

## Ia. Zusammenfassung

Die Ausbildung von Biofilmen ist ein wichtiger Schritt in der Pathogenese von Polymer-assoziierten Infektionen durch *S. epidermidis*. Sie hängt von der Expression des *ica*ADBC-Operons ab, das die Synthesenzyme für die Produktion eines extrazellulären Polysaccharids (PIA) kodiert. PIA steht für Polysaccharid-Interzelluläres-Adhäsion. Diese Substanz stellt ein beta-1,6 verknüpftes N-Acetyl-Glukosaminoglycan dar, das den Bakterien extrazellulär aufliegt, die Adhärenz der Zellen untereinander vermittelt und so die Akkumulation eines Biofilms wesentlich fördert. Epidemiologische und experimentelle Studien haben gezeigt, daß die PIA-Produktion und damit die Biofilmbildung wesentlich zur Virulenz bestimmter *S. epidermidis* Stämme beiträgt.

Die vorliegende Arbeit zielte auf die Untersuchung äußerer Faktoren ab, die die PIA-Expression in *S. epidermidis* regulieren. Dazu wurde eine Genfusion zwischen dem *ica*-Promotor und dem beta-Galaktosidasegen aus *E. coli* hergestellt und stabil in das Chromosom eines *ica*-positiven *S. epidermidis* Klinikisolates integriert. Das Reportergenkonstrukt wurde benutzt, um den Einfluß verschiedener Umweltfaktoren und die Wirkung subinhibitorischer Antibiotikadosen auf die Expression des *ica*-Operons zu bestimmen. Es konnte gezeigt werden, daß die *ica*-Expression wachstumsphasenabhängig ist und ihr Maximum in der späten logarithmischen und frühen stationären Phase erreicht. Die optimale Expressionstemperatur liegt bei 42 °C und einem neutralen pH-Wert in einem Bereich zwischen 7,0 und 7,5. Die Biofilmbildung hängt stark vom Glukosegehalt des Wachstumsmediums ab. So wurde gezeigt, daß 1,5 bis 2 % im Kulturmedium die *ica*-Expression in der logarithmischen Phase induzieren. Externe Stressfaktoren wie erhöhte Osmolarität durch 3 bis 5 % NaCl oder sublethale Dosen von Detergenzien, Äthanol, Wasserstoffperoxid und Harnstoff begünstigen ebenfalls die *ica*-Expression und damit die Biofilmbildung. Subinhibitorische Dosen von Tetrazyklin, des Streptogramingemisches Quinupristin/Dalfopristin (Synercid™) sowie des Streptogramin-Leistungsförderers Virginiamycin führten zu einer Erhöhung der *ica*-Expression um das 8 bis 11-fache. Eine kurzzeitige Exposition der Bakterien zu hohen Konzentrationen dieser Antibiotika führte ebenfalls zu einer langanhaltenden Induktion der Biofilmexpression, auch wenn die Stoffe aus dem Wachstumsmedium sofort wieder entfernt worden waren. Andere Antibiotika wie Penicillin, Oxacillin, Gentamicin, Clindamycin, Vancomycin, Teicoplanin und Chloramphenicol zeigten keinerlei Effekt auf die *ica*-Expression. Eine schwache Induktion

wurde dagegen für Erythromycin verzeichnet. Die Daten wurden durch Northernblotanalysen der *ica*-Transkription und durch einen quantitativen Biofilmassay in Polystyrol-Mikrotiterplatten bestätigt.

Die Propagierung des Reportergenkonstruktes als Plasmid sowohl in einem *B. subtilis*-Hintergrund als auch in einem *ica*-negativen *S. epidermidis*-Stamm ergab, daß die Induktion des *ica*-Operons durch niedrige Tetrazyklin- oder Streptograminkonzentrationen möglicherweise von spezifischen Regulatoren abhängt, die nur in Staphylokokken vorkommen. Im Gegensatz dazu ist die Induktion durch externe Stressfaktoren sowohl in *B. subtilis* als auch in *S. epidermidis* möglich. Durch die Herstellung und Untersuchung einer *agr*-Mutante in einem Biofilm-bildenden *S. epidermidis*-Stamm konnte ausgeschlossen werden, daß das Agr-Quorum-Sensing-System einen wesentlichen Einfluß auf die *ica*-Expression in der stationären Phase ausübt. Dagegen wurde klar gezeigt, daß die *ica*-Transkription in *S. aureus* von der Expression des alternativen Transkriptionsfaktors SigmaB abhängt, der einen globalen Regulator für die Stressantwort in Staphylokokken und in *B. subtilis* darstellt. Zu diesem Zweck war eine *sigB*-Deletionsmutante in einem Biofilm-bildenden *S. aureus*-Stamm hergestellt worden. Diese Mutante zeigte eine deutlich verminderte *ica* Transkription und Biofilmbildung. Dagegen wies die Komplementante, die das *sigB*-Gen auf einem Expressionsvektor trug, wieder alle Merkmale des Biofilm-bildenden *S. aureus* Wildtyps auf.

Southernblot-Analysen zeigten, daß das *sigB*-Gen auch in *S. epidermidis* nachweisbar ist und unter denselben Bedingungen (d. h. in der stationären Phase und durch externen Stress) wie das *ica* Gen transkribiert wird. Das läßt vermuten, daß die Regulation des *ica*-Operons in *S. epidermidis* ähnlich abläuft wie in *S. aureus* und durch SigB beeinflusst wird. Da jedoch weder in *S. aureus* noch in *S. epidermidis* der *ica*-Promotor Ähnlichkeiten zu den bekannten SigB-abhängigen Promotor-Strukturen aufweist, ist anzunehmen, daß dieses Operon nicht direkt durch diesen alternativen Transkriptionsfaktor kontrolliert wird. Wahrscheinlich existieren noch weitere regulatorische Elemente, die hieran beteiligt sind und die noch zu identifizieren sind.