

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Institute für Infektionsmedizin
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. M. Herrmann

**Etablierung und Evaluierung eines Modells zur *in vitro*
Generierung von *Staphylococcus aureus* Biofilmen im
Fließsystem**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2005*

vorgelegt von
Sarah Seiler

geb. am 14.10.1980 in Neunkirchen/ Saar

Tag der Promotion: 28. 06. 06

Dekan: Prof. Dr. Montenarh

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Gärtner

1. Prüfer: Prof. Dr. Herrmann

2. Prüfer: Prof. Dr. Zimmermann

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>3</u>
<u>3</u>	<u>Einleitung</u>	<u>5</u>
3.1	Bedeutung von Biofilmen	5
3.2	Weitere Erreger mit besonderer Bedeutung bei der Biofilmbildung	6
3.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
3.2.2	<i>Escherichia coli</i>	7
3.3	Virulenzfaktoren von <i>Staphylococcus aureus</i>	7
3.3.1	Adhäsion an Zellen oder eine extrazelluläre Matrix	8
3.3.2	Umgehung der Wirtsabwehr	9
3.3.3	Invasion und Gewebepenetration	11
3.4	Der Wirtsorganismus.....	12
3.4.1	Abwehrmechanismen des Wirts.....	12
3.4.2	Reaktion des Wirts auf Superantigene	13
3.5	Biofilmformation.....	14
3.5.1	Initial attachment.....	14
3.5.2	Accumulation	15
3.6	Quorum sensing und molekulare Grundlagen.....	15
3.6.1	Accessory gene regulator (=agr).....	15
3.6.2	<i>sarA</i>	16
3.6.3	<i>ica</i>	16
3.6.4	SigB.....	17
3.6.5	<i>rbf</i>	17
3.6.6	Chaperone.....	18
3.7	Methoden zur Gewinnung von Biofilm	18
3.7.1	Statische Systeme	18
3.7.2	Fließsysteme.....	19
3.8	Fragestellung	20
<u>4</u>	<u>Material und Methoden</u>	<u>21</u>
4.1	Material	21
4.1.1	Verwendete Bakterienstämme.....	21
4.1.2	Chemikalien	22

4.1.3	Spezielle Laborgeräte	23
4.2	Methoden.....	26
4.2.1	Kulturen.....	26
4.2.2	Vorversuche	28
4.2.3	Versuchsaufbau und -durchführung mit dem MRD unter sterilen Bedingungen (23,39,45,70,73)	29
4.2.4	Sterilisation der Arbeitsmaterialien.....	33
4.2.5	Versuchsauswertung.....	34
4.2.6	SEM.....	35
5	<u>Ergebnisse</u>	36
5.1	Vorversuche	36
5.1.1	Vergleich der Biofilmbildung von verschiedenen Staphylococceenstämmen in Mikrotiterplattenversuchen (Versuchsdurchführung siehe 3.2.2.1.1).....	36
5.1.2	Austestung des Einflusses der Glukosekonzentration im Nährmedium auf die Biofilmbildung des <i>Staphylococcus aureus</i> DSM20231 in Mikrotiterplattenversuchen (Versuchsdurchführung siehe 3.2.2.1.2).....	39
5.2	Etablierbarkeit der Biofilmgewinnung mit dem MRD	42
5.2.1	Versuche außerhalb der Steril-Werkbank	42
5.2.2	Versuchsaufbau unter sterilen Bedingungen.....	42
5.3	Austestung verschiedener Parameter unter Nutzung des modifizierten Robbins Device	45
5.3.1	Positionseffekt.....	45
5.3.2	TSB im Vergleich zu TSB mit 2 %-igem Glukosezusatz	47
5.3.3	SEM-Bilder	49
5.4	Reproduzierbarkeit	51
5.5	Etablierbarkeit, Validität und Reproduzierbarkeit	55
6	<u>Diskussion</u>	56
6.1	Prinzipielle Möglichkeiten zur Nutzung des modifizierten Robbins Device.....	56
6.2	Übersicht und Bewertung publizierter Literatur über die Nutzung eines Robbins Device:	56
6.3	Diskussion der eigenen Ergebnisse	64
6.3.1	Mikrotiterplattenversuche	64
6.4	Ergebnisse der Parametertestung im modifizierten Robbins Device.....	67
6.4.1	Positionseffekt.....	67

6.4.2	Effekt von TSB bzw. TSB + 2 % Glukose.....	68
6.5	Zusammenfassende Bewertung.....	71
<u>7</u>	<u>Literaturverzeichnis.....</u>	<u>72</u>
<u>8</u>	<u>Veröffentlichung.....</u>	<u>81</u>
<u>9</u>	<u>Danksagung.....</u>	<u>82</u>
<u>10</u>	<u>Lebenslauf.....</u>	<u>84</u>

1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Fließsystems zur *in vitro* Herstellung von *Staphylococcus aureus* Biofilmen. Nach der Etablierung erfolgte die Untersuchung des Einflusses von gerätespezifischen Parametern auf die Biofilmbildung, weiterhin wurde der Einfluß des Glukosegehaltes des Nährmediums TSB auf die Biofilmbildung der Staphylokokken untersucht. Dies erfolgte durch Vorversuche unter statischen Bedingungen mit Mikrotiterplatten und anschließend unter Fließbedingungen mit Hilfe des zuvor etablierten Fließsystems, dem „modifizierten Robbins Device“ (MRD). Die Untersuchungen erwiesen das etablierte Fließsystem als zur Untersuchung von Staphylokokkenbiofilmen einsetzbar und demonstrierten die Beeinflussbarkeit der Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus* durch gerätespezifische Parameter wie z. B. die Abhängigkeit der Zahl von adhärierten Bakterien von der Position im Fließkanal: Silikonscheibchen, die von Stempeln entnommen wurden, die weiter distal im Fließkanal positioniert waren, wiesen einen geringere Zahl von adhärierten Bakterien auf als die Silikonscheibchen weiter proximal im Fließkanal. Die größte Zahl an koloniebildenden Einheiten war im Mittel an Position vier zu verzeichnen, mit $4,9 \times 10^3$ CFU/ml nach 24 Stunden. Diese Zahl an koloniebildenden Einheiten wurde nach Position zehn nicht mehr annähernd erreicht, mit noch $3,1 \times 10^3$ CFU/ml im Mittel nach 24 Stunden. In den distalen Positionen waren nur noch $3,7 \times 10^2$ CFU/ml im Mittel nach 24 Stunden nachweisbar. Die beschriebenen Unterschiede stellten sich nach statistischer Prüfung als signifikant heraus. Neben der Position der Testoberflächen konnte eine Abhängigkeit der Zahl koloniebildender Staphylokokken von metabolischen Faktoren, beeinflusst durch Glukosekonzentrationen im Medium beobachtet werden. Es wurde beobachtet, dass bei Verwendung von TSB mit einem Glukosegehalt von 2% eine größere Zahl von adhärierten Bakterien zu verzeichnen war als bei der Verwendung von TSB mit 0,25% Glukosegehalt. Bei einen Glukosegehalt von 2% wurden im Laufe von 96 Stunden Werte bis zu $7,6 \times 10^6$ CFU/ml erhoben, während bei TSB mit einem Glukosegehalt von 0,25% nur $5,2 \times 10^5$ CFU/ml nach 96 Stunden nachgewiesen wurden. Statistische Überprüfung zeigte auch hier die Signifikanz der gefundenen Ergebnisse auf. Insgesamt ist es mit dieser Arbeit gelungen, das MRD für die Generierung von Biofilmen *in vitro* zu etablieren und die gewonnenen Ergebnisse zu validieren; in diesem Prozeß hat sich jedoch gezeigt, dass das System aufgrund einer Vielzahl zu kontrollierender technischer und biologischer Faktoren insgesamt aufwendig ist und zwischen einzelnen Versuchen Probleme in der Reproduzierbarkeit verursachte. Andererseits ist das MRD jedoch ein geeignetes

Instrument zur Untersuchung unterschiedlicher experimenteller Bedingungen, und hierbei insbesondere zur Untersuchung von Biofilmen unter Fließbedingungen. Besonders attraktiv war die Möglichkeit der Entfernung einzelner Silikonscheibchen aus dem Fließkanal des Devices, ohne das ganze System zu kontaminieren. Bei richtiger, steriler Versuchsdurchführung ergab sich somit die Möglichkeit, Staphylokokkenbiofilme aus einem Versuch zu verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen und hierdurch insgesamt zu einem vertieften Verständnis der Dynamik mikrobieller Biofilmpopulationen zu führen. Die hier erhobenen Ergebnisse stellen jetzt die Grundlage für weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppen dar, die sich u. a. mit dem Metabolismus von Biofilmpopulationen sowie der Genexpression von Staphylokokken in sessiler Wachstumsform befassen.

2 Abkürzungsverzeichnis

AD: Außendurchmesser

APA: Abrus Precatorius Agglutinin

ATP: Adenosintriphosphat

ATCC: American Type Culture Collection

BHI: Brain Heart Infusion Medium

CA-MRSA: Community Acquired-Methicillin Resistent Staphylococcus Aureus

CAPD: Continous Ambulant Peritoneal Dialysis

CFU: Colony Forming Units

CSFs: Colony Stimulating Factors

Con A: Concanavalin A

D: Durchmesser

DNA: Desoxyribonukleinsäure

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

EAF: EPEC-Adhesion-Factor

Eap: Extracellular adhesion protein

EDTA: Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure

Emp: Extracellular matrix protein-binding protein

Fbp: Fibrinogen binding protein

FMC: Ficoll 400R-Methyl Cellulose

FnbpA und B: Fibronectin-bindendes Protein A und B

Glu: Glukose

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1

ID: Innendurchmesser

Ig: Immunglobulin

IL: Interleukin

INF: Interferon

MBK: Minimale Bakterizide Konzentration

MHC: Major Histocompatibility Complex

MHK: Minimale Hemm-Konzentration

MRD: modifiziertes Robbins Device

mRNA: messenger Ribonukleinsäure

MSCRAMMs: Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

OD: Optische Dichte

PAP: Pyelonephritis-Assoziierte Pili

PBS: Phosphate Buffered Saline (Puffer)

PIA: Polysaccharide Intercellular Adhesin

PMN: Polymorphkernige Neutrophile

PS/A: Capsular Polysaccharide/Adhesin

RNA: Ribonukleinsäure

rpm: rounds per minute

RT-PCR: Reverse Transcriptase-
Polymerase Chain Reaction

SEM: Scanning Electrone Microscopy

S-WGA: Succinyl-Wheat Germ
Agglutinin

TEM: Transmission Electrone Microscopy

TNF: Tumornekrosefaktor

TSA: Tryptic Soy Agar

TSB: Tryptic Soy Broth

TSST-1: Toxic Shock Syndrome Toxin-1

UKS: Universitätsklinikum des Saarlandes

WGA: Wheat Germ Agglutinin

3 Einleitung

3.1 Bedeutung von Biofilmen

Biofilme werden von Bakterien als Adaptationsreaktion auf Umweltfaktoren gebildet, z. B. in Abhängigkeit von der Nährstoffkonzentration, Sauerstoffmangel, hoher Osmolarität, erhöhten Temperaturen, subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen und von weiteren definierten oder globalen Parametern (63,79). Sie stellen in der Medizin ein zunehmendes Problem dar, weil die Biofilmarchitektur die Bakterien vor der Immunantwort des Wirtes und teilweise auch vor der Wirkung von Antibiotika schützen. Häufig ist daher eine operative Sanierung des Infektionsherdes unumgänglich. Besonders bedeutsam ist diese Problematik im Zusammenhang mit biomedizinischen Implantaten (18,34). Staphylokokken sind typische Erreger Biofilm-assoziiierter Implantatinfektionen. Häufig anzutreffen bei diesen Infektionen sind *Staphylococcus aureus* und koagulasenegative Staphylokokken, hier insbesondere *Staphylococcus epidermidis* (18). *S. epidermidis* ist der häufigste Erreger bei Infektionen von Zentralvenenkathetern, Zerebrospinalflüssigkeitshunts, beim Herzklappenersatz und Augenlinsenimplantaten (3,18,19,38). *S. aureus* findet man häufiger bei Infektionen durch periphere venöse Zugänge, nach endotrachealer Intubation, Tracheotomien, Peritonealdialysezugänge und bei Korneainfektionen von Kontaktlinsenträgern (3,18,49,66). Eine vergleichbare Anzahl von Infektionen mit *S. aureus* und *S. epidermidis* wurde bei Gefäßtransplantaten und auch beim Gelenkersatz beobachtet (18,38). Die Infektion mit *S. aureus* ist im Vergleich zu einer *S. epidermidis*-Infektion als gefährlicher einzustufen, da typischerweise mit höherer Morbidität und Mortalität verbunden. Als Grund hierfür sind die zahlreicheren Virulenzfaktoren von *S. aureus* zu nennen, andererseits sind die Resistenzbildungen gegen gebräuchliche Antibiotika bei den koagulasenegativen Staphylococccen noch ausgeprägter (18). Das Überwiegen von nosokomialen Infektionen durch *S. epidermidis* bei bestimmten biomedizinischen Implantaten lässt sich durch seine fast ubiquitäre Lage auf Haut und Schleimhaut, die somit gegebene örtliche Nähe zu allen Operationsgebieten erklären. Man geht davon aus, dass Implantate typischerweise bereits bei ihrer operativen Insertion durch kommensale *S. epidermidis*-Erreger der Operationswunde kolonisiert werden. Der Erreger wird leicht übertragen durch Hautkontakt zwischen Patienten und/oder Krankenhauspersonal. *S. aureus* kommt hauptsächlich auf der Mund- und Nasenschleimhaut vor und ist daher etwas seltener mit einer Kontamination der Operationswunde assoziiert. Möglicherweise ist dies der Grund, dass Peri-Implantatinfektionen mit diesem Erreger seltener nachzuweisen sind (18).

3.2 Weitere Erreger mit besonderer Bedeutung bei der Biofilmbildung

3.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Die Biofilmbildung ist ein bei zahlreichen Erregern beobachtetes und untersuchtes Phänomen. Ein gutes Beispiel bietet *Pseudomonas aeruginosa*. Hierbei handelt es sich um ein gramnegatives, ubiquitär vorhandenes und sehr widerstandsfähiges Bakterium, das feuchte Umgebung bevorzugt. Es kolonisiert Pflanzen, Insekten, Menschen und andere Säuger (64,75) und ist häufig Verursacher nosokomialer Infektionen. Unter bestimmten Voraussetzungen sind fulminante Verläufe zu befürchten, z.B. bei Immunschwäche, Breitspektrumantibiose, defekter Haut- und Schleimhautbarriere, Zystischer Fibrose als Grunderkrankung und weiteren Prädispositionsbedingungen (65,75). Ein wichtiger Virulenzfaktor von *P. aeruginosa* ist die Bildung von Biofilmen, was von Relevanz bei der Verursachung von Pneumonien ist, ganz besonders bei Patienten mit Zystischer Fibrose, bei Osteomyelitiden, Implantatinfektionen, Meningitiden, Endophthalmitiden, usw. (75). Eine Studie von O' Toole und Kolter zeigte, dass ein Charakteristikum von *P. aeruginosa*, nämlich seine Beweglichkeit, eng mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung verknüpft ist: Non-motile Mutanten ohne Flagellum erzeugten weniger Biofilm, andere Mutanten ohne Typ-IV-Pili konnten zwar Biofilm bilden, aber dafür keine Mikrokolonien (56,75). Eine weitere Besonderheit ist die Struktur des Biofilm von *P. aeruginosa*: Er verfügt über ein komplexes Kanalsystem, das sicherstellt, dass auch tiefliegende Bakterien noch mit Nährstoffen versorgt werden. Ist der Biofilm ausgereift, lösen sich Konglomerate und dislozieren, um sich an anderen Stellen im Körper anzulagern und erneut Biofilme zu bilden. Die Konglomerate lösen sich durch hydrodynamischen Fluß und wahrscheinlich auch durch die Aufregulation der Alginat-Lyase, die durch das Gen *algL* kodiert wird. Die verstärkte Expression dieses Gens bewirkt, dass Alginat aufgelöst wird, und somit wahrscheinlich der Biofilm an einer Stelle abgestreift und aufgelöst wird, aber sich dann an anderer Stelle wiederum neu bilden kann (11,75). Es wird außerdem eine Art Zyklus in der Biofilmbildung vermutet, bei dem sich zu gewissen Zeitpunkten Bakterien ablösen oder am Biofilm anlagern. Ebenfalls zu berücksichtigen ist, dass sich einzelne, nicht adherierte Bakterien jederzeit lösen können (75). Studien, die die Genexpression und Proteinexpression von planktonischen und Biofilmbakterien untereinander verglichen, stellten kaum Unterschiede in der Genexpression fest, dafür aber signifikante Unterschiede in der Proteinexpression (49,71,85).

3.2.2 *Escherichia coli*

Das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* reiht sich ebenfalls in die Kategorie der Biofilmbildner ein, es ist beweglich und nicht sporenbildend. Bei *E. coli* handelt es sich um den häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen. Sepsis, Harnwegsinfekte, Cholangitis, Wundinfektionen, intestinale Infektionen, Appendizitis und Peritonitis sind typische Krankheitsbilder. Weiterhin gilt er als klassischer Fäkalindikator, in 100 ml Trinkwasser darf kein *E. coli* zu finden sein. Die serologische Typisierung erfolgt anhand von 171 bekannten O-Antigenen, 56 H-Antigenen, 72 K-Antigenen und 12 F-Antigenen. Bei den O-Antigenen handelt es sich um thermostabile, in der Zellwand lokalisierte Lipopolysaccharide, die im Rahmen einer Sepsis als Endotoxine wirken. Die H-Antigene sind Geißelantigene, die aus dem thermolabilen Protein Flagellin bestehen. Die K-Antigene sind als Kapselantigene klassifiziert. Sie bestehen aus Polysacchariden, die sich auf der Bakterienoberfläche befinden. Die F-Antigene als Fimbrienantigene spielen eine wichtige Rolle bei der Adhärenz an Zellen (32). Ausgeprägte klinische Relevanz haben die *E. coli*-Stämme, die als Auslöser von Harnwegsinfektionen und Gastroenteritiden gelten. Als häufige Auslöser von Harnwegsinfektionen finden sich Stämme mit P-Fimbrien, auch als PAP bezeichnet. Bei den intestinalen Infektionen sind vier Subtypen von *E. coli* zu finden, EPEC: Enteropathogener *E. coli*, ausgestattet mit dem EAF, wodurch sich die besondere Fähigkeit zur Adhärenz an Darmmukosazellen und deren Zerstörung erklärt; ETEC: Enterotoxinbildender *E. coli*, dieser bildet zwei hitzelabile Enterotoxine (LT I und LT II) und oft noch ein zusätzliches hitzestabiles Toxin (ST); EIEC: Enteroinvasiver *E. coli*, dieser imitiert im klinischen Bild die Shigellen-Ruhr. Er dringt in Darmmukosazellen ein und zerstört sie; EHEC: Enterohämorrhagischer *E. coli*, welcher ein chromosomales Gen für die Adhäsion an Epithelzellen besitzt und durch Phagenkodierung noch über ein zusätzliches Toxin, nämlich Verotoxin, verfügen kann (32). Laut einer Veröffentlichung von J. L. Adams und Robert J. C. McLean hat das *rpoS*-Gen für die Biofilmbildung bei *E. coli* einen hohen Stellenwert. Die Abwesenheit dieses Gens scheint für das Wachstum von planktonischen Kulturen keine große Rolle zu spielen im Gegensatz zu den Biofilmkulturen. Das *rpoS*-Gen beeinflusst anscheinend zusätzlich die Dichte und Struktur des Biofilms (2).

3.3 *Virulenzfaktoren von Staphylococcus aureus*

Als allgemeine Pathogenitätsprinzipien von *S. aureus* sind im einzelnen die Mechanismen der Adhäsion an Zellen oder eine extrazelluläre Matrix, die Umgehung des Abwehrsystems des Wirtes und die Invasion bzw. Gewebepenetration näher zu erörtern.

3.3.1 Adhäsion an Zellen oder eine extrazelluläre Matrix

3.3.1.1 MSCRAMMs („Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules“)

Die Adhäsion ist für die Kolonisierung bzw. generell für die Entstehung einer Staphylokokkeninfektion essentiell. Die Adhäsion an Matrix- und Plasmafaktoren wird über die sogenannten MSCRAMMs vermittelt (60). Diese Oberflächenproteine haben einen ähnlichen grundsätzlichen Aufbau, auch bei anderen grampositiven Erregern: Am N-Terminus steht ein langes Signalpeptid, welches die Sekretion dieser Proteine ermöglicht. Es folgt eine komplexere Sequenz, die im Falle bestimmter MSCRAMMs das Anheften an spezielle Substanzen (z. B. an Fibronectin) ermöglicht. Diese Sequenz ist oft gefolgt von repetitiven Domänen oder Sequenzen bei einigen MSCRAMMs mit Matrix-Bindefunktion, gefolgt von einer prolinreichen Sequenz, die die Zellwand durchzieht: Der hydrophobe, positiv geladene C-Terminus, der die Zellmembran durchzieht schließt sich an. Das LPXTGX-Motiv, das außerhalb der Zellmembran liegt, besteht aus sechs Aminosäuren. Es handelt sich um eine Erkennungssequenz für ein bestimmtes Enzym, die Sortase. Vier Einzelschritte führen zur proteolytischen Durchtrennung der Polypeptidkette. Die Sortase katalysiert die Peptid-Spaltung zwischen dem Threonin und Glycin des LPXTGX-Motives. Die Carboxylgruppe des Threonins geht dann eine Amidbindung mit der freien Aminogruppe der Pentaglycinbrücke der Zellwand ein (33,60) und resultiert hierdurch in einer kovalenten Bindung des MSCRAMM-Proteins mit dem Zellwand-Peptidoglykan. *In vitro* wird beobachtet, dass die Faktoren, die das Anheften an Oberflächen vermitteln, hauptsächlich in der exponentiellen Wachstumsphase gebildet werden. Erfolgt ihre Bildung erst in der postexponentiellen Wachstumsphase, werden sie in großen Mengen extrazellulär gefunden. Das gleiche Phänomen ist bei Mutanten ohne das LPXTGX-Motiv zu beobachten (60).

3.3.1.2 Clumping factor

Das *clfA*-Gen kodiert für den clumping factor (ClfA). Das ClfA-Protein bindet Fibrinogen und enthält eine 308-Aminosäuren-Region, bestehend aus Dipeptid-„repeats“, die vornehmlich aus den Aminosäuren Serin (S) und Asparagin (D) aufgebaut sind. Die Sequenz endet 28 Reste N-terminal vom LPXTGX-Motiv. Aufgrund seiner „repeat“-Struktur wird das Molekül auch als Mitglied der Familie der SD-Moleküle beschrieben (52,60).

