX*-Mutation zum Verlust der Mikrokoloniebildung. Bemerkenswerterweise besaß der Mikrokolonie-bildende Stamm 2120*siaD*- keine Autoaggregation, während der autoaggregative Stamm 2594*mynB*- keine

Mikrokolonien ausbildete. Daraus ist zu schließen, dass die PilX-vermittelte Autoaggregation nicht ausreichend die Mikrokoloniebildung im Flusssystem erklären kann.

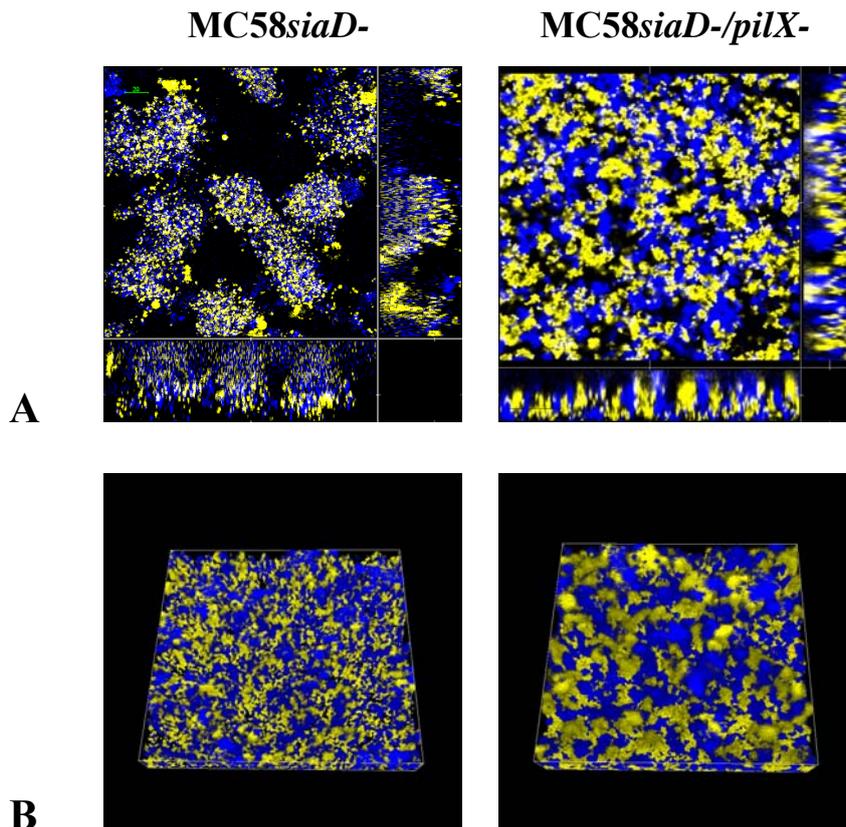
Daraus ergab sich die Frage, wie PilX die Mikrokoloniebildung beeinflusst, wenn die Expression von PilX nicht an Autoaggregation gekoppelt ist.

Die mikroskopische Betrachtung früher Biofilme ergab, dass die Stämme MC58*siaD*- und 2120*siaD*- ein höheres Maß an *Twitching Motility* als der Stamm 2594*mynB*- und die *pilX*-Mutanten zeigten. Kurze Zeitraffer-Filme konnten diesen Eindruck bestätigen (supplementäres Material unter: [www.blackwell-synergy.com/doi/suppl/10.1111/j.1365-2958.2006.05448.x](http://www.blackwell-synergy.com/doi/suppl/10.1111/j.1365-2958.2006.05448.x)). Die *Twitching Motility* des Stammes MC58*siaD*-/*pilX*- konnte durch Komplementation *in trans* wiederhergestellt werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die *pilX*-Mutation die *Twitching Motility* der Zellen im Flusssystem reduzierte, und dass der *Twitching Motility*-Phänotyp mit der Mikrokoloniebildung assoziiert war. In Tabelle 6 sind die Phänotypen bezüglich der Autoaggregation, der Mikrokoloniebildung und der *Twitching Motility* der *pilX*-Wildtypen und *pilX*-Mutanten gezeigt. In weiteren Experimenten wurde der Effekt der *Twitching Motility* auf die Mikrokoloniebildung und während der Mikrokoloniebildung untersucht. Dazu wurden jeweils gleiche Mengen CFP- und YFP-markierter Bakterien des *pilX*-Wildtyps oder der -Mutante des Stammes MC58*siaD*- gemischt und als Inokulum verwendet. 12 h nach Inokulation bestanden die Biofilme des Wildtyps aus homogen blau und gelb gemischten Mikrokolonien (Abb. 12). Im Gegensatz dazu waren die Biofilme der Mutante flach mit distinkten blauen und gelben Zonen, die kein ersichtliches Vermischen zeigten. Daraus ist zu schließen, dass die *Twitching Motility* in Meningokokkenbiofilmen zu ausgedehntem Vermischen der Zellen in den Mikrokolonien führt. Dieses Vermischen findet auch noch nach der initialen Mikrokoloniebildung während des Wachstums der Kolonien statt.

**Tab. 6:** Phänotypen der kapsellosen Stämme und ihrer *pilX*-Mutanten

Stamm	Autoaggregation	<i>Twitching Motility</i>	Mikrokolonien*
MC58 <i>siaD</i> -	+	+	+
MC58 <i>siaD</i> -/ <i>pilX</i> -	-	-	-
MC58 <i>siaD</i> -/ <i>pilX</i> -/pHC33	+	+	+
2120 <i>siaD</i> -	-	+	+
2120 <i>siaD</i> -/ <i>pilX</i> -	-	-	-
2594 <i>mynB</i> -	+	-	-
2594 <i>mynB</i> -/ <i>pilX</i> -	-	-	-

\* Alle Stämme bildeten Biofilme aus, unterschieden sich aber in der Biofilmarchitektur bezüglich der Mikrokolonien; pHC33: Komplementationsplasmid für PilX<sub>MC58</sub>



**Abb. 12.** Biofilmbildung CFP- und YFP-markierter Derivate der Stämme MC58siaD- und MC58siaD-/pilX-. Der Biofilm wurde mit einer 1:1-Mischung gelb fluoreszierender und blau fluoreszierender Bakterien des Stammes MC58siaD- oder des Stammes MC58siaD-/pilX- initiiert. Die Biofilmbildung wurde mittels CLSM 12 h nach Inokulation dokumentiert. (A) repräsentiert horizontale und vertikale Schnitte. Die Größe des Areal beträgt 235x 235  $\mu\text{m}$ . (B) zeigt simulierte dreidimensionale Bilder der gleichen Areale.

### 5.3.5. Bestimmung der Anzahl Pili-tragender Diplokokken durch Immunfluoreszenz

*Twitching Motility* ist als wichtiger Faktor für die Mikrokoloniebildung bei verschiedenen Bakterienspezies (Klausen *et al.*, 2003a, b; O'Toole und Kolter, 1998) beschrieben worden.

Wir stellten die Frage, warum *Twitching Motility* bei *pilX*-Mutanten reduziert war. *Twitching Motility* bei pathogenen Neisserien wird durch Typ IV-Pili vermittelt. Deshalb wurde mittels Immunfluoreszenz die Anzahl Pili-tragender Zellen der *pilX*-Wildtypen, -Mutanten und -Komplementanten bestimmt. Für die Immunfluoreszenz wurden die Pili-spezifischen Antikörper SM1 und AD211 verwendet. Pro Stamm wurden 10 digitale mikroskopische Aufnahmen gemacht. Davon wurde das Verhältnis von pilierten zu unpilierten Diplokokken bestimmt. In den Stämmen MC58siaD-, 2120siaD- und 2594mynB- führte die *pilX*-Mutation zu einer statistisch signifikanten Reduktion Pili-tragender Diplokokken auf etwa ein Fünftel bis ein Zehntel, je nach Stamm (Tab. 7). Die *pilX*-Komplementierung *in trans* konnte den vollen Piliierungsstatus wiederherstellen (Tab. 7). Die Komplementanten waren in den

Stämmen MC58*siaD*-/*pilX*- und 2120*siaD*-/*pilX*- um etwa 50% häufiger piliert als der Wildtyp. Diese Hyperpiliierung, verglichen mit dem Wildtyp, lässt sich durch das Komplementationskonstrukt erklären.

**Tab.7:** Bestimmung der Anzahl Pili-tragender Meningokokken mit Immunfluoreszenz

<b>Stamm</b>	<b>Anzahl getesteter Diplokokken</b>	<b>Anzahl Pili- tragender Diplokokken</b>	<b>Prozentzahl Pili-tragender Diplokokken</b>
MC58 <i>siaD</i> -	459	20	4,36
MC58 <i>siaD</i> -/ <i>pilX</i> -	660	6	0,9
MC58 <i>siaD</i> -/ <i>pilX</i> -/pHC33	569	37	6,5
2120 <i>siaD</i> -	638	63	9,9
2120 <i>siaD</i> -/ <i>pilX</i> -	639	8	1,25
2120 <i>siaD</i> -/ <i>pilX</i> -/pHC34	602	91	15,1
2594 <i>mynB</i> -	555	97	17,4
2594 <i>mynB</i> -/ <i>pilX</i> -	500	6	1,2
2594 <i>mynB</i> -/ <i>pilX</i> -/pHC35	580	45	7,8

pHC33: Komplementationsplasmid für PilX<sub>MC58</sub>, pHC34: Komplementationsplasmid für PilX<sub>2120</sub>, pHC35: Komplementationsplasmid für PilX<sub>2594</sub>

Hierbei steht das *pilX*-Gen unter der Kontrolle des starken Promotors des Gens *porA*. Diese durch den *porA*-Promotor induzierte Überexpression des PilX (siehe auch Abb. 6b) führt dann zur Hyperpiliierung. Die Reduktion der Piliierung durch die *pilX*-Mutation wurde sowohl für Zellen beobachtet, die direkt Agarplatten entnommen wurden, als auch für Zellen, die zwischenzeitlich in Schüttelkultur gehalten wurden. Es konnte auch keine Veränderung im Verhältnis von zellgebundenen Pili zu freien Pili gefunden werden. Wie Tabelle 7 ebenfalls zu entnehmen ist, lagen die Anteile der pilierten Zellen etwa zwischen 1 und 15%. Dieser recht geringere Anteil piliierter Zellen steht im ersten Moment im Widerspruch zu den Zeitraffer-Filmen (supplementäres Material unter: [www.blackwell-synergy.com/doi/suppl/10.1111/j.1365-2958.2006.05448.x](http://www.blackwell-synergy.com/doi/suppl/10.1111/j.1365-2958.2006.05448.x)), in denen für die PilX-exprimierenden Derivate der Stämme MC58*siaD*- und 2120*siaD*- der Eindruck entstand, dass annähernd alle Zellen motil waren. Dem ist zu entgegen, dass Mikrokolonien durch nur wenige motile Zellen bewegt werden können (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise werden bei der initialen Anheftung der Zellen nach Inokulation Pili-tragende Zellen selektiert. Helaine *et al.* benutzten ELISA zur Bestimmung des Piliierungsstatus der Wildtypstämme als auch der entsprechenden *pilX*-Mutanten. Es wurde von ihnen ein Unterschied von Faktor 1,5 zwischen Wildtyp und Mutante gemessen, was aus ihrer Sicht einen kaum messbaren und vernachlässigbaren Unterschied darstellte (Helaine *et al.*, 2005). Es muss zudem erwähnt

werden, dass die von dieser Gruppe benutzten Stämme bekapselt waren und zu einem anderen Genotyp gehörten.

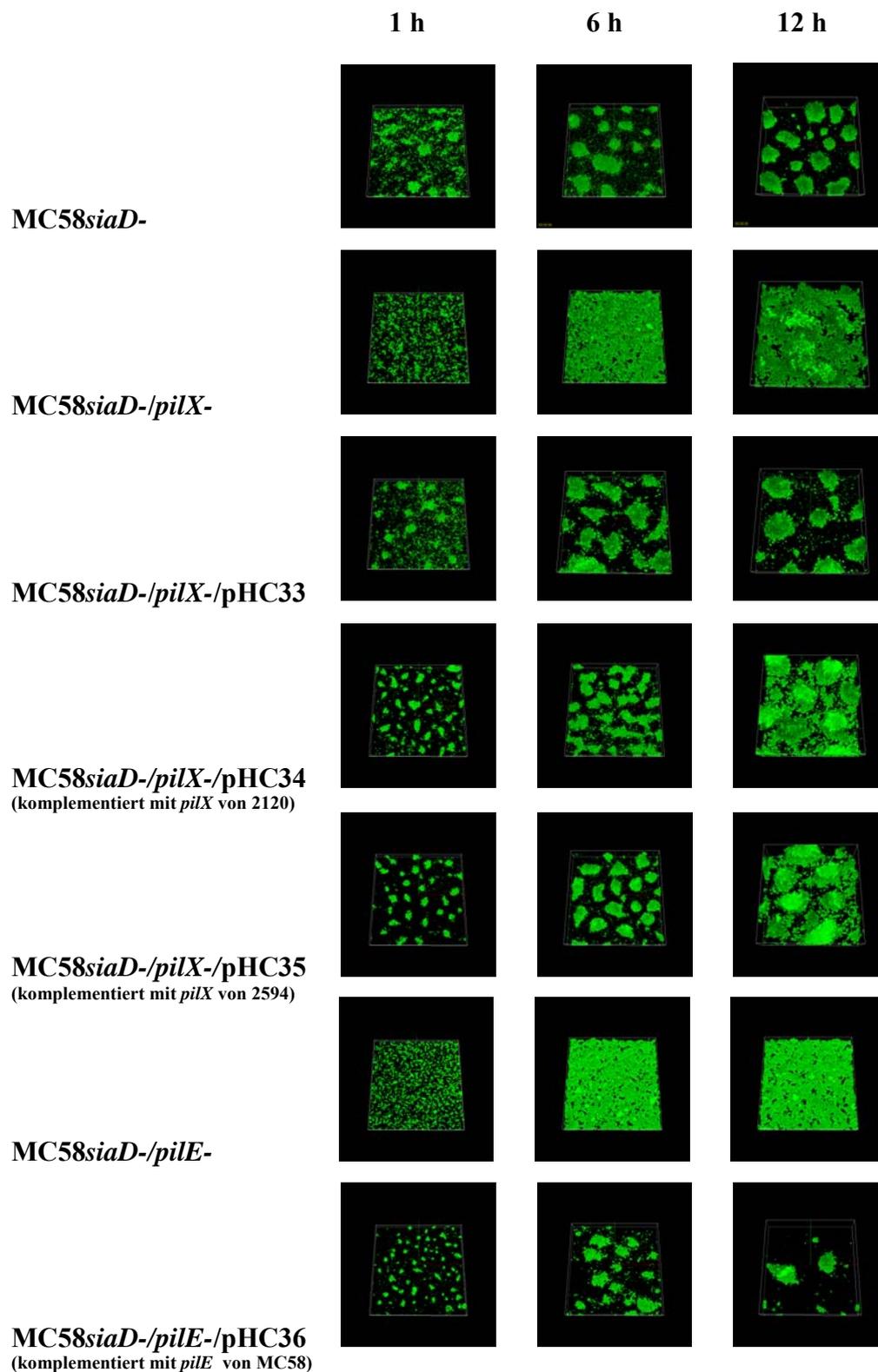
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mutation des *pilX* zu einer verringerten Piliierung der Zellen führte. Diese reduzierte Piliierung führte zu einer sehr starken Reduktion der *Twitching Motility* in den Meningokokkenbiofilmen, was letztendlich die Bildung distinkter Mikrokolonien verhinderte.

### 5.3.6. Der Austausch von PilX-Allelen

Möglicherweise tragen Sequenzunterschiede im PilX-Protein zur Ausbildung unterschiedlicher Biofilmarchitekturen bei. Als einen ersten Schritt zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die PilX-Allele der Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*- *in trans* im Stamm MC58*siaD*-/*pilX*- exprimiert. Alle drei PilX-Allele komplementierten die Mutation des *pilX* im Stamm MC58*siaD*-/*pilX*- in Bezug auf die Ausbildung distinkter Mikrokolonien (Abb. 13). Diese Beobachtung stützt die These, dass das PilX, unabhängig von seinem Allel, essentiell für die Pilus-Assemblierung, die *Twitching Motility* und damit letztendlich für die Mikrokoloniebildung ist. Andererseits zeigen diese Komplementationsexperimente, dass es weitere Faktoren neben dem PilX geben muss, die die Ausbildung bestimmter Biofilmarchitekturen beeinflussen. Nur so ist zu erklären, dass das PilX des Stammes 2594*mynB*- im Stamm MC58*siaD*-/*pilX*- zur Ausbildung distinkter Mikrokolonien führte, obwohl der Stamm 2594*mynB*- einen homogenen flachen Biofilm ausbildete.

### 5.3.7. Die Biofilmbildung von *pilE*-Knock-out-Mutanten

Um die These weiter untersuchen zu können, dass der Verlust der Mikrokoloniebildung durch *pilX*-Mutation durch eine Reduktion der Piliierung hervorgerufen wurde, erfolgte die Testung von *pilE*-Knock-out-Mutanten im Flusssystem. Pile stellt die Hauptuntereinheit der Pili dar. *PilE*-Mutanten sind nicht piliert und sollten nach den zuvor präsentierten Daten keine Mikrokolonien mehr ausbilden, dennoch aber immer noch effektiv Biofilm bilden können. Erwartungsgemäß bildete der Stamm MC58*siaD*/*pilE*-, trotz des Vorhandenseins einer funktionellen Kopie des *pilX*-Gens, keine Mikrokolonien mehr aus (Abb. 13). Die Biofilmbildung selbst war durch die *pilE*-Mutation nicht beeinträchtigt. Die Mutation wurde *in trans* durch die Expression von Pile von einem Plasmid komplementiert (Abb.13).



**Abb. 13.** Räumliche Verteilung der Biofilmbildung der Stämme MC58*siaD*-/*gfp*+, MC58*siaD*-/*gfp*+/ *pilX*- und MC58*siaD*-/*gfp*+/ *pilX*- komplementiert mit dem *pilX*<sub>MC58</sub>, *pilX*<sub>2120</sub> oder *pilX*<sub>2594</sub>. Zudem ist die Biofilmbildung der *pilE*-Mutante und der mit *pilE* komplementierten *pilE*-Mutante des Stammes MC58*siaD*-/*gfp*+ zu sehen. Die Biofilme wurden in Flusszellen kultiviert. Die Biofilmentwicklung wurde 1 h, 6 h und 12 h nach Inokulation mittels CLSM dokumentiert. Die Einzelabbildungen repräsentieren simulierte dreidimensionale Bilder.