3.3.1.3 Fbp

Erst nach dem clumping factor entdeckte man ein anderes Fibrinogen-bindendes Protein, das Fbp. Das kodierende Gen hat in seiner Sequenz hohe Ähnlichkeit zu der Sequenz der Gene,

die für die Koagulase kodieren. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei dem Fbp eventuell um eine Art membrangebundene Koagulase handelt (14,22,60).

3.3.1.4 FnbpA und B

FnbpA und B vermitteln die Anheftung von Bakterien an Fibronectin-bedeckte Oberflächen. Von besonderer Bedeutung sind hier mit Fibronectin adsorbierte Implantate (34). Die Fnbps ermöglichen auch die Invasion von Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Phagozyten, sie dienen hierbei als Invasionsrezeptoren (35,76).

3.3.1.5 Eap und Emp

Eap und Emp sind lösliche Adhäsine mit sehr breiter Bindungsspezifität: Sie binden an Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin und Kollagen. Anscheinend handelt es hier um *S. aureus*-spezifische Oberflächenproteine. Es wurde eine immunmodulatorische Wirkung des Eaps festgestellt, nämlich die Beeinträchtigung der Interaktion von β -2-Integrinen und ICAM-1. Dies hat eine verminderte Leukozytenadhäsion und -migration zur Folge (35), daher kann man Eap und Emp als Immunmodulatoren verstehen (siehe unten).

3.3.2 Umgehung der Wirtsabwehr

3.3.2.1 Protein A

Protein A wurde als architypisches Oberflächenprotein von *S. aureus* charakterisiert. Seine Fc-Region bindet Ig G und den von-Willebrand-Faktor (33), wodurch eine Opsonierung und damit die Aufnahme der Bakterien durch Phagozyten verhindert wird. Eine Besonderheit ist der nicht mit anderen Zellwand-assoziierten Proteinen vergleichbare Aufbau von Protein A. Der Stellenwert dieses speziellen Proteins bei der Staphylokokkeninfektion wird noch nicht komplett verstanden. Seine Effektivität als Virulenzfaktor ist in der freien, ungebundenen Form größer, als in der zellwandgebundenen Form als Oberflächenmolekül (33,60). Im Biofilmzustand wird die Bildung von Protein A drastisch herunterreguliert (6).

3.3.2.2 Rolle von Proteasen

S. aureus besitzt eine Reihe sezernierter Proteasen mit unterschiedlicher Substratspezifität. Ein Beispiel für die Rolle dieser Proteasen ist die Serin-Protease V8. Sie fragmentiert und inaktiviert somit IgG-Antikörper (60). Diese Funktion bietet einen Schutz gegen antimikrobielle Peptide des Wirts und bedeutet eine Erhöhung der Invasivität des Erregers (29,60). Proteasen findet man auch bei apathogenen Erregern. Sie scheinen also nicht nur als Virulenzfaktoren eine wichtige Rolle zu spielen, sondern sind auch für konstitutive Vorgänge von Bedeutung (60).

3.3.2.3 Superantigene (siehe auch unter 2.4 Wirtsfaktoren)

Wichtige Superantigene von *Staphylococcus aureus* sind Enterotoxine, das TSST-1 und die Exfoliativtoxine. Bei den Enterotoxinen gibt es die Unterteilung von A bis E, sie sind bifunktionale Toxine: Einerseits gibt es die schon erwähnte Wirkung als Superantigen, andererseits haben sie eine emetische Wirkung. Die emetische Komponente wird durch Cystein-Schleifen in der Proteinstruktur erklärt (1). Die Funktion der Enterotoxine kommt bei Lebensmittelvergiftungen zum Tragen (60). Das TSST-1 ist Verursacher des toxischen Schocksyndroms, welches z. B. als menstruelles toxisches Schock-Syndrom auftritt (68). Die N- und C-terminalen Domänen des Proteins beinhalten Regionen, die mit MHC II interagieren. Es wird postuliert, dass die C-terminale Domäne die molekulare Lokalisation beinhaltet, die an der Bindung mit den T-Zellrezeptoren beteiligt ist (1). Exfoliativtoxine verursachen das „Staphylococcal Scalded Skin Syndrome“. Exfoliativtoxine A und B haben hohe Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz und ihrem Hydrophobitäts- bzw. Hydrophilitätsverhalten, dennoch werden sie im Körper als zwei unterschiedliche Antigene erkannt, die Kreuzreaktivität ist äußerst gering (60).

3.3.2.4 Leukozytolytische Proteine

Zwei Vertreter dieser Gattung sind γ -Hämolysin und Panton-Valentine-Leukocidin. Beide haben eine besondere Bedeutung im Zusammenhang mit ambulant erworbenen (Community Acquired, CA) Methicillin Resistent *S. aureus* (MRSA), CA-MRSA, einem Verursacher von nekrotisierenden Pneumonien und Hautinfekten. Eine Gemeinsamkeit von CA-MRSA-Stämmen weltweit ist die Bildung von Panton-Valentine-Leukocidin. Einige Stämme verfügen zusätzlich über *hlg*, das Gen zur Bildung von γ -Hämolysin (80). Die Untereinheiten von beiden Proteinen interagieren miteinander, wodurch die „Synergohymenotrophic Toxins“ (SHT) entstehen, da für die leukozytolytische Aktivität die S- und F-Komponenten nötig sind. Als F-Komponenten sind HlgB und LukF-PV klassifiziert, HlgA, HlgC und LukS-PV sind zu den S-Komponenten gehörig (60,77).

3.3.2.5 Kapselpolysaccharide und Zellwandbestandteile

Die Rolle von Kapselpolysacchariden als Virulenzfaktoren ist teilweise noch unklar, den Zellwandbestandteilen Lipoteichonsäure und Peptidoglykan wird eine immunmodulatorische Wirkung und eine Rolle bei der Entstehung des septischen Schocks zugesprochen (60). Eine Teichuronsäurekapsel schützt vermutlich die Peptidoglykane vor einer Reaktion mit Antikörpern oder Komplementfaktoren (C3b). Dies bedeutet einen Schutz vor Phagozytose. Ein anderer Erklärungsansatz ist, dass die Bindung an Antikörper oder Komplementfaktoren

zwar erfolgt, aber die Kapsel verhindert, dass eine Bindung an die polymorphkernigen Neutrophilen stattfindet (12,81).

3.3.3 Invasion und Gewebepenetration

3.3.3.1 α -Toxin

Das kodierende Gen für das α -Toxin ist *hla*. Dieses Toxin bewirkt eine Porenbildung in Membranen und kann somit Erythrozyten lysieren. Monomere des Toxins lagern sich an Zellmembranen an und bilden dann vor Ort funktionsfähige Penta- und Hexamere (8,60).

3.3.3.2 β -Hämolysin

Hierbei handelt es sich um ein Enzym, eine Sphingomyelinase (60,84). β -Hämolysin wirkt *in vitro* antagonistisch zu α -Toxin, da β -Hämolysin direkt sphingomyelinhaltige Zellmembranen angreift und dadurch die Anlagerung von α -Toxin verhindert wird. Das kodierende Gen ist *hlb* (61).

3.3.3.3 δ -Hämolysin

Dieses Hämolysin potenziert *in vitro* die Wirkung von β -Hämolysin (60,69), seine Wirkung *in vivo* bleibt noch ungeklärt. Man vermutet eine surfactantartige, tunnelbildende bzw. lysierende Wirkung bei zellwandlosen Bakterien (7,60).

3.3.3.4 Hyaluronidase, Hyaluronatlyase

Beide Enzyme spalten Hyaluronsäure, die in Nabelschnur, Haut, Knochen und Synovialflüssigkeit vorkommt. Elektrophoretisch und chromatographisch fand man mehrere Spezies dieser Enzyme. Sie fördern die Ausbreitung der Bakterien durch Gewebeauflösung (51,60).

3.3.3.5 Virulenzgen-, „Inseln“ (Pathogenicity Islands)

Virulenzgene sind häufig mobile genetische Elemente (z. B. Plasmide). Das Gen für das weiter oben erwähnte TSST-1 befindet sich ebenfalls auf einem mobilen genetischen Element. Diese Elemente werden häufig durch Phagenkonversion in das Bakteriengenom eingebracht, es gibt aber auch den umgekehrten Fall, nämlich, dass Virulenzgene durch Prophagen inaktiviert werden. Darüberhinaus können Virulenzgene auch auf Plasmiden lokalisiert sein.

3.4 Der Wirtsorganismus

S. aureus ist nicht obligat pathogen, es gibt zahlreiche klinisch unauffällige Keimträger. Die Pathogenität des Erregers lässt sich nicht einzelnen Faktoren zuschreiben, sondern ist vielmehr ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Die Wichtigkeit einzelner Virulenzfaktoren hängt von der spezifischen Infektionsform ab. Dies bedeutet aber nicht, dass bestimmte Virulenzfaktoren einzelnen Infektionsformen eindeutig zugeschrieben werden können (60). *S. epidermidis* verursacht nur bei bestimmten Patientengruppen eitrige Infektionen. Zu diesen Gruppen gehören vor allem durch Krankheit oder Chemotherapie immunsupprimierte Patienten, insbesondere bei erniedrigter Zahl der neutrophilen Granulozyten, Drogensüchtige mit intravenösem Gebrauch von Rauschmitteln, Patienten mit intravaskulären Kathetern, Prothesen oder Implantaten (30,82). Beim Einbringen dieser Fremdkörper in den Körper gelangen gleichzeitig die Erreger von der Hautoberfläche in das Körperinnere.

3.4.1 Abwehrmechanismen des Wirts

3.4.1.1 Polymorphkernige Leukozyten

Sie stellen einen wesentlichen Verteidigungsmechanismus des Immunsystems gegen Staphylokokken dar. Sie werden z. B. durch CSFs (siehe 2.4.1.2) aktiviert. Weitere chemotaktisch wirksame Substanzen sind Bakterienprodukte, aktivierte Komplementfaktoren, Interleukine, Arachidonsäuremetaboliten, usw. Diese Substanzen binden an Rezeptoren der polymorphkernigen Leukozyten, wodurch dann über eine von G-Proteinen gesteuerte Kaskade Adhäsionsmoleküle an der Leukozytenoberfläche exprimiert werden (Selektine, Integrine). Erst jetzt ist den Leukozyten die Adhäsion an das Gefäßendothel möglich und die Migration in Richtung des Infektionsortes (Diapedese), indem sie dann das Endothel durchdringen und ins Bindegewebe gelangen. Dort phagozytieren sie dann die bereits mit Antikörpern oder Komplementfaktoren opsonierten Bakterien (24,74,81). Ineffektiv ist die Leukozytenfunktion bei Staphylokokkeninfektionen mit Biofilmbildung. Die Leukozyten können zwar den Biofilm penetrieren, aber die Phagozytose der Staphylococcen ist aufgrund gehemmter Interleukin- und Zytokinfreisetzung inhibiert. Somit das empfindliche Zusammenspiel einzelner Abwehrkomponenten gestört (43).

3.4.1.2 Zytokine

Die Zytokine vermitteln die Abstimmung einzelner Komponenten der Abwehr. Sie sind Signalmoleküle zur Kommunikation zwischen den Zellen. Sobald Makrophagen und Monozyten Bakterien aufnehmen, wird zuerst TNF α freigesetzt. Danach werden dann CSFs,

IL-1 und IL-6 von Fibroblasten, von B-Lymphozyten ebenfalls IL-1, zusätzlich IL-10 und IL-12 freigesetzt. T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen setzen auch TNF α frei, die T-Lymphozyten bilden noch IL-6 und IL-10. Zytokine der frühen Abwehrphase sind eindeutig TNF α und IL 1. IL 12 induziert die Bildung von INF γ in NKs, welches bei Makrophagen die Bildung von inflammatorischen Zytokinen bewirkt. Das Zytokinsystem ist sehr komplex und leicht aus dem Gleichgewicht zu bringen, wenn z. B. ein Zytokin überexprimiert wird (74,81).

3.4.1.3 Fibrinogen, Fibronectin

Fibronectin und Fibrinogen sind Bestandteile des Immunsystems. Fibronectin dient einerseits der Verteidigung des Organismus, indem es Bakterien opsoniert, andererseits ist dieses Molekül aufgrund seiner proadhäsiven Funktion bei der Infektions-Pathogenese beteiligt: Fremdkörper, also auch Implantate sind mit Fibrinogen und auch Fibronectin bedeckt. Dieser Umstand ist von Nutzen für Staphylokokken, da diese bei der initialen Kolonisierung an Fibrinogen (bevorzugt von *S. aureus*) und Fibronectin (bevorzugt von *S. epidermidis*) adhären, was durch Rezeptoren in ihrer Zellwand ermöglicht wird. Als „Nebenwirkung“ fördern Fibrinogen und Fibronectin somit auch die Biofilmbildung auf Implantaten (24,81).

3.4.2 Reaktion des Wirts auf Superantigene

3.4.2.1 Erkennung der Superantigene

Superantigene, wie die bereits unter 2.3.2.3 erwähnten Exfoliativtoxine, Enterotoxine und das TSST-1 können lebensbedrohliche Krankheitsbilder verursachen. Die Besonderheit dieser Toxine ist, dass sie nicht in antigenpräsentierenden Zellen prozessiert und dann auf deren Oberfläche präsentiert werden müssen. Sie binden direkt an MHC II auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen, wo sie dann mit dem T-Zellrezeptor (TCR) agieren.

3.4.2.2 T-Zellen

Generell werden alle T-Zellen durch Superantigene stimuliert, dennoch gibt es antigenabhängige Präferenzen, was durch die Komposition des variablen Anteils der β -Kette ($V\beta$) des T-Zellrezeptorkomplexes verursacht wird. Das TSST-1 stimuliert alle T-Zellen, die $V\beta 2$ in ihrem Rezeptorkomplex tragen, was eine Stimulierung von 10-50 % aller T-Zellen zur Folge hat. Durch ein gewöhnliches Antigen werden nur etwa 10000 T-Zellen aktiviert, da hier eine spezifische Interaktion mit den α - und β -Ketten des TCRs obligat ist (10,50). Die Aktivierung durch Superantigene oder normale Antigene hat die gleichen Abläufe zur Folge: IL-2 wird produziert, es erfolgt eine Teilung der T-Zellen. T-Zellen und Makrophagen bilden

TNF- α , IL-1 und INF- γ und setzen diese frei, was bei einer massiven Freisetzung zu einem undichten Kapillarendothel (capillary leak) und zur Hypotension führen kann (10,42).

3.4.2.3 Toxische Effekte der Superantigene

Die eben erläuterten allgemeinen Effekte können durch spezifische Beeinträchtigung der Leberfunktion durch die Superantigene verstärkt werden, weil diese die RNA-Synthese in den Leberzellen hemmen. Das bedeutet wiederum, dass die Synthese der dem capillary leak entgegenwirkenden Plasmaproteine, wie z. B. Albumin, verhindert wird. Weiterhin bedeutet die Blockade der Leberfunktion, dass ungehindert ein „Endotoxin-Spillover“ entsteht, da die filternde Leberfunktion ebenfalls ausfällt. Dies hat eine Überflutung des gesamten Organismus mit Endotoxinen zur Folge, die von Bakterien aus dem Darm, der Vagina oder aus sonstigen Körperregionen stammen. TNF α wird freigesetzt, über das capillary leak kommt es wieder zur Hypotension, im Extremfall zum hypotensiven Schock. Die Superantigene als Toxine haben auch direkte Effekte. Dies lässt sich am Beispiel des TSST-1 verdeutlichen: Es bindet an Endothelzellen, wo es zytotoxisch wirkt. In niedrigen Dosen verursacht es direkt die eben schon erwähnte Undichte der Kapillaren, ohne nennenswerte Zeichen von Toxizität (9,10,42).

3.5 Biofilmformation

Die Formation von Biofilm läuft in zwei Schritten ab: Initial attachment und accumulation. Am besten wurde die Biofilmbildung an *S. epidermidis* untersucht. Die späteren Untersuchungen an *S. aureus* ergaben, dass viele der Ergebnisse, die die Biofilmbildung betreffen, übertragbar sind zwischen den beiden Staphylokokkenspezies (18). Das langsame Wachstum ist ein wichtiger Aspekt in der Bildung von Biofilm. Das schnellste Wachstum ist an der Grenze zwischen Flüssigkeit und Biofilm zu finden, langsameres Wachstum ist in den tieferen Schichten, insbesondere in den Mikrokolonien vorherrschend, da dort die Versorgung mit Nährstoffen schlechter ist (2,28,54,59). Vielleicht liegt die Begründung aber auch in noch ungeklärten Mechanismen innerhalb komplexer Biofilm-Architekturen.

3.5.1 Initial attachment

Darunter versteht man die Zelladhäsion an solide Substrate. Die Zelloberflächencharakteristika des Bakteriums, das Material der Oberfläche an der die Bakterien haften sollen, Ladung der Oberfläche, hydrophobe Wechselwirkungen und Van der Waal's Kräfte sind hierbei entscheidende Faktoren. Auf die erwähnten Zelloberflächencharakteristika soll nun näher eingegangen werden.

3.5.1.1 SSP-1 und 2

„Staphylococcal Surface Proteins“ 1 und 2, hierbei handelt es sich um fimbrienartige Polymere.

3.5.1.2 AtlE

Surface associated autolysin, man findet eine hohe Ähnlichkeit des AtlE bei *S. aureus* und *S. epidermidis*. Es besteht aus zwei bakteriolytisch aktiven Domänen, nämlich einer Amidase und einer Glucosaminidase und drei zentral liegenden repetitiven Sequenzen, die vermutlich wichtig sind für die Adhäsionsfunktion (30).

3.5.1.3 PS/A

PS/A ist ein kapsuläres Polysaccharid bzw. Adhäsine, dem eine zentrale Bedeutung bei der initialen Anlagerung zugesprochen wird. Bei PS/A und dem weiter unten erwähnten PIA handelt sich wahrscheinlich um das gleiche Polysaccharid oder man vermutet zumindest eine enge Verwandtschaft (30,53,67).

3.5.2 Accumulation

Nach der initialen Anlagerung der Bakterien erfolgt nun die Zell-Zell-Adhäsion, es werden mehrere Schichten ausgebildet.

3.5.2.1 PIA

PIA, vermutlich identisch mit dem oben erwähnten PS/A, ist essentiell für diese Phase. Es ist aus einem Polysaccharid I und II aufgebaut. Das Polysaccharid I besteht aus β -1,6-verknüpften Glucosaminoglykanen und kann *in vitro* aus UDP-N-Acetylglucosamin durch das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase hergestellt werden. Das Polysaccharid II ist ähnlich aufgebaut wie Polysaccharid I, es besitzt aber weniger nicht-N-acetylierte Reste und eine kleine Menge an Phosphaten und esterverbundenen Succinylresten. Die kodierenden Gene für PIA sind die *ica*-Gene (siehe 2.6 Quorum sensing und molekulare Grundlagen) (18,30).

3.6 Quorum sensing und molekulare Grundlagen

3.6.1 Accessory gene regulator (=agr)

Bei diesem Regulator handelt es sich um ein „Quorum sensing System“, welches die Expression mehrerer Virulenzfaktoren beeinflusst. Es wird beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase aktiviert und vermittelt den Wechsel der Expression von Genen, die für Oberflächenproteine kodieren zur vermehrten Expression von Genen, die für Exoproteine kodieren (60,79). Die genaue Funktion des *agr*-Systems bei der Regulation

der Biofilmbildung wird anscheinend sehr stark durch äußere Faktoren beeinflusst und variiert bei verschiedenen in Untersuchungen verwendeten *S. aureus*-Stämmen. Der *agr*-Locus besteht aus divergenten Operonen, die durch die Promoter P₂ und P₃ kontrolliert werden. P₂ besteht aus *agrBCDA* und kodiert für die Transkription von RNA II, P₃ für die Transkription von RNA III. RNA III ist das Effektormolekül des *agr*-Locus (85).

3.6.1.1 *agr*-dependent und *agr*-independent pathway

δ-Hämolysin wird direkt durch RNA III kodiert (85). RNA III sorgt darüber hinaus für die Modulation von Zielgenen, die an anderen Genorten lokalisiert sind. Es wird eine erhöhte Expression von sezernierten Virulenzfaktoren bewirkt. Die Expression der Gene für Oberflächenproteine, wie fibronectinbindendes Protein oder oberflächengebundenes Protein A, wird vermindert (85). Die Modulation über RNA III wird als „*agr*-dependent pathway“ bezeichnet. Der *agr*-independent pathway wird unter Umgehung von dem eben erläuterten Mechanismus aktiviert. Hier agiert *sarA* direkt mit den Zielgenen. Man vermutet, dass für die Biofilmbildung möglicherweise dieser Mechanismus der wesentlichere ist (60,79). Vuong et al. (83) zeigten 2000, dass die Adhärenz an Polysterene unter statischen Bedingungen in 78 % der Fälle durch *agr*-defekte Isolate erfolgte. Nur 6 % der adherenten Isolate waren *agr*-positiv (60,79,85).

3.6.2 *sarA*

sarA beeinflusst einerseits den *agr*-dependent pathway, indem es ein Protein kodiert, das an den P₃-Promoter bindet und die RNA III- Transkription stimuliert. Andererseits agiert es unter Umgehung von *agr*, indem es direkt mit dem *ica*-Locus agiert. Es bewirkt hierdurch eine höhere *ica*-Operon-Transkription, supprimiert die Transkription von Genen, die für Proteine kodieren, die am Abbau von PIA beteiligt sind. Es hemmt zusätzlich einen unbekannt Inhibitor der PIA-Synthese, welcher anscheinend durch *sigB* gefördert wird (79). Durch den bereits erwähnten *agr*-dependent pathway müßte theoretisch die Biofilmbildung supprimiert werden, da- wie oben erwähnt- die δ-Toxin-Bildung erhöht und die Bildung von Adhäsionsproteinen vermindert wird. Dies würde implizieren, dass eine Mutation von *sarA* in einer vermehrten Biofilmbildung resultieren würde. Dies wird jedoch nicht von allen Autoren experimentell bestätigt (6). Wahrscheinlich wirkt *sarA* daher noch über andere Wege auf die Biofilmbildung.