Diese Ergebnisse belegen die Wichtigkeit der Pili für die Mikrokoloniebildung von Meningokokken unter Flussbedingungen. Zudem verdeutlichen sie, dass Typ IV-Pili für die Biofilmbildung bei Meningokokken nicht nötig sind. Außerdem unterstützen diese Ergebnisse die These, dass eine durch *pilX*-Mutation verringerte Piliierung zu verminderter *Twitching Motility* führt, was

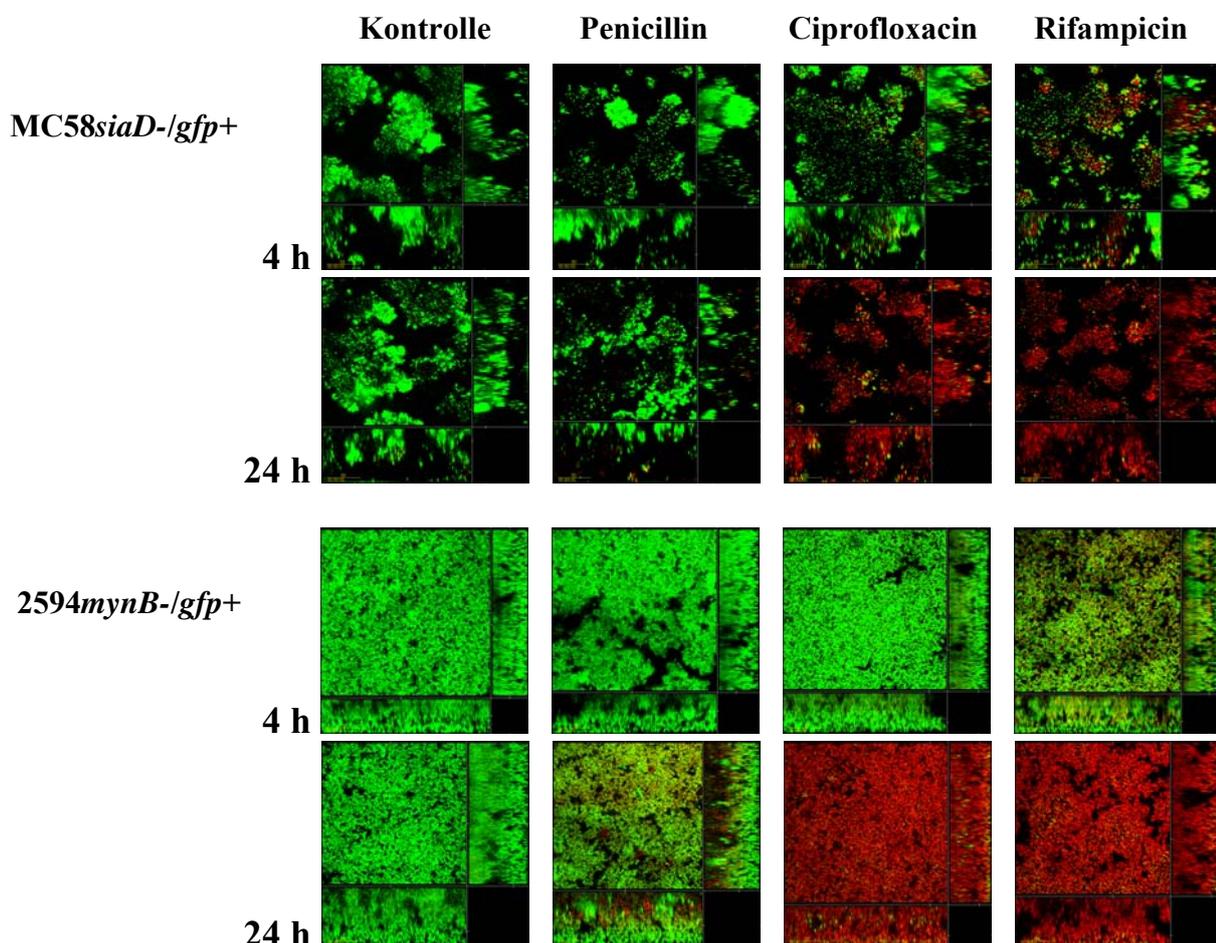
letztendlich die Ausbildung distinkter Mikrokolonien verhindert. Es steht dazu noch aus, die Pile-Varianten verschiedener Stämme in heterologen Komplementationen zu testen.

#### **5.4. Die Bestimmung der Suszeptibilität von Meningokokkenbiofilmen gegenüber der Wirkung von Penicillin, Ciprofloxacin und Rifampicin**

Penicillin kann nicht effektiv das Trägertum der Meningokokken aus dem Nasopharynx eradizieren (Abramson und Spika, 1985), obwohl es höchst wirksam in der Behandlung invasiver Meningokokken-Erkrankungen ist. Ciprofloxacin (Cuevas *et al.*, 1995) und Rifampicin (Schwartz *et al.*, 1988) hingegen können zuverlässig verwendet werden, um z.B. enge Kontaktpersonen von Personen mit invasiven Meningokokkenerkrankungen prophylaktisch zu behandeln.

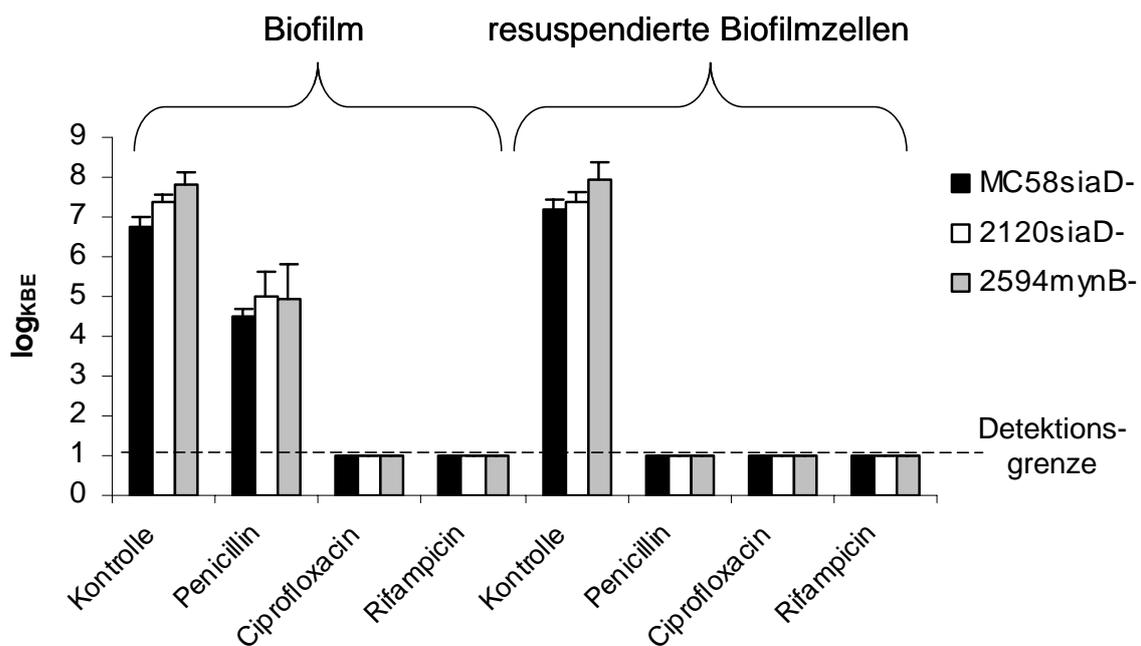
Die Sensitivität von Meningokokken gegenüber diesen drei Medikamenten wurde im Biofilm analysiert. Diesen Experimenten lag zu Grunde, dass möglicherweise multizelluläre Aggregate (Mikrokolonien) im Nasopharynx der Wirkung des Penicillins nicht zugänglich sind. Nach 24 h des Biofilmwachstums in den Flusszellen wurde die zehnfache minimale Hemmkonzentration (MHK) Penicillin, Ciprofloxacin oder Rifampicin dem Medium beigemischt. PI im Medium wurde zur kontinuierlichen Überwachung der Vitalität der Biofilmzellen eingesetzt. Die Biofilme wurden mittels CLSM nach 4 h und 24 h erfasst, um die antimikrobielle Wirkung zu dokumentieren. In Abbildung 14 sind repräsentative Daten für die Stämme MC58*siaD*- und 2594*mynB*- dargestellt. Nach 4 h antibiotischer Behandlung zeigten nur die Biofilme, die mit Rifampicin behandelt wurden, in beiden Stämmen einen geringen Anteil roter Zellen. Wie für den Stamm 2594*mynB*- sehr gut zu sehen ist, nahmen die Zellen der apikalen Schichten des Biofilms das rote PI auf, was Zelltod indiziert (Abb. 14). Die Biofilme, die mit Penicillin oder Ciprofloxacin behandelt worden waren, schienen ähnlich der Kontrolle unbeeinträchtigt zu sein. Nach 24 h antibiotischer Behandlung waren die mit Ciprofloxacin und Rifampicin behandelten Biofilme fast vollständig tot (Abb. 14). Im Gegensatz dazu wurden in den mit Penicillin behandelten Biofilmen nur die äußeren bzw. apikalen Schichten getötet. Die tieferen bzw. inneren Schichten exprimierten weiterhin GFP

und nahmen kein PI auf (Abb. 14), was vermuten ließ, dass diese Zellen noch lebten. Interessanterweise zeigten beide Stämme sehr ähnliche Suszeptibilitätsprofile, trotz ihrer so gegensätzlichen Biofilmarchitekturen. Die oben gezeigten Resultate konnten durch antibiotische Behandlung statischer Biofilme bestätigt und quantifiziert werden. Hierzu wurden 24-well-Zellkulturschalen benutzt, in denen runde Glasdeckgläschen (15mm Durchmesser) als Substratum dienten. 24 h nach Einsaat der Bakterien wurden die Biofilme mit der 10-fachen MHK Penicillin, Ciprofloxacin bzw. Rifampicin behandelt. Danach wurden die Biofilme mit Wattestäbchen aufgelöst und durch längeres Vortexen resuspendiert. Davon wurden serielle Verdünnungen, zur Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE), auf GC-Agar ausplattiert. Ohne antibiotische Behandlung konnten je nach Stamm  $10^7$  bis  $10^8$  KBE pro Well (Abb. 15) aus dem Biofilm detektiert werden.



**Abb. 14.** Antibiotische Behandlung von Meningokokkenbiofilmen. Die Stämme *MC58siaD-/gfp+* und *2594mynB-/gfp+* wurden als Biofilme in Flusszellen für 24 h kultiviert. Danach wurde dem Medium die 10-fache MHK Penicillin, Ciprofloxacin bzw. Rifampicin zugesetzt. Simultan wurde dem Medium PI beigefügt, um das Absterben der Biofilmzellen zu dokumentieren. Die Einzelabbildungen repräsentieren Biofilme, die 4 h bzw. 24 h antibiotisch behandelt wurden. Die Größe des gezeigten Areals beträgt 235x 235  $\mu\text{m}$ .

Aus den Biofilmen, die mit Ciprofloxacin oder Rifampicin für 24 h behandelt wurden, konnten keine Meningokokken kultiviert werden. Im Gegensatz dazu konnten nach der Behandlung mit Penicillin je nach Stamm noch  $10^4$  bis  $10^5$  KBE pro Well kultiviert werden (Abb. 15). Um herauszufinden, ob die teilweise Resistenz (Toleranz) der Meningokokken gegen Penicillin im Biofilm an die Integrität des Biofilms gekoppelt ist, und folglich nach Auflösung des Biofilms in Einzelzellen wieder verschwinden sollte, wurden unbehandelte 24 h alte Meningokokkenbiofilme resuspendiert und mit 10-facher MHK Penicillin, Ciprofloxacin oder Rifampicin behandelt. In diesem Versuch waren die resuspendierten Biofilmzellen gegen alle drei Antibiotika vollständig sensitiv (Abb. 15). Damit lässt sich schlussfolgern, dass die Resistenz von Zellen des Meningokokkenbiofilms eine Eigenschaft des intakten Biofilms, nicht aber eine Eigenschaft planktonischer (dem Biofilm entstammender Zellen) ist.



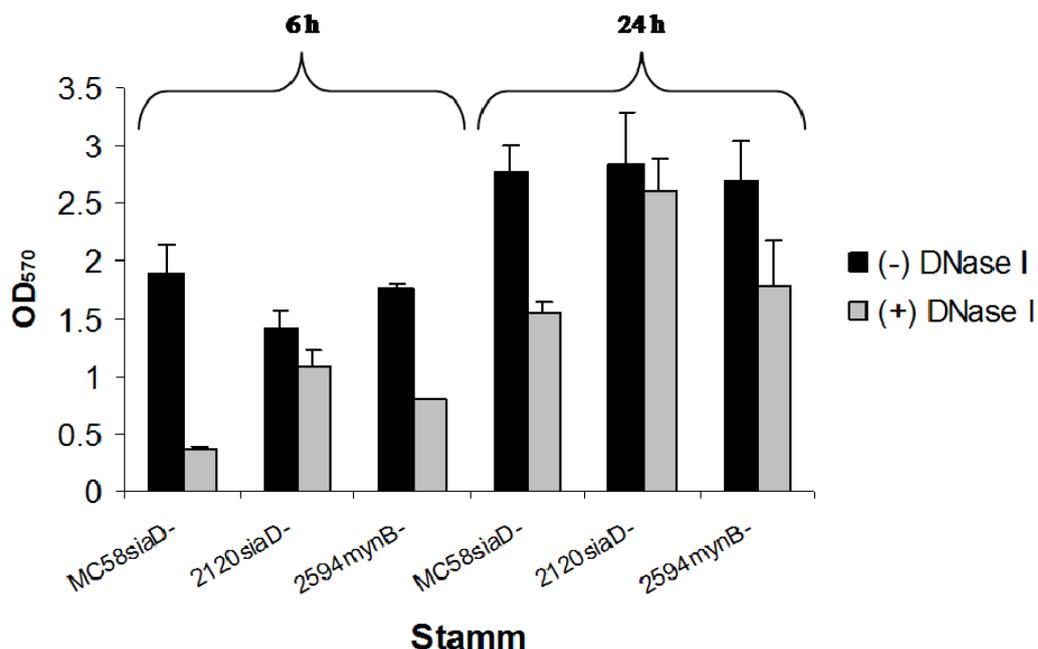
**Abb. 15.** Überlebensfähigkeit statischer Biofilme und planktonischer Kulturen unter antibiotischer Behandlung. 24 h alte Biofilme der Stämme MC58*siaD*-/*gfp*+, 2120*siaD*-/*gfp*+ und 2594*mynB*-/*gfp*+ wurden für 24 h mit der 10-fachen MHK Penicillin, Ciprofloxacin oder Rifampicin behandelt. Zudem wurden 24 h alte Biofilme aufgelöst, die Zellen resuspendiert und anschließend wie die Biofilme mit den entsprechenden Antibiotika behandelt.

## 5.5. Die DNase-Sensitivität von Meningokokkenbiofilmen

Der letzte Abschnitt befasst sich mit der extrazellulären Matrix von Meningokokkenbiofilmen, zu deren Zusammensetzung nichts bekannt ist. Unveröffentlichte elektronengrafische Aufnahmen legen nahe, dass die Zellen in den Biofilmen sehr dicht

gepackt sind. 2002 konnte durch *Whitchurch et al.* gezeigt werden, dass extrazelluläre DNA zur Biofilmbildung bei *Pseudomonas aeruginosa* benötigt wird.

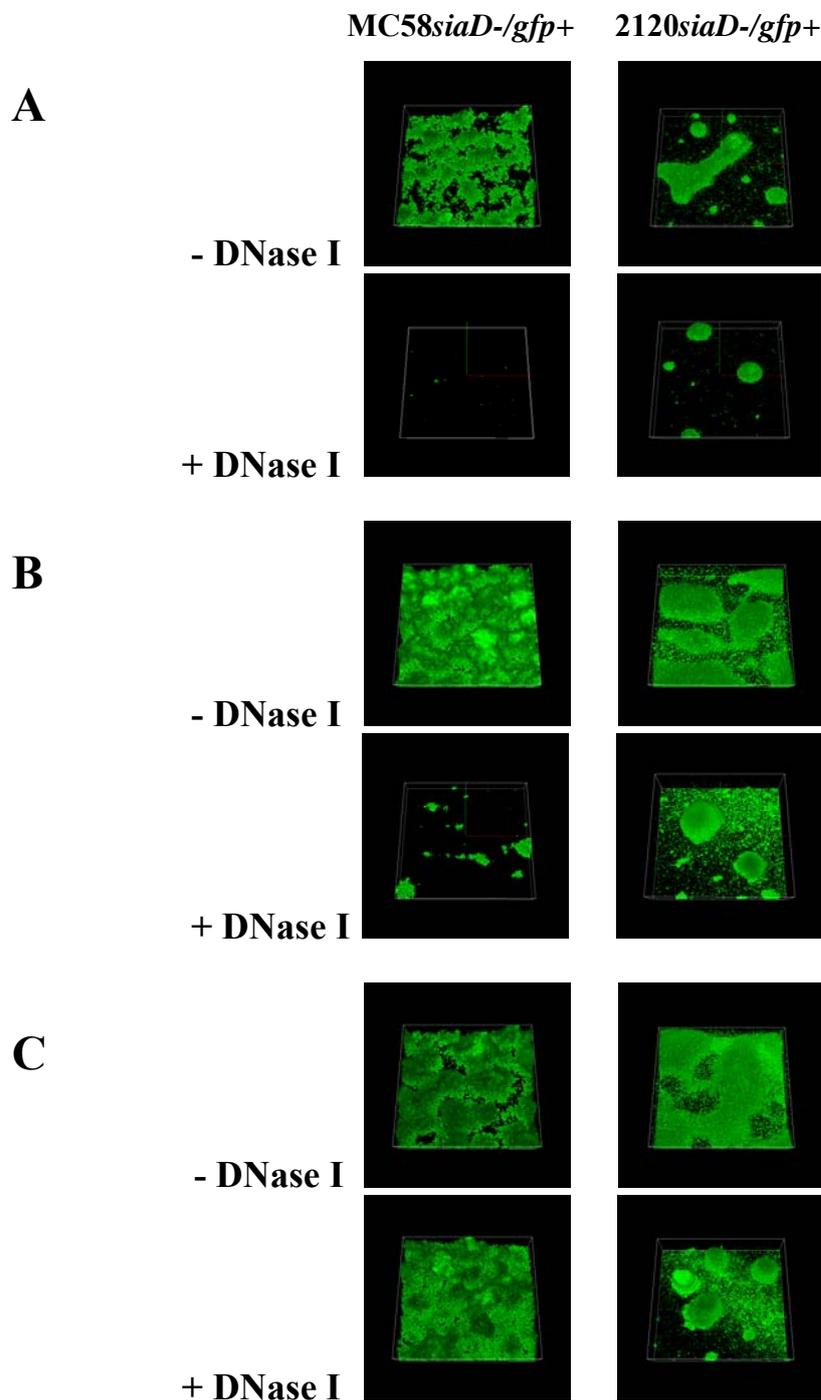
Nachfolgend sind vorläufige, noch unveröffentlichte Ergebnisse gezeigt, die eine Rolle extrazellulärer DNA für die Biofilmbildung bei Meningokokken nahelegen. Es wurde die Sensitivität von Meningokokkenbiofilmen gegenüber DNase I getestet. 6 h alte Biofilme der Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*- wurden auf Glasplättchen in 24-Well-Zellkulturschalen mit 0,1 mg/ml DNase I im Medium für 6 h inkubiert (Abb. 16). Anschließend wurden die Biofilme mit Kristallviolett gefärbt. Als Kontrolle dienten Biofilme, die 6 h mit DNase I-freiem Medium inkubiert wurden. Stamm MC58*siaD*- hatte nach sechsstündiger DNase I-Behandlung nur etwa 20% der Biomasse des unbehandelten Biofilms. Im Stamm 2594*mynB*- betrug die Biomasse des behandelten Biofilms etwa die Hälfte des unbehandelten Biofilms. Somit waren die Biofilme dieser beiden Stämme DNase I-sensitiv. Stamm 2120*siaD*- zeigte eine nur etwa 20%-ige Reduktion des Biofilms gegenüber der unbehandelten Kontrolle, und war also weitgehend unbeeinflusst geblieben.