3.6.3 *ica*

Der intercellular adhesin (*ica*) locus kodiert die N-Acetylglucosaminyltransferase und ist somit wichtig für die PIA-Synthese (18). Die meisten *Staphylococcus-aureus*-Stämme

verfügen über das *ica*-Operon, unabhängig davon, ob sie gute Biofilmbildner sind oder nicht (6). *icaA* und *icaD* scheinen bei der *in vitro* untersuchten PIA-Synthese durch das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase, mit UDP-N-Acetylglucosaminen als Substrat, eine Rolle zu spielen. IcaR reguliert die Expression von *ica* zusammen mit anderen Faktoren (z. B. TcaR) herunter. Die Transkription von *icaR* erfolgt unabhängig von den anderen *ica*-Genen. Glucose scheint zu bewirken, dass die Expression von *icaR* herunterreguliert wird und die PIA-Synthese zunimmt (36).

3.6.4 SigB

Bei SigB handelt es sich um einen alternativen Transkriptionsfaktor. Er kooperiert mit anderen Regulatoren und ist an der Regulation der *sarA*- und *ica*-Operon-Transkription beteiligt. Wichtig ist seine Funktion auch für die Regulation der Reaktionen des Bakteriums in Hunger- und anderen Stresssituationen, z. B. moduliert er die Expression von *asp23*, einem alkalischen Schockprotein (62). Weiterhin reguliert SigB den Eintritt des Bakteriums in die stationäre Phase.

3.6.4.1 Einfluß von SigB auf die Regulation der Biofilmbildung

SigB scheint die Bildung eines unbekanntes Inhibitors der PIA-Synthese zu fördern. In diesem Fall kann man *sarA* als dazugehörigen Antagonisten bezeichnen, da *sarA* die Bildung dieses unbekanntes Inhibitors hemmt (79). Eine Mutation von *sigB* geht mit einem leichten Abfall der *ica*-Transkription einher, laut der Arbeit von Valle et al. (79) ist der Transkriptionsfaktor SigB im Prozess der Biofilmbildung nur als zweitrangig anzusehen. Anderer Meinung sind Ziebuhr und Rachid et al. (62). Sie zeigten an natürlichen *sigB*-Mutanten, dass diese erst nach Komplettierung mit dem Plasmid pSK9, das *sigB* trägt, in der Lage waren Biofilm zu bilden.

3.6.5 *rbf*

Der *rbf* (=regulator of biofilm formation) gehört vermutlich zur AraC/XylS-Regulatorfamilie und kodiert für ein 190 kDa-Protein. Seine Aktivität ist anscheinend wichtig für spätere Biofilmstadien, außerdem hat er eine besondere Funktion bei der Biofilmbildung, die speziell durch NaCl-Konzentrationen größer als 1,6 % und durch Glucose induziert wird. Besonders in späteren Biofilmstadien scheint Glucose von enormer Wichtigkeit zu sein. Laut Lim et al. besteht kein Einfluß auf die *ica*-Expression (44).

3.6.6 Chaperone

Chaperone ermöglichen die Anpassung des Bakteriums an extreme Umweltbedingungen, z. B. Nährstoffmangel, extreme Temperaturen, pH-Veränderungen und an andere ungünstige Situationen. Sie falten oder entfalten in lebenden Organismen Proteine. Ist das Falten oder Entfalten nicht mehr möglich, fungieren sie als Proteasen (55).

3.6.6.1 Hitzeschockproteine

Sie sind eine Unterklasse der Chaperone und bei vielen Pro- und Eukaryonten vorhanden. Als Beispiele sind die ClpC- und ClpE- ATPase von *Listeria monocytogenes* zu nennen. ClpC scheint an der Expressionsregulation von einigen Virulenzfaktoren beteiligt zu sein und in der Zelladhäsion eine Rolle zu spielen. ClpE ist ein kleineres Protein als ClpC. Es hat eine kleinere spacer-region, eine kürzere N-terminale Region mit möglicherweise einem Zinkfingermotiv. Es fungiert synergistisch mit ClpC in der Zellteilung bei hohen Temperaturen, unter ungünstigen Energie- und Nahrungsbedingungen. In Abwesenheit von ClpC wird seine Expression verstärkt, aber ClpC wird nicht verstärkt exprimiert in der Abwesenheit von ClpE (55). Bei *S. aureus* scheinen die Clp-ATPasen ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen (26), einige bilden durch Assoziation mit der sogenannten ClpP-Peptidase einen proteolytischen Komplex. ClpC, ClpB und ClpL scheinen wichtig für die Vermehrung von *S. aureus* in Epithelzellen zu sein. Von Bedeutung scheint ClpC weiterhin für Vermehrung bei hohen Temperaturen zu sein. Die Rolle der Clp-ATPasen bei der Biofilmbildung wird in der Diskussion erörtert (siehe 5.2.1.1.2).

3.7 Methoden zur Gewinnung von Biofilm

3.7.1 Statische Systeme

3.7.1.1 Methode nach Christensen et al. (16,17)

Es werden 10ml TSB in ein Petri-Röhrchen gegeben, auf Blutagar angezüchtete Staphylokokken hinzugefügt und das Röhrchen dann bei 37 C für 18 Stunden inkubiert. Dann wird das Röhrchen dekantiert. Die Rückstände auf der Innenwand werden mit Safranin oder Trypanblau angefärbt. Der Untersucher gibt auf einer Skala von null (=kein Biofilm) bis drei (=viel Biofilm) eine qualitative Einschätzung des Biofilms ab.

3.7.1.2 Methode nach Prosser et al. (61)

Hier wird ein ähnliches Prinzip verwendet, also ebenfalls eine statische Methode. Anstatt Staphylokokken wird *E. coli* verwendet und anstatt der Petri-Röhrchen Petri-Schalen.

3.7.1.3 Methode nach Freeman et al. (25)

BHI-Agar wird mit Zugabe von 5 % Saccharose hergestellt, nachträglich wird Kongo-Rot hinzugefügt. Durch Betrachten der Agar-Platten kann man schleimproduzierende von nicht-schleimproduzierenden Bakterien unterscheiden: Schleimbildner bilden schwarze, trockene und kristalline Kolonien. Nicht-Schleimbildner bilden pinke Kolonien.

3.7.1.4 „tissue culture plate assay“ (16)

Diese Methode, ebenfalls von Christensen et al. entwickelt, ist eine quantitative, objektivere Methode zur Biofilmmessung. Es erfolgt eine spektrophotometrische Messung von Biofilm in Zellkulturplatten (96 Vertiefungen) mit Hilfe eines Mikro-ELISA-Auto-Reader ($\lambda=570$ nm). Bei Messwerten kleiner oder gleich OD 0,120 liegt keine Biofilmbildung vor, bei Werten zwischen OD 0,120 und OD 0,240 schwache Biofilmbildung und bei Werten größer OD 0,240 starke Biofilmbildung. In jeder Vertiefung befinden sich 0,2 ml Bakterienlösung. Diese wird für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Flüssigkeit wird dann aspiriert, unter Verwendung eines Absaugers. Dann erfolgen vier Waschschrte mit PBS. Anschließend kommt der Färbeschritt mit Hucher-Kristallviolett. Diese Methode wurde von Knobloch et al. (40) im Vergleich zur Kongo-Rot-Agar-Methode nach Freeman et al. und zur Petri-Röhrchen-Methode nach Christensen et al als am Aussagekräftigsten zur Beurteilung der Biofilmbildung befunden.

3.7.2 Fließsysteme

Bei der Verwendung von Fließsystemen ergibt sich oft das Problem, dass nicht mehrere, verschiedene Varianten eines Parameters gleichzeitig getestet werden können. Dies ist z. B. der Fall bei Verwendung mehrerer Materialien, die im Bezug auf die Adhärenz von Bakterien verglichen werden sollen. Die Ergebnisse von der Untersuchung verschiedener Materialien sind dann unter Umständen nicht vergleichbar, da die Rahmenbedingungen nicht völlig identisch sind. Das Gleiche gilt auch für die Untersuchung der Biofilmbildung verschiedener Bakterienstämme. Unterschiede bezüglich der Biofilmbildung können in dem Sinne interpretiert werden, dass unterschiedliche Bakterienstämme in unterschiedlichem Maß zur Biofilmbildung fähig sind. Dies erklärt sich z. B. anhand unterschiedlicher genetischer Ausstattung der Erreger. Die beobachteten Unterschiede können auch so gedeutet werden, dass die Rahmenbedingungen der einzelnen Versuche nicht identisch sind. Durch auch nur minimale Veränderungen könnte der ohnehin sehr empfindliche Prozeß der Biofilmbildung beeinflusst werden.

3.7.2.1 „Pedersen chamber“ und „Robbins Device“

Die „Parallel Plate Chamber“ von Pedersen (58), der „Rotating Annular Reactor“ (78) und das „Robbins Device“ (2,21,23,37,45,70,73) ermöglichen theoretisch bei jedem Durchlauf gleiche Milieubedingungen und ermöglichen somit das Austesten mehrerer, unterschiedlicher Materialien gleichzeitig. Das „Robbins Device“ und der „Rotating Annular Reactor“ ermöglichen weiterhin, dass prinzipiell zusätzlich einzelne Proben entnommen werden können, ohne eine Störung des gesamten Systems. Im „Rotating Annular Reactor“ können außerdem die Rotationsgeschwindigkeit des Zylinders und der Scherstress in der Kammer eingestellt werden.

Die Voruntersuchungen mit dem „Robbins Device“ ließen die Verwendung dieses Instrumentes zur Generation von Staphylokokken-Biofilmen am Geeignetsten erscheinen. Seine Verwendung wurde daher zu einem zentralen Bestandteil dieser Dissertation gemacht.

3.8 Fragestellung

1. Ist das MRD als *in vitro* System zur Untersuchung von *Staphylococcus aureus* Biofilmen prinzipiell für die mikrobiologische Forschung etablierbar?
2. Falls ja, soll eine Abhängigkeit von Bakterienwachstum und Biofilmbildung im MRD unter einfachen Modifikationen von folgenden Parametern aufgezeigt werden: Der Glukosekonzentration im Nährmedium, die Position der untersuchten Silikonscheibchen im Fließkanal und der Versuchslaufzeit.
3. Unter Beachtung der methodischen Anforderungen für den Einzelversuch soll danach eine Stellungnahme zur Validität und Reproduzierbarkeit der Biofilmbildung unter Verwendung des MRD Stellung genommen werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Die folgenden Bakterienstämme wurden für die quantitative Testung auf Biofilmbildung durch Mikrotiterplattenversuche sowie im MRD verwendet. Ein Teil der Versuche mit dem MRD wurde in der Steril-Werkbank durchgeführt.

4.1.1.1 *S. epidermidis* RP62A

Bei diesem Stamm handelt es sich bekanntermaßen um einen guten Biofilmbilder, er wurde zwischen 1979 und 1980 von Christensen et al. im Rahmen von Untersuchungen an Sepsisfällen, welche durch *S. epidermidis*-assoziierte Katheterinfektionen verursacht wurden, isoliert (5,15). Er diente im Mikrotiterplattenversuch als Positivkontrolle.

4.1.1.2 *S. aureus* DSM20231

Hierbei handelt es sich um einen Standard-Laborstamm, hinterlegt bei der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ in Braunschweig. Aus mehreren Untersuchungen ist bekannt, dass er über eine gute Fähigkeit zur Biofilmbildung verfügt (4,5,31,46). Dieser Stamm wurde im Mikrotiterplattenversuch und im MRD auf Biofilmbildung untersucht. Ebenfalls zur Untersuchung auf Biofilmbildung im Mikrotiterplattenversuch wurde eine *clpC*-Mutante (PBM001) verwendet. Ihr wurde mit dem Vektor *pclpC::ermB* eine Erythromycin-Kassette in das *clpC*-Gen eingefügt, wodurch das Gen nicht mehr transkribierbar war. Zusätzlich benutzte man eine wieder mit dem Vektor *pCX19clpC* komplementierte Mutante (MGM001). Das Gen *clpC* war bei diesem Bakterium somit wieder funktionell (46). Beide Mutanten sind genveränderte Varianten des Wildtyps DSM20231.

4.1.1.3 *S. carnosus* TM300

S. carnosus TM300, ein apathogener Erreger, wurde als Negativkontrolle bei der Untersuchung von Biofilmbildung auf Mikrotiterplatten verwendet, da es sich um einen nur schwachen Biofilmbildner handelt (15,72).

4.1.2 Chemikalien

Tabelle 1 zeigt eine Auflistung der verwendeten Chemikalien:

Tabelle 1

Chemikalien	Hersteller
Bacto Tryptic Soy Broth (TSB)	BD (Heidelberg)
- Pankreatisch abgebautes Casein	17,0 g/l
- Enzymatisch abgebautes Sojamehl	3,0 g/l
- Dextrose	2,5 g/l
- Natriumchlorid	5,0 g/l
- Dikaliumphosphat	2,5 g/l
Difco Tryptic Soy Agar (TSA)	BD
- Pankreatisch abgebautes Casein	15,0 g/l
- Enzymatisch abgebautes Sojamehl	5,0 g/l
- Natriumchlorid	5,0 g/l
- Gelose	
Blutagar	
- TSA (siehe oben) mit 5 % Schafsblut	
D-(+)-Glukose	Roth (Karlsruhe)
- als Zugabe zu TSB und als 5 %-ige Glukoselösung (5 g in 100 ml destilliertem Wasser)	
Chloramphenicol	Sigma- Aldrich (Taufkirchen)
- in absolutem Ethanol gelöst	
Erythromycin	Fluka (siehe Sigma-Aldrich)
- in absolutem Ethanol gelöst	
Destilliertes Wasser	
Phosphate- buffered Saline (PBS)	Riedel-de Haen (siehe Sigma- Aldrich)
- Natriumchlorid	8,0 g/l
- Kaliumchlorid	0,2 g/l
- Dinatriumhydrogenphosphat	1,44 g/l
- Natriumdihydrogenphosphat	0,24 g/l
Adjustierung des pHs auf 7,4 mit Salzsäure	Merck (Darmstadt) Merck
Safranin- Pulver	Merck
- verarbeitet als 0,1 %ige Safraninlösung (0,1 g Safranin- Pulver in 100 ml destilliertem Wasser)	
Ethanol 70 %-ig als Sprühdesinfektion	

Frekanol als Sprühdesinfektion, enthalten sind in 100 g:	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
- Ethanol	42 g
- Glyoxal	0,16 g
- Didecyl-Dimethylammonium-Chlorid	0,04 g
- Hilfsstoffe	
Epiglue Gewebekleber als Lösung/Solution, enthalten sind in 0,1 g:	Meyer-Haake (Wehrheim)
- Ethyl-2- Cyanoacrylat	95,45 mg/l
- Polymethylacrylat	

4.1.3 Spezielle Laborgeräte

4.1.3.1 Mikro-ELISA-Reader

Die optischen Dichten der angefärbten Biofilme im Rahmen der Mikrotiterplatten-Versuche wurden mit dem Mikro-ELISA-Reader Multiskan MCC/340 MK II der Firma Titertek (Huntsville, Alabama, USA) gemessen.

4.1.3.2 Photometer

Die optischen Dichten der Übernachtskulturen und Starterkulturen wurden mit dem Photometer Gene Quant Pro der Firma Amersham (Freiburg) gemessen.

4.1.3.3 Vortexer

Zum Vortexen wurde das Model VF2 von IKA-Labortechnik (Staufen) benutzt.

4.1.3.4 Ultraschallgerät

Zum Ablösen der Biofilmbakterien von den Silikonscheibchen wurde ein Ultraschallgerät mit Schwingsonde (Labsonic 1510) von B.Braun Melsungen) benutzt.

4.1.3.5 API und Vitek

Die Systeme API ID 32 Staph und Vitek 2 von Bio Merieux (Marcy-l'Etoile, Frankreich) wurden zur Identifizierung von Bakterien verwendet.

4.1.3.6 Schüttler

Die Übernacht- und Starterkulturen wurden in einem Schüttelinkubator System (Multitron II) von dem Hersteller Infors (Einsbach) inkubiert.

4.1.3.7 Brutschrank

In einem Wärme- und Trockenschrank der Baureihe 5000 von Heraeus (Hanau) wurden die auf Blutagar ausgestrichenen Bakterien bzw. die auf TSA ausplattierten Verdünnungsreihen bei 37° C über Nacht bebrütet.

4.1.3.8 Steril-Werkbank

Der Versuchsaufbau des MRD unter sterilen Bedingungen wurde unter Nutzung der Steril-Werkbank Hera Safe von Heraeus etabliert.

4.1.3.9 Benutzte Geräte für den Versuchsaufbau des MRD

4.1.3.9.1 Modifiziertes Robbins Device (MRD)

Das hier benutzte Robbins Device (siehe Abbildung 1 und 2) war nach den Spezifikationen von Evans und Holmes (23) nachgefertigt worden. Es handelt sich um eine Version aus rostfreiem Stahl, mit einem Faßvermögen von 16 ml Volumen in seinem Fließkanal. Der Kanal ist von einer Gummidichtung umgeben. Die 25 entnehmbaren Stahlstempel stehen mit ihrem unteren Ende, das ebenfalls durch Gummi abgedichtet ist, mit dem Fließkanal in Kontakt. Durch Schrauben am oberen Ende ist einstellbar, wie weit die angebrachten Testmaterialien in den Kanal hinein ragen. Durch Schrauben, die die untere und obere Hälfte des Devices verbinden, wird sichergestellt, dass das System im Inneren des Devices keine Berührung mit der Umgebung hat. Durch die unten aufgeführten Apparaturen und Schlauchsysteme wurde das Device für die hier durchgeführten Versuche modifiziert. In dieser Arbeit wird von einer modifizierten Variante des Robbins Device (MRD) gesprochen, da es gegenüber dem ursprünglich von Robbins beschriebenen Gerät ein verändertes Design aufweist.

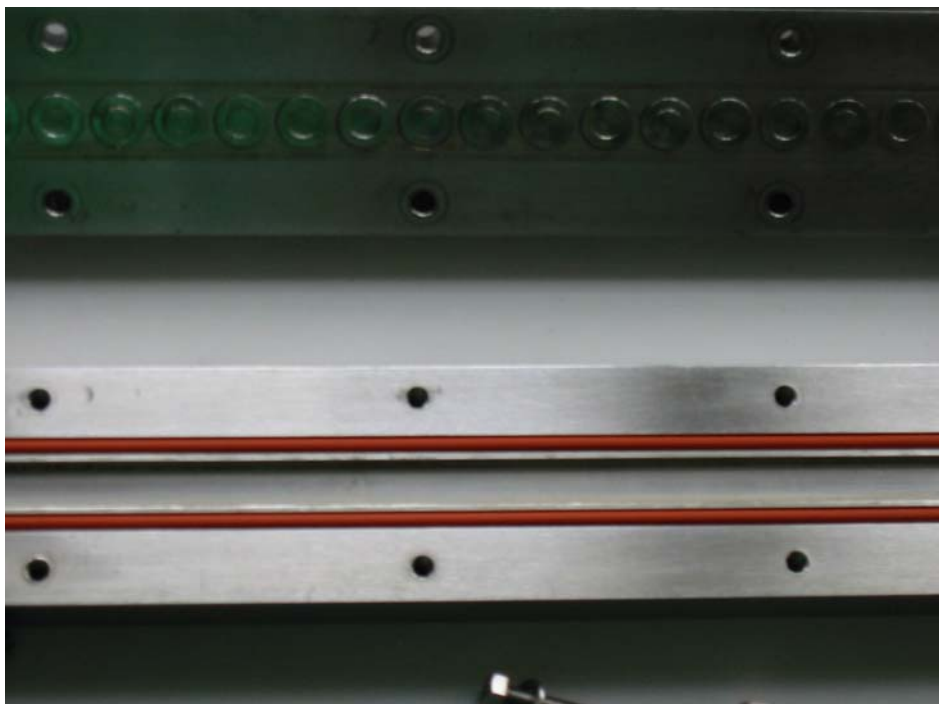


Abbildung 1 Eröffnetes MRD



Abbildung 2 Aufsicht MRD

4.1.3.10 Schlauchpumpe

Zum Transport der flüssigen Medien durch das MRD, wurde die Reglo Digital Schlauchpumpe von Ismatec (Glattbrugg, Schweiz) verwendet.

4.1.3.11 Temperiertes Wasserbad

Das Wasserbad bestand aus einem Transportbehälter von VWR (Bruchsal), der vor dem Einbringen unter die Sterilbank mit destilliertem Wasser gefüllt wurde. Das Einhängethermostat EH 2 von IKA-Labortechnik temperierte das Wasser auf 37° C.

4.1.3.12 Magnetrührer

Der Transportbehälter wurde unter der Sterilbank auf eine Magnet-Rührplatte aus Metall (IKAMAG EOA 9) gestellt, die über ein Kabel an den Laborreagenzienmischer ES 5, beides von der Firma IKA-Labortechnik, angeschlossen war, um später den Magnetührstab in den Starterkulturen zum Rotieren bringen zu können.

4.1.3.13 Heizbank

Eine Heizbank zur Trocknung lichtmikroskopischer Objektträger-Präparate erwies sich als geeignet zur homogenen Temperierung des MRD bei 37° C.

Tabelle 2 zeigt eine Auflistung der verwendeten Materialien für den Versuchaufbau des modifizierten Robbins Device.

Tabelle 2

Arbeitsmaterial	Hersteller
Schlauchmaterial	
-Silikonschläuche: ID 5 mm x AD 8 mm ID 6 mm x AD 9 mm ID 8 mm x AD 1,2 cm	Bezug aus dem Magazin des UKS
-Pumpschläuche (Tygon R 3607): ID 1,52 mm; Wanddicke 0,86 mm	Ismatec
Silikonscheibchen: D 6 mm; Wanddicke 1,5 mm	Herstellung durch Ausstanzen aus den oben erwähnten Silikonschläuchen
Schlauchverbindungen	
-Übergangsstücke aus Polypropylen (Schlauch IDMR 3-6/7-11 mm)	VWR
-Schnellkupplungen (zweiteilig)	Ismatec
Filterhalter aus Plastik (Selectron FP 050/1)	Schleicher und Schuell (Dassel)
Filter	
- Membranfilter aus Celluloseacetat (OE 66) D 50 m, Porengröße 0,2 µm	Schleicher und Schuell
- Vorfilter aus Glasfaser (GF 92) D 40 mm	
Behältnisse	
-Polypropylenflaschen mit vier Liter Faßvermögen	Nalgene (Hereford, UK)
Flaschenverschluß: aus Plastik mit 9 mm-Bohrung	Bohrung wurde in den Werkstätten des UKS durchgeführt.

4.2 Methoden

4.2.1 Kulturen

4.2.1.1 Anzüchten der Bakterien

Die benötigten Bakterienstämme wurden über Nacht bei 37° C im Brutschrank auf Blutagar angezüchtet. Bei den genveränderten Stämmen wurde der Agar entsprechend mit Antibiotika

versetzt: Der Agar für die *clpC*-defizienten Mutant enthielt Erythromycin in einer Endkonzentration von 10 µg/ml, der der wieder komplettierten Mutante Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 10 ng/ml.