**Abb. 16.** Kristallviolett-Test zur quantitativen Bestimmung der Biofilmbildung DNase I-behandelter statischer Biofilme in 24-Well-Zellkulturschalen auf runden Glasplättchen. 6 h bzw. 24 h alte Biofilme der Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*- wurden für weitere 6 h mit DNase I-haltigem Medium oder DNase I-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Biofilme mit Kristallviolett gefärbt und die optische Dichte bei 570 nm bestimmt. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung.

Als nächstes wurde die DNase I-Sensitivität von 24 h alten Biofilmen der Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*- untersucht (Abb. 16). Der Versuchsaufbau war gleich

zu dem vorangegangenen Satz Experimenten. Die sechsstündige DNase I-Behandlung 24 h alter Biofilme führte im Stamm MC58*siaD*- zu einer etwa 50%-igen, im Stamm 2120*siaD*- zu



**Abb. 17.** Räumliche Verteilung der Biofilmbildung der Stämme MC58*siaD*-/*gfp*+ und 2120*siaD*-/*gfp*+ mit und ohne DNase I-Behandlung. Die Biofilme wurden in Flusszellen kultiviert. (A) Einsaat der Biofilme in DNase I-haltigen Medium und weitere Inkubation in DNase I-haltigem Medium für 6 h, (B) Biofilme für die initialen 6 h in DNase I-freiem Medium, danach weitere 6 h Inkubation in DNase I-haltigem Medium, (C) Biofilme für die initialen 12 h in DNase I-freiem Medium, danach weitere 6 h Inkubation in DNase I-haltigem Medium. Die Biofilmentwicklung wurde mittels CLSM dokumentiert. Die Einzelabbildungen repräsentieren simulierte dreidimensionale Bilder.

---

einer etwa 10%-igen und im Stamm 2594*mynB*- zu einer 30%-igen Reduktion der Biofilmbildung. Somit waren die 6 h alten Biofilme wesentlich sensitiver gegenüber der DNase I-Behandlung als 24 h alte Biofilme.

Abbildung 17 zeigt die Biofilmbildung der Stämme MC58*siaD*- und 2120*siaD*- im Flusssystem unter DNase I-Behandlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Stamm MC58*siaD*- bildete erwartungsgemäß keinen Biofilm, wenn schon die Vorkultur und dann das Medium für weitere 6 h mit DNase versetzt wurden. Im Gegensatz dazu bildete Stamm 2120*siaD*- einen Biofilm unter gleichen Bedingungen. Bei Zugabe DNase-haltigem Mediums zu einem schon 6 h alten Biofilm des Stammes MC58*siaD*- war eine deutliche Reduktion der Biofilmbildung zu verzeichnen. Es konnten nur vereinzelte kleine Mikrokolonien beobachtet werden. Die Biofilmbildung des Stammes 2120*siaD*- hingegen war unter diesen Bedingungen nur wenig beeinträchtigt. Die Behandlung 12 h alter Biofilme der Stämme MC58*siaD*- und 2120*siaD*- mit DNase-haltigem Medium für weitere 6 Stunden führte zu keiner merklichen Reduktion des Biofilms. Somit bestätigten auch die Versuche im Flusssystem, dass die Sensitivität der Biofilme gegenüber der DNase steigt, je früher die DNase während der Biofilmbildung zugesetzt wird. Das lässt die Spekulation zu, dass zellgebundene DNA für initiale Schritte der Biofilmbildung in zumindest einigen Stämmen eine essentielle Funktion ausübt.

## 6. Diskussion

### 6.1. Methodische Voraussetzungen für die Etablierung eines Biofilmmodells für Meningokokken unter Flussbedingungen

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Biofilmmodells für Meningokokken unter standardisierten Flussbedingungen. Auf diesem System aufbauend sollte dann die Biofilmbildung einer Vielzahl von Meningokokkenstämmen verschiedenster klonaler Herkunft untersucht werden. Hierbei war der Focus der Untersuchungen auf die Struktur und die Entwicklung der Biofilme gerichtet. Zudem sollte von Meningokokkenbiofilmen die Resistenz bzw. Toleranz gegenüber Antibiotika untersucht werden.

Biofilm-Flusssysteme in Kombination mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) gelten als der Goldstandard in der Biofilmforschung (Christensen *et al.*, 1999), da diese Systeme eine äußerst detaillierte Bildgebung der Biofilmstrukturen in Echtzeit ermöglichen, ohne destruktiv auf die Biofilmstrukturen bzw. -entwicklung einzuwirken. Biofilm-Flusssysteme zeichnen sich ebenso durch eine sehr große Reproduzierbarkeit der Experimente aus, die nicht zuletzt durch die Verwendung von definierten Medien als Substrat gewährleistet werden kann (Heydorn *et al.*, 2000). Die Nutzung der CLSM wird durch die Markierung der Bakterien mit Fluoreszenzproteinen stark vereinfacht, da die intrinsische Fluoreszenz der Bakterien die Färbung der Bakterien mit Fluoreszenzfarbstoffen erübrigt, die möglicherweise zu Beeinträchtigungen der Biofilmentwicklung oder schon bestehender Strukturen führt. Um also die Biofilmbildung von Meningokokken in einem Flussmodell untersuchen zu können, mussten mehrere Grundprobleme gelöst werden, wie (i) die Etablierung eines Minimalmediums für die Biofilmbildung, (ii) die Adaption von Meningokokken an das Flusssystem durch Testung verschiedenster Parameter, wie z.B. Einsaat oder Vorkultur, und (iii) die Markierung von Meningokokken mit Fluoreszenzproteinen.

Es ist bestens bekannt, dass verschiedene Kohlenstoffquellen (Klausen *et al.*, 2003a, b) oder aber auch verschiedene Metallionen wie etwa Eisenionen (Banin *et al.*, 2005; Singh, 2004) einen Einfluss auf die Biofilmbildung selbst oder die Biofilmarchitektur haben können. Um solche Einflüsse auf die Biofilmbildung durch schwankende und nicht zu kontrollierende Nährstoffzusammensetzungen ausschließen zu können, war die Etablierung eines definierten

Minimalmediums für diese Arbeit von entscheidender Wichtigkeit. In der vorliegenden Arbeit wurde NDM (Archibald und DeVoe, 1978) als Wachstumsmedium verwendet, das ursprünglich zur Austestung des Eisenbedarfs für das Wachstum von Meningokokken eingesetzt wurde. Andere definierte Medien wie MCDA (Catlin, 1973) oder RPMI 1640 ließen bei Meningokokken keine Biofilmbildung trotz planktonischen Wachstums zu. Für Gonokokken konnte hingegen Biofilmbildung in einem Flussmodell mit RPMI als Medium gezeigt werden (Greiner *et al.*, 2005). Zu unserer Überraschung konnte reines NDM die Biofilmbildung im Flusssystem nicht mit zufriedenstellender Reproduzierbarkeit gewährleisten. Deshalb wurde das NDM zusätzlich mit dem Supplement PolyViteX und 5 mM Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) versehen und anschließend in allen weiteren Experimenten verwendet.  $\text{NaHCO}_3$  in Nährmedien soll eine  $\text{CO}_2$ -angereicherte Atmosphäre generieren, wie sie auch innerhalb des menschlichen Organismus zu finden ist. Das von Greiner *et al.* (2005) verwendete RPMI 1640 als auch das von Yi *et al.* (2005) verwendete Komplexmedium enthielt ebenfalls  $\text{NaHCO}_3$ .

Neben der vorliegenden Arbeit ist bisher keine Arbeit zur Markierung von Meningokokken mit Fluoreszenzproteinen veröffentlicht worden. Daher wurde der Gonokokken-Expressionsvektor pEG2 verwendet, der ein *gfp*-Gen unter der Kontrolle des starken *porA*-Promotors enthält (Christodoulides *et al.*, 2000). Die Ampicillin-Resistenzkassette von pEG2 wurde durch eine Erythromycin-Resistenzkassette ersetzt, was in dem Plasmid pEG2-Ery resultierte, das letztendlich zur Fluoreszenzmarkierung der Meningokokken verwendet wurde. Die Transformation von Gonokokken mit pEG2 ist als stabil beschrieben worden (Christodoulides *et al.*, 2000). Das Plasmid pEG2-Ery wurde ebenfalls ohne Selektionsdruck (Erythromycin im Medium) stabil in den Meningokokken gehalten. Dadurch konnte auf die Zugabe des Antibiotikums zum Biofilmmedium verzichtet werden, wenn es der Versuchsaufbau verlangte, wobei jedoch meist das Antibiotikum zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen zugesetzt wurde. Die Entwicklung der Meningokokkenbiofilme erfolgte mit und ohne Zugabe des Antibiotikums identisch, was durch mehrfache visuelle Inspektion gezeigt wurde.

## 6.2. Die Rolle der Kapsel für die Biofilmbildung

Über die Biofilmbildung von Neisserien war bisher nur sehr wenig bekannt. Yi *et al.* (2004) testeten eine Reihe von Trägerisolaten und Isolaten von invasiven Meningokokkenerkrankungen auf Biofilmbildung in statischen Tests in Komplexmedium. 30% der Trägerisolate und 12,5% der Isolate aus invasiven Meningokokkenerkrankungen bildeten Biofilme. Der Kapselstatus dieser Stämme wurde nicht untersucht. Von nur einem bekapselten Stamm wurde das *ctrA*-Gen (Frosch *et al.*, 1992) mutiert, so dass dieser Stamm kein Kapselpolysaccharid mehr über die äußere Membran ausschleusen konnte. Die Kapselmutante bildete in dieser Arbeit wesentlich mehr Biofilm als der Wildtypstamm. Daraus wurde eine inhibierende Wirkung der Kapsel auf die Biofilmbildung geschlossen. Nichtsdestotrotz wurde der bekapselte Wildtypstamm in dieser Arbeit als Biofilm bildend angesehen. In der vorliegenden Arbeit wurde in statischen Biofilm-Tests und unter Flussbedingungen sowohl in Komplex- als auch in Minimalmedium die Biofilmbildung konstitutiv bekapselter, konstitutiv unbekapselter und durch Mutation von Kapselsynthesegenen unbekapselter pathogener und apathogener Meningokokkenstämme unterschiedlichster klonaler Linien untersucht. Im Gegensatz zu Yi *et al.* konnte ganz klar gezeigt werden, dass ausschließlich unbekapselte Stämme Biofilm bildeten, wobei unerheblich war, ob diese Stämme konstitutiv oder durch Mutation bedingt unbekapselt waren. Yi *et al.* suggerierten, dass Trägerisolate grundsätzlich besser Biofilme bildeten als Isolate invasiver Meningokokkenerkrankungen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch belegt werden, dass Biofilmbildung eine ubiquitäre Eigenschaft von Meningokokken ist, solange keine Kapselexpression stattfindet, unabhängig davon ob es sich um Trägerisolate oder Isolate aus invasiven Meningokokkenerkrankungen handelt. Das bedeutet, dass alle getesteten bekapselten Meningokokken im Gegensatz zur Arbeit von Yi *et al.* keine Biofilme bildeten.

Betrachtet man die Kapselexpression und die Biofilmbildung anderer bakterieller Spezies, so kommt man zu dem Schluss, dass Kapselpolysaccharide sowohl die Biofilmbildung fördern als auch hemmen können. Nachfolgend sind einige Beispiele genannt. Das Kapselpolysaccharid von *Vibrio vulnificus* (Joseph und Wright, 2004) inhibiert die initiale Anheftung der Zellen an eine Oberfläche und folglich auch die Biofilmbildung, während das EPS von *Vibrio cholerae* die initiale Anheftung und die Biofilmbildung fördert (Yildiz und

Schoolnik, 1999). Uronsäure-Zucker von mucoiden *E. coli* (Danese *et al.*, 2000) und *Pseudomonas* spp. (Evans und Linker, 1973) wurden bisher als essentiell für die Biofilmbildung angesehen, jedoch konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass das EPS von *Pseudomonas aeruginosa* hauptsächlich aus Glucose und nicht aus Alginat besteht (Wozniak *et al.*, 2003). In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Alginat-freie Mutanten ebenso gut Biofilme bildeten wie die bekapselten Wildtypen. Bei *Porphyromonas gingivalis* (Davey und Duncan, 2006) und *Streptococcus pneumoniae* (Allegrucci und Sauer, 2006) führte verminderte Expression der Kapselpolysaccharide zu verstärkter Biofilmbildung, während die verminderte Expression von Kapselpolysacchariden bei *Klebsiella pneumoniae* (Boddicker *et al.*, 2006) zu reduzierter Biofilmbildung führte.

### **6.3. Die Biofilmbildung unbekapselter Meningokokken in einem Flusssystem**

Um die Biofilmbildung von *Neisseria meningitidis* im Biofilm-Flusssystem zu untersuchen, wurde die Biofilmentwicklung von 10 unbekapselten Stämmen unterschiedlichster klonaler Herkunft zu verschiedenen Zeitpunkten mittels CLSM dokumentiert. Die Biofilmbildung wird, hauptsächlich basierend auf Daten aus der Erforschung der *in vitro*-Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa*, in 5 diskrete Schritte unterteilt: (i) Die initiale reversible Anlagerung an eine Oberfläche, (ii) die irreversible Anlagerung an eine Oberfläche, (iii) die Proliferation und Ausbildung von Mikrokolonien, (iv) die Biofilmreifung und (v) das Ablösen (Detachment) oder Streuen (Dispersal) des Biofilms (Übersicht in: Stoodley *et al.*, 2002). Diese diskreten Schritte waren ebenfalls für die Biofilmentwicklung der Meningokokken unterscheidbar. Es konnte beobachtet werden, dass die Meningokokken initial als Einzelzellen an die Glasoberfläche anlagerten. Aus diesen Einzelzellen entwickelten sich dann die Biofilme, die in Abhängigkeit vom Stamm entweder die „klassische“ Mikrokoloniestruktur besaßen oder flache, homogene Strukturen zeigten. Die Mehrzahl der getesteten Stämme bildete Mikrokolonien aus. Nach etwa 24 bis 48 Stunden der Biofilmentwicklung war ein Maximum der Biofilmmasse erreicht. Interessanterweise unterschied sich die weitere Entwicklung der Biofilme in Abhängigkeit vom Stamm erheblich. Während etwa die Biofilme des Stammes 2120*siaD*- über fünf Tage vollkommen vital blieben, was sich u.a. durch den geringen Anteil toter Zellen im Biofilm zeigte, lösten sich die Strukturen des

Biofilms im Stamm MC58*siaD*- bis zum Ablauf von fünf Tagen erheblich auf. Dieser Stamm zeigte auch einen sehr hohen Anteil toter Zellen in späten Biofilmen, wie durch Färbung der Zellen im Biofilm gezeigt werden konnte. Diesem Unterschied in der Biofilmentwicklung dieser zwei Stämme scheint das Phänomen der Autolyse zu Grunde zu liegen. Dieser werden in Biofilmen mehrere Funktionen zugeschrieben. Zum einen nimmt man an, dass das Material lysierter Zellen zur Ernährung umgebender Zellen dienen kann (Lorenz und Wackernagel, 1991). Zum anderen wird Autolyse eine wichtige Rolle beim horizontalen Gentransfer zugeschrieben (Übersicht in: Lorenz und Wackernagel, 1994). Bei *Streptococcus pneumoniae* ist die Ausbildung von Kompetenz sehr eng mit der Autolyse von Zell-Subpopulationen verbunden (Steinmoen *et al.*, 2002). Natürliche Kompetenz ist bei Gonokokken sehr ausführlich, bei Meningokokken jedoch nur sehr wenig untersucht worden. Meines Wissens nach ist nicht bekannt, an welche physiologischen Bedingungen Kompetenz bei Meningokokken gekoppelt ist. Es wird lediglich spekuliert, dass die Kompetenz durch Nährstoffe wie etwa Fructose beeinflussbar ist (Sun *et al.*, 2005). Autolyse bei Meningokokken, die nur sehr schlecht untersucht ist, erfolgt verstärkt unter Bedingungen der stationären Phase (Bos *et al.*, 2005). Inwiefern ein Zusammenhang zwischen Autolyse und Kompetenz bei Meningokokken besteht, ist vollkommen unklar. Autolyse von Bakterien ist sehr leicht zu erkennen. Lässt man eine planktonisch gewachsene Bakterien-Kultur bei Zimmertemperatur über mehrere Tage stehen, so sedimentieren die Bakterien am Boden. Versucht man nun das Pellet durch Schütteln der Kultur wieder zu resuspendieren, löst sich das Pellet eines autolytischen Stammes sehr schlecht auf, während das Pellet eines nicht autolysierenden Stammes leicht aufzulösen ist. Nach diesem einfachen Test war der Stamm MC58*siaD*- autolytisch und der Stamm 2120*siaD*- nicht autolytisch. Es gibt wahrscheinlich mehrere verschiedene Autolysine bei Meningokokken, wie etwa die outer membrane phospholipase A [(*pldA*-Gen) (Bos *et al.*, 2005)], die membrane-bound lytic transglycosylase [(*mtlA*-Gen, GNA33) (Jennings *et al.*, 2002)] oder die lytische Transglykosylase [(*ltgA*-Gen) (Bos *et al.*, 2005)]. Diesen drei Autolysinen ist gemeinsam, dass ihre Wirkung am augenscheinlichsten ist, wenn die Bakterien die stationäre Wachstumsphase erreicht haben. Für Zellen in Biofilmen wird ebenfalls angenommen, dass sich ein Großteil der Population aufgrund von Nährstoff- bzw. Sauerstoffmangel in der stationären Wachstumsphase befindet (Übersicht in: Fux *et al.*, 2005). Vorläufige Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass der über mehrere Tage in Biofilm vitale Stamm 2120*siaD*- eine nicht funktionelle Kopie des *pldA*-

Gens besitzt, während der im Biofilm schnell sterbende Stamm MC58*siaD*- eine funktionelle Kopie des *pldA*-Gens besitzt. Für das *mtlA*-Gen konnte seine weite Verbreitung bei 31 Stämmen wichtiger Serogruppen (A, B, C, Y, W-135) und Sequenztypen (ET-5, ET-37) gezeigt werden (Pizza *et al.*, 2000). Außerdem führte die Expression von GNA33 in *E. coli* zu verstärkter Autolyse (Jennings *et al.*, 2002). Bos *et al.* (2005) beschrieben das Vorhandensein eines Homologs der lytischen Transglykosylase A (*ltgA*) von *E. coli* im MC58-Genom.

Mikrokolonien werden als die Grundeinheit des Biofilms betrachtet (Übersicht in: Costerton *et al.*, 1995) und entstehen zumeist durch klonales Wachstum, was sehr ausführlich bei dem Modellorganismus *Pseudomonas aeruginosa* untersucht wurde (Klausen *et al.*, 2003; Sauer *et al.*, 2002; Tolker-Nielsen *et al.*, 2000). Es stellte sich die Frage, ob Mikrokolonien von *Neisseria meningitidis* ebenfalls klonalen Ursprungs sind, und ob die breite Masse oder nur eine kleine Sub-Population der inokulierten Bakterien zur Biofilmbildung beiträgt. Dazu wurde die Biofilmbildung der Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*- genauer untersucht, indem die Biofilme je eines Stammes mit der gleichen Menge gelb und blau fluoreszierender Bakterien initiiert wurden. Stamm MC58*siaD*- bildete unverzüglich homogen gemischte Mikrokolonien gelb und blau fluoreszierender Bakterien aus. Somit werden die Biofilme des Stammes MC58*siaD*- aus einer breiten Basis Zellen heraus gebildet. Im Gegensatz dazu waren die Mikrokolonien des Stammes 2120*siaD*- und der homogene Biofilm des Stammes 2594*mynB*- klonalen Ursprungs. Diese Klonalität deutet darauf hin, dass die Biofilme in diesen zwei Stämmen aus einer sehr kleinen Subpopulation hervorgehen. Warum in den Stämmen 2120*siaD*- und 2594*mynB*- nur wenige Zellen zur Biofilmbildung befähigt sind, während anscheinend ein Großteil der Zellen des Stammes MC58*siaD*- Biofilme ausbilden können, ist vollkommen unklar. Meines Wissens nach wird durch die vorliegende Arbeit erstmals gezeigt, dass es fundamentale Unterschiede bezüglich der Klonalität der Mikrokolonien während der Biofilmbildung zwischen Stämmen der derselben Spezies geben kann. Für *Pseudomonas aeruginosa* konnte belegt werden, dass die Art der verwendeten Kohlenstoffquelle darüber entschied, ob die Zell-Population des Biofilms homogen blieb oder sich in Subpopulationen aufspaltete. Wurde Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle verwendet, teilte sich die Bakterienpopulation in eine nicht migrierende Population, die dann die Stiele der „Mushrooms“ bildete, und in eine migrierende Population, die auf die Stiele wanderte und die Kappen der „Mushrooms“ bildete (Klausen *et al.*, 2003b). Wurde hingegen Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle verwendet, gab es nur eine Population

motiler Bakterien, die aufgrund der gesteigerten Motilität flache homogene Biofilme ausbildete (Klausen *et al.*, 2003a). Diese Autoren spekulieren, dass möglicherweise die unterschiedliche Verfügbarkeit von Eisen zur Ausbildung und zum differentiellen Verhalten dieser Subpopulationen beiträgt (persönliche Mitteilung). Für *Pseudomonas aeruginosa* wurde gefunden, dass sowohl sehr niedrige als auch sehr hohe Eisenkonzentrationen die Biofilmbildung durch gesteigerte Motilität inhibierten (Banin *et al.*, 2005; Singh, 2004). Da in unserem Biofilmmodell für Meningokokken ebenfalls mit einem Minimalmedium gearbeitet wird, bietet sich die Möglichkeit, beispielsweise durch das Wählen unterschiedlicher Kohlenstoffquellen oder Eisenkonzentrationen, die für die Ausbildung bzw. Vermeidung von Biofilmen bei Meningokokken relevanten Faktoren zu finden.

Biofilme stellen wahrscheinlich eine stressreiche Umgebung dar (Beloin *et al.*, 2004), die auch durch das Vorhandensein ausgeprägter Gradienten von z.B. Nährstoffen oder Sauerstoff gekennzeichnet ist (Xu *et al.*, 1998). Es wird davon ausgegangen, dass Mutationsraten in Biofilmen wesentlich höher sind als in planktonisch wachsender Kultur (Taddei *et al.*, 1995). Für *Pseudomonas aeruginosa* (Kirisits *et al.*, 2005; Deziel *et al.*, 2001; Boles *et al.*, 2004) und *Streptococcus pneumoniae* (Allegrucci und Sauer, 2007) konnte die Bildung von Kolonievarianten während der Biofilmbildung bzw. während des Biofilmwachstums gezeigt werden. Die phänotypischen Veränderungen dieser Kolonievarianten sind vererblich und stabil, also durch genetische Veränderungen verursacht. In *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen wurden mit hoher Frequenz „mini“- und „wrinkly“-Varianten gefunden. Die „wrinkly“-Varianten waren durch reduzierte Raten an Detachment und erhöhte Raten an Adhärenz und Zellcluster-Bildung charakterisiert. Die „mini“-Varianten hingegen waren durch erhöhte Detachment-Raten gekennzeichnet. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass manche Kolonie-Varianten wie etwa „Small Colony Variants“ (SCV) einen Selektionsvorteil unter Biofilmbedingungen besitzen, indem diese Varianten Biofilm-verwandte Phänotypen zeigen, die sich durch gesteigerte Adhärenz, Autoaggregation und Hydrophobizität, und durch reduzierte *Swimming Motility* und *Swarming Motility* auszeichnen (Kirisits *et al.*, 2005; Deziel *et al.*, 2001; Boles *et al.*, 2004). Die Fähigkeit von Biofilm-Bakterien verschiedene Kolonievarianten mit spezialisierten Funktionen hervorzubringen wird als Überlebensstrategie betrachtet, die eine Toleranz gegenüber einer Vielzahl von Umweltbedingungen sichert (Boles *et al.*, 2004). Für *Neisseria meningitidis* sind bisher über 100 putativ phasenvariable Gene beschrieben worden (Snyder *et al.*, 2001). Zu diesen Genen zählen u.a. Adhäsine wie

das Opa-Protein oder auch Kapsel- und LPS-Synthese-Gene. Es wäre daher nicht unwahrscheinlich oder überraschend, wenn Meningokokken ebenfalls während der Biofilmbildung verschiedenste Varianten erzeugen würden, die dann eine bessere Anpassungsfähigkeit an wechselnde Umweltbedingungen gewährleisten könnten.

#### 6.4. Die Rolle von PilX für die Biofilmarchitektur

Um zu verstehen, welche Faktoren bzw. welche Mechanismen zur Mikrokoloniebildung oder zur Ausbildung flacher homogener Biofilme führen, wurden in unserer Arbeitsgruppe PilX-Mutanten der Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*- erstellt (Dr. rer. nat. Heike Claus), phänotypisch getestet und deren Biofilmbildung studiert. Prinzipiell sind die zwei Mechanismen Motilität und/oder Aggregation für die Mikrokoloniebildung in Betracht zu ziehen. Vor kurzem wurde PilX als Pilus-assoziiertes Protein beschrieben, das Aggregation vermitteln kann, ohne dabei das Adhärenzverhalten zu beeinflussen. Zudem bildeten PilX-Mutanten keine Mikrokolonien auf Epithelzellen mehr aus (Helaine *et al.*, 2005). Da PilX die Mikrokoloniebildung zu beeinflussen schien, bot dieses Protein aus unserer Sicht das perfekte Ziel, die Mikrokoloniebildung bei der Biofilmbildung von *Neisseria meningitidis* zu studieren.

Im Gegensatz zu Helaine *et al.*, die die Funktion von PilX in nur einem Stamm untersuchten, wurde in dieser Arbeit konsequent die Funktion des PilX in den drei Stämmen MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*- untersucht. Die PilX-Mutanten wurden phänotypisch durch den von Helaine *et al.* ebenfalls verwendeten Aggregationstest charakterisiert. Für den Stamm MC58*siaD*- konnte das Ergebnis von Helaine *et al.* bestätigt werden, dass PilX in Suspensionen interbakterielle Aggregation vermittelt. Zu unserer Überraschung war der Stamm 2120*siaD*- nicht autoaggregativ. Somit konnte auch die entsprechende PilX-Mutante keinerlei Aggregationsvermögen verlieren. Es gibt drei mögliche Erklärungen für das Fehlen des Aggregationsvermögens im Stamm 2120*siaD*-: (i) Der Stamm 2120*siaD*- exprimiert kein funktionelles PilX, (ii) Sequenzdiversität von PilX erzeugt Autoaggregation vermittelndes und nicht Autoaggregation vermittelndes PilX, oder (iii) die Expression von PilX variiert zwischen den Stämmen. Mittels RT-PCR konnte jedoch für die Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*- keine Unterschiede in der Transkription des *pilX*-Gens festgestellt werden. Im Flussflussmodell konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Wildtyp des Stammes

2120*siaD*- Mikrokolonien ausbildete, während die PilX-Mutante dieses Stammes homogene flache Biofilme ausbildete. Somit war das PilX des Stammes 2120*siaD*- zumindest für die Mikrokoloniebildung funktionell. Es stellte sich die Frage, ob Autoaggregation und Mikrokoloniebildung bezüglich PilX unterschiedliche Funktionalitäten darstellen. Durch die Komplementation der PilX-Mutante des Stammes MC58*siaD*- mit dem PilX des nicht aggregativen Stammes 2120*siaD*- konnte die Aggregation nicht vollständig wiederhergestellt werden, während durch die Komplementation der PilX-Mutante des Stammes 2120*siaD*- mit dem PilX des aggregativen Stammes MC58*siaD*- die Aggregation gesteigert werden konnte. Somit wäre denkbar, dass verschiedene Allele des PilX zwar in gleichem Maße die Mikrokoloniebildung fördern, aber in unterschiedlichem Maße Aggregation vermitteln. Die Proteinsequenz von PilX unterschiedlichster klonaler Herkunft äußerst variabel ist (Claus *et al.*, unveröffentlicht). Es wurde das *pilX* von etwa 140 Meningokokkenstämmen sequenziert und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen miteinander verglichen. Durchschnittlich waren die PilX-Allele 163 AS lang. Es wurden 41 verschiedene PilX-Allele mit insgesamt 39 segregierenden Positionen (segregating sites) gefunden. Diese hohe Sequenzvariabilität lässt darauf schließen, dass PilX unter Immunselektionsdruck steht, was durch die vermutete Lokalisation des PilX in den Pilusfasern (Helaine *et al.*, 2005) nicht verwunderlich ist. Unveröffentlichte Befunde aus unserem Labor belegen das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern gegen PilX bei Trägern und Erkrankten. Die 39 segregierenden Positionen befanden sich fast ausschließlich in drei variablen Regionen in der postulierten globulären Domäne des PilX. Das PilX des nicht aggregierenden Stammes 2120*siaD*- weist eine acht AS lange Insertion in der dritten variablen Region gegenüber der Sequenz des aggregierenden Stammes MC58*siaD*- auf. Möglicherweise ist der dokumentierte Unterschied in der Aggregation aus den Kreuzkomplementationsexperimenten zwischen den Stämmen MC58*siaD*- und 2120*siaD*- auf diese Sequenzunterschiede zurückzuführen. Mit Hilfe der *Site-directed mutagenesis* könnte diese Hypothese untersucht werden. Es muss aber erwähnt werden, dass die Möglichkeit einer unterschiedlich starken Expression des PilX zwischen den Stämmen MC58*siaD*- und 2120*siaD*- nicht ausgeschlossen werden kann. Um die Expression des PilX nachweisen bzw. quantifizieren zu können, wurden PilX-spezifische Antiseren generiert. Es konnten lediglich durch das PilX<sub>MC58</sub> PilX-spezifische Antikörper induziert werden, die aber leider nicht reaktiv gegen das PilX<sub>2120</sub> waren. Somit konnte bisher nicht

getestet werden, ob das PilX zwischen beiden Stämmen unterschiedlich stark exprimiert wird. Diese Versuche werden derzeit mit geänderten Expressionsprotokollen wiederholt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von PilX für die Mikrokoloniebildung für die drei Stämme MC58*siaD*-, 2120*siaD*- und 2594*mynB*- untersucht. Wie oben erläutert konnte für diese drei Stämme keine Korrelation von Autoaggregation und PilX-Expression gefunden werden. Nichtsdestotrotz führte die Mutation des PilX bei den Stämmen MC58*siaD*- und 2120*siaD*- zum Verlust der Mikrokoloniebildung, während diese Mutation bei dem Stamm 2594*mynB*- zum Verlust der Autoaggregation führte. Wildtyp und Mutante des Stammes 2594*mynB*- bildeten jeweils einen homogenen flachen Biofilm ohne Mikrokolonien aus. Diese Beobachtung wirft die Frage auf: Welcher durch PilX vermittelte Effekt führt zu Mikrokoloniebildung in den Stämmen MC58*siaD*- und 2120*siaD*-, während das ebenfalls funktionelle PilX des Stammes 2594*mynB*- in diesem Stamm zu keiner Mikrokoloniebildung führt?

Für *Pseudomonas aeruginosa* konnte sehr anschaulich belegt werden, dass in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle des Wachstumsmediums die Bakterien entweder flache, homogene Biofilme oder heterogene Mikrokolonie-reiche Biofilme ausbildeten (Klausen *et al.*, 2003a, b). In diesen Arbeiten konnte das Ausmaß an *Twitching Motility* als der bestimmende Faktor für die Entstehung einer bestimmten Biofilmmorphologie identifiziert werden. Pathogene Neisserien sind ebenfalls zur *Twitching Motility* befähigt (Henrichsen, 1975). *Twitching Motility* kommt sehr wahrscheinlich durch das alternierende Vorschieben und Zurückziehen der Typ IV-Pili zustande (Merz *et al.*, 2000). PilT ist als der Motor der *Twitching Motility* beschrieben worden (Wolfgang *et al.*, 1998). PilT-Mutanten sind hyperpiliert und unbeweglich (Wolfgang *et al.*, 1998), während PilE-Mutanten unpiliert und unbeweglich sind (Merz *et al.*, 1999). Somit sind durch PilX verschiedene Einwirkungsmöglichkeiten auf Faktoren des sehr komplexen Typ IV-Pilus-Systems denkbar, die letztendlich die Motilität der Bakterien beeinflussen. Während der Untersuchungen zum Effekt des PilX auf die Mikrokoloniebildung wurde deutlich, dass alle motilen Stämme Mikrokolonien ausbildeten, während die nicht-motilen Stämme homogene flache Biofilme ausbildeten. Dieses Phänomen wurde durch Zeitraffer-Filme und Mischfarben-Experimente eines jeweiligen Stammes zur Dokumentation der *Twitching Motility* bewiesen. Diese Beobachtung steht absolut im Einklang mit Beobachtungen bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Vibrio cholerae*, wo *Twitching* bzw. *Swarming Motility* (Klausen *et al.*, 2003b; Watnick und Kolter, 1999) zur