4.2.1.2 Anlegen der Übernachtskultur

Die Übernachtskulturen der Bakterien wurden in 15 ml TSB angelegt. Mit einer Plastiköse wurden drei bis vier Kolonien von der jeweiligen Blutagarplatte abgetragen und in das Nährmedium gegeben. Die Bakterien wuchsen dann im Schüttler bei 37° C und 150 rpm für ungefähr 18 Stunden. Anschliessend wurde die optische Dichte mit dem Photometer gemessen.

4.2.1.3 Anlegen der Starterkultur

20 ml TSB wurden in einen 100 ml-Kolben gegeben, weiterhin wurden 0,25 % Glukose hinzugefügt. Es wurde die benötigte Menge an Übernachtskultur berechnet, die dem eben genannten Volumen zugegeben werden musste, um eine optische Dichte von 0,1 zu erreichen. Die berechnete Menge Übernachtskultur wurde dann in den Kolben dazugegeben. Die neue Kultur, die hier als Starterkultur bezeichnet wird, wuchs im Schüttler bei 37° C und 150 rpm, bis sie eine optische Dichte im Bereich von 1 erreicht hatte. Diese Starterkultur wurde dann in eine 2 l Glasflasche umgefüllt, in der bereits ein Magnetührstab lag. Bevor die Kultur zur Inokulation des MRD benutzt wurde, gab man noch 100 ml TSB oder alternativ 100 ml TSB mit einem Zusatz von 2 % Glukose hinzu.

4.2.1.4 Messen der optischen Dichte von Kulturen mit dem Photometer

Falls eine optische Dichte über 1 zu erwarten war, wurden 900 µl TSB in ein Reaktionsgefäß des Herstellers Eppendorf (Hamburg) gegeben und 100 µl der zu messenden Kultur dazu pipettiert. War eine optische Dichte von kleiner 1 wahrscheinlich, wurden nur 1 ml der zu messenden Kultur in das Reaktionsgefäß gegeben. Im Anschluß wurde das Reaktionsgefäß auf maximaler Stufe für eine Minute gevortext. Die Messung erfolgte im Zellkultur-Programm des Photometers, bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die zu messenden Kulturen wurden zuvor in Küvetten pipettiert. Wurden 1ml unverdünnte Bakterienkultur gemessen, war das Photometer auf Faktor 1 einzustellen, bei einer 1:10 verdünnten Kultur auf Faktor 10. Vor der eigentlichen Messung wurde zur Kalibrierung des Geräts 1 ml reines TSB gemessen.

4.2.2 Vorversuche

4.2.2.1 Mikrotiterplattenversuche (5,16)

4.2.2.1.1 Ermittlung der Fähigkeit der einzelnen Bakterienspecies zur Biofilmbildung unter statischen Bedingungen

Von *S. epidermidis* (Stamm RP62A), *S. aureus* (Stamm DSM20231, PBM001 und MGM001) und *S. carnosus* (Stamm TM300) wurden Übernachtskulturen angesetzt, wobei den Übernachtskulturen der gentechnisch veränderten Organismen Antibiotika hinzugefügt wurden: Zu den 15 ml TSB Übernachtskultur der *clpC*-defizienten Mutante wurde Erythromycin supplementiert (in einer finalen Konzentration von 10 µg/ml) und zu der Kultur der wieder komplementierten Mutante Chloramphenicol (ebenfalls in einer Endkonzentration von 10 µg/ml). Nach 18 Stunden im Schüttler wurde die optische Dichte gemessen. Anschließend verdünnte man die jeweilige Übernachtskultur 1:100 mit einer TSB-Glukosemischung (Zugabe von 0,25 % Glukose zum ansonsten wie in Tabelle 1 aufgeführt zusammengesetzten TSB-Medium) und gab jeweils 200 µl der verdünnten Lösung in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte (Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen von Sarstedt Inc., Newton, USA), auf diese Weise wurde 1 ml Lösung auf fünf Vertiefungen einer Reihe der Mikrotiterplatte verteilt. Eine Reihe mit reiner TSB-Glukose-Lösung diente als Kontrollreihe. Die Mikrotiterplatte wurde nun im Brutschrank bei 37° C für 24 Stunden bebrütet. Nach 24 Stunden wurde das Medium aus jeder Vertiefung abpipettiert, es folgten zwei Waschschritte mit PBS. Dann wurde die Mikrotiterplatte vorsichtig ausgeklopft und für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet, danach wurde in jede Vertiefung 100 µl Safraninlösung gegeben, was für 30 Sekunden einwirkte. Hiernach wurde die Platte wieder ausgeklopft und noch einmal mit PBS gespült. Der Grad der Biofilmbildung wurde nach dem Trocknen durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 492 nm quantifiziert.

4.2.2.1.2 Ermittlung des Einflusses der Glukosekonzentration auf die Biofilmbildung von DSM20231 unter statischen Bedingungen

Von *S. aureus* DSM20231 wurde eine Übernachtskultur angesetzt wie oben beschrieben. Die Übernachtskultur wurde wieder 1:100 mit einer TSB-Glukose-Lösung verdünnt. Dieses Mal wurde der Glukosegehalt der TSB-Glukose-Mischung in den verschiedenen Reihen variiert. Die erste Reihe enthielt nur TSB-Medium, dem 0,25 % Glukose hinzugefügt worden waren, als Kontrolle, die folgenden Reihen die verdünnte Übernachtskultur mit den unterschiedlichen Glukosekonzentrationen im Nährmedium. In der zweiten Reihe war dem TSB 1 % Glukose

zugefügt, in der Dritten 1,5 % Glukose, in der Vierten 2 %, in der Fünften 2,5 %, in der Sechsten 3 %, in der Siebten 4 % und in der Achten 5 %. Ansonsten wurde das gleiche Prozedere wie unter 3.2.1.1.1 durchgeführt.

4.2.2.1.3 Versuche mit dem MRD außerhalb einer Steril-Werkbank

Es wurde, wie bereits beschrieben, eine Übernachtskultur des *S. epidermidis* RP62A und alternativ des *S. aureus* DSM20231 angelegt. Am nächsten Tag wurde eine Starterkultur hergestellt: Lediglich 20 ml TSB unter Zugabe der Übernachtskultur, ohne Zufügen von Glukose. Die Kulturen wurden unter sterilen Bedingungen, also unter Benutzung einer Sterilbank, angesetzt. Zum Festlegen des Versuchsaufbaus und des Versuchsprotokolls wurden einige Versuche mit dem MRD außerhalb einer Sterilbank vorgenommen. Hierzu wurde das MRD an einem vorher mit Frekanol desinfiziertem Arbeitsplatz aufgebaut und über Silikonschläuche mit einem ID von 6 mm und einem AD von 9 mm zur einen Seite mit einem Abflußbehältnis und zur anderen Seite mit den Schnellkupplungen der Schlauchpumpe verbunden. Vor die Schlauchpumpe war wiederum ein Silikonschlauchstück mit den eben angegebenen Maßen geschaltet, welches auch durch ein Schnellkupplungsset mit der Pumpe verbunden war. Das freie Schlauchende tauchte durch einen mit einer 9 mm breiten Bohrung versehenen Flaschenverschluß in eine ein-Liter-Glasflasche, in die Starterkultur hinein. Die Pumpe wurde auf eine Fließgeschwindigkeit von 499 µl/min eingestellt. Mit dieser Geschwindigkeit floß die Starterkultur für zwei Stunden durch das Device. Anschließend wurde die Pumpe abgeschaltet, so dass die Flüssigkeitssäule über Nacht stand. Nach 24 Stunden wurde ein Stempel entfernt und auf die Anwesenheit von makroskopisch sichtbarem Biofilm untersucht.

4.2.3 Versuchsaufbau und -durchführung mit dem MRD unter sterilen Bedingungen (23,39,45,70,73)

4.2.3.1 Vorbereitung der Sterilbank

Die Versuche unter sterilen Bedingungen wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Diese wurde durch gründliche Sprühdesinfektion mit Frekanol gereinigt und nach Aufbau des Wasserbades und der Heizbank mit UV-Licht für 20 Minuten bestrahlt.

4.2.3.2 Anbringen der Silikonscheibchen an die Stempel

Das autoklavierte, in Alufolie eingewickelte Robbins Device wurde unter die laufende Sterilbank gebracht und unter Vermeidung von Berührungen zwischen der Alufolie und der Arbeitsfläche ausgepackt. Vor dem Ablegen des MRD auf der Arbeitsfläche wurde die

vorgesehene Stelle nochmals mit Frekanol besprüht. Nun wurde die gewünschte Zahl an zu beklebenden Stempel aus dem MRD entfernt und mit der zu beklebenden Fläche nach oben auf der Arbeitsfläche abgestellt. Dann wurde bei einem Stempel nach dem anderen die zu beklebende Fläche, durch Betätigung einer Schraube, 1,5 mm nach innen in den Stempel hineingedreht. Dies entsprach der Dicke der verwendeten Silikonscheibchen; es wurde so sichergestellt, dass die Scheibchen zwar Kontakt mit dem Fließkanal im MRD hatten, aber nicht so weit in ihn hinein ragten, das nennenswerte Turbulenzen in der Strömung entstehen konnten. Die sterilen Scheibchen wurden nur mit einer sterilisierten, bei jedem Scheibchen neu abgeflammt, Pinzette berührt. Während des Haltens mit der Pinzette wurde ein Tropfen sterilen Gewebeklebers auf die Rückseite des Scheibchens aufgebracht, dann wurde es an den Stempel angebracht und kurz mit der Pinzette angedrückt. Jetzt wurde der fertig beklebte Stempel wieder in das Device eingedreht. Nachdem alle Stempel beklebt waren, wurde die Arbeitsfläche noch mal 20 Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Das soeben beschriebene Bekleben wurde mit sterilen Handschuhen ausgeführt.

4.2.3.3 Spülen des MRD mit sterilem Wasser

Vor diesem Schritt erfolgte, gemäß der Bedienungsanleitung, die Kalibrierung der Pumpe auf eine Fließrate von 499 $\mu\text{l}/\text{min}$, das Einschalten des Wasserbades und der Heizbank. Dann wurden die Schläuche angebracht: In diesem Arbeitsschritt wurde nur Silikonschlauch mit einem ID von 6 mm und einem AD von 9 mm verwendet. Ein langes Schlauchstück leitete die Flüssigkeit aus dem MRD in den Abfallbehälter ab, ein kurzes Schlauchstück verband das Device mit der Pumpe. Ein etwas längeres Schlauchstück war ebenfalls zum einen Ende über den Pumpschlauch mit der Pumpe verbunden, das andere Ende hing durch einen Flaschenverschluß mit Bohrung in eine 100 ml-Glasflasche mit 30 ml autoklaviertem Wasser. Dieses Wasser wurde zur Spülung des MRD bei oben genannter Fließrate benutzt.

4.2.3.4 Inokulation des Systems mit der Starterkultur

Wie unter 3.2.1.3 beschrieben wurde die Starterkultur mit 100 ml sterilem TSB, welches einen Zusatz von 2 % Glukose zu den in Tabelle 1 aufgeführten Komponenten hatte, vermischt. Die Flasche wurde in das Wasserbad gestellt. Nachdem der stabile Stand der Glasflasche im Wasserbad gewährleistet war, wurde ein neuer Flaschenverschluß mit einer 9 mm breiten Bohrung vorsichtig auf den Flaschenhals geschraubt. Der autoklavierte Flaschenverschluß wurde erst unter der Sterilbank aus seiner sterilen Verpackung entfernt, möglichst ohne Berührung der Innenseite des Verschlusses. Unter Verwendung steriler Handschuhe wurde dann das freie Ende des Silikonschlauches, der vorher wie unter 3.2.3.3

beschrieben in der Glasflasche mit Wasser tauchte, durch die Bohrung im Flaschenverschluß in die Glasflasche mit der Bakterienlösung transferiert. Dabei war zu beachten, nicht den Teil des Schlauches mit den Händen zu berühren, der anschließend in die Flasche eingebracht wurde. Die Pumpe wurde wieder mit einer Fließrate von 499 µl/min für vier Stunden in Betrieb genommen.

4.2.3.5 Anbringen der Nährlösung

Nach vier Stunden wurden alle Schläuche aus dem System entfernt und durch neue, sterile ersetzt. Silikonschlauchstücke mit einem ID von 6 mm und AD von 9 mm wurden erneut als Abflußschlauch, der aus dem Device herausführte und als Einflußschlauch, der unmittelbar in das Device hineinführte, verwendet. Dieser Einflußschlauch war durch ein Übergangsstück mit Silikonschlauch, dessen ID 8 mm und dessen AD 1,2 cm betrug, verbunden. Am dickeren Schlauch war der Plastikfilterhalter mit dem Membranfilter und Vorfilter angebracht. Nach dem Filterhalter folgte wieder ein Stück dickerer Silikonschlauch und ein Übergangsstück, das eine Verbindung mit einem dünneren Schlauchstück (ID 6 mm x AD 9 mm) ermöglichte. Dieser Schlauch stand dann über ein Schnellkupplungsset mit dem Pumpschlauch in Kontakt, dessen anderes Ende dann über ein weiteres Schnellkupplungsset mit Silikonschlauch (ID 5 mm x AD 8 mm) konnektiert war. Dieser dünnere Schlauch hing dann durch die völlig abgedichtete Verschlußkappe in eine Polypropylen-Flasche, die vier Liter TSB oder alternativ vier Liter TSB mit einem 2 %-igem Glukosezusatz fasste. Generell war bei dem Austauschen der Schläuche darauf zu achten, nicht deren Öffnungen oder Teile zu berühren, die später mit der sterilen Nährlösung in Kontakt kamen, die Endungen der Schläuche und kontaminationsgefährdete Stellen am MRD wurden vor dem Zusammenstecken des Schlauchsystems noch mit Ethanol besprüht. Alle eben beschriebenen Teilschritte des Versuchs waren wieder unter Tragen von sterilen Handschuhen auszuführen.



Abbildung 3 Versuchsaufbau: 1 Robbins Device 2 Schlauchpumpe 3 Polypropylenflasche mit Nährlösung 4 Transportbehälter 5 Filterhalter 6 Einhänge-Thermostat 7 Heizbank



Abbildung 4 Übersicht des Versuchsaufbaus: Der Pfeil markiert den Abfluß über einen Silikonschlauch in eine Polypropylenflasche, die als Abfallbehältnis dient.

4.2.3.6 Variante des Versuchaufbaus ohne Filter im System

Bei dieser Variante des Versuchaufbaus wurde der Filterhalter mit dem Membran- und Vorfilter nicht in das System eingebracht. Zwischen Pumpe und MRD wurde daher nur ein Silikonschlauchstück mit den mittleren Durchmessern (ID 6 mm x AD 9 mm) eingebracht, ansonsten bestand der gleiche Aufbau und die gleiche Durchführung wie unter 3.2.3.1 bis 3.2.3.5 erläutert wurde.

4.2.4 Sterilisation der Arbeitsmaterialien

Das MRD wurde in Alufolie eingewickelt und im Feststoffprogramm des Dampfsterilisator Varioklav Typ 400 EC (H+P Labortechnik, Oberschleißheim) autoklaviert (121° C, 20 Minuten., 1 bar Überdruck). Die Silikonschläuche, der Filterhalter, die Übergangsstücke, der Magnetührstab, der Flaschenverschluß mit Bohrung und die ausgestanzten Silikonscheibchen waren zum Autoklavieren in Bechergläsern, die mit Alufolie verschlossen wurden, verpackt. Die Polypropylen-Flasche wurde mit ihrem dazugehörigen Deckel und die Pinzetten in Alufolie gewickelt ebenfalls im Feststoffprogramm autoklaviert. Der Filterhalter wurde vorher schon mit dem Membran- und Vorfilter versehen. Die Pumpschläuche und Schnellkupplungen wurden bereits zusammengesteckt, also in der Kombination von zwei Schnellkupplungs-Sets mit einem Pumpschlauch, in Folie eingeschweißt und mit Ethylenoxid sterilisiert.

4.2.4.1 Sterilisation der Nährmedien oder anderer Lösungen

TSB zum Ansetzen der Übernachts- und Starterkulturen wurde im Flüssigkeitsprogramm sterilisiert. Das TSB mit 2 %-igem Glukosezusatz wurde vor der Sterilisation mit 20 g/l Glukose versetzt und in autoklavierbare Glasflaschen umgefüllt. Die Lösung wurde dann im Flüssigkeits-Programm autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden dann vier Liter unter sterilen Bedingungen in die bereits sterile Polypropylenflasche gefüllt. Das für 3.2.2.1.2 verwendete TSB-Medium wurde mit den unterschiedlichen, benötigten Glukosekonzentrationen versetzt und anschließend autoklaviert. Für 3.2.2.1.1 wurde zum sterilen TSB 0,25 % von der sterilfiltrierten 5 %-igen Glukoselösung hinzugegeben. Die Safraninlösung und die 5 %-ige Glukoselösung wurden mit Filtrationseinheiten (Porengröße 0,2 µm) von Sarstedt sterilfiltriert.

4.2.5 Versuchsauswertung

4.2.5.1 Entnahme der Silikonscheibchen

Zur Entnahme der besiedelten Silikonscheibchen wurde die Pumpe am gewünschten Zeitpunkt gestoppt und, unter Tragen von sterilen Handschuhen, der gewünschte Stempel aus dem Device entfernt. Die Schraube dieses Stempels wurde mit dem Silikonscheibchen weiter herausgedreht, zum leichteren Zugang. Dann wurde das Scheibchen mit einer abgeflamten Pinzette vorsichtig an seinen Rändern gegriffen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß, das 1 ml TSB enthielt, überführt.

4.2.5.2 Ablösen der Biofilmbakterien von den Silikonscheibchen

4.2.5.2.1 Mittels Ultraschallsonde

Das Reaktionsgefäß wurde für diesen Vorgang in einem Styroporbehälter mit Eis gelagert. Vor Benutzung wurde die Ultraschallsonde mit Ethanol gereinigt. Nach Einstellung des Gerätes auf 100 Watt wurde die Sonde circa zehn Mal für acht Sekunden in das Reaktionsgefäß mit dem Silikonscheibchen getaucht. Die Ultraschallsonde befand sich unter einem sterilen Abzug.

4.2.5.2.2 Mittels Vortexen

Als Alternative zur Ablösung der Bakterien durch Ultraschall wurde das Ablösen durch Vortexen versucht: Das verschlossene Reaktionsgefäß inklusive Silikonscheibchen wurde für drei Minuten auf maximaler Stufe gevortext.

4.2.5.3 Erstellung einer Verdünnungsreihe

Nach dem Schritt zum Ablösen der Bakterien wurde unter sterilen Bedingungen eine Verdünnungsreihe mit TSB erstellt: Aus dem Reaktionsgefäß mit den abgelösten Bakterien wurden 100 µl entnommen und in ein Reaktionsgefäß mit 900 µl TSB pipettiert. Nach erneutem Vortexen für eine Minute wurden aus diesem wiederum 100 µl entnommen und in 900 µl TSB gegeben. Diese Schritte wurden weiter durchgeführt bis zum Erreichen der gewünschten Verdünnung. Bei einer Scheibchen-Entnahme nach 24 Stunden wurde die Verdünnung bis zu 10^{-4} durchgeführt, bei den Probe-Entnahmen aus dem MRD nach 48, 72 und 96 Stunden bis 10^{-8} .

4.2.5.4 Ausstreichen auf Agar

Nach dem Erstellen der Verdünnungsreihe wurden, nachdem die Reaktionsgefäße jeweils noch mal für eine Minute gevortext worden sind, 100 µl aus jeder Verdünnung mit

Glasstäbchen auf TSA ausgestrichen. Die TSA-Platten wurden dann über Nacht im Brutschrank bei 37° C bebrütet.

4.2.5.5 Bestimmung der Keimzahl

Die Bestimmung der Keimzahl erfolgte dann nach 24 Stunden durch Auszählen der koloniebildenden Einheiten pro ml (CFU/ml) auf den Agarplatten.

4.2.5.6 Statistik

Die Aufarbeitung der Rohdaten sowie die statistische Auswertung erfolgten rechnerunterstützt mit handelsüblicher Software. Zur Anwendung kamen je nach Fragestellung und entsprechender Vortestung auf Normalverteilung und Varianzgleichheit der „Student-t-Test“, der U-Test nach Mann/Whitney sowie der Friedman/Wilcoxon-Wilcox Test. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p \leq 0,05$) angesetzt, hoch signifikant war ein Ergebnis bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1 % ($p \leq 0,01$).

4.2.6 SEM

4.2.6.1.1 Fixierung der Silikonscheibchen

Nach der wie unter 3.2.5.1 geschilderten Entnahme von Silikonscheibchen an unterschiedlichen Zeitpunkten wurden diese für eine halbe Stunde unter leichter Bewegung bei Raumtemperatur, in einer Fixierlösung aus 1 % Formaldehyd, 1 % Glutaraldehyd und 0,1 % Pikrinsäure bestehend, in einem sterilen, verschlossenen Gefäß gebadet.

4.2.6.1.2 Vorbereitung zur Mikroskopie

Anschließend wurden die Zellen unter Nutzung eines Alkoholgradienten dehydriert und der Kritischen-Punkt-Trocknung zugeführt. Dann wurden sie auf Probenhalter aus Aluminium montiert, wo sie mit Gold-Palladium gesputtert wurden.

4.2.6.1.3 Das Gerät

Die SEM-Untersuchungen erfolgten mit dem Scanning- Elektronen-Mikroskop ESEM XL 30 (FEI-Niederlande).

5 Ergebnisse

5.1 Vorversuche

5.1.1 Vergleich der Biofilmbildung von verschiedenen Staphylococcenstämmen in Mikrotiterplattenversuchen (Versuchsdurchführung siehe 3.2.2.1.1)

Im Rahmen dieser Versuche sollte festgestellt werden, ob es sich bei *S. aureus* DSM20231 nach den Kriterien von Christensen et al. (16) um einen starken oder schwachen Biofilmbildner handelt, im Vergleich zu einem starken Biofilmbildner, wie dem *S. epidermidis* RP62A und einem schwachen, wie dem *S. carnosus* TM300. Es sollte sich zeigen ob es sinnvoll wäre, diesen Erreger im MRD auf Biofilmbildung unter Fließbedingungen näher zu untersuchen.