Mikrokoloniebildung führt. Bei pathogenen Neisserien ist die *Twitching Motility* an der Ausbildung bzw. an der anschließenden Auflösung von Mikrokolonien auf Epithelzellen beteiligt (Merz *et al.*, 1999). Es stellte sich nun die Frage, welchen Effekt PilX auslöst, um die *Twitching Motility* zu beeinflussen. Helaine *et al.* postulierten für PilX eine intrinsische aggregative Funktion ohne dabei Einfluss auf die adhäsiven Eigenschaften der Meningokokken zu nehmen. Sie zeigten zwar eine Reduktion der Piliierung um den Faktor 1,5, basierend auf einem ELISA-Test, wenn man den Wildtyp mit der PilX-Mutante vergleicht. Jedoch wurde diesem Unterschied in der Piliierung keine Bedeutung beigemessen. Zudem konnte für die PilX-Mutation kein Effekt auf die *Twitching Motility* gefunden werden. Es muss zudem erwähnt werden, dass Helaine und Mitarbeiter mit bekapselten Meningokokken eines anderen Genotyps arbeiteten, während sich die vorliegende Arbeit mit unbekapselten Meningokokken befasst. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch eine Reduktion der pilierten Bakterien um den Faktor 5 bis 15 durch die PilX-Mutation beobachtet werden. Diese Ergebnisse wurden mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie erzielt. Die drastische Reduktion der Piliierung kann nun auch die drastisch reduzierte Motilität der PilX-Mutanten erklären. Möglicherweise fällt die Wirkung von PilX in der vorliegenden Arbeit wesentlich drastischer aus als bei Helaine *et al.* da ich die *Twitching Motility* von Zellen gemessen habe, die sich schon in intemem Kontakt miteinander befanden, während Helaine *et al.* die Motilität einzeln liegender Zellen auf Glas betrachteten. *Twitching Motility* kann aber auch als soziale Handlung von Bakterien untereinander betrachtet werden, die multiple Zell-Zell-Kontakte beinhaltet bzw. ermöglicht (Mattick, 2002). Somit erlaubt der von uns gewählte experimentelle Ansatz durch die Ausbildung einer Vielzahl von Pilus-Pilus- und Pilus-Zell-Kontakten eine gesteigerte *Twitching Motility*. Eine Reduktion der *Twitching Motility* durch eine verringerte Piliierung kann nun leichter wahrgenommen werden. Zur Unterstützung der These, dass dem Verlust der Mikrokoloniebildung durch PilX-Mutation eine verringerte Piliierung zu Grunde liegt, die zu verringerter *Twitching Motility* führt, wurden Pile-Mutanten auf ihre Mikrokoloniebildung hin untersucht. Erwartungsgemäß bildeten die nicht-pilierten, nicht-motilen Pile-Mutanten flache, homogene Biofilme ohne Mikrokolonien aus. Die Biofilme der PilX- und Pile-Mutanten waren phänotypisch nicht zu unterscheiden. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass zumindest im Meningokokkenbiofilmmodell der Verlust der Mikrokoloniebildung nach PilX-Mutation durch eine reduzierte Piliierung und nachfolgend durch reduzierte *Twitching Motility*

verursacht war. Ob nun allein die *Twitching Motility* für die Mikrokoloniebildung verantwortlich ist, oder doch noch andere Komponenten wie etwa Aggregation oder Adhäsion eine Rolle spielen, ließe sich nur durch die Zergliederung von Motilität einerseits und Aggregation/Adhäsion andererseits erreichen. Leider sind die unbeweglichen PilT-Mutanten hyperpiliiert (Wolfgang *et al.*, 1998), was die Aggregation und Adhäsion erhöht. Somit ist die isolierte Betrachtung des Einflusses der Motilität der Meningokokken auf die Mikrokoloniebildung unmöglich. Dass jedoch der nicht aggregative Stamm 2120*siaD*-Mikrokolonien ausbildete, während der aggregative Stamm 2594*mynB*- keine Mikrokolonien ausbildete, spricht für die Rolle der Motilität und gegen die Rolle der Aggregation bei der Mikrokoloniebildung. Unklar ist noch, warum das PilX des Stammes 2594*mynB*- im eigenen Stamm keine Mikrokoloniebildung und *Twitching Motility* zulässt, während es *in trans* in den Stamm MC58*siaD*-/*pilX*- komplementiert die Motilität und Mikrokoloniebildung unterstützt. Die Antwort ist sehr wahrscheinlich in der Interaktion des PilX mit anderen Pilus-Proteinen bzw. Pilus-assoziierten Proteinen zu suchen. Möglicherweise ist die PilT-getriggerte Pilus-Retraktion im Stamm 2594*mynB*- gestört. Es ist weiterhin bekannt, dass unterschiedliche PilE-Varianten in isogenen Stämmen die Aggregation und Adhäsion beeinflussen (Penn *et al.*, 1980; Marceau *et al.*, 1995). Das gleiche Phänomen kann für die Substitution einzelner AS im PilE von Gonokokken beobachtet werden (Park *et al.*, 2001). Vorläufige Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Komplementation *in trans* der PilE-Mutante des Stammes 2594*mynB*- mit dem PilE<sub>MC58</sub> zur Ausbildung distinkter Mikrokolonien führt. Es wurde jedoch bisher weder die Motilität der Komplementante untersucht, noch das PilE<sub>2594</sub> in die PilE-Mutante des Stammes MC58*siaD*- eingebracht. Diese Untersuchungen könnten ersten Aufschluss über das Zusammenwirken von PilX mit PilE geben.

## **6.5. Die Suszeptibilität von Meningokokkenbiofilmen gegenüber Penicillin, Ciprofloxacin und Rifampicin**

Penicillin kann Meningokokken nicht absolut zuverlässig aus dem menschlichen Nasopharynx eradizieren (Abramson und Spika, 1985), obwohl die sehr hohe Wirksamkeit von Penicillin bei der Behandlung invasiver Meningokokkenerkrankungen belegt ist. Ciprofloxacin (Cuevas *et al.*, 1995) und Rifampicin (Schwartz *et al.*, 1988) sind hingegen hervorragend geeignet, um enge Kontaktpersonen von Patienten mit invasiven

Meningokokkenerkrankungen prophylaktisch zu behandeln. Es gibt mehrere denkbare Erklärungen für dieses Phänomen. Würden Meningokokken intrazellulär persistieren, wären diese nicht zugänglich für Penicillin, da Penicillin intakte Zellmembranen nicht überwinden kann (Sim *et al.*, 2000). Eine Alternative zur postulierten aber bisher unbewiesenen intrazellulären Persistenz bietet das Vorhandensein von Mikrokolonien in den Tonsillen-Krypten, wie unlängst immunhistochemisch demonstriert wurde (Sim *et al.*, 2000). Möglicherweise lassen diese Mikrokolonien einen Phänotyp entstehen, der resistent bzw. tolerant gegen Penicillin ist. Um dieser Fragestellung effektiv nachgehen zu können, habe ich die Suszeptibilität von Meningokokken gegenüber Penicillin, Ciprofloxacin und Rifampicin im statischen Biofilmmodell als auch im Flussmodell untersucht. Ciprofloxacin und Rifampicin konnten in zehnfacher MHK innerhalb von 24 Stunden Meningokokkenbiofilme vollständig abtöten, während in Penicillin-behandelten Biofilmen etwa ein Tausendstel der Bakterien überlebten. Die reduzierte Suszeptibilität gegenüber Penicillin kann nicht durch genetische Mutationen hervorgerufen sein, da diesen Mutationen stets der Erwerb von Resistenzplasmiden oder von horizontal transferierter DNA resistenter Meningokokken oder verwandter Spezies zu Grunde liegt (Spratt *et al.*, 1992; Backman *et al.*, 2000), und da aus Biofilmen herausgelöste Meningokokken vollständig sensibel gegenüber Penicillin waren. Als mögliche Mechanismen für die reduzierte Suszeptibilität gegenüber Penicillin wären hingegen eine verminderte Penetration des Antibiotikums in den Biofilm, die Entstehung metabolisch inaktiver Subpopulationen durch Sauerstoff- und Nährstoffgradienten, die adaptive Stressantwort einiger Zellen oder aber auch die Beteiligung von Quorum sensing-Phänomenen in Betracht zu ziehen (Zusammenfassung in: Drenkard, 2003). Zur Zusammensetzung und zum Ausmaß extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) in Meningokokkenbiofilmen ist noch nichts bekannt. Möglicherweise ist extrazelluläre DNA ein Bestandteil der EPS, da DNase I die Biofilmbildung von Meningokokken beeinträchtigt (Lappann *et al.*, unveröffentlicht). Zur Interaktion extrazellulärer DNA mit verschiedenen Antibiotikaklassen ist nichts bekannt. Es kann also nur spekuliert werden, ob die EPS der Meningokokken als Barriere gegen Antibiotika dienen können. Diffusionsmessungen in Biofilmmatrices mit gelösten Stoffen mit einem Molekulargewicht zwischen 100 und 1000 haben gezeigt, dass die Matrix den Diffusionskoeffizienten für Stoffe der Größe aller gebräuchlichen Antibiotikaklassen maximal auf 40% erniedrigt (Stewart *et al.*, 1998). Somit müssten Antibiotika, von ihrem Molekulargewicht aus betrachtet, prinzipiell problemlos in

die Biofilmmatrix diffundieren können. Die Möglichkeit, dass Matrixkomponenten mit den Antibiotika interagieren könnten und somit die Diffusion in den Biofilm herabgesetzt würde, ist in der Veröffentlichung von Stewart *et al.* nicht Gegenstand der Untersuchungen gewesen, obwohl diese Wechselwirkung tatsächlich Wichtigkeit besitzen kann. Beispielsweise konnten Ciprofloxacin und Ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*-Biofilme frei diffundieren (Anderl *et al.*, 2000), während etwa das positiv geladene Aminoglykosid Tobramycin durch die Bindung an die negativ geladene Matrixkomponente Alginat an der Diffusion in *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilme gehindert wird (Nichols *et al.*, 1988). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*-Biofilmen (Darouiche *et al.*, 1994) und Tetracyclin in *E. coli*-Biofilmen (Stone *et al.*, 2002) die MHK und MIK erreichen können. Schon länger wird vermutet, dass Unterschiede in der Verfügbarkeit von Sauerstoff und Nährstoffen zu metabolischer Heterogenität der Bakterien in verschiedenen Kleinräumen eines Biofilms führt. Darüber hinaus wird vermutet, dass langsam oder nicht wachsende Bakterien maßgeblich zur Verringerung der Suszeptibilität von Zellen in Biofilmen gegenüber antimikrobiellen Substanzen beitragen (Lewis, 2001). Mit Hilfe von Reporter genen, die mit Fluoreszenzproteinen fusioniert wurden, um die metabolische Aktivität der Zellen zu zeigen, konnte die Anwesenheit und Verteilung langsam wachsender oder nicht wachsender Bakterien im Biofilm bestätigt werden (Sternberg *et al.*, 1999). Tanaka *et al.* (1999) konnten zeigen, dass die bakterizide Wirkung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gegen *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilme deutlich durch geringe Wachstumsraten beeinträchtigt war. Dieser Befund ist wenig überraschend, da schon sehr lange bekannt ist, dass Penicillin ausschließlich sich teilende Zellen tötet (Lee *et al.*, 1944). Es konnte aber auch dargestellt werden, dass die bakterizide Wirkung der Fluorochinolone unabhängig von den Wachstumsraten der Biofilmzellen war (Tanaka *et al.*, 1999). Die Meningokokkenbiofilme wurden sehr effektiv durch das Fluorochinolon Ciprofloxacin und durch das Ansamycin-Antibiotikum Rifampicin getötet, während Penicillin das Überleben einer Subpopulation von Meningokokken erlaubte. Das Muster des Absterbens der Zellen unter Penicillin-Behandlung zeigte einen klaren Oberfläche-Substratum-Gradienten mit den meisten toten Zellen an der Oberfläche des Biofilms. Dieses Muster der Antibiotika-Suszeptibilität wird häufig in Biofilmen beobachtet (Übersicht in: Stewart, 2002). Für die verringerte Suszeptibilität der Bakterien in der Tiefe des Biofilms wird neben dem Nährstoffmangel auch die Akkumulation von Abfallstoffen und Signalmolekülen durch sehr hohe Zelldichten als wichtig erachtet (Spoering *et al.*, 2001; Fux

*et al.*, 2004). Planktonische Zellen und Biofilmzellen unter Nährstoffmangel können durch Zugabe frischen Mediums sehr schnell die antibiotische Suszeptibilität wiedererlangen (Anderl *et al.*, 2003). Diese Beobachtung konnte ebenfalls für Meningokokken des Biofilms gemacht werden, die durch die Herauslösung aus dem Biofilm und die Passagierung in frisches Medium wieder vollständig durch Penicillin zu töten waren. Es ist also sehr gut denkbar, dass das Penicillin die Zellen der oberen bzw. äußeren Schichten des Biofilms tötete, da diese sich aufgrund ausreichender Nährstoff- und Sauerstoffversorgung teilten, während die Zellen der tieferen bzw. inneren Schichten des Biofilms durch Penicillin unbeeinträchtigt blieben, da sich diese, mutmaßlich durch Nährstoff- und Sauerstoffmangel bedingt, nicht teilten. Kürzlich wurde die Toleranz von *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen gegenüber dem kationischen zyklischen Decapeptid Colistin und Natriumdodecylphosphat (SDS) untersucht (Haagensen *et al.*, 2007). Es wurde wie in der Arbeit von Klausen *et al.* (2003) Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle verwendet, so dass sich die Bakterien in eine motile (Pilzkappen) und eine nicht motile Subpopulation (Pilzstiele) aufspalteten. Interessanterweise war die motile Subpopulation wesentlich toleranter gegenüber beiden Substanzen als die nicht motile Subpopulation, obwohl beide Subpopulationen genetisch identisch sind. Ob ein direkter Zusammenhang zwischen gesteigerter Motilität und gesteigerter Toleranz besteht ist unklar. Möglicherweise spielt eine induzierte LPS-Modifikation, die eigentlich der Anheftung dient, eine Rolle für die erhöhte Toleranz. Grundsätzlich müssten Meningokokken durch die Vielzahl phasenvariabler Gene in der Lage sein Varianten hervorzubringen, die sich phänotypisch im Biofilm unterscheiden. Mischfarbenexperimente für den Stamm MC58*siaD* ließen bisher aber den Schluss zu, dass es sich zumindest in jungen Biofilmen phänotypisch um nur eine distinkte Population von Zellen handelt. Somit ist nach jetzigem Wissensstand die teilweise Toleranz von Meningokokken im Biofilm nicht damit zu erklären, dass sich die Meningokokken im Biofilm in Subpopulationen aufspalteten, die dann wiederum unterschiedliche Muster der antibiotischen Toleranz besaßen. Wenn Meningokokken im Biofilm Penicillin tolerante Phasen-Varianten entwickeln würden, so würde man aufgrund der genetischen Stabilität auch eine Penicillin-Toleranz von Meningokokken erwarten, die aus dem Biofilm herausgelöst wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden aber planktonische, aus dem Biofilm herausgelöste Zellen stets vollständig getötet.

Quorum sensing (QS) wird ebenfalls als ein Faktor angenommen, der zur Resistenz von Biofilmen gegen antimikrobielle Substanzen beiträgt. Gramnegative Bakterien nutzen N-

Acyl-Homoserin-Lakton-Moleküle, die auch *Autoinducer* (AI) genannt werden, zur Kommunikation, zur Messung der Bakterien-Zelldichte und schlussendlich zur Koordination der Transkription von Zielgenen. Welche genaue Rolle QS bei der Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen spielt ist noch vollkommen unklar. Für *Pseudomonas aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass QS wichtig für die Toleranz der Zellen im Biofilm gegen Wasserstoffperoxid, Polymorphnukleäre Leukozyten (PMN) und Tobramycin war (Bjarnsholt *et al.*, 2005). Zudem war die Virulenz von *Pseudomonas aeruginosa* durch die Inhibition des QS attenuiert (Hentzer *et al.*, 2003). Zur Rolle von QS bei Meningokokken ist nur sehr wenig bekannt. Meningokokken produzieren AI-2 in der mittleren bis späten Log-Phase, und Mutanten des AI-2-Synthesegens (*luxS*) zeigten sich im Infektionsmodell mit neugeborenen Ratten weniger virulent (Winzer *et al.*, 2002b). Andererseits fehlt Meningokokken die Sensorikine (*luxS*), die essentiell zur Wahrnehmung von AI-2 ist. Meningokokken zeigen auch keinerlei konzertierte transkriptionelle Antwort auf die Produktion von AI-2 (Dove *et al.*, 2003). Möglicherweise spielt QS aber gerade für Meningokokken im Biofilm eine Rolle, da hier durch die sehr dichte Packung der Zellen lokal sehr hohe Konzentrationen von AI-2 aber auch von anderen Metaboliten auftreten könnten. Möglicherweise könnten QS-Signale im Meningokokkenbiofilm einen Penicillin-toleranteren Phänotyp induzieren, der durch das Auflösen des Biofilms und Überbringen der Zellen in planktonische Kultur, die verglichen mit dem Biofilm viel geringere Zelldichten aufweist, wieder verschwinden würde. Dieses Szenario passt ebenso zu den experimentellen Beobachtungen.

## **6.6. Die Rolle extrazellulärer DNA für die Biofilmbildung von Meningokokken**

Verschiedenste Spezies wie die grampositiven Bakterien *Streptococcus mutans* (Petersen *et al.*, 2005), *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* (Catlin und Cunningham, 1958) oder die gramnegativen Spezies *Pseudomonas aeruginosa* (Whitchurch *et al.*, 2002), *Neisseria meningitidis* (Catlin, 1960) und *Neisseria gonorrhoeae* (Hamilton *et al.*, 2005) produzieren extrazelluläre DNA (exDNA), d.h. sie setzen DNA durch weitgehend unbekannte Mechanismen in das sie umgebende Medium frei. 2002 konnte für *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt werden, dass extrazelluläre DNA zur Biofilmbildung benötigt wird (Whitchurch *et al.*, 2002). Durch Zugabe von DNase I während der initialen Anheftung der Zellen an das