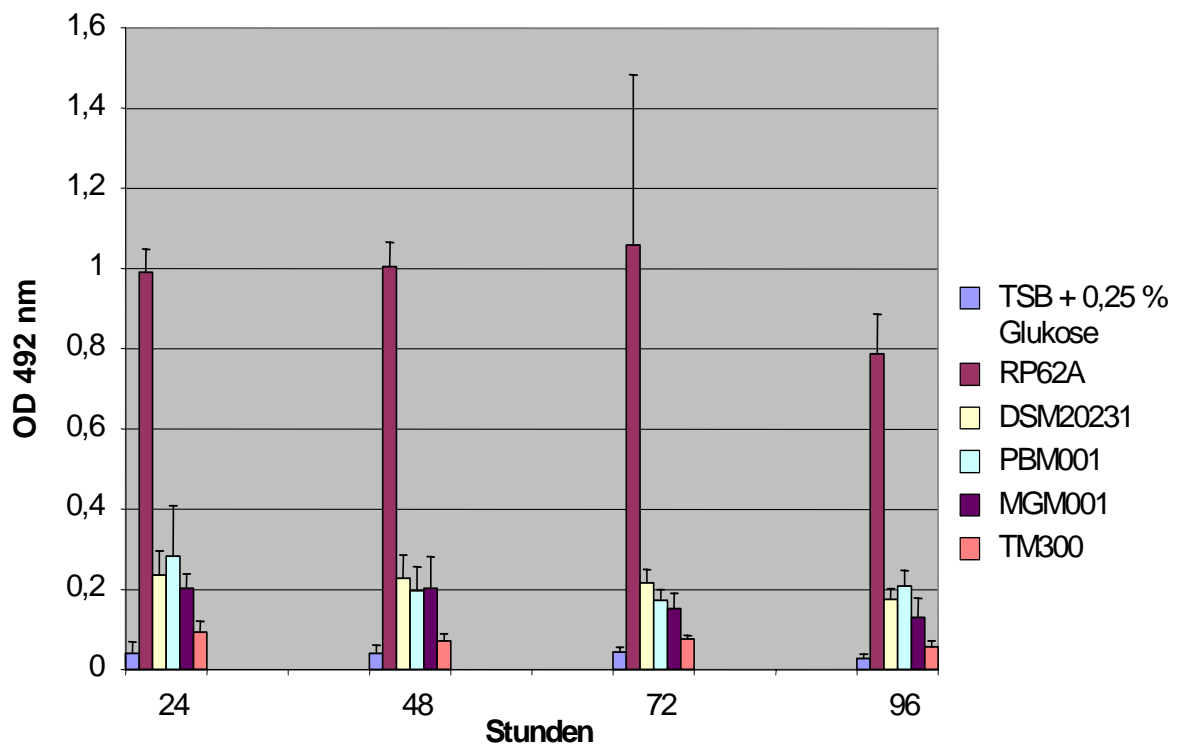


Abbildung 5 Mikrotiterplattenversuch: Vergleich der Fähigkeit verschiedener Staphylococcenstämmen zur Biofilmbildung; alle Mikrotiterplattenreihen enthielten ein Gemisch aus der Übernachtskultur des entsprechenden Stammes und TSB + 0,25 % Glukose (Details zur Versuchsdurchführung siehe 3.2.2.1.1)

Tabelle 3 OD_{492nm} der Kontrollreihe

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,041	0,03
48 Stunden	0,048	0,02
72 Stunden	0,043	0,01
96 Stunden	0,028	0,01

Tabelle 4 OD_{492nm} der RP62A- Reihe

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,991	0,06
48 Stunden	1,005	0,06
72 Stunden	1,059	0,42
96 Stunden	0,788	0,10

Tabelle 5 OD_{492nm} der DSM20231- Reihe

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,236	0,06
48 Stunden	0,228	0,06
72 Stunden	0,216	0,03
96 Stunden	0,176	0,03

Tabelle 6 OD_{492nm} der PBM001- Reihe

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,283	0,13
48 Stunden	0,196	0,06
72 Stunden	0,172	0,03
96 Stunden	0,207	0,04

Tabelle 7 OD_{492nm} der MGM001- Reihe

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,203	0,04
48 Stunden	0,204	0,03
72 Stunden	0,152	0,04

96 Stunden	0,131	0,05
------------	-------	------

Tabelle 8 OD_{492nm} der TM300- Reihe

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,093	0,03
48 Stunden	0,072	0,02
72 Stunden	0,076	0,01
96 Stunden	0,057	0,02

In der Kontrollreihe war mit einer durchschnittlichen optischen Dichte von 0,04, also kleiner als 0,120, nach den Kriterien von Christensen et al (16)., wie erwartet, keine Biofilmbildung zu sehen. Die Reihe, die das Gemisch der RP62A-Übernachtskultur und der TSB-Glukoselösung enthielt, zeigte bei Messung eine durchschnittliche optische Dichte von 0,961. Somit sind hier die Kriterien eines starken Biofilmbildners nach Christensen et al. (gemessene optische Dichte größer als 0,240) erfüllt. Bei der Messung der optischen Dichten der DSM20231-Reihe zeigte sich eine durchschnittliche optische Dichte von 0,214. Laut Christensen et al. handelt es sich somit um einen schwachen Biofilmbildner (der Wert liegt zwischen 0,120 und 0,240). Dieser *S. aureus*-Stamm wurde ebenfalls von Becker et al. für Untersuchungen der Genexpression in *S. aureus*-Biofilmen im Vergleich zur Genexpression in planktonischen Kulturen mittels Micro-Representational-Difference-Analysis verwendet (4). Der PBM001, also die *clpC*-defiziente Mutante des DSM20231, zeigte im Durchschnitt eine optische Dichte von 0,215. Somit handelt es sich hierbei laut Definition auch um einen schwachen Biofilmbildner. Die Messungen der wieder komplementierten *clpC*-Mutante des DSM20231, der Stamm MGM001, ergaben einen durchschnittlichen Wert von 0,173. Bei den Messungen des *S. carnosus* TM300 ergab sich ein durchschnittlicher Wert von 0,075. Laut Christensen et al. ist dieser Stamm kein Biofilmbildner. Eigene, hier durchgeführte Messungen erlaubten den Schluß, dass der *S. aureus* DSM20231 zumindest ein schwacher Biofilmbildner ist und somit durchaus weitere Untersuchungen seiner Biofilmbildung unter Fließbedingungen im MRD vorgenommen werden sollten.

5.1.2 Austestung des Einflusses der Glukosekonzentration im Nährmedium auf die Biofilmbildung des *Staphylococcus aureus* DSM20231 in Mikrotiterplattenversuchen (Versuchsdurchführung siehe 3.2.2.1.2)

Hier sollte getestet werden, welche Glukosekonzentrationen sich auf die Biofilmbildung dieses Stammes positiv auswirken. Bei *S. epidermidis* und *S. aureus* scheint die Auswahl des verwendeten Nährmediums, des Stammes und der Glukosekonzentration im Nährmedium eine sehr wichtige Rolle zu spielen. Bei *S. aureus* scheint der Einfluß dieser Faktoren noch größer zu sein als bei *S. epidermidis*. (40,48)

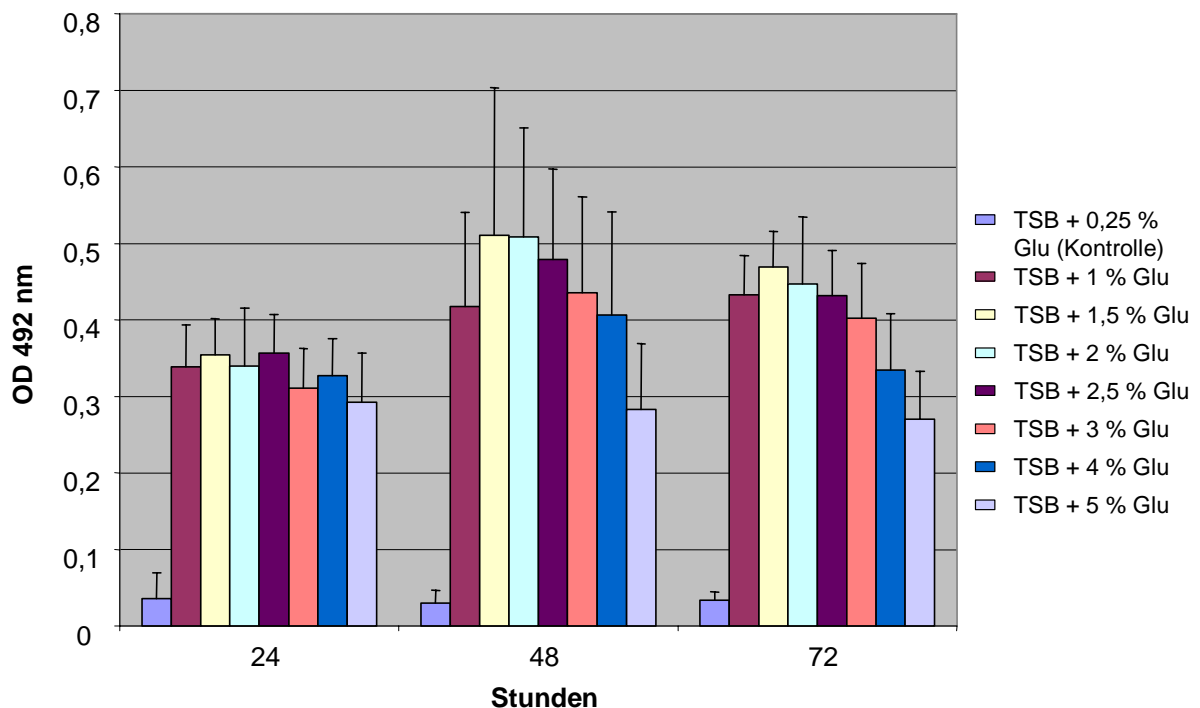


Abbildung 6 Auswirkung verschiedener Glukosekonzentrationen im TSB-Medium auf die gemessene optische Dichte von *S. aureus*- DSM20231-Biofilmen; die Mikrotiterplattenreihen enthielten ein Gemisch aus verdünnter Übernachtskultur des *DSM20231* und TSB mit entsprechender Glukosekonzentration; die Kontrollreihe enthielt lediglich ein TSB-Glukosegemisch, keine Übernachtskultur

Tabelle 9 OD_{492nm} der Kontrollreihe (TSB + 0,25 % Glukose)

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,035	0,03
48 Stunden	0,030	0,02
72 Stunden	0,033	0,01

Tabelle 10 OD_{492nm} der Reihe DSM20231 mit TSB +1 % Glukose

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,338	0,06
48 Stunden	0,417	0,12
72 Stunden	0,433	0,05

Tabelle 11 OD_{492nm} der Reihe DSM20231 mit TSB + 1,5 % Glukose

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,355	0,05
48 Stunden	0,511	0,19
72 Stunden	0,469	0,05

Tabelle 12 OD_{492nm} der Reihe DSM 20231 mit TSB + 2 % Glukose

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,339	0,08
48 Stunden	0,508	0,14
72 Stunden	0,447	0,09

Tabelle 13 OD_{492nm} der Reihe DSM20231 mit TSB + 2,5 % Glukose

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,357	0,05
48 Stunden	0,479	0,12
72 Stunden	0,431	0,06

Tabelle 14 OD_{492nm} der Reihe DSM20231 mit TSB + 3 % Glukose

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,311	0,05
48 Stunden	0,435	0,13
72 Stunden	0,402	0,07

Tabelle 15 OD_{492nm} der Reihe DSM20231 mit TSB + 4 % Glukose

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,327	0,05
48 Stunden	0,407	0,14
72 Stunden	0,334	0,07

Tabelle 15 OD_{492nm} der Reihe DSM20231 mit TSB + 5 % Glukose

	Mittelwert	Standardabweichung
24 Stunden	0,292	0,07
48 Stunden	0,283	0,09
72 Stunden	0,271	0,06

In der Kontrollreihe, in der die Vertiefungen nur eine TSB-Glukose-Lösung enthielten, war über 72 Stunden eine durchschnittliche optische Dichte von 0,033 zu messen und somit, wie erwartet, keine erhöhte Absorption nachzuweisen. In der Reihe mit der Übernachtskultur des DSM20231 und TSB mit 1 % Glukosezusatz war über 72 Stunden eine durchschnittliche optische Dichte von 0,396 zu messen. Laut der Einteilung von Christensen et al. (16) liegt hier eine starke Biofilmbildung vor. Bei einem Glukosezusatz von 1,5 % zum TSB-Medium zeigte der DSM20231 eine noch stärkere Biofilmbildung: Der durchschnittliche gemessene Wert der optischen Dichte betrug hier 0,445. Bei einem Glukosezusatz von 2 % zum TSB fiel die durchschnittliche optische Dichte ab auf 0,431. Dennoch lag auch hier nach den Kriterien von Christensen et al. eine starke Biofilmbildung vor. Der Glukosezusatz von 2,5 % bewirkte eine durchschnittliche optische Dichte von 0,422. Bei einem Glukosezusatz von 3 % betrug die durchschnittliche optische Dichte 0,383, bei einem Zusatz von 4 % 0,356 und bei einem Zusatz von 5 % Glukose sank die durchschnittliche optische Dichte auf 0,282. Dennoch waren alle Werte größer als 0,240, es war also bei allen angegebenen Glukosekonzentrationen eine starke Biofilmbildung zu verzeichnen nach der Einteilung von Christensen et al.. Die

größte optische Dichte war im Durchschnitt bei einem Glukosezusatz von 1,5 % zu verzeichnen.

5.2 Etablierbarkeit der Biofilmgewinnung mit dem MRD

5.2.1 Versuche außerhalb der Steril-Werkbank

Diese Versuche wurden durchgeführt um die Funktionalität des MRD zu überprüfen und einen vorläufigen Versuchsaufbau festzulegen, der natürlich im weiteren Verlauf der Arbeit noch ausgebaut und unter sterilen Bedingungen modifiziert wurde. Das MRD bewies sich als in dem geplanten Kontext einsetzbar, da in den wie unter 3.2.2.2 beschrieben durchgeführten Versuchen eindeutige makroskopische Indizien für Biofilmbildung vorliegen: Bei Begutachtung der Stempel, die aus dem über Nacht inokulierten Device entfernt worden waren, war mit bloßem Auge eine massive Schleimbildung auf dem Silikonscheibchen zu sehen. Bei Inokulation der Silikonscheibchen mit dem RP62A war diese Schleimschicht dicker und noch ausgeprägter als bei Verwendung des DSM202321. Aufgrund des Versuchsaufbaus außerhalb einer Sterilbank, war davon auszugehen, dass es sich bei den Bakterien auf den Silikonscheibchen nicht ausschließlich um die in das MRD gegebenen Staphylokokken handeln konnte, sondern auch um andere Umweltkeime. Dies bestätigte sich auch nach dem Ausplattieren von Bakterien, die von einem der Scheibchen gewonnen wurden (Prozedere siehe 3.2.5.2 bis 3.2.5.4): Schon anhand der Kolonienmorphologie, die teilweise deutlich von der der glatten, goldenen Kolonien des *S. aureus* oder von dem Aussehen der eher weißlichen, kleineren Kolonien des *S. epidermidis* abwich (große, rauhe, erhabene, weiße Kolonien) war von einer Kontamination des Systems auszugehen. Da die verwendeten Materialien und Nährmedien bereits wie unter 3.2.4 und 3.2.4.1 angegeben sterilisiert waren, war die Schlußfolgerung, dass die Kontamination bei dem Schritt des Versuchsaufbaus außerhalb der Sterilbank, während des Versuches, wo das nicht völlig geschlossene System lange Zeit Umweltkeimen ausgesetzt war oder bei Entnahme des Stempels aus dem Device, erfolgt sein musste. Um die Besiedelung des MRD mit nicht erwünschten Umweltkeimen zu verhindern, erfolgten die weiteren Versuche unter Verwendung einer Sterilbank.

5.2.2 Versuchsaufbau unter sterilen Bedingungen

5.2.2.1 Handhabbarkeit

Zur Handhabbarkeit des Systems ist zu bemerken, dass für den korrekten Versuchsaufbau und die korrekte Versuchsdurchführung eine gewisse Routine notwendig war, um nicht durch

Fehler bei bestimmten Handgriffen und Versuchsschritten, z. B. bei dem Ankleben der sterilen Silikonscheibchen an die Stempel, dem sterilen Anbringen und Austauschen der Schläuche, dem Platzieren der Glasflasche mit der Starterkultur im Wasserbad, verfälschte Ergebnisse durch Kontaminationen oder auch gar keine Ergebnisse zu bekommen. Zum Beispiel war dies der Fall, wenn die gerade mit der Pinzette von den Stempeln entfernten Silikonscheibchen auf die Arbeitsfläche fielen. Nach Vortexen und Ausplattieren war dann bereits vorab mit Kontamination durch andere Keime, einer verminderten Zahl an koloniebildenden Einheiten oder auch mit fehlendem Nachweis koloniebildender Einheiten auf der Agarplatte zu rechnen.

5.2.2.2 Kontaminationen

Zuerst wurde die Variante des Versuchsaufbaus ohne Filter, wie unter 3.2.3.6 beschrieben, verwendet. Dies brachte Kontaminationsprobleme mit sich, die sich in einer Besiedelung der TSA-Platten mit morphologisch nicht als Staphylokokkenkolonien einstuftbaren Kolonien äußerte. Diese nahm im Laufe einer 96-stündigen Versuchsreihe immer mehr zu und verdrängte das Staphylokokkenwachstum. Unter Nutzung des Vitek 2 wurden diverse Kolonien aus mehreren Versuchsreihen als *Bacillus cereus* und *Bacillus subtilis* identifiziert. Bei diesen Bakterien handelt es sich um ubiquitäre, sporenbildende Umweltkeime. Zur Eradikation der Kontaminationsprobleme wurden Modifikationen des Versuchsaufbaus vorgenommen. Anfänglich wurde die TSB-Nährlösung, zu der 2 % Glukose addiert worden war im Vorfeld, unter sterilen Bedingungen in Zwei-Liter-Glasflaschen abgefüllt und so in das Wasserbad gestellt. Die Glasflaschen waren mit einem Plastikdeckel mit 9 mm-Bohrung verschlossen, das Bohrloch, durch das der Silikonschlauch dann in die TSB-Nährlösung hing, war mit autoklavierter Alufolie von außen abgedichtet. Alle 48 Stunden musste die Glasflasche mit der Nährlösung ausgetauscht werden. Nach ungefähr 30 Stunden wurde zusehend eine Trübung der Nährlösung sichtbar, als Hinweis auf die Kontaminationsquelle. Zur Vermeidung einer Inokulation des TSB mit Keimen während der 48 Stunden im Wasserbad durch die nicht vollständige Abdichtung des Flaschenverschlusses, wurde die Verwendung der Zwei-Liter-Glasflaschen eingestellt. Stattdessen wurde die gesamte Menge an Medium, die für einen Versuch von 96 Stunden Dauer benötigt wurde, in die Polypropylenflaschen mit vier Liter Volumen (siehe Tabelle 2) abgefüllt, an das System angeschlossen und für die folgenden 96 Stunden nicht mehr manipuliert. Der Vorteil dieser Flaschen lag auch in ihrer vollkommenen Abdichtbarkeit, so daß das Eindringen von Erregern durch undichte Flaschenverschlüsse ausgeschlossen wurde. Trotz dieser Maßnahmen traten

weiterhin Kontaminationen mit Bacillen auf. Das Überprüfen aller Arbeitsschritte vor und während des Versuchaufbaus, die Kontrolle des verwendeten TSBs und der TSA-Platten als mögliche Kontaminationsquelle blieb erfolglos. Auffällig war auch, dass eine Trübung des Nährmediums am Ende der Versuche weiterhin sichtbar war, wenn auch nicht mehr in einem so ausgeprägten Maß wie zuvor, bei der Verwendung der Glasflaschen. Es war zu vermuten, dass das Medium in der Polypropylenflasche durch eine Art „Reflux“ aus dem Silikonschlauch-System zwischen MRD und Flasche kontaminiert worden war, da alle von außen kommenden Möglichkeiten zur Kontamination ausgeschaltet wurden. Eine minimale Keimzahl, die durch den „Reflux“ in die Flasche gelangte, würde sich dann in dem durch das Wasserbad auf 37° C temperierten Medium in der Flasche problemlos vermehren. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde ein Filterhalter, der einen Membranfilter und einen Vorfilter enthielt (siehe unter 3.2.3.5) in das System eingefügt. Die Positionierung unmittelbar vor dem Robbins Device, nach der Schlauchpumpe, erwies sich als dynamisch am günstigsten, da bei der Positionierung zwischen Polypropylenflasche und Schlauchpumpe zu hohe Widerstände entstanden. Sie waren so hoch, dass die Saugleistung der Schlauchpumpe unzureichend war. Nach der optimalen Positionierung des Filtersystems im Versuchsaufbau war das Kontaminationsproblem jedoch gelöst. Bei nachfolgenden Testungen von Bakterienkolonien, die von den Silikonscheibchen aus dem MRD stammten, zeigte sich im API ID 32 Staph, dass wirklich nur noch der in das Device gegebene *S. aureus* DSM20231 auf den TSA-Platten vorhanden war. Dies war schon allein an den Agarplatten sichtbar, die nur noch Kolonien mit der eindeutigen Morphologie von Staphylokokkenkolonien zeigten. Außerdem war der letzte, bei Versuchsende nach 96 Stunden, noch in der Polypropylenflasche verbliebene Mediumrest, klar. Anfänglich war zum Ablösen der Bakterien von den Silikonscheibchen eine Ultraschallsonde verwendet worden (siehe unter 3.2.5.2.1). Davon wurde dann schließlich Abstand genommen, weil durch die erwähnten Kontaminationsproblemen vermieden werden mußte, das Eppendorf-Reaktionsgefäß unter einem nicht sicher sterilen Abzug zu öffnen und die Ultraschallsonde einzutauchen. Es wurde nun das Vortexen der Silikonscheibchen bevorzugt (siehe 3.2.5.2.2), da dort nicht mehr die Gefahr von Kontaminationen bestand.

5.3 Austestung verschiedener Parameter unter Nutzung des modifizierten Robbins Device

5.3.1 Positionseffekt

Bei der Nutzung des MRD stellte sich die Frage, ob die Position des Stempels bzw. des Silikonplättchens, innerhalb der 25 möglichen Positionen, einen Einfluß auf die Zahl der koloniebildenden Einheiten hat. Dies wurde dann im Rahmen des unter 3.2.3.1 bis 3.2.3.5 beschriebenen Versuchsanordnung, unter Verwendung von TSB mit 2 %-igem Glukosezusatz (angesetzt und sterilisiert wie unter 3.2.4. und 3.2.4.1 beschrieben), in 24-stündigen Versuchen überprüft. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der koloniebildenden Einheiten auf TSA (siehe 3.2.5.1 bis 3.2.5.2) nach Loslösen der Bakterien mittels Vortexen von den Silikonscheibchen, Erstellen einer Verdünnungsreihe und Ausstreichen auf Agar. Bei diesen Versuchen wurde *S. aureus* DSM20231 verwendet.