Substratum konnte die Biofilmbildung im Flussmodell komplett verhindert werden. Wurde die DNase I reifen (späten) Biofilmen appliziert, konnten die Biofilme nicht aufgelöst werden. Diesen Befunden zufolge spielt die exDNA eine maßgebliche Rolle für die initiale Anheftung der Zellen an das Substratum, während sie ihre Rolle als strukturelle Komponente in späten Biofilmen zu verlieren scheint. Für *Neisseria meningitidis*-Biofilme konnten in dieser Arbeit sehr ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Im Flussmodell verhinderte die Zugabe von DNase während der initialen Anheftung die Biofilmbildung. Ein sechs Stunden alter Biofilm ließ durch Zugabe von DNase fast komplett wieder auflösen, während ein 24 Stunden alter Biofilm von der DNase unbeeinträchtigt blieb. Somit spielt sehr wahrscheinlich exDNA für die initiale Anheftung der Meningokokken an das Substratum eine wichtige Rolle. Ob exDNA auch für spätere Stadien der Biofilmbildung wichtig ist, lässt sich mit diesem experimentellen Ansatz nicht klären, da man nicht sicher sagen kann, ob die exDNA in späteren Biofilmen wirklich durch DNase degradiert wird. Möglicherweise spielt die exDNA als strukturelle Komponente in späten Biofilmen eine Rolle, ist aber durch die Bindung an Proteine vor Degradation durch DNase geschützt (Tavares und Sellstedt, 2001). Erst kürzlich wurde äußerst detailliert die Verteilung von exDNA in *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen im Flussmodell dargestellt (Allesen-Holm *et al.*, 2006). Es zeigte sich, dass die unbewegliche Subpopulation der Zellen im Pilzstiel von einem Netz aus exDNA überzogen war. Es wurde spekuliert, dass diese DNA der beweglichen Subpopulation als Bindematrix für ihre Typ IV-Pili dient, um mittels *Twitching Motility* auf die Pilzstiele klettern zu können. Diese Theorie wird durch die Beobachtung gestützt, dass unbewegliche Pseudomonaden ebenso wie nicht exDNA-produzierende Pseudomonaden keine Pilzköpfe bilden können. Für *Pseudomonas aeruginosa* wurde die DNA-Bindfähigkeit von Typ IV-Pili gezeigt (van Schaik *et al.*, 2005). Für Meningokokken ist ebenfalls davon auszugehen, dass deren Pili DNA binden, da intakte Pili zur Erhaltung der natürlichen Kompetenz unerlässlich sind (Wolfgang *et al.*, 1998). Vorläufige Ergebnisse mit Pile-, PilX-, und PilC-Mutanten zeigen aber, dass die Biofilmbildung dieser Stämme hinsichtlich der Biomasse nicht beeinträchtigt ist, diese Stämme aber verglichen mit dem Wildtyp eine ebenso ausgeprägte DNase-Sensitivität zeigen. Somit wäre zumindest während der initialen Anheftung eine DNA-vermittelte Bindung der Pili an das Substratum unwesentlich für die Biofilmbildung. Arbeiten zur Bindung von exDNA an die Oberfläche von *Frankia*-Zellen legen nahe, dass diese Bindung unspezifisch durch Adsorption erfolgt, weil die gebundene DNA sehr leicht mit Triton X-100 abzulösen

war (Tavares und Sellstedt, 2001). Die DNase-sensitiven Stämme MC58*siaD*- und 2594*mynB*- besitzen beide eine funktionelle Kopie des *pldA*-Gens, das das Autolysin Outer membrane phospholipase A [(OMPLA) (Bos *et al.*, 2005)] kodiert, während der nicht DNase-sensitive Stamm 2120*siaD*- keine funktionelle Kopie dieses Gens besitzt. Unter der Annahme, dass DNase-sensitive, autolytische Stämme mehr DNA in das Medium freisetzen als DNase-tolerante, nicht autolytische Stämme, habe ich in präliminären Experimenten die DNA-Freisetzung dieser drei Stämme in planktonischer Kultur bestimmt. Der DNase-tolerante Stamm 2120*siaD*- setzte die meiste DNA frei, während die DNase-sensitiven Stämme MC58*siaD*- und 2594*mynB*- wesentlich weniger DNA produzierten. Aus den Befunden, dass die DNase-sensitiven, autolytischen Stämme weniger DNA in das Medium freisetzen als der DNase-tolerante, nicht autolytische Stamm, ergibt sich vordergründig ein Widerspruch. In der Fortführung dieses Projektes im Rahmen des Würzburger SFB 479 wird deshalb untersucht, (i) welche Rolle die Autolyse (speziell vermittelt durch OMPLA) für die Biofilmbildung unter Flussbedingungen spielt, (ii) wie viel DNA OMPLA-positive oder -negative Stämme in das Medium freisetzen und an ihre Zelloberflächen binden können, und (iii) zu welchem Zeitpunkt und wie viel exDNA zur Biofilmbildung benötigt wird. Durch Allesen-Holm *et al.* (2006) wurde ebenfalls die DNA-Freisetzung in das Medium untersucht. In dieser Arbeit wurde spekuliert, dass es bei *Pseudomonas aeruginosa* ein konstitutiv aktives Programm zur Freisetzung kleinster Mengen DNA gibt, die für die initiale Anheftung benötigt wird. Diese Freisetzung erfolgt durch Autolyse. In der mittleren bis späten Log-Phase wird dann ein weiteres Autolyse-Programm aktiv, das QS-abhängig ist und größere Mengen DNA freisetzt. Gonokokken können über ein Typ IV-Sekretionssystem (T4SS), dessen Gene Teil der Gonococcal Genetic Island (GGI) sind, DNA ausschleusen ohne dabei Zellen lysieren zu müssen (Hamilton *et al.*, 2005). Mittels Microarray-Analysen konnte unlängst gezeigt werden, dass einzelne Meningokokkenstämme die GGI besitzen (Snyder *et al.*, 2005) und damit prinzipiell DNA ausschleusen könnten. Eine Rolle der GGI-kodierter oder möglicherweise anderer T4SS bei der Biofilmbildung einzelner Meningokokkenstämme kann daher nicht ausgeschlossen werden. Schließlich ist auch zu bedenken, dass exDNA in gemischten Biofilmen bei Individuen, die mit mehreren Neisserien-Stämmen kolonisiert sind, durch horizontalen Gentransfer zu der für die Biologie der Meningokokken so wichtigen genetischen Variabilität beitragen könnte.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abramson JS, Spika JS. 1985.** Persistence of *Neisseria meningitidis* in the upper respiratory tract after intravenous antibiotic therapy for systemic meningococcal disease. *J Infect Dis.* **151(2)**: 370-1
- Allegrucci M, Sauer K. 2007.** Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Streptococcus pneumoniae* Biofilms. *J Bacteriol.* **189(5)**: 2030-8
- Allegrucci M, Hu FZ, Shen K, Hayes J, Ehrlich GD, Post JC, Sauer K. 2006.** Phenotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development. *J Bacteriol.* **188(7)**: 2325-35
- Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T. 2006.** A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol.* **59(4)**: 1114-28
- Allison DG, B Ruiz, C SanJose, A Jaspe, P Gilbert. 1998.** Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**: 179-84
- Anderl JN, MJ Franklin, PS Stewart. 2000.** Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(7)**: 1818-24
- Anderl JN, J Zahller, F Roe, PS Stewart. 2003.** Role of nutrient limitation and stationary phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 1251-6
- Andersen J, Berthelsen L, Bech Jensen B, Lind I. 1998.** Dynamics of the meningococcal carrier state and characteristics of the carrier strains: a longitudinal study within three cohorts of military recruits. *Epidemiol Infect.* **121(1)**: 85-94
- Andersen JB, C Sternberg, LK Poulsen, SP Björn, M Givskov, S Molin. 1998.** Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(6)**: 2247-55
- Andersen JB, A Heydorn, M Hentzer, L Eberl, O Geisenberger, BB Christensen, S Molin, M Givskov. 2001.** gfp-based N-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Appl. Environ. Microbiol.* **67(2)**: 575-85
- Archibald FS, DeVoe IW. 1978.** Iron in *Neisseria meningitidis*: minimum requirements, effects of limitation, and characteristics of uptake. *J Bacteriol.* **136(1)**: 35-48
- Backman A, Orvelid P, Vazquez JA, Skold O, Olcen P. 2000.** Complete sequence of a beta-lactamase-encoding plasmid in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44(1)**: 210-2
- Bagge N, Hentzer M, Andersen JB, Ciofu O, Givskov M, Hoiby N. 2004.** Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(4)**: 1168-74
- Banin E, Vasil ML, Greenberg EP. 2005.** Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102(31)**: 11076-81
- Beloin C, J Valle, JA Haagenen, S Molin, JM Ghigo 2004.** Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* **51**: 659-74
- Beveridge TJ, Makin SA, Kadurugamuwa JL, Li Z. 1997.** Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol Rev.* **20(3-4)**: 291-303
- Bjarnsholt T, Jensen PO, Burmolle M, Hentzer M, Haagenen JA, Hougen HP, Calum H, Madsen KG, Moser C, Molin S, Hoiby N, Givskov M. 2005.** *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology.* **151(Pt 2)**: 373-83

- Bjedov I, Tenailon O, Gerard B, Souza V, Denamur E, Radman M, Taddei F, Matic I. 2003.** Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science*. **300(5624)**: 1404-9
- Boaretti M, MM Leo, B Bonato, C Signoretto, P Canepari. 2003.** Involvement of *rpoS* in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. *Environ. Microbiol.* **5**: 986-96
- Boddicker JD, Anderson RA, Jagnow J, Clegg S. 2006.** Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. *Infect Immun.* **74(8)**: 4590-7
- Boles BR, Thoendel M, Singh PK. 2004.** Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101(47)**: 16630-5
- Borriello G, E Werner, F Roe, AM Kim, D Ehrlich, PS Stewart. 2004.** Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 2659-64
- Bos MP, Tefsen B, Voet P, Weynants V, van Putten JP, Tommassen J. 2005.** Function of neisserial outer membrane phospholipase a in autolysis and assessment of its vaccine potential. *Infect Immun.* **73(4)**: 2222-31
- Boucher RC. 2004.** New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J.* **23(1)**: 146-58
- Boyd A, AM Chakrabarty. 1994.** Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2355-2359
- Branda SS, JE Gonzales-Pastor, S Ben-Yehuda, R Losick, R Kolter. 2001.** Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *PNAS* **98(20)**: 11621-6
- Branda SS, S Vik, L Friedman, R Kolter. 2005.** Biofilms: The matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13(1)**: 20-6
- Brook I. 2003.** Effects of antimicrobial therapy on the microbial flora of the adenoids. *J Antimicrob Chemother.* **51(6)**: 1331-7
- Carbounelle E, S Helaine, L Prouvensier, JL Beretti, X Nassif, V Pelicic. 2005.** PilX, a pilus-associated protein essential for bacterial aggregation, is a key to pilus-facilitated attachment of *Neisseria meningitidis* to human cells. *Mol Microbiol.* **55(1)**: 65-77
- Cartwright KA, Stuart JM, Jones DM, Noah ND. 1987.** The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect.* **99(3)**: 591-601
- Catlin BW, Cunningham LS. 1958.** Studies of extracellular and intracellular bacterial deoxyribonucleic acids. *J Gen Microbiol.* **19(3)**: 522-39
- Catlin BW. 1960.** Interspecific transformation of *Neisseria* by culture slime containing deoxyribonucleate. *Science.* **131**: 608-10
- Catlin BW. 1973.** Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirements for gonococcal typing. *J Infect Dis.* **128(2)**: 178-94
- Caugant DA, Mocca LF, Frasch CE, Froholm LO, Zollinger WD, Selander RK. 1987.** Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J Bacteriol.* **169(6)**: 2781-92
- Caugant DA, Kristiansen BE, Froholm LO, Bovre K, Selander RK. 1988.** Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infect Immun.* **56(8)**: 2060-8
- Caugant DA, Tzanakaki G, Kriz P. 2007.** Lessons from meningococcal carriage studies. *FEMS Microbiol Rev.* **31(1)**: 52-63
- Chalfie M, Y Tu, G Euskirchen, WW Ward, DC Prasher. 1994.** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* **263**: 802-5
- 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. *J Clin Microbiol.* **22(6)**: 996-1006
- Christensen BB, C Sternberg, JB Andersen, RJ Palmer, AT Nielsen, M Givskov, S Molin. 1999.** Molecular tools for study of biofilm physiology. *Methods Enzymol.* **310**: 20-42
- Christensen BB, JA Haagensen, A Heydorn, S Molin. 2002.** Metabolic commensalisms and competition in a two-species microbial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(5)**: 2495-502
- Cirz RT, Chin JK, Andes DR, de Crecy-Lagard V, Craig WA, Romesberg FE. 2005.** Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol.* **3(6)**: e176
- Christodoulides M, Everson JS, Liu BL, Lambden PR, Watt PJ, Thomas EJ, Heckels JE. 2000.** Interaction of primary human endometrial cells with *Neisseria gonorrhoeae* expressing green fluorescent protein. *Mol Microbiol.* **35(1)**: 32-43
- Claus H, Maiden MC, Maag R, Frosch M, Vogel U. 2002.** Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology.* **148(Pt 6)**: 1813-9
- Claus H, Maiden MC, Wilson DJ, McCarthy ND, Jolley KA, Urwin R, Hessler F, Frosch M, Vogel U. 2005.** Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis.* **191(8)**: 1263-71
- Costerton, JW, GG Geesey, GK Cheng. 1978.** How bacteria stick. *Sci. Am.* **238**: 86-95
- Costerton JW, KJ Cheng, GG Geesey, TI Ladd, JC Nickel, M Dasgupta; TJ Marrie. 1987.** Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 435-464
- Costerton JW and HM Lappin-Scott. 1995.** Introduction to microbial biofilms, p. 1-11. *In* H.M. Lappin-Scott and J.W. Costerton (ed.), *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom
- Costerton JW, Z Lewandowski, DE Caldwell, DR Korber, D de Beer, G James. 1994.** Biofilms the customized microniche. *J. Bacteriol.* **176**: 2137-42
- Costerton JW, Z Lewandowski, DE Caldwell, DR Korber, HM Lappin-Scott. 1995.** Mimicrobial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711-45
- Costerton JW, PS Stewart, EP Greenberg. 1999.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* **284**: 1318-22
- Courcelle J, Khodursky A, Peter B, Brown PO, Hanawalt PC. 2001.** Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics.* **158(1)**: 41-64
- Craig L, ME Pique, JA Tainer. 2004.** Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* **2(5)**: 363-78
- Cramton SE, Ulrich M, Gotz F, Doring G. 2001.** Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* **69(6)**: 4079-85
- Cuevas LE, Kazembe P, Mughogho GK, Tillotson GS, Hart CA. 1995.** Eradication of nasopharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in children and adults in rural Africa: a comparison of ciprofloxacin and rifampicin. *J Infect Dis.* **171(3)**: 728-31
- Danese PN, LA Pratt, SL Dove, R Kolter. 2000.** The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* **37**: 424-432
- Danese PN, Pratt LA, Kolter R. 2000.** Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol.* **182(12)**: 3593-6
- Darby C, JW Hsu, N Ghori, S Falkow. 2002.** *Caenorhabditis elegans*: plaque bacteria biofilm blocks food intake. *Nature.* **417**: 243-4

- Darouiche RO, Dhir A, Miller AJ, Landon GC, Raad II, Musher DM. 1994.** Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *J Infect Dis.* **170(3):** 720-3
- Davenport V, Guthrie T, Findlow J, Borrow R, Williams NA, Heyderman RS. 2003.** Evidence for naturally acquired T cell-mediated mucosal immunity to *Neisseria meningitidis*. *J Immunol.* **171(8):** 4263-70
- Davenport V, Groves E, Hobbs CC, Williams NA, Heyderman RS. 2006.** Regulation of Th-1 T cell-dominated immunity to *Neisseria meningitidis* within the human mucosa. *Cell Microbiol.* **9(4):** 1050-61
- Davey ME, GA O'Toole. 2000.** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64(4):** 847-67
- Davey ME, Duncan MJ. 2006.** Enhanced biofilm formation and loss of capsule synthesis: deletion of a putative glycosyltransferase in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* **188(15):** 5510-23
- Davies DG, AM Chakrabarty, GG Geesey. 1993.** Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59(4):** 1181-6
- Dehio C, Gray-Owen SD, Meyer TF. 1998.** The role of neisserial Opa proteins in interactions with host cells. *Trends Microbiol.* **6(12):** 489-95
- Deighton M, Borland R. 1993.** Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun.* **61(10):** 4473-9
- Delaquis PJ, DE Caldwell, JR Lawrence, AR McCurdy. 1989.** Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from biofilm on glass surfaces in response to nutrient stress. *Microb. Ecol.* **18:** 199-2120
- Deziel E, Comeau Y, Villemur R. 2001.** Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol.* **183(4):** 1195-204
- Dolan-Livengood JM, Miller YK, Martin LE, Urwin R, Stephens DS. 2003.** Genetic basis for nongroupable *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis.* **187(10):** 1616-28
- Donlan RM und JW Costerton. 2002.** Biofilms: Survival Mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15:** 167-193
- Dove JE, Yasukawa K, Tinsley CR, Nassif X. 2003.** Production of the signalling molecule, autoinducer-2, by *Neisseria meningitidis*: lack of evidence for a concerted transcriptional response. *Microbiology.* **149(Pt 7):** 1859-69
- Drake SL und Koomey M. 1995.** The product of the pilQ gene is essential for the biogenesis of type IV pili in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol.* **18(5):** 975-86
- Drenkard E. 2003.** Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* **5(13):** 1213-9.
- Evans LR, Linker A. 1973.** Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **116(2):** 915-24
- Fitzgerald RJ, Keyes PH. 1960.** Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc.* **61:** 9-19
- Flemming HC, RJ Palmer, AA Arrage, HC van der Mei, DC White. 1998.** Cell surface physicochemistry alters biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide mutants. *Biofouling.* **13:** 213-31
- Fletcher M. 1996.** Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies, p. 1-24. *In* Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity. John Wiley and Sons, Inc. , New York, N.Y
- Fowler VG Jr, Li J, Corey GR, Boley J, Marr KA, Gopal AK, Kong LK, Gottlieb G, Donovan CL, Sexton DJ, Ryan T. 1997.** Role of echocardiography in evaluation of

- patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia: experience in 103 patients. *J Am Coll Cardiol.* **30(4)**: 1072-8
- Freitag NE, HS Seifert, M Koomey. 1995.** Characterization of the pilF-pilD pilus-assembly locus of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol.* **16(3)**: 575-86
- Friedman L, R Kolter. 2004.** Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* **51(3)**: 675-90
- Friedman L, R Kolter. 2004.** Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J. Bacteriol.* **176**: 269-275
- Frosch M, Gorgen I, Boulnois GJ, Timmis KN, Bitter-Suermann D. 1985.** NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: Isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of *Escherichia coli* K1 and group B meningococci. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 1194-8
- Frosch M, Muller D, Bousset K, Muller A. 1992.** Conserved outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. *Infect Immun.* **60(3)**: 798-803
- Fux CA, S Wilson, P Stoodley. 2004.** Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. *J. Bacteriol.* **186**: 4486-91
- Fux CA, JW Costerton, PS Stewart, P Stoodley. 2005.** Survival strategies in infectious biofilms. *Trends Microbiol.* **13**: 34-40
- Ghigo JM. 2001.** Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature.* **412**: 442-445
- Gilligan PH. 1991.** Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4(1)**: 35-51
- Gjermansen M, P Ragas, C Sternberg, S Molin, T. Tolker-Nielsen. 2005.** Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ. Microbiol.* **7**: 894-906
- Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. 1969.** Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J Exp Med.* **129(6)**: 1327-48
- Greiner LL, Edwards JL, Shao J, Rabinak C, Entz D, Apicella MA. 2005.** Biofilm Formation by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun.* **73(4)**: 1964-70
- Haagensen JA, Klausen M, Ernst RK, Miller SI, Folkesson A, Tolker-Nielsen T, Molin S. 2007.** Differentiation and distribution of colistin- and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol.* **189(1)**: 28-37
- Hall-Stoodley L, JW Costerton, P Stoodley. 2004.** Bacterial Biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 95-108
- Hall-Stoodley L, P Stoodley. 2005.** Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* **13(1)**: 7-10
- Hamilton HL, Dominguez NM, Schwartz KJ, Hackett KT, Dillard JP. 2005.** *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol.* **55(6)**: 1704-21
- Hammerschmidt S, Muller A, Sillmann H, Muhlenhoff M, Borrow R, Fox A, van Putten J, Zollinger WD, Gerardy-Schahn R, Frosch M. 1996a.** Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (siaD): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol.* **20(6)**: 1211-20
- Hammerschmidt S, Hilse R, van Putten JP, Gerardy-Schahn R, Unkmeir A, Frosch M. 1996b.** Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J.* **15(1)**: 192-8
- Harrison OB, BD Robertson, SN Faust, MA Jepson, RD Goldin, M Levin, RS Heyderman. 2002.** Analysis of pathogen-host cell interactions in purpura fulminans:

- expression of capsule, type IV pili, and PorA by *Neisseria meningitidis* in vivo. Infect. Immun. **70(9)**: 5193-201
- Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F. 1996.** Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol. **20(5)**: 1083-91
- Helaine S, Carbonnelle E, Prouvensier L, Beretti JL, Nassif X, Pelicic V. 2005.** PilX, a pilus-associated protein essential for bacterial aggregation, is a key to pilus-facilitated attachment of *Neisseria meningitidis* to human cells. Mol Microbiol. **55(1)**: 65-77
- Henrichsen J. 1975.** The occurrence of twitching motility among gram-negative bacteria. Acta Pathol Microbiol Scand [B]. **83(3)**: 171-8
- Hentzer M, K Riedel, S Molin, N Hoiby, S Kjelleberg, M Givskov. 2002.** Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. Microbiology **147(Pt 12)**: 3249-62
- Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Hoiby N, Givskov M. 2003.** Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. EMBO J. **22(15)**: 3803-15
- Heydorn A, Ersboll BK, Hentzer M, Parsek MR, Givskov M, Molin S. 2000.** Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. Microbiology. **146 ( Pt 10)**: 2409-15
- Heydorn A, B Ersboll, J Kato, M Hentzer, MR Parsek, T Tolker-Nielsen, M Givskov, S Molin. 2002.** Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. Appl. Environ. Microbiol. **68(4)**: 2008-17
- Holbein BE. 1980:** Iron-controlled infection with *Neisseria meningitidis* in mice. Infect Immun. **29(3)**: 886-91
- Huang CT, FP Yu, GA McFeters, PS Stewart. 1995.** Nonuniform spatial pattern of respiratory activity within biofilms during disinfection. Appl. Environ. Microbiol. **61(6)**: 2252-6
- Huang CT, KD Xu, GA McFeters, PS Stewart. 1998.** Spatial pattern of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation. Appl Environ Microbiol. **64(4)**: 1526-31
- Hunt SM, EM Werner, B Huang, MA Hamilton, PS Stewart. 2004.** Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 7418-7425
- Jackson KD, M Starkey, S Kremer, MR Parsek, DJ Wozniak. 2004.** Identification of psl, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. J. Bacteriol. **186**: 4466-75
- Jennings GT, Savino S, Marchetti E, Arico B, Kast T, Baldi L, Ursinus A, Holtje JV, Nicholas RA, Rappuoli R, Grandi G. 2002.** GNA33 from *Neisseria meningitidis* serogroup B encodes a membrane-bound lytic transglycosylase (MltA). Eur J Biochem. **269(15)**: 3722-31
- Jensen ET, A Kharazmi, P Garred, G Kronberg, A Fomsgaard, TE Mollmoss, N Hoiby. 1993.** Complement activation by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Microb Pathog. **15(5)**: 377-88.
- Jesaitis AJ, MJ Franklin, D Berglund, H Beyenal, Z Lewandowski. 2003.** Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. J. Immunol. **171(8)**: 4329-39

- Johansson L, Rytönen A, Bergman P, Albiger B, Kallstrom H, Hokfelt T, Agerberth B, Cattaneo R, Jonsson AB. 2003.** CD46 in meningococcal disease. *Science*. **301(5631)**: 373-5
- Jolley KA, Kalmusova J, Feil EJ, Gupta S, Musilek M, Kriz P, Maiden MC. 2000.** Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J Clin Microbiol*. **38(12)**: 4492-8
- Jordens JZ, Williams JN, Jones GR, Christodoulides M, Heckels JE. 2004.** Development of immunity to serogroup B meningococci during carriage of *Neisseria meningitidis* in a cohort of university students. *Infect Immun*. **72(11)**: 6503-10
- Joseph LA, Wright AC. 2004.** Expression of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide inhibits biofilm formation. *J Bacteriol*. **186(3)**: 889-93
- Kaiser D. 2004.** Signaling in myxobacteria. *Annu Rev Microbiol*. **58**: 75-98
- Kaplan JB, Meyerhofer MF, Fine DH. 2003.** Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Bacteriol*. **185**: 1399-1404
- Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N, Fine DH. 2003.** Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *J. Bacteriol*. **185**: 4693-98
- Keren I, Kaldula N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. 2004.** Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett*. **230(1)**: 13-8
- Kierek K and Watnick PI. 2003** The *Vibrio cholerae* O139 O-antigen polysaccharide is essential for Ca<sup>2+</sup> dependent biofilm development in sea water. *PNAS*. **100**: 14357-62
- Kierek K and Watnick PI. 2003.** Environmental determinants of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Appl Environ Microbiol*. **69(9)**: 5079-88
- Kirchner M, Heuer D, Meyer TF. 2005.** CD46-independent binding of neisserial type IV pili and the major pilus adhesin, PilC, to human epithelial cells. *Infect Immun*. **73(5)**: 3072-82
- Kirisits MJ, Prost L, Starkey M, Parsek MR. 2005.** Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. **71(8)**: 4809-21.
- Kjaergaard K, Schembri MA, Hasman P, Klemm. 2000.** Antigen 43 from *Escherichia coli* induces inter- and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol*. **182(17)**: 4789-96
- Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aas-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen. 2003a.** Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol*. **48(6)**: 1511-24
- Klausen M, Aas-Jørgensen S, Molin T, Tolker-Nielsen. 2003b.** Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol*. **50(1)**: 61-8
- Knirel YA, Bystrova OV, Hatano K, Pier GB. 2001.** Structural analysis of the lipopolysaccharide core of a rough, cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Biochem*. **268**: 4708-19
- Kolter R. 2005.** Surfacing views of biofilm biology. *Trends Microbiol*. **13(1)**: 1-2
- Korber D, Lawrence JR, Hendry MJ, Caldwell D. 1993.** Analysis of spatial variability within mot<sup>+</sup> and mot<sup>-</sup> *Pseudomonas fluorescens* biofilms using representative elements. *Biofouling* **7**: 339-59
- Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW. 1980.** Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect. Immun*. **28**: 546-56
- Lam MY, McCroarty EJ, Kropinski AM, Hoiby N, Lam JS. 1989.** Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol*. **27**: 962-67

- Lambertsen L, Sternberg C, Molin. S 2004.** Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ. Microbiol.* **6**: 726-32
- Lawrence JR, DR Korber, BD Hoyle, JW Costerton, DE Caldwell. 1991.** Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bac.* **173(20)**: 6558-67
- Leid JG, CJ Willson, ME Shirtliff, DJ Hassett, MR Parsek, AK Jeffers. 2005.** The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol.* **175(11)**: 7512-8.
- Lee SW, Foley EJ, Epstein JA. 1944.** Mode of Action of Penicillin: I. Bacterial Growth and Penicillin Activity-Staphylococcus aureus FDA. *J Bacteriol.* **48(4)**: 393-9
- Lee SF, YH Yi, GH Bowdon. 1996.** Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect. Immun.* **64**: 1035-38
- Lee SW, Higashi DL, Snyder A, Merz AJ, Potter L, So M. 2005.** PilT is required for PI(3,4,5)P3-mediated crosstalk between *Neisseria gonorrhoeae* and epithelial cells. *Cell Microbiol.* **7(9)**: 1271-84
- Lerouge I und J Vanderleyden. 2002.** O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant microbe interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 17-47
- Lewis K 2001.** Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **45(4)**: 999-1007
- Lorenz MG, Wackernagel W. 1991.** High Frequency of Natural Genetic Transformation of *Pseudomonas stutzeri* in Soil Extract Supplemented with a Carbon/Energy and Phosphorus Source. *Appl Environ Microbiol.* **57(4)**: 1246-1251
- Lorenz MG, Wackernagel W. 1994.** Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev.* **58(3)**: 563-602
- Lundberg JO, Weitzberg E, Cole JA, Benjamin N. 2004.** Nitrate, bacteria and human health. *Nat Rev Microbiol.* **2(7)**: 593-602
- Luppens SB, MW Rej, RW van der Heijden, FM Rombouts, T Abee. 2002.** Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(9)**: 4194-200
- Marceau M, Beretti JL, Nassif X. 1995.** High adhesiveness of encapsulated *Neisseria meningitidis* to epithelial cells is associated with the formation of bundles of pili. *Mol Microbiol.* **17(5)**: 855-63
- 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. *Infect Immun.* **60(5)**: 2048-57
- Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R. 1996.** The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol.* **178(1)**: 175-83
- McKenzie GJ, Harris RS, Lee PL, Rosenberg SM. 2000.** The SOS response regulates adaptive mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97(12)**:6646-51
- Mackinnon FG, Borrow R, Gorrings AR, Fox AJ, Jones DM, Robinson A. 1993.** Demonstration of lipooligosaccharide immunotype and capsule as virulence factors for *Neisseria meningitidis* using an infant mouse intranasal infection model. *Microb Pathog.***15(5)**: 359-66
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. 1998.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95(6)**: 3140-5
- Makin SA und Beveridge TJ. 1996.** The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology.* **142(Pt. 2)**: 299-307

- Malik M, Zhao X, Drlica K. 2006.** Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. *Mol Microbiol.* **61(3)**: 810-25
- Marrie TJ, Nelligan J, Costerton JW. 1982.** A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation.* **66(6)**: 1339-41
- Marsh PD. 2003.** Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis.* **9 Suppl 1**: 16-22
- Marshall, KC. 1976.** Interfaces in microbial ecology. P. 44-47. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Mattick JS. 2002.** Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol.* **56**:289-314
- Merz AJ, Enns CA, So M. 1999.** Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Mol Microbiol.* **32(6)**: 1316-32
- Merz AJ, M So, MP Sheetz. 2000.** Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature.* **407(6800)**: 98-102
- Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN. 2004.** SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science.* **305(5690)**: 1629-31
- Möller S, C Sternberg, JB Andersen, BB Christensen, JL Ramos, M Givskov, S Molin. 1998.** In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(2)**: 721-32
- Morand PC, P Tattevin, E Eugene, JL Beretti, X Nassif. 2001.** The adhesive property of the type IV pilus-associated component PilC1 of pathogenic *Neisseria* is supported by the conformational structure of the N-terminal part of the molecule. *Mol Microbiol.* **40(4)**: 846-56
- Morand PC, Bille E, Morelle S, Eugene E, Beretti JL, Wolfgang M, Meyer TF, Koomey M, Nassif X. 2004.** Type IV pilus retraction in pathogenic *Neisseria* is regulated by the PilC proteins. *EMBO J.* **23(9)**: 2009-17
- Moser C, Kjaergaard S, Pressler T, Kharazmi A, Koch C, Hoiby N. 2000.** The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. *APMIS.* **108(5)**: 329-35
- Nassif X, JL Beretti, J Lowry, P Stenberg, P O'Gaora, J Pfeifer, S Normark, M So. 1994.** Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91(9)**: 3769-73
- Nemoto K, K Hirota, D Viducic, Y Miyake. 2003.** Effects of varidase (streptodornase) on biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy* **49**: 121-5
- Newcombe J, Eales-Reynolds LJ, Wootton L, Gorringer AR, Funnell SG, Taylor SC, McFadden JJ. 2004.** Infection with an avirulent phoP mutant of *Neisseria meningitidis* confers broad cross-reactive immunity. *Infect Immun.* **72(1)**: 338-44
- Newmark KG, O'Reilly EK, Pohlhaus JR, Kreuzer KN. 2005.** Genetic analysis of the requirements for SOS induction by nalidixic acid in *Escherichia coli*. *Gene.* **356**: 69-76
- Nichols WW, SM Dorrington, MP Slack, HL Walmsley. 1988.** Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32(4)**: 518-23
- Novick RP. 2003.** Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* **48**: 1429-1449
- Nunn DN, Lory S. 1991.** Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene pilD is a prepilin leader peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88(8)**: 3281-5
- Nyvad B und M Kilian. 1990.** Comparison of the streptococcal microflora on dental enamel in caries-inactive individuals. *Caries Res.* **24(4)**: 267-72
- O'Toole GA, LA Pratt, PI Watnick, DK Newman, VB Weaver, R Kolter. 1999.** Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* **310**: 91-109

- O'Toole G, HB Kaplan, R Kolter. 2000.** Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 49-79
- O'Toole GA, R Kolter. 1998.** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30(2)**: 295-304
- O'Toole GA, R Kolter. 1998.** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28(3)**: 449-61
- O'Toole GA, KA Gibbs, PW Hager, PV Phibbs, R Kolter. 2000.** The global carbon metabolism regulator Crc isa component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182(2)**: 425-31
- Otto K und TJ Silhavy. 2002.** Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *PNAS* **99**: 2287-2292
- Park HS, Wolfgang M, van Putten JP, Dorward D, Hayes SF, Koomey M. 2001.** Structural alterations in a type IV pilus subunit protein result in concurrent defects in multicellular behaviour and adherence to host tissue. *Mol Microbiol.* **42(2)**: 293-307
- Park HS, M Wolfgang, M Koomey. 2002.** Modification of type IV pilus-associated epithelial cell adherence and multicellular behavior by the PilU protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun.* **70(7)**: 3891-903
- Parsek MR, EP Greenberg. 2005.** Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* **13(1)**: 27-33
- Peltola H. 1987.** Meningococcal disease: still with us. *Rev Infect Dis.* **5(1)**: 71-91
- Penn CW, Parsons NJ, Veale DR, Smith H. 1980.** Antigenic heterogeneity associated with pilus aggregation and autoagglutinability in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Gen Microbiol.* **121(1)**: 195-202
- Perry AC, IJ Nicolson, JR Saunders. 1987.** Structural analysis of the pilE region of *Neisseria gonorrhoeae* P9. *Gene.* **60(1)**: 85-92
- Petersen FC, Tao L, Scheie AA. 2005.** DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *J Bacteriol.* **187(13)**: 4392-400.
- Piggot PJ, Hilbert DW. 2004.** Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol.* **7(6)**: 579-86
- Post JC. 2001.** Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope.* **111(12)**: 2083-94
- Poulsen LK, G Ballard, DA Stahl. 1993.** Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1354-60
- Pratt LA und R Kolter. 1998.** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30(2)**: 285-93
- Pratt LA und R Kolter 1999.** Genetic analysis of bacterial biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 598-603
- Prigent-Combaret C and P Lejeune. 1999.** Monitoring gene expression in biofilms. *Methods Enzymol.* **310** : 56-79
- Prigent-Combaret C. O Vidal, C Dorel, P Lejeune. 1999.** Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181** : 5993-6002
- Prigent-Combaret C, G Prensier, TT Le Thi, O Vidal, P Lejeune, C Dorel. 2000.** Developmental pathways for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Eviron. Microbiol.* **2(4)**: 450-64
- Prigent-Combaret C, E Brombacher, O Vidal, A Ambert, P Lejeune, P Landini, C Dorel. 2001.** Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the csgD gene. *J. Bac.* **183(24)**: 7213-23

- Pujol C, E Eugene, M Marceau, X Nassif. 1999.** The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96(7):** 4017-22
- Rahman M, H Kallström, S Normark, AB Johnsson. 1997.** PilC of pathogenic *Neisseria* is associated with the bacterial cell surface. *Mol Microbiol.* **25(1):** 11-25
- Ram S, Cox AD, Wright JC, Vogel U, Getzlaff S, Boden R, Li J, Plested JS, Meri S, Gulati S, Stein DC, Richards JC, Moxon ER, Rice PA. 2003.** Neisserial lipooligosaccharide is a target for complement component C4b. Inner core phosphoethanolamine residues define C4b linkage specificity. *J Biol Chem.* **278(51):** 50853-62
- Rayner MG, Y Zang, C Gorry, Y Chen, JC Post, GD Ehrlich. 1998.** Evidence of bacterial metabolic activity in culture-negative otitis media with effusion. *JAMA* **279:** 296-9
- Reisner A, JA Haagensen, MA Schembri, EL Zechner, S Molin. 2003.** Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol. Microbiol.* **48(4):** 933-46
- Ren D, LA Bedzyk, P Setlow, SM Thomas, RW Ye, TK Wood. 2004.** Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Environ. Biotechnol.* **64:** 515-24
- Rocchetta H, LL Burrows, JS Lam. 1999.** Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63:** 523-53
- Rock JD, Mahnane MR, Anjum MF, Shaw JG, Read RC, Moir JW. 2005.** The pathogen *Neisseria meningitidis* requires oxygen, but supplements growth by denitrification. Nitrite, nitric oxide and oxygen control respiratory flux at genetic and metabolic levels. *Mol Microbiol.* **58(3):** 800-9
- Römling U, WD Sierralta, K Eriksson, S Normak. 1998.** Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol. Microbiol.* **28(2):** 249-64
- Römling U und M Rohde. 1999.** Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. *FEMS Microbiol. Lett.* **180:** 91-102
- Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. 2001.** *Meningococcal disease.* *N Engl J Med.* **344(18):** 1378-88
- Rudel T, I Scheuerflug, TF Meyer. 1995.** Neisseria PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin. *Nature.* **373(6512):** 357-9
- Runyen-Janecky LJ, Hong M, Payne SM. 1999.** The virulence plasmid-encoded *impCAB* operon enhances survival and induced mutagenesis in *Shigella flexneri* after exposure to UV radiation. *Infect Immun.* **67(3):** 1415-23
- Sabbuba NA, Mahenthalingam E, Stickler DJ. 2003.** Molecular epidemiology of *Proteus mirabilis* infections of the catheterized urinary tract. *J Clin Microbiol.* **41(11):**4961-5
- Salit IE und Tomalty L. 1986.** Experimental meningococcal infection in mice: a model for mucosal invasion. *Infect Immun.* **51(2):** 648-52
- Sauer K und AK Camper. 2001.** Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* **183(22):** 6579-89
- Sauer K, AK Camper, GD Ehrlich, JW Costerton, DG Davies. 2002.** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bac.* **184(4):** 1140-54
- Sauer K, MC Cullen, AH Rickart, LA Zeef, DG Davies, P Gilbert. 2004.** Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol.* **186:** 7312-7326
- Schembri M, K Kjaergaard, P Klemm. 2003.** Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* **48:** 253-267
- Schryvers AB und GC Gonzales. 1989.** Comparison of the abilities of different protein sources of iron to enhance *Neisseria meningitidis* infection in mice. *Infect Immun.* **57(8):** 2425-9