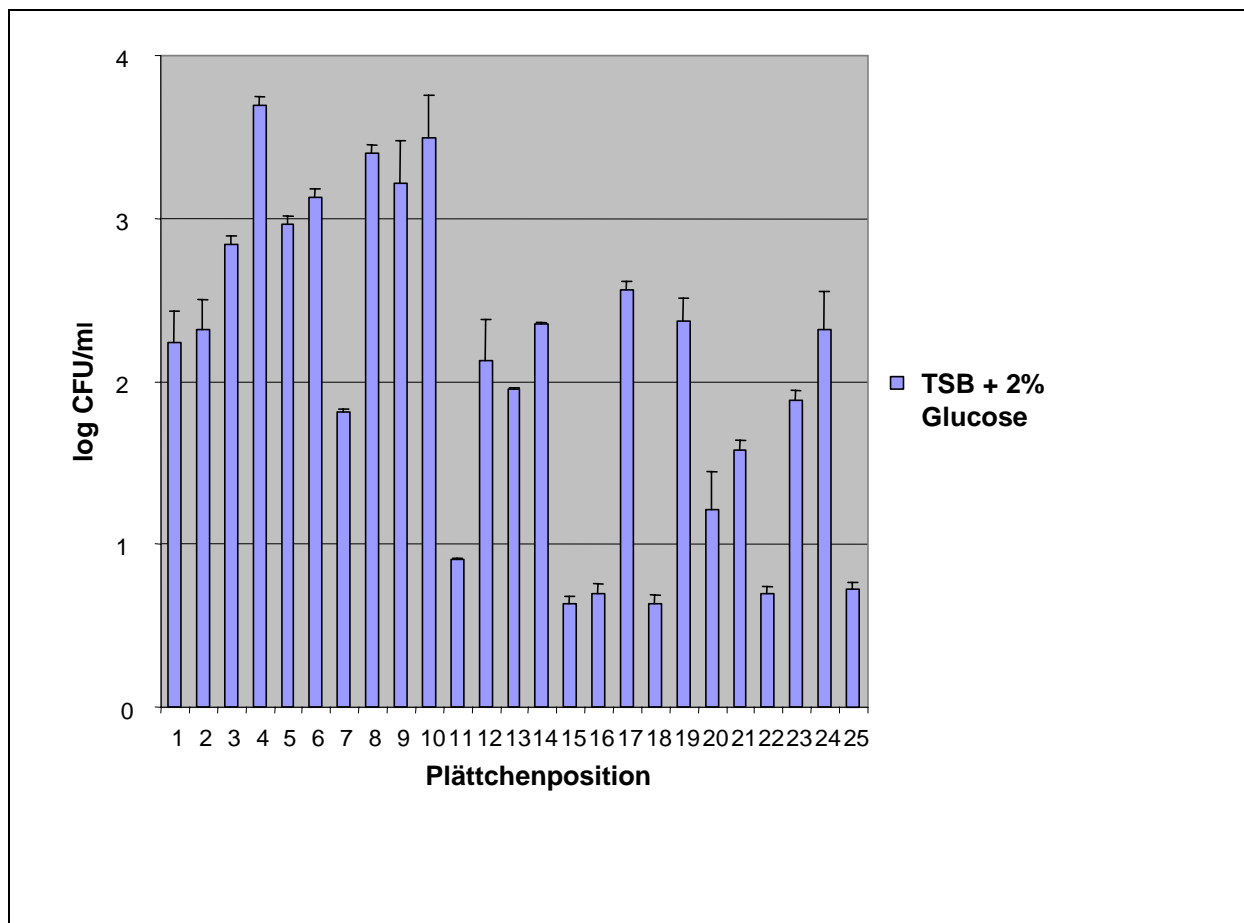


Abbildung 7 Darstellung des Effekts der Plättchen- bzw. Stempelposition im Fließkanal des Robbins Device auf die gewonnene Zahl an koloniebildenden Einheiten von *S. aureus* DSM20231

Tabelle 17 Koloniebildende Einheiten der einzelnen Stempelpositionen

Stempel- bzw. Plättchenposition im Robbins Device	Mittelwert der koloniebildenden Einheiten pro ml (= CFU/ml)	Standardabweichung
1	$1,74 \times 10^2$	$0,97 \times 10^2$
2	$2,10 \times 10^2$	$1,03 \times 10^2$
3	$7,00 \times 10^2$	$0,80 \times 10^2$
4	$4,92 \times 10^3$	$0,70 \times 10^3$
5	$9,20 \times 10^2$	$1,08 \times 10^2$
6	$1,35 \times 10^3$	$0,18 \times 10^3$
7	$6,50 \times 10^1$	$0,29 \times 10^1$
8	$2,50 \times 10^3$	$0,31 \times 10^3$
9	$1,65 \times 10^3$	$1,38 \times 10^3$
10	$3,14 \times 10^3$	$2,51 \times 10^3$
11	$8,00 \times 10^0$	$0,28 \times 10^0$
12	$1,33 \times 10^2$	$1,07 \times 10^2$
13	$9,00 \times 10^0$	$1,13 \times 10^0$
14	$2,27 \times 10^2$	$0,03 \times 10^2$
15	$4,30 \times 10^0$	$0,51 \times 10^0$
16	$5,00 \times 10^0$	$0,71 \times 10^0$
17	$3,65 \times 10^2$	$0,47 \times 10^2$
18	$4,33 \times 10^0$	$0,51 \times 10^0$
19	$2,33 \times 10^2$	$0,91 \times 10^2$
20	$1,63 \times 10^1$	$1,19 \times 10^1$
21	$3,80 \times 10^1$	$0,54 \times 10^1$
22	$5,00 \times 10^0$	$0,50 \times 10^0$
23	$7,70 \times 10^1$	$1,08 \times 10^1$
24	$2,10 \times 10^2$	$1,47 \times 10^2$
25	$5,30 \times 10^0$	$0,50 \times 10^0$

Wie zu erkennen ist, wurden von Silikonscheibchen, die an den Stempel in Position vier, sechs, acht, neun und zehn angebracht waren, durchschnittlich die größte Zahl

koloniebildender Einheiten gewonnen. Der Vergleich der Messergebnisse in Position eins bis zehn ergab hochsignifikant höhere Werte gegenüber denen in Position 11-25 ($p=0,001$).

5.3.2 TSB im Vergleich zu TSB mit 2 %-igem Glukosezusatz

Wie schon Knobloch et al. (40) zeigten, wird die Biofilmbildung von *S. aureus* stark von äußeren Faktoren beeinflusst. Darunter fällt ganz wesentlich die Glukosekonzentration im Nährmedium dar, deren Bedeutung für die Biofilmbildung des *S. aureus* DSM20231 bereits unter statischen Bedingungen getestet wurde (siehe 4.1.2). Ebenfalls wurde der Einfluß von Glukose auf Biofilmbildung unter Fließbedingungen, also im MRD untersucht. Verwendet wurden TSB und TSB mit einem Zusatz von 2 % Glukose. Der Versuchsablauf entsprach 3.2.3.1 bis 3.2.3.5. Das Nährmedium angesetzt und sterilisiert nach 3.2.4.1. Die Versuchsauswertung erfolgte nach Entnahme von jeweils einem Silikonscheibchen nach 24, 48, 72 und 96 Stunden nach den unter 3.2.5.1 und 3.2.5.2.2 beschriebenen Methoden.

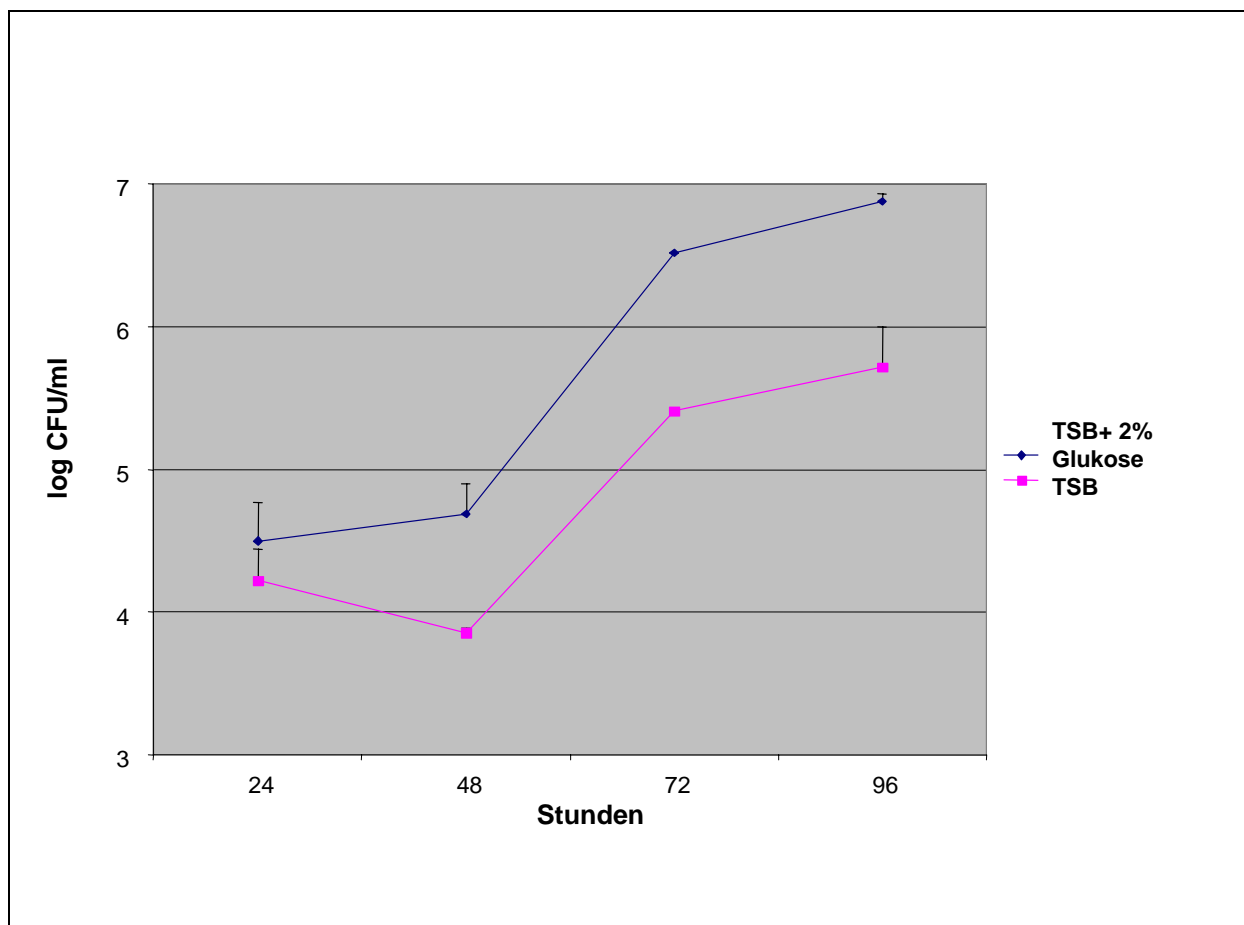


Abbildung 8 Einfluß der Glukosekonzentration im TSB-Medium auf die Zahl der gewonnenen koloniebildenden Einheiten des *S. aureus* DSM20231 unter Fließbedingungen im MRD

Tabelle 18 Zahl der koloniebildenden Einheiten im Verlauf von 96 Stunden mit TSB

	Mittelwert der koloniebildenden Einheiten pro ml (= CFU/ml)	Standardabweichung
24 Stunden	$1,67 \times 10^4$	$1,08 \times 10^4$
48 Stunden	$7,20 \times 10^3$	$0,46 \times 10^3$
72 Stunden	$2,56 \times 10^5$	$0,04 \times 10^5$
96 Stunden	$5,24 \times 10^5$	$4,78 \times 10^5$

Tabelle 19 Zahl der koloniebildenden Einheiten im Verlauf von 96 Stunden mit TSB + 2 % Glukose

	Mittelwert der koloniebildenden Einheiten pro ml (= CFU/ml)	Standardabweichung
24 Stunden	$3,15 \times 10^4$	$2,77 \times 10^4$
48 Stunden	$4,92 \times 10^4$	$3,07 \times 10^4$
72 Stunden	$3,29 \times 10^6$	$0,03 \times 10^6$
96 Stunden	$7,56 \times 10^6$	$1,08 \times 10^6$

Im Vergleich zwischen der Verwendung von TSB und der Verwendung von TSB mit Zusatz von 2 % Glukose waren Unterschiede bis zur Größe einer Zehnerpotenz zugunsten der angereicherten Lösung zu verzeichnen. Dieser Unterschied war nach 24 Stunden noch nicht signifikant, beide Mittelwerte bewegten sich im Bereich von 10^4 ($p=0,27$). Die Differenz wurde dann aber nach 48 Stunden deutlicher, wenngleich noch immer nicht statistisch signifikant ($p=0,14$): Bei TSB war sogar ein Absinken der CFU-Zahl zu sehen, in den Bereich von 10^3 . Bei TSB mit 2 %-igem Glukosezusatz war ein Anstieg im Vergleich zum vorausgehenden 24- Stunden-Wert zu sehen. Nach 72 Stunden bestand ein signifikanter Unterschied zugunsten TSB mit 2 %-igem Glukosezusatz ($p=0,03$). Nach 96 Stunden war weiterhin eine eine Differenz um eine Zehnerpotenz vorhanden, die statistisch jedoch nicht mehr signifikant war ($p=0,13$). Aus diesen Ergebnissen ist Schlußzufolgern, daß das Hinzufügen von weiterer Glukose zum Standard-TSB-Medium ein größeres Bakterienwachstum und auch eine stärkere Biofilmbildung des DSM20231 bewirkte.

5.3.3 SEM-Bilder

Als nächstes war die Frage zu beantworten, ob es sich bei den von den Silikonscheibchen entfernten Bakterien um planktonische Mikroorganismen handelt, die durch einen Adhäsionsvorgang auf der Oberfläche immobilisiert wurden, oder ob es sich bei diesen Oberflächen-gebundenen Populationen tatsächlich um „Biofilm-Organismen“ handelt, die ultramorphologische Kriterien sessilen Wachstums aufweisen, d. h. einen ein- bis mehrschichtigen Wachstumstyp sowie eine Einbettung in eine dreidimensionale, aus exopolymeren Substanzen bestehende Matrix? Zur Beantwortung dieser Frage wurden ultramorphologische Methoden mit hochauflösender Raster-Elektronenmikroskopie (Scanning Electron Microscopy) verwendet. Es wurden Aufnahmen von Bakterien auf den Silikonscheibchen angefertigt (Präparation siehe 2.2.5.6) und morphologisch mit SEM-Bildern von planktonischen DSM20231 Kulturen verglichen.

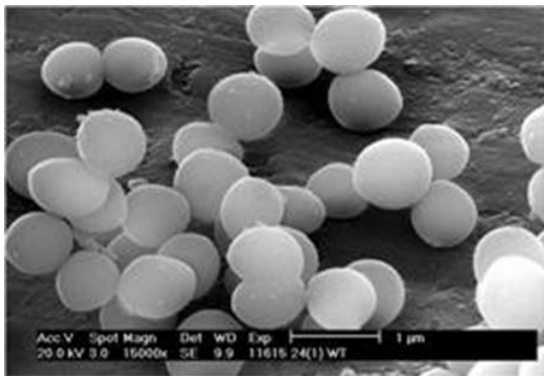


Abbildung 9
DSM20231 im planktonischen Zustand, 15000-fache Vergrößerung, 24 Stunden

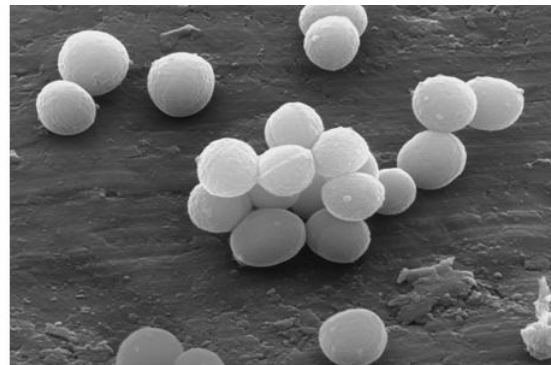


Abbildung 10
DSM20231 im planktonischen Zustand, 15000-fache Vergrößerung, 48 Stunden

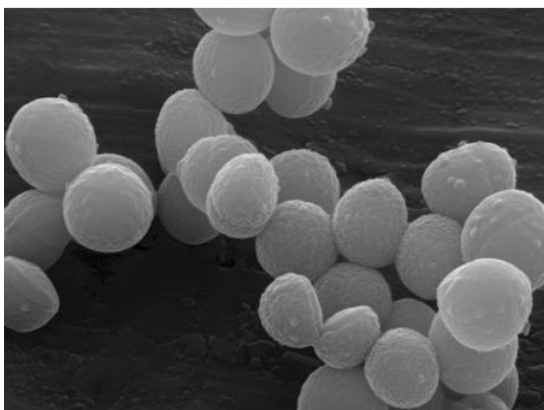


Abbildung 11
DSM20231 im planktonischen Zustand, 15000-fache Vergrößerung, 72 Stunden

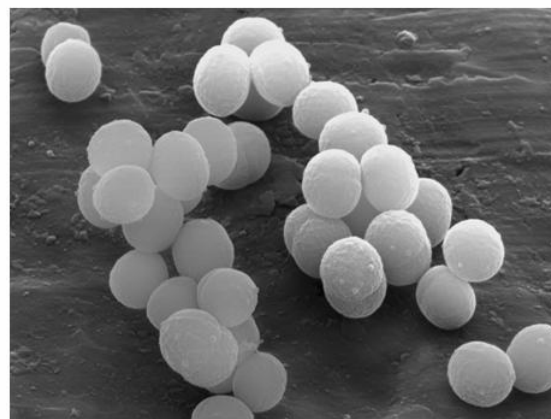


Abbildung 12
DSM20231 im planktonischen Zustand, 15000-fache Vergrößerung, 96 Stunden

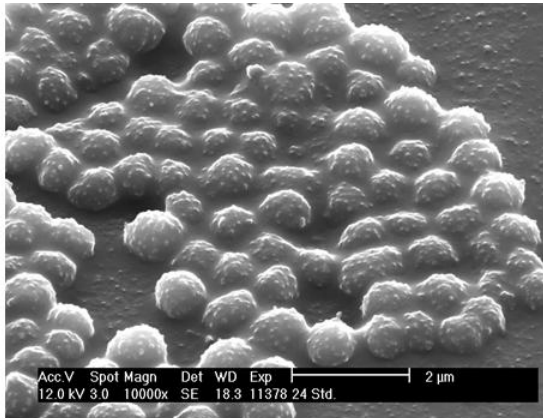


Abbildung 13
DSM20231 im Biofilmzustand, 10000-fache
Vergrößerung, 24 Stunden

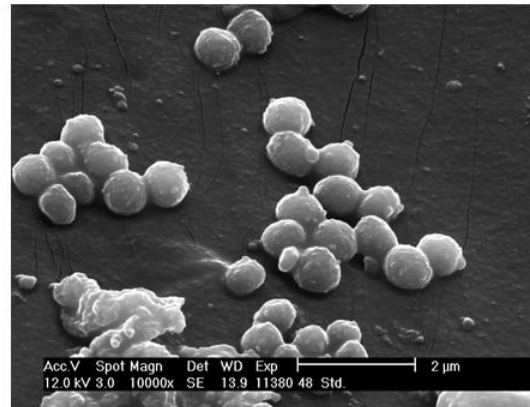


Abbildung 14
DSM20231 im Biofilmzustand, 10000-fache
Vergrößerung, 48 Stunden

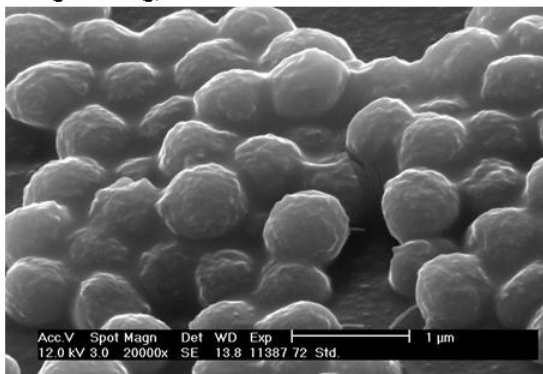


Abbildung 15
DSM 20231 im Biofilmzustand, 20000-fache
Vergrößerung, 72 Stunden

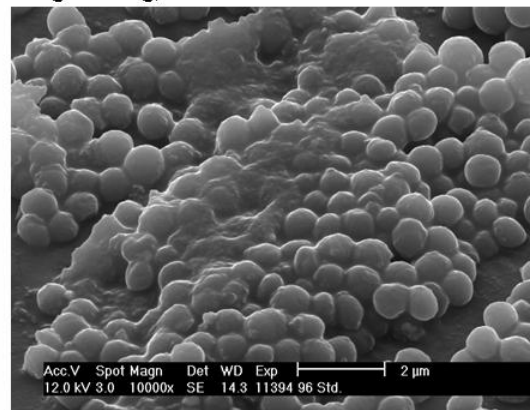


Abbildung 16
DSM20231 im Biofilmzustand, 10000-fache
Vergrößerung, 96 Stunden

Bei diesen Vergleichen waren deutliche morphologische Unterschiede zu erkennen. Die Bakterien in Abbildung 13 bis 16 sind sichtbar in eine Matrix eingebettet, ganz in Übereinstimmung mit der Annahme einer Polyaccharid-Matrix bei Biofilmen. Die Oberfläche der Bakterien in Abbildung 9 bis 12 ist glatter, offensichtliche Zeichen einer Zell-Zell-Bindung fehlen. Bei Betrachtung der Abbildungen 13 bis 16 ist somit von Biofilmpopulationen auszugehen; diese entsprechen dem Desiderat und der Fragestellung, die dieser Arbeit zugrunde liegt.

5.4 Reproduzierbarkeit

Zur Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen mit dem MRD ist zu sagen, dass diese während der Untersuchungen für diese Arbeit z. T. deutliche Schwankungen aufwies. Dies wird an folgendem Beispiel deutlich: Bei Untersuchung des Einflusses von TSB mit 2 %-igem Glukosezusatz auf die Biofilmbildung des DSM20231 zeigte sich bei drei Versuchen eine Schwankung der Zahl an koloniebildenden Einheiten an den einzelnen, untersuchten Zeitpunkten trotz identischem Versuchsaufbau und identischer Versuchsdurchführung. Dennoch anzumerken ist, daß sich alle drei Versuchsdurchführungen in der zeitlichen Abfolge signifikant voneinander unterschieden ($p=0,05$).

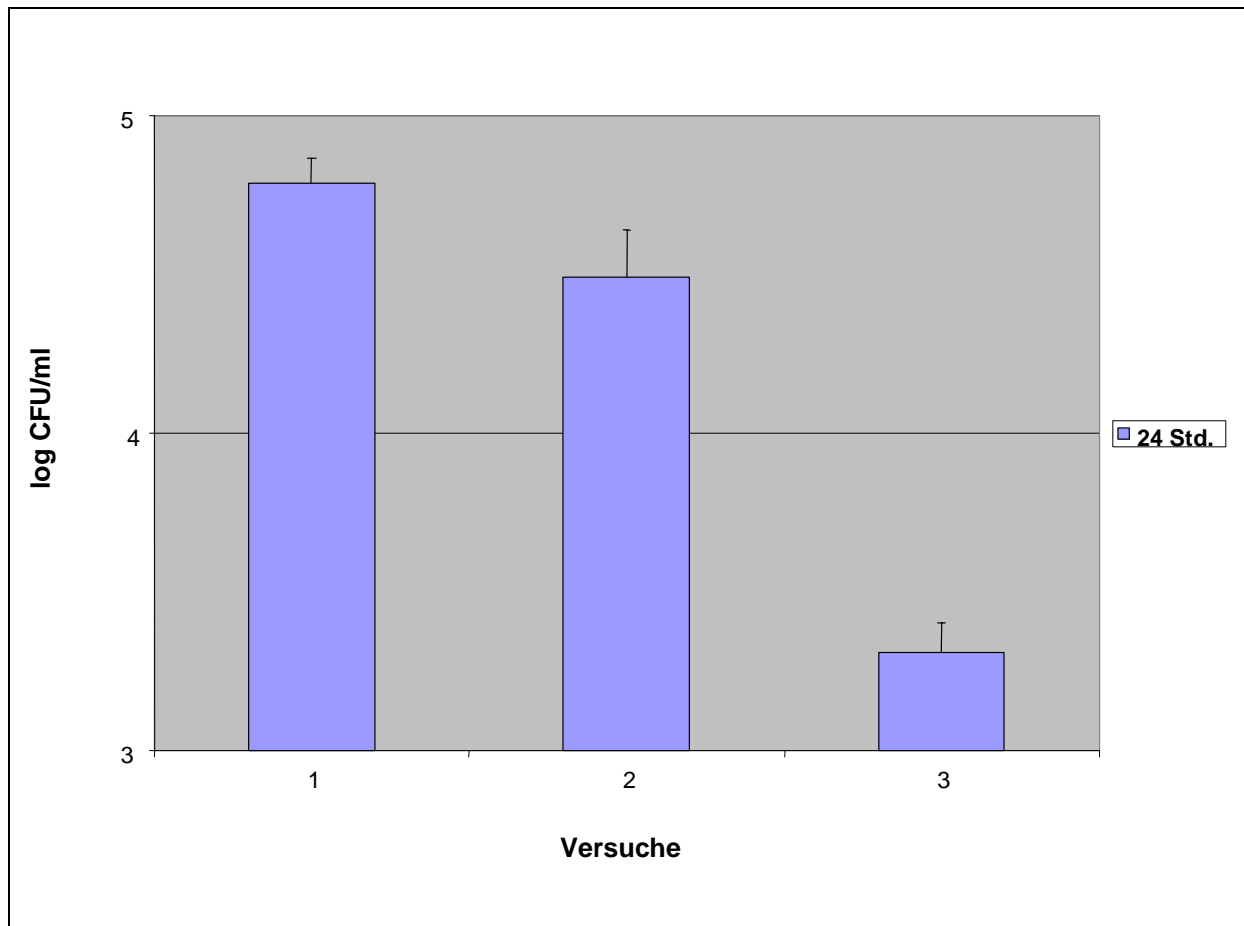


Abbildung 17

Vergleich der Anzahl an gewonnenen koloniebildenden Einheiten aus drei identisch durchgeführten Versuchen nach jeweils 24 Stunden

Tabelle 20 Zahl der koloniebildenden Einheiten nach 24 Stunden

	Mittelwert (CFU/ml)	Standardabweichung
Versuch 1	$6,14 \times 10^4$	$1,22 \times 10^4$
Versuch 2	$3,10 \times 10^4$	$1,27 \times 10^4$
Versuch 3	$2,05 \times 10^3$	$0,50 \times 10^3$

Zwei der drei 24-Stunden-Werte aus Tabelle 20 sind kaum unterschiedlich. Der gleiche Versuch, zum dritten Mal durchgeführt, lieferte eine Abweichung der Zahl der koloniebildenden Einheiten um eine Zehnerpotenz.

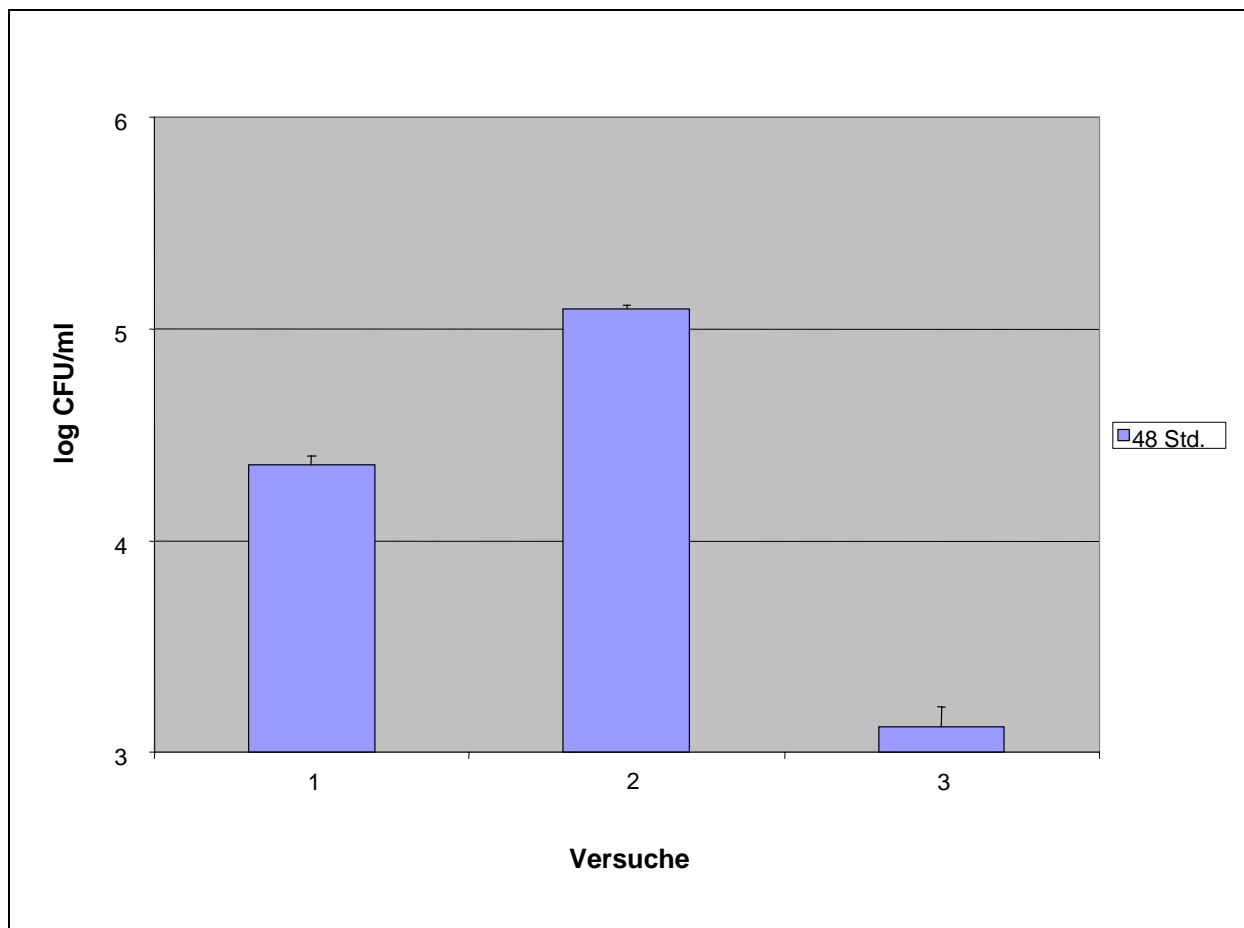


Abbildung 18 Vergleich der Anzahl an gewonnenen koloniebildenden Einheiten aus drei identisch durchgeführten Versuchen nach jeweils 48 Stunden

Tabelle 21 Zahl der koloniebildenden Einheiten nach 48 Stunden

	Mittelwert (CFU/ml)	Standardabweichung
Versuch 1	$2,28 \times 10^4$	$0,24 \times 10^4$
Versuch 2	$1,24 \times 10^5$	$0,05 \times 10^5$
Versuch 3	$1,33 \times 10^3$	$0,32 \times 10^3$

Bei den 48-Stunden-Werte ergab sich eine noch deutlichere Schwankung, nämlich Unterschiede im Bereich von zwei Zehnerpotenzen. Obwohl Versuch 1 bei der 24-Stunden-Messung noch die meisten koloniebildenden Einheiten erzeugte, war dies nach 48 Stunden Versuch 2 (Tabelle 21, Abbildung 18).

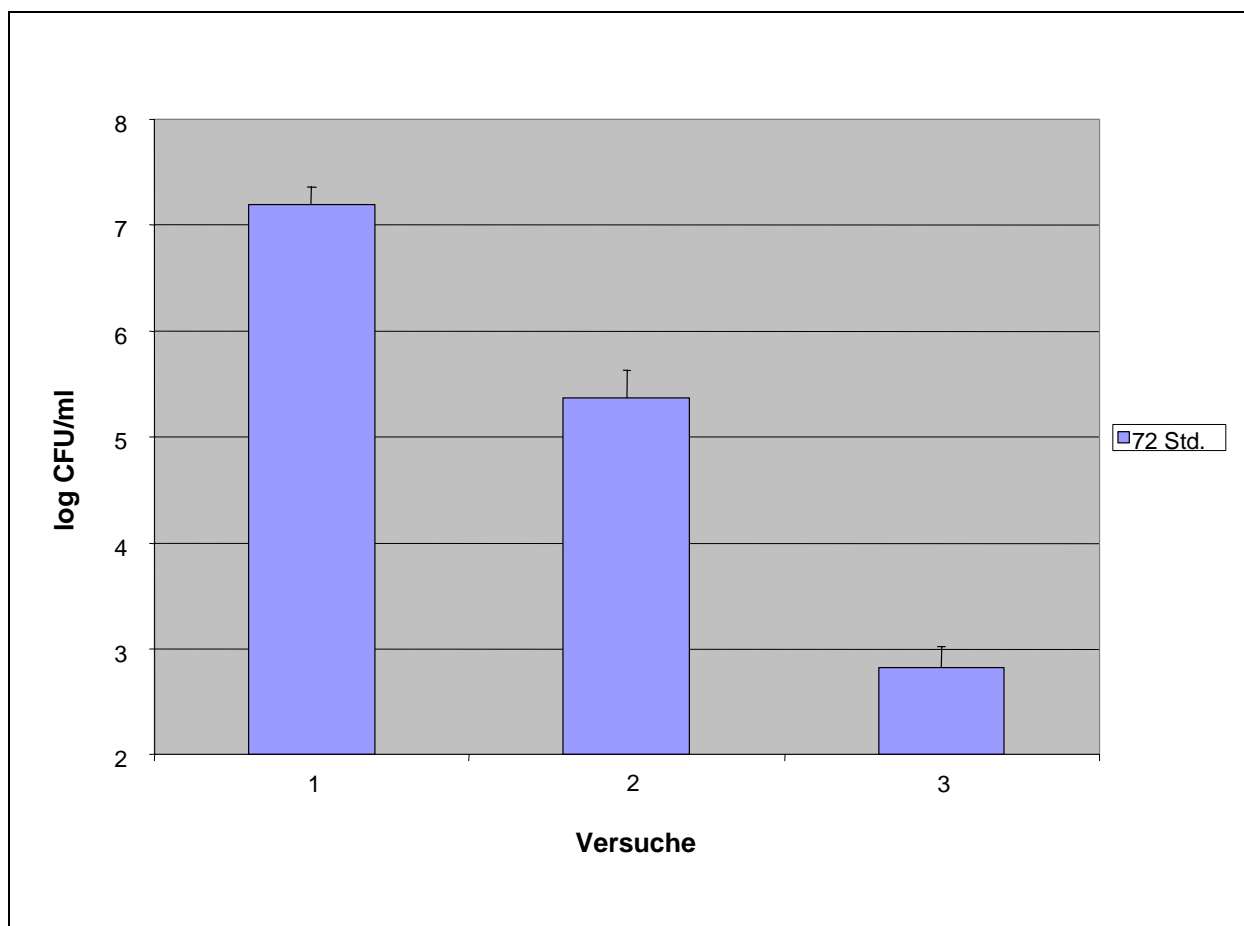
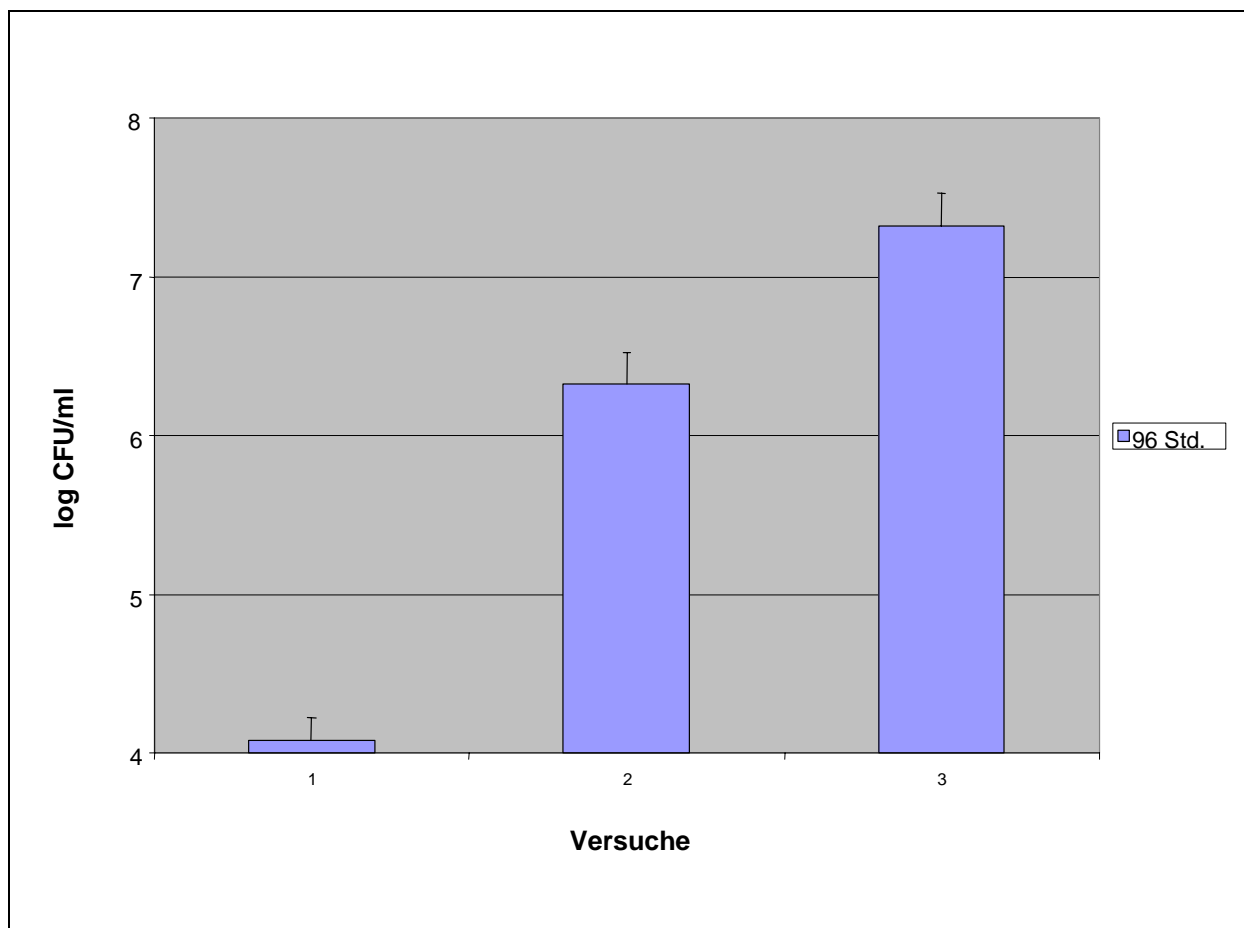


Abbildung 19 Vergleich der Anzahl an gewonnenen koloniebildenden Einheiten aus drei identisch durchgeführten Versuchen nach jeweils 72 Stunden

Tabelle 22 Zahl der koloniebildenden Einheiten nach 72 Stunden

	Mittelwert (CFU/ml)	Standardabweichung
Versuch 1	$1,60 \times 10^7$	$0,68 \times 10^7$
Versuch 2	$2,35 \times 10^5$	$1,91 \times 10^5$
Versuch 3	$6,75 \times 10^2$	$3,89 \times 10^2$

Die 72-Stunden-Ergebnisse zeigten maximale Unterschiede, die Zahl der koloniebildenden Einheiten bot eine Streubreite bis zu fünf Zehnerpotenzen (Tabelle 22, Abbildung 19).

**Abbildung 20**

Vergleich der Anzahl an gewonnenen koloniebildenden Einheiten aus drei identisch durchgeführten Versuchen nach jeweils 96 Stunden

Tabelle 23 Zahl der koloniebildenden Einheiten nach 96 Stunden

	Mittelwert (CFU/ml)	Standardabweichung
Versuch 1	$1,22 \times 10^4$	$0,46 \times 10^4$
Versuch 2	$2,13 \times 10^6$	$1,23 \times 10^6$
Versuch 3	$2,10 \times 10^7$	$1,27 \times 10^7$

Nach 96 Stunden zeigten sich bei den verschiedenen Versuchen Schwankungen bis zu drei Zehnerpotenzen. In Versuch 3 war die höchste Anzahl adhärenter koloniebildender Einheiten nachweisbar (Tabelle 23, Abbildung 20).

5.5 Etablierbarkeit, Validität und Reproduzierbarkeit

Das MRD erwies sich als *in vitro*-System zur Untersuchung von *S. aureus*-Biofilmen prinzipiell einsetzbar. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erfahrungen zeigen jedoch Probleme auf, die in dieser Form bisher noch nicht beschrieben worden sind und die die Anwendbarkeit des MRD zur Gewinnung von bakteriellen Biofilmen *in vitro* einschränken. Zu berücksichtigen ist zunächst einmal der erhebliche zeitliche Aufwand, den ein einzelner Versuch bedeutet: Für Vorbereitung der Materialien, der Versuchsdurchführung und Auswertung sind ungefähr 48 Stunden und für den Versuch dann an den folgenden fünf Tagen mindestens jeweils eine Stunde Arbeitszeit zu veranschlagen (bei einer geplanten Versuchslänge von 96 Stunden). Auf der anderen Seite hat sich durch diese Arbeit gezeigt, dass stabile Biofilmpopulationen unter definierten Bedingungen *in vitro* mit dieser Methode zu generieren sind. Diese Populationen sind Voraussetzung dafür, Untersuchungen der Genexpression von Biofilmbakterien durchzuführen, um genauere Rückschlüsse auf Stoffwechselwege und -vorgänge im Biofilmzustand unter Flußbedingungen ziehen zu können. Die aus einem Versuch mit dem MRD gewonnene Zahl an Bakterien im Biofilmzustand reicht aus, um zum Beispiel mittels RNA-Extraktion und RT-PCR näher untersucht zu werden.

6 Diskussion

6.1 *Prinzipielle Möglichkeiten zur Nutzung des modifizierten Robbins Device*

Wie schon unter 5.5 festgestellt wurde, ist das MRD für wissenschaftliche Zwecke einsetzbar. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, die mit Biofilmbakterien arbeiteten. Es kamen auch dort modifizierte Varianten des Robbins Device zum Einsatz: Die Genexpression in Biofilmen unterschiedlicher Bakterienpopulationen wurde im Vergleich zu planktonischen Kulturen untersucht. Weiterhin wurde der Einfluß von Umweltbedingungen auf die Biofilmbildung und somit die wiederum veränderte Genexpression der verwendeten Erreger getestet. Bisher mitgeteilte Untersuchungen schlossen den Einfluß verschiedener Materialien auf die Adhäsion der Bakterien im Robbins Device unter Flußbedingungen sowie Antibiotikaempfindlichkeiten von Biofilmerregern ein. Das Robbins Device kam auch zur Anwendung bei der Gewinnung von Biofilmbakterien für transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen und im Rahmen immunologischer Untersuchungen.

6.2 *Übersicht und Bewertung publizierter Literatur über die Nutzung eines Robbins Device:*

Linton et al. (45), Untersuchung des Adhäsionsverhaltens koagulase-negativer Staphylokokken

Die Gruppe um Linton untersuchte mit Hilfe eines MRD das Adhäsionsverhalten von *S. epidermidis* RP62A. Sie untersuchten den Einfluß verschiedener Materialien, der Fließrate, der Stempelposition im Device, der Vorbehandlung von Materialien mit humanem Plasma, von unterschiedlichen Ionenkonzentrationen und anderer Parameter auf die Adhäsion. Sie verwendeten ein Robbins Device aus Perspex, mit einem Fließkanal von 40 x 9 x 2 mm. Besonderheiten waren eine Peristaltikpumpe, ein Luftfilter zur Entfernung von Luftblasen, ein weiterer Filter mit 14 µm Porengröße, um große Zellklumpen zu entfernen und eine auf 37° C temperierte Heizplatte. Ein Chemostat wurde zur Kultivierung der Bakterien verwendet. Es zeigte sich generell eine stärkere Adhäsion von Bakterien im Einfluß-Bereich im Vergleich zu den weiter hinten im Fließkanal gelegenen Scheibchen, was sich mit den Ergebnissen dieser Dissertation deckt. Als große Ausnahme hiervon entdeckten Linton et al. das Material Titan. Bei Scheibchen aus diesem Material nahm die Adhäsion von Bakterien mit zunehmendem Abstand zur Einfluß-Öffnung zu. Die Adhäsion an silikoniertem Glas war jeweils geringer als an normalem Glas, unabhängig von der verwendeten Fließrate. Unter Verwendung von

Teflonscheibchen zeigte sich allerdings eine deutliche Abhängigkeit von der Fließrate: Bei einer Fließrate von 60 ml/Stunde war die Adhäsion im Vergleich zu Glas stärker. Bei einer Rate von 300 ml/Stunde war aber die Adhäsion an Glas stärker. Die Anzahl adhärerter Bakterien an rostfreiem Stahl im Vergleich zu Glas zeigte keine Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit. Das Hinzufügen von divalenten Kationen, (Magnesium und Kalzium) zur Bakterienkultur vor der Inkubation des Robbins Device bewirkte bei der Fließgeschwindigkeit von 300 ml/Stunde bei Glas und silikoniertem Glas eine Abnahme der Adhärenz. Bei Zugabe von Magnesium war zwar bei Glas und silikoniertem Glas eine abnehmende Adhärenz feststellbar, dennoch war zwischen beiden Materialien ein signifikanter Unterschied feststellbar. Dieser Unterschied wurde bei der Verwendung von Kalzium aufgehoben. Bei zusätzlicher Verwendung des Chelatbildners EDTA war zwar bei beiden Materialien wieder ein Anstieg der Adhäsion zu verzeichnen, aber es war kein Unterschied mehr zwischen den Materialien sichtbar. Eine Erhöhung der Ionenstärke führte sowohl bei Glas als auch bei silikoniertem Glas, zu einer Zunahme der Adhäsion, unter Reduktion des Unterschiedes zwischen beiden Materialien. Die Verwendung von mit Humanplasma vorbehandeltem Glas hatte eine geringere Adhäsion als an unbehandeltem Glas zur Folge. Ein immer wieder vorhandenes Problem in der Untersuchung der Adhäsion von Bakterien ist die Schwierigkeit der Definition von identischen Bedingungen. Dies bewegte Linton et al. zur Bakterienzüchtung in einem Chemostat, unter möglichst kontrollierten Bedingungen. Bei den eigenen hier dargestellten Versuchen mit dem Robbins Device wurde versucht, möglichst identische Bedingungen zu schaffen, als Voraussetzung für die Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher Versuche. Dies erfolgte mit für jeden Versuch frisch auf Blutagar angezüchteten Bakterien und mit konstantem Ablauf hergestellten Übernacht- und Starterkulturen. Die Reproduzierbarkeit stellte sich trotzdem -wie schon im Ergebnisteil erläutert- nur mit Einschränkungen gewährleistet dar. Auch Linton et al stellten sich die Frage, wann von Adhäsion und wann tatsächlich von Biofilmbildung der Bakterien im Robbins Device gesprochen werden kann. Sie gingen dieses Problem durch eine Behandlung der frisch aus dem Robbins Device entfernten Testmaterialien mit einer Luft-Wasser-Zwischenstufe an, unter Ablösung von nur locker angehafteten Bakterien auf diesem Wege. Ähnliches wurde im Rahmen der eigenen Dissertation praktiziert, durch Spülung des MRD mit PBS nach Inokulation mit der Bakterienkultur. Hier sollten ebenfalls die nicht vollständig adhärerten Bakterien -wie bei den Versuchen von Linton et al.- von den Silikonscheibchen abgelöst werden. Wieweit bei beiden Methoden tatsächlich nur noch die Biofilmbakterien auf den Oberflächen haften blieben, bleibt offen. Nicht nur die

Fließgeschwindigkeit schien eine Auswirkung auf die Bakterienadhäsion zu haben, sondern auch die Vorbehandlung der verwendeten Materialien. Ein Effekt durch die Variation der Fließrate war dennoch nur bei bestimmten Materialien vorhanden, wie oben diskutiert. Eine Vorbehandlung der Materialien durch z. B. Plasma bewirkte bei Linton et al. eine Abnahme der Adhäsion von *S. epidermidis* RP62A. Unterschiedliche andere Zusatzmaßnahmen wie Sterilisation, Behandlung der Scheibchen aus unterschiedlichen Materialien mit Luft und Wasser hatten möglicherweise bei den Versuchen von Linton et al. ebenfalls Effekte auf die Bakterienadhäsion. Es läßt sich schlußfolgern, dass die in unseren Versuchen durchgeführte Sterilisation als Autoklavieren der Silikonscheibchen vor Einsetzen in das MRD sowie das Spülen mit sterilem Wasser vor Inokulation des Systems mit der Bakterienkultur möglicherweise Auswirkungen auf die Adhäsion des *S. aureus* DSM20231 hatten, da *S. aureus* in seiner Biofilmbildung sehr empfindlich gegenüber äußeren Faktoren ist (41).

Adams et al. (2), Untersuchung von E. coli-Biofilmen

1999 nutzten Jennifer L. Adams und Robert J. C. McLean ein MRD zur Untersuchung der Expression des *rpoS*-Gens in *E. coli*-Biofilmen. Hierbei handelt es sich um ein Gen, dass durch langsames Wachstum aktiviert wird. Geprüft wurden zwei *E. coli*-Stämme, ZK126, ein *rpoS*-positiver Stamm, und ZK1000, ein *rpoS*-negativer Stamm. Diese Stämme wuchsen bei unterschiedlichen Raten in einem Glukose-limitierten Chemostat, das entweder mit einem MRD oder einer Fließzelle aus Glas verbunden war. An den Stempeln des Robbins Device waren Scheibchen aus Silikongummi befestigt, die aus Urinkathetern hergestellt worden waren. Mit dieser Methoden fanden sie, daß das *rpoS*-Gen unter planktonischen Wachstumsbedingungen keine große Rolle zu spielen scheint, im Gegensatz zum Wachstum unter Biofilmbedingungen: Durch Auszählen der colony forming units zeigte sich, dass die *rpoS*-Mutante eine um 50 % geringere Biofilm-Zelldichte aufwies. Auf Bildern, die mittels scanning confocal laser microscopy gemacht wurden, waren auch morphologische Unterschiede im Zell-Arrangement zwischen den *rpoS*-positiven und *rpoS*-negativen Bakterien erkennbar.

Schultz et al. (73), Untersuchung der Haftung von Pseudomonas aeruginosa 15442 und Serratia marcescens 8100 an weichen Kontaktlinsen

1995 stellten C. L. Schultz, M. R. Pezzutti, D. Silor und R. White ihre Ergebnisse vor. Um Bakterien von ungetragenen Kontaktlinsen unterschiedlichen Materials zu lösen, benutzten sie ein modifiziertes Vortex-device. Es wurden Kontaktlinsen aus Etafilcon A, Vifilcon A und Polymacon getestet. Als Kontrolle dienten Hydrogel-Kontaktlinsen, positiv und negativ geladen. Bei *P. aeruginosa* und *S. marcescens* war die Adhäsion an die unterschiedlichen

Materialien sehr ähnlich, nur unter der Voraussetzung, daß die Experimente unter der optimalen Adhäsionstemperatur des jeweiligen Bakteriums stattfanden. Im Vergleich der einzelnen Linsen-Materialien untereinander war ebenfalls kein deutlicher Unterschied erkennbar. Getragene und ungetragene Etafilcon-A-Kontaktlinsen wurden im modifizierten Robbins Device getestet, in Hinblick auf die Frage, ob *P. aeruginosa* im direkten Vergleich stärker an benutzten oder unbenutzten Linsen haftet. Die Bakterienkultur wurde für eine Stunde bei 32° C mittels einer Peristaltikpumpe durch das Device gepumpt mit einer Fließrate von 50 ml/Minute. Dann wurden beide Enden des Device verschlossen. Die im Device verbliebene Kultur besiedelte unter sanfter Agitation die Kontaktlinsenscheibchen für fünf Stunden bei 35° C. Zum Zeitpunkt null, nach drei und nach fünf Stunden wurden Proben entnommen. Die Adhäsion an den ungetragenen Kontaktlinsen war größer. In den erläuterten Versuchen von Schultz et al. lagen nur anfänglich Fließbedingungen vor, später stand die Flüssigkeitssäule. Im Rahmen der Experimente dieser Dissertation lagen konstant Fließbedingungen vor, um die physiologischen Strömungen im menschlichen Körper zu imitieren.

Evans und Holmes (23), Testung des Effekts von Vancomycin-Hydrochlorid auf S. epidermidis-Biofilme an Silikonelastomeren

Das dort beschriebene Robbins Device aus rostfreiem Stahl war die Vorlage zur Fertigung des in dieser Dissertation verwendeten Robbins Device. Evans und Holmes untersuchten die Fähigkeit von Vancomycin-Hydrochlorid, *S. epidermidis*, der in seiner Biofilmform wahrscheinlich an hartnäckigen, rezidivierenden Katheterinfektionen bei der Peritonealdialyse beteiligt war, in eben diesem erwähnten Zustand zu eliminieren. Sie verwendeten hierzu ein typisches Antibiotika-Regime zur Behandlung der Peritonitis. Zur *in vitro*-Biofilmbildung wurde das Robbins Device zwei Stunden bei einer Fließrate von 60 ml pro Stunde von einer *S. epidermidis*-Suspension durchspült, vermischt mit sterilem, synthetischem Dialyse-Spülmedium. In diesen zwei Stunden adhärten die Bakterien an die 25 Silikonscheibchen im Device. Anschliessend wurden die besiedelten Scheibchen in ein weiteres steriles Robbins Device transferiert. Dieses wurde für 72 Stunden bei einer Fließrate von 60 ml pro Stunde und einer Temperatur von 37° C konstant mit sterilem synthetischem Dialyse-Spülmedium gespült. Nach 72 Stunden wurden zwei bis drei Silikonscheibchen entnommen für die Ermittlung der sichtbaren und totalen Zellquantität. Zusätzlich wurden sie mittels SEM begutachtet. Alle restlichen Scheibchen wurden dann auf Test-Röhrchen verteilt, die entweder 10 ml Dialyse-Spülmedium mit 25 µg Vancomycin per ml enthielten oder Kontrollröhrchen mit 10 ml reinem Dialyse-Spülmedium. Diese zweite Phase des Experiments simulierte

stehende Flüssigkeit im Peritoneum. Sie sollte die Reaktion von Katheter-assoziiertem Biofilm im Körper auf das intraperitoneal verabreichte Vancomycin imitieren. Die Scheibchen wurden täglich in frische Flüssigkeit umgelagert. Zusätzlich erfolgten nach einem, vier, sieben und zehn Tagen wiederum Probeentnahmen aus den Kontrollröhrchen und den Dialyse-Medium-Röhrchen, zur Überprüfung der sichtbaren und totalen Zellquantität und zur Betrachtung der Proben durch SEM. Die Antibiotikaempfindlichkeit wurde an der Bakterienkultur, mit der das Robbins Device beimpft worden war und an einem Homogenat - das aus den 72 Stunden alten Biofilmbakterien gewonnen wurde - getestet. Erstaunlicherweise war nach zehn Tagen zwischen den Vancomycin-exponierten Staphylokokken und den Staphylokokken aus den Kontroll-Röhrchen kein signifikanter Unterschied feststellbar, die Morphologie (SEM-Aufnahmen) und die Zellzahlen betreffend. Die dem Vancomycin ausgesetzten Bakterien zeigten lediglich eine Wachstumsabnahme von $0,5 \log_{10} \text{ CFU/cm}^2$. Die MHK und MBK der Original-Staphylokokken-Suspension betragen $3,125 \mu\text{g/ml}$ und $6,25 \mu\text{g/ml}$. Die MHKs der Biofilm-Homogenat-Suspensionen betragen $3,125 \mu\text{g/ml}$, die MBKs waren größer als $400 \mu\text{g/ml}$. Die Beobachtung, dass ein Staphylokokken-Biofilm über zehn Tage trotz konstanter Vancomycin-Exposition weiterbesteht, geht konform mit den Erfahrungen aus dem klinischen Alltag: Katheterinfektionen bei Peritonealdialyse und generell alle Infektionen einhergehend mit Biofilmbildung sprechen sehr schlecht auf antibiotische Behandlung an. Die Ursache hierfür wird noch nicht völlig verstanden.

Domingue et al. (21), Testung von Antibiotikaempfindlichkeiten adhärierter Bakterien in in-vitro-hergestellten Biofilmen

Ähnlich wie Evans und Holmes (23) untersuchten Domingue et al. Antibiotikaempfindlichkeiten von adhärerten Bakterien. Hierfür verwendeten sie ebenfalls einen Versuchsaufbau mit sogar zwei Robbins Devicen. Die Untersuchungen waren eher anwendungsorientiert konzipiert und basierten auf nach den Richtlinien des NCCLS durchgeführten MHK- und MBK-Testungen. Domingue et al. betonten die Relevanz des Problems der biofilmassoziierten Infektionen im klinischen Alltag und die notwendige Optimierung der antibiotischen Behandlungsschemata gegen bakterielle Biofilme. Als Kontrollstämme wurden von Domingue et al. *S. aureus* ATCC29213 und *P. aeruginosa* ATCC27853 eingesetzt. Die klinischen Stämme waren ein CAPD-Isolat von *S. epidermidis* und ein Urogenital-Trakt-Infektions-Isolat von *P. aeruginosa*. Die verwendeten Antibiotika waren Cefuroxim und Vancomycin für die Staphylokokken, Tobramycin und Piperacillin für die Pseudomonaden. Der Versuchsaufbau bzw. -ablauf war wie folgt: Die Stempel der Robbins Devices wurden mit Membranfilterscheibchen von 6 mm Durchmesser versehen. Die

beiden Devices -nun entsprechend modifiziert- wurden anschließend mit Gas sterilisiert. Dann wurden beide aseptisch über eine Pumpe mit jeweils einer Flasche verbunden. Diese Flasche enthielt einen Liter Mueller-Hinton-Agar, auf 35° C temperiert. Für die Pseudomonaden war vorher noch Calcium und Magnesium zum Agar hinzugefügt worden. Es folgte eine Inokulation der Flaschen mit der entsprechenden Staphylokokken- bzw. Pseudomonaskultur über Nacht, bis zu einer Zieldichte von 10⁶ CFU/ml. Es wurden 15 Liter Luft pro Stunde in die Flaschen gegeben. Die Kultur wurde mit einem Rührstäbchen für ein bis zwei Stunden gerührt. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte von ungefähr 2 x 10⁶ CFU/ml, wurde ein Fluß von 300 ml/h über die Filterscheibchen initiiert. Nach einer Stunde Fluß zeigte sich eine Besiedelung der Scheibchen von 10⁴ CFU sich aktiv teilender Bakterien. Nach der Kolonisation wurden die planktonischen Bakterien ausgezählt. Zusätzlich wurde ein Bouillondilutionstest zur Ermittlung der MHK und MBK durchgeführt. Ein Agardilutionstest diente ebenfalls der Ermittlung der MHK der planktonischen Bakterien. Die adhärenierten Bakterien wurden mittels Ultraschall von den Filterscheibchen abgelöst und -wie eben schon erläutert- prozessiert. Manche der Filterscheibchen wurden zur Elektronenmikroskopie verwendet. Die durch Verwendung von Ultraschall abgelösten Bakterien wurden –wie die planktonischen Bakterien- einem Agardilutionstest zur MHK- und MBK-Bestimmung zugeführt. Die Ergebnisse zeigten -wie erwartet- eine hohe phänotypische Toleranz der adhärenierten Bakterien gegenüber den getesteten Substanzen. Irreführend niedrige MHKs intakter Mikrokolonien reflektierten den Aspekt des jungen, sich gerade entwickelnden Biofilms. Die Daten sind mit den bisherigen Kenntnissen über Biofilmbildung und -entwicklung konform gehend: Den NCCLS-Richtlinien folgend, waren die untersuchten adhärenierten Bakterien annähernd zwei Stunden alt. Sie konnten nach dieser kurzen Zeit noch nicht die für Biofilmbakterien typischen erhöhten MHKs zeigen.

Sanford et al (70), Nutzung eines MRD zur Durchführung eines Lectin-Biotin Assays mit Biofilm von S. epidermidis

Es wurden die *S. epidermidis*-Stämme RP62A und M187sp11 verwendet. Ein Lectin-Biotin-Assay wurde entwickelt, um Biofilm dieser beiden Stämme zu identifizieren. Die *in vitro*-Züchtung des Biofilms erfolgte in einem an ein Chemostat gekoppelten Robbins Device. Als Adhäsionsmaterial waren Polyvinylchloridscheibchen im Gebrauch, die nach gründlichem Waschen mit destilliertem Wasser und anschließender Trocknung in das Robbins Device eingebracht worden waren. Dann wurde das fertig präparierte Device mit Ethylenoxid sterilisiert und in einem Inkubator bei 37° C gelagert. 750 ml steriles FMC-Medium wurden in ein Chemostat gegeben. Es erfolgte eine Inokulation des FMC-Mediums mit 10⁶ CFU

Bakterien. Der Kultur wurden anschließend 0,2 l Raumluft pro Minute bei 37° C zugeführt. Weiterhin wurde sie mit einer Geschwindigkeit von 200 rpm für 24 Stunden geschüttelt. Frisches Medium wurde mit einer Rate von 30 ml pro Stunde addiert. Die Kultursuspension wurde ebenfalls mit einer Rate von 30 ml pro Stunde durch das Robbins device transportiert. Sanford et al ließen aus dem Device entfernte Scheibchen erst abtropfen und befreiten sie mit PBS von nicht vollständig adhärierten Bakterien. Die vollständig adhärierten Bakterien wurden mit einer sterilen Nadel von der Scheibchenoberfläche entfernt und weiter zur quantitativen Auswertung oder zur Elektronenmikroskopie verwendet. Weiterhin wurden Scheibchen zur Ablösung adhärierter Bakterien mit Ultraschall in einem Ultraschallwasserbad behandelt. Sie wurden dann gevortext und nach Erstellung einer Verdünnungsreihe auf TSA ausplattiert. Zur Betrachtung unter dem Transmissionselektronenmikroskop wurden die Bakterien auf den Scheibchen fixiert und mit Ruthenium-Rot angefärbt. Nach der Reaktion von Biotin-gelabelten Lectinen (WGA, S-WGA und Con A) mit Bakterien auf den Polyvinylchloridscheibchen, wurden diese Scheibchen ebenfalls der TEM zugeführt. Andere Scheibchen wurden einer Antikörperreaktion gegen PS/A zugeführt, unter Nutzung einer Immunogold-Prozedur. Es zeigte sich in den Ergebnissen, daß WGA und S-WGA -die spezifisch an N-Acetylglucosamine binden- nur mit der Polysaccharidmatrix des Biofilms reagierten. Im Kontrast dazu reagierten Con A, APA und Anti-PS/A mit der Oberfläche der Bakterien, dafür aber nicht mit der Matrix. Die Ergebnisse zeigten den Nutzen von WGA-Lectin um die Polysaccharidmatrix von Biofilmen zu detektieren. Hier wurde also ein Verfahren entwickelt, was als Detektor für Biofilmbildung einsetzbar ist.

Jensen et al. (37), Einfluß von Biofilmformation auf die Immunantwort durch polymorphkernige, neutrophile Granulozyten

Ein bekanntes und schwieriges Problem in der klinischen Medizin ist die bronchopulmonale Infektion von Zystische-Fibrose-Patienten mit *P. aeruginosa*. Die Vermutung, dass bei diesen bronchopulmonalen Infektionen Biofilminfektionen vorliegen könnten, brachte Jensen et al dazu, sich näher mit der Thematik zu befassen. Sie fokussierten sich auf die Untersuchung der Reaktion polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten auf Pseudomonaden. Es wurden Biofilm- und planktonische Pseudomonaden im Vergleich getestet. Von besonderem Interesse war hierbei die „oxidative burst reaction“, die Bildung freier Sauerstoffradikale durch die neutrophilen Granulozyten zur Elimination von Erregern. Die Versuche wurden mit *P. aeruginosa* 6680/85 durchgeführt, einem klinischen bronchopulmonalem Isolat von einem Patienten mit Zystischer Fibrose. Zur Biofilmbildung wurde auch hier ein Robbins Device genutzt. Eine belüftete Kultur von *P. aeruginosa* wurde mit einer Geschwindigkeit von 40 bis

60 ml pro Stunde durch das Device transportiert. Die Adhäsion der Erreger fand an Silikonscheibchen statt. Nach 20 bis 24 Stunden wurden die Scheibchen aseptisch entfernt und mit Salzlösung gespült. Dann wurden sie für 45 Minuten im feuchten Milieu aufbewahrt und dem PMN-Assay zugeführt. Für einige Versuche wurde eine mechanische Beschädigung des Pseudomonas-Biofilms auf den Silikonscheibchen vorgenommen. Anschließend wurden diese Scheibchen in einem Reaktionspuffer gebadet, gevortext und leicht mit Ultraschall behandelt. Die Auswertung erfolgte im Fall der planktonischen Bakterien durch Auszählen der CFU auf Lactose-Agar und 5 %-igem Blutagar. Die Biofilmbakterien wurden nach dieser Prozedur ebenfalls ausgezählt. Die Erhebung der totalen Bakterienzahl -ohne Differenzierung zwischen toten und vitalen Erregern- erfolgte in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, unter Nutzung anoptraler Mikroskopie. Planktonische Bakterien und Biofilmbakterien wurden durch Rotation mit Serum opsoniert. Zur Untersuchung des Unterschieds zwischen beschädigtem und nicht-beschädigtem Biofilm mittels Chemilumineszenz wurden normales Humanserum und Immunsersum benutzt. Für andere Experimente kam lediglich normales Humanserum zur Anwendung. Die Chemilumineszenz-Antwort der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten auf die Biofilmbakterien war auf 30,5 bis 47,5 % reduziert, im Vergleich zur Antwort auf die planktonischen Bakterien. Die Superoxidantwort war vergleichsweise auf 85,9 % reduziert. Eine eventuelle Erklärung dafür, dass die Chemilumineszenz-Antwort durch die Biofilmbakterien stärker gesenkt wurde als die Superoxidantwort, ist in der suboptimal kleinen Zahl an Biofilm-Bakterien zu suchen, die überhaupt mit den Granulozyten in Berührung kamen. Dennoch lassen die Ergebnisse einen Rückschluß auf die Bedingungen *in vivo* zu: Hier werden im Falle einer Biofilmbildung ebenso wenig Möglichkeiten für Granulozyten bestehen, Biofilmbakterien einzeln, aus dem Verbund herausgelöst anzutreffen. Bei Beschädigung des Biofilms war ein Anstieg des oxidativen Bursts zu verzeichnen, was sich somit problemlos nachvollziehen läßt. Interessanterweise berichteten Jensen et al, dass die Untersuchung der Superoxidantwort