- Schryvers und Stojiljkovic. 1999.** Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. Mol Microbiol. **32(6)**: 1117-23
- Schwartz B, Al-Tobaiqi A, Al-Ruwais A, Fontaine RE, A'ashi J, Hightower AW, Broome CV, Music SI. 1988.** Comparative efficacy of ceftriaxone and rifampicin in eradicating pharyngeal carriage of group A *Neisseria meningitidis*. Lancet. **1(8597)**: 1239-42
- Sheikh J, S Hicks, M Dall'Àgnol, AD Phillips, JP Nataro. 2001.** Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **41**: 983-997
- Sim RJ, Harrison MM, Moxon ER, Tang CM. 2000.** Underestimation of meningococci in tonsillar tissue by nasopharyngeal swabbing. Lancet. **356(9242)**: 1653-4
- Singh PK. 2004.** Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. Biometals. **17(3)**: 267-70
- Snyder LA, Butcher SA, Saunders NJ. 2001.** Comparative whole-genome analyses reveal over 100 putative phase-variable genes in the pathogenic *Neisseria* spp. Microbiology. **147( 8)**: 2321-32
- Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I. 2002.** Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. Mol Microbiol. **43(3)**: 793-808
- Spoering AL und K Lewis. 2001.** Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. J. Bacteriol. **183**: 6746-51
- Spratt BG, Bowler LD, Zhang QY, Zhou J, Smith JM. 1992.** Role of interspecies transfer of chromosomal genes in the evolution of penicillin resistance in pathogenic and commensal *Neisseria* species. J Mol Evol. **34(2)**: 115-25
- Stanley NR und BA Lazazzera. 2004.** Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. Mol. Microbiol. **52(4)**: 917-24
- Steinmoen H, Knutsen E, Havarstein LS. 2002.** Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. Proc Natl Acad Sci U S A. **99(11)**: 7681-6.
- Sternberg C, BB Christensen, T Johansen, A Toftgaard Nielsen, JB Andersen, M Givskov, S Molin. 1999.** Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. Appl. Environ. Microbiol. **65(9)**: 4108-17
- Stewart PS. 1998.** A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. Biotechnol. Bioeng. **59(3)**: 261-72
- Stewart PS, F Roe, J Rayner, JG Elkins, Z. Lewandowski, UA Ochsner, DJ Hassett. 2000.** Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 836-8
- Stewart PS und JW Costerton. 2001.** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet **358**: 135-8
- Stewart PS. 2002.** Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int J Med Microbiol. **292(2)**: 107-13
- Stone G, Wood P, Dixon L, Keyhan M, Matin A. 2002.** Tetracycline rapidly reaches all the constituent cells of uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. **46(8)**: 2458-61
- Stoodley P, D de Beer, Z. Lewandowski. 1994.** Liquid flow in biofilm systems. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 2711-16
- Stoodley P, D de Beer, Z. Lewandowski, D Boyle, HM Lappin-Scott. 1999.** Evolving perspectives of biofilm structure. Biofouling. **14**: 75-90
- Stoodley P, K Sauer, DG Davies, JW Costerton. 2002.** Biofilms as complex differentiated communities. Ann. Rev. Microbiol. **56**: 187-209

- Sufya N, DG Allison, P Gilbert. 2003.** Clonal variation in maximum specific growth rate and susceptibility towards antimicrobials. *J. Appl. Microbiol.* **95(6)**: 1261-7
- Sun YH, Exley R, Li Y, Goulding D, Tang C. 2005.** Identification and characterization of genes required for competence in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* **187(9)**: 3273-6
- Sutherland IW 2001.** The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* **9(5)**: 222-7
- Taddei F, I Matic, M Radman. 1995.** cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *PNAS* **92(25)**: 11736-40
- Tanaka G, Shigeta M, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H, Usui T. 1999.** Effect of the growth rate of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on the susceptibility to antimicrobial agents: beta-lactams and fluoroquinolones. *Chemotherapy.* **45(1)**: 28-36
- Tauber MG und A Zwahlen. 1994.** Animal models for meningitis. *Methods Enzymol.* **235**: 93-106
- Tavares F, Sellstedt A. 2001.** DNase-resistant DNA in the extracellular and cell wall-associated fractions of *Frankia* strains R43 and CcI3. *Curr Microbiol.* **42(3)**: 168-72
- Tolker-Nielsen T, UC Brinch, PC Ragas, JB Andersen, CS Jacobsen, S Molin. 2000.** Development and dynamics of *Pseudomonas sp.* Biofilms. *J. Bacteriol.* **182(22)**: 6482-9
- Tonjum T, NE Freitag, E Namork, M Koomey. 1995.** Identification and characterization of pilG, a highly conserved pilus-assembly gene in pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol.* **16(3)**: 451-64
- Tümmler B und C Kiewitz. 1999.** Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Mol. Med. Today.* **5(8)**: 351-8
- Unkmeir A, Latsch K, Dietrich G, Wintermeyer E, Schinke B, Schwender S, Kim KS, Eigenthaler M, Frosch M. 2002.** Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol Microbiol.* **46(4)**: 933-46
- Vale RD. 2000.** AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol.* **150(1)**: F13-9
- van Schaik EJ, Giltner CL, Audette GF, Keizer DW, Bautista DL, Slupsky CM, Sykes BD, Irvin RT. 2005.** DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *J Bacteriol.* **187(4)**: 1455-64
- Vedros NA. 1987.** In: Vedros NA, ed. Evolution of meningococcal disease 33-37
- Vidal O, R Longin, C Prigent-Combaret, C Dorel, M Hooreman, P Lejeune. 1998.** Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces : involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J. Bacteriol.* **180**: 2442-49
- Virji M, JE Heckels, WJ Potts, CA Hart, JR Saunders. 1989.** Identification of epitopes recognized by monoclonal antibodies SM1 and SM2 which react with all pili of *Neisseria gonorrhoeae* but which differentiate between two structural classes of pili expressed by *Neisseria meningitidis* and the distribution of their encoding sequences in the genomes of *Neisseria* spp. *J Gen Microbiol.* **135(12)**: 3239-51
- Vogel U, Hammerschmidt S, Frosch M. 1996.** Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitis* serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat. *Med Microbiol Immunol (Berl).* **185(2)**: 81-7
- Vogel U, Morelli G, Zurth K, Claus H, Kriener E, Achtman M, Frosch M. 1998.** Necessity of molecular techniques to distinguish between *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients with meningococcal disease and from their healthy contacts. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2465-2470
- Vroom JM, KJ Grauw, GK Watson, JJ Birmingham, C Allison. 1999.** Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(8)**: 3502-11

- Vuong C, JM Voyich, ER Fischer, KR Braughton, AR Whitney, FR DeLeo, M Otto. 2004.** Polysaccharide intercellular adhesion (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell. Microbiol.* **6**: 269-75
- Walker TS, Tomlin KL, Worthen GS, Poch KR, Lieber JG, Saavedra MT, Fessler MB, Malcolm KC, Vasil ML, Nick JA. 2005.** Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect Immun.* **73(6)**: 3693-701
- Walters MC, F Roe, A Bugnicourt, MJ Franklin, PS Stewart. 2003.** Contribution of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 317-23
- Wang JF, Caugant DA, Morelli G, Koumare B, Achtman M. 1993.** Antigenic and epidemiologic properties of the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis.* **167(6)**: 1320-9
- Wang X, JF Preston, T Romeo. 2004.** The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesion required for biofilm formation. *J. Bacteriol.* **186**: 2724-34
- Watnick PI und Kolter R. 1999.** Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol.* **34(3)**: 586-95
- Watnick PI, KJ Fullner, R Kolter. 1999.** A role of the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* **181**: 3606-9
- Webb JS, LS Thompson, S James, T Charlton, T. Tolker-Nielsen, B Koch, M. Givskov, S. Kjelleberg. 2003.** Cell Death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* **185**: 4585-4592
- Weber MV, Claus H, Maiden MC, Frosch M, Vogel U. 2006.** Genetic mechanisms for loss of encapsulation in polysialyltransferase-gene-positive meningococci isolated from healthy carriers. *Int J Med Microbiol.* **296(7)**: 475-84
- Wentland EJ, PS Stewart, CT Huang, GA McFeters. 1996.** Spatial variations in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilm. *Biotechnol. Prog.* **12**: 316-21
- Werner E, F Roe, A Bugnicourt, MJ Franklin, A Heydorn, S Molin, B Pitts, PS Stewart. 2004.** Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6188-6196
- Whitchurch CB, T Tolker-Nielsen, PC Ragas, JS Mattick. 2002.** Extracellular DNA is required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487
- Williams V, M Fletcher. 1996.** *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are effected by lipopolysaccharide composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 100-4
- Winzer K, Hardie KR, Burgess N, Doherty N, Kirke D, Holden MT, Linforth R, Cornell KA, Taylor AJ, Hill PJ, Williams P. 2002.** LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology.* **148(4)**: 909-22
- Winzer K, Sun YH, Green A, Delory M, Blackley D, Hardie KR, Baldwin TJ, Tang CM. 2002.** Role of *Neisseria meningitidis* luxS in cell-to-cell signaling and bacteremic infection. *Infect Immun.* **70(4)**: 2245-8
- Wolfaardt GM, JR Lawrence, RD Robarts, SJ Caldwell, DE Caldwell. 1994.** Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* **60(2)**: 434-446
- Wolfgang M, HS Park, SF Hayes, JP van Putten, M Koomey. 1998.** Suppression of an absolute defect in type IV pilus biogenesis by loss-of-function mutations in pilT, a twitching motility gene in *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95(25)**: 14973-8

- Wolfgang M, P Lauer, HS Park, L Brossay, J Herbert, M Koomey. 1998.** PilT mutations lead to simultaneous defects in competence for natural transformation and twitching motility in piliated *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol.* **29(1)**: 321-30
- Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole GA, Parsek MR. 2003.** Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100(13)**: 7907-12
- Wrangstadh M, PL Conway, S Kjelleberg. 1988.** The role of an extracellular polysaccharide produced by the marine *Pseudomonas* sp S9 in cellular detachment during starvation. *Can. J. Microbiol.* **35**: 309-12
- Xavier JB, Foster KR. 2007.** Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104(3)**: 876-81
- Xu KD, PS Stewart, F Xia, CT Huang, GC McFeters. 1998.** Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4035-39
- Xu KD, PS Stewart, F Xia, CT Huang, GA McFeters. 1998.** Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4035-4039
- Xu KD, MJ Franklin, CH Park, GA McFeters, PS Stewart. 2001.** Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor, RpoS, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**: 67-71
- Yasuda H, Y Ajiki, J Aoyama, T Yokota. 1994.** Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in-vitro bacterial biofilm models. *J. Med. Microbiol.* **41(5)**: 359-67
- Yi K, Stephens DS, Stojiljkovic I. 2003.** Development and evaluation of an improved mouse model of meningococcal colonization. *Infect Immun.* **71(4)**: 1849-55
- Yildiz FH, GK Schoolnik. 1999.** *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *PNAS* **96**: 4028-33
- Yildiz FH, NA Dolganov, GK Schoolnik. 2001.** VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of vps biosynthesis genes and EPS(ETr)-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J. Bacteriol.* **183**: 1716-26
- Ziehbür W, V Krimmer, S. Rachid, I. Lossner, F Götz, J. Hacker. 1999.** A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for the control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol. Microbiol.* **32**: 345-56
- Zimmerli W, AF Widmer, M Blatter, R Frei, PE Ochsner. 1998.** Role of riampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *JAMA* **279(19)**: 1537-41
- Zogaj X, M Nimtz, M Rohde, W Bokranz, U Römling. 2001.** The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **39**: 1452-1463

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
absol.	absolut
ad.	auffüllen bis
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CF	Cystische Fibrose
CFP	blau fluoreszierendes Protein
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
cm	Zentimeter
cnl	Kapsel-Null-Lokus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTU	Technische Universität von Dänemark
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
exDNA	extrazelluläre DNA
g	Gramm; Erdbeschleunigung: $g=9,81 \text{ m/s}^2$
GC-Agar	Gonokokken-Agar
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
kDa	Kilo-Dalton
kV	Kilo-Volt
l	Liter
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	monoklonaler Antikörper
MAC	mutagenesis in aging colonies
µF	Mikro-Farad
MHK	minimale Hemmkonzentration
MIK	minimale inhibitorische Konzentration
min	Minute

mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MLST	Multi-Lokus Sequenz Typisierung
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mM	millimolar
µM	mikromolar
mRNA	messenger RNA
NDM	Neisseria Defined Medium
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
Ω	Ohm
ORF	offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered sialine
PI	Propidiumiodid
PIA	Polysaccharide Intercellular Adhesin
PCR	Polymerasekettenreaktion
POX	Meerrettichperoxidase
PPM	Proteose-Pepton-Medium
QS	Quorum sensing
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rsGFP	red-shifted GFP
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s, sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
ST	Sequenztyp
syn.	Synonym
TfP	Typ IV-Pili
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tab.	Tabelle
U	Umdrehungen, Units
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

## 8.2. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Martin Lappann  
 Geburtstag: 26.6.1977  
 Geburtsort: Jena

### Schulbildung

03.09.1984 bis 31.08.1992 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule  
 (Grundschule und Realschule) in Schleiz/Thüringen  
 01.09.1992 bis 20.06.1996 Gymnasium Dr. Konrad Duden in Schleiz,  
 Abschluss: Abitur

### Wehrdienst

01.07.1996 bis 31.04.1997 Panzergrenadierbataillon 152, Schwarzenborn/Hessen

### Studium

01.10.1997 bis 30.06.2000 Studium der Biologie an Friedrich-Schiller-Universität  
 Jena  
 Hauptfach Mikrobiologie, Nebenfächer: Genetik,  
 Biochemie und Medizinische Mikrobiologie  
 Diplomarbeit im Institut für Allgemeine Mikrobiologie  
 und Mikrobengenetik (Juli 2002-Juni 2003) zum Thema:  
 „Molekulare Stammtypisierung von *Enterococcus*  
*faecalis*: Eine Fallstudie“ bei Herrn Prof. Dr. rer. nat.  
 Johannes Wöstemeyer

### Berufstätigkeit

seit 01.07.2003 Dissertation zum Thema: „Morphologische und  
 funktionelle Untersuchungen zur Biofilmbildung bei dem  
 humanen Pathogen *Neisseria meningitidis*“ am Institut  
 für Hygiene und Mikrobiologie der Universität  
 Würzburg bei Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Vogel  
 01.07.2003-30.06.2006 reguläres Mitglied des Graduiertenkollegs 520  
 „Immunmodulation“  
 01.07.-31.12.2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Hygiene  
 und Mikrobiologie der Universität Würzburg  
 seit 01.01.2007 wissenschaftlicher Mitarbeiter im  
 Sonderforschungsbereich 479, Projekt A10

### 8.3. Publikationen

#### Originalarbeiten in Peer Review Journalen

**Lappann M**, Haagensen JA, Claus H, Vogel U (korrespondierender Autor), Molin S. 2006. Meningococcal biofilm formation: structure, development and phenotypes in a standardized continuous flow system. *Molecular Microbiology* 62(5): 1292-309.

#### Kongreßbeiträge

##### Vorträge

**Lappann M**, Claus H, Haagensen JA, Molin S, Vogel U. “Studies on meningococcal biofilms and the role of bacterioferritin“, 4<sup>th</sup> joint retreat of GK 520 (Würzburg) and GK 592 (Erlangen): Immunomodulation meets Lymphocyte Activation”, Mark Taschendorf, Deutschland, 04.-06.07.2004

**Lappann M**, Claus H, Haagensen JA, Molin S, Vogel U. “Biofilms of *Neisseria meningitidis*“, 5<sup>th</sup> joint retreat of GK 520 (Würzburg) and GK 592 (Erlangen): Immunomodulation meets Lymphocyte Activation, Mark Taschendorf, Deutschland, 16.-18.07.2005

**Lappann M**, Haagensen JA, Claus H, Molin S, Vogel U. “Biofilm formation by *Neisseria meningitidis* under flow conditions”, 2. gemeinsame Jahrestagung der DGHM und VAAM, Göttingen, Deutschland, 25.-28.09.2005

##### Poster

**Lappann M**, Claus H, Meinhardt C, Vogel U. “Diversity of the pilin-like protein PilX of *Neisseria meningitidis*“, 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg, Deutschland, 01.-04.10.2006

**Lappann M**, Claus H, Haagensen JA, van Alen T, Molin S, Vogel U. “Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*: Molecular investigation of biofilm formation, and implications on population biology“, 4<sup>th</sup> ASM conference on biofilms, Quebec, Kanada, 25.-29.03.2007

## Danksagung

Ich danke ganz herzlich Prof. Dr. med. Ulrich Vogel für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung meiner Doktorarbeit und hervorragende Arbeitsbedingungen. Im Besonderen gilt ihm der Dank, mich nicht nur gefördert, sondern auch gefordert zu haben.

Ein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Heike Claus, die äußerst engagiert meine Arbeit betreut und sehr gut kooperiert hat.

Vielen Dank an Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt, der sich zur Übernahme des Zweitgutachtens bereiterklärt hat.

Ich danke rechtherzlich Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig als Sprecher des Graduiertenkollegs Immunmodulation für die Finanzierung dieser Arbeit und die Ausbildung in Immunologie.

Ein außerordentlicher Dank gilt Prof. Ph.D. Søren Molin, der mir die Arbeit in seinem sehr aufgeschlossenen Team ermöglichte, nicht zuletzt auch für seine Diskussionsfreude und die Übernahme von Reisekosten nach Lyngby.

Ich danke vielmals M.Sc. Janus Haagensen für seine hervorragende Zusammenarbeit und Ph.D. Susse Kirkelund Hansen für viele experimentelle Tipps und mentale Unterstützung während der sehr arbeitsintensiven und schlafarmen Aufenthalte in Lyngby.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Mathias Frosch für die Möglichkeit, die Promotion am IHM durchzuführen, und für die kontinuierliche Unterstützung.

Ich danke meiner Familie, mir mein Studium ermöglicht und mich immer unterstützt zu haben.

Ein großer Dank gilt meiner Freundin Ines für ihre moralische Unterstützung und natürlich auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Der MTA Gabi Heinze sei gedankt für die Einarbeitung in Methoden und für experimentelle Hilfestellungen.

Vielen Dank auch an Christine, Isabell, Johannes und Tessa für eine angenehme Arbeitsatmosphäre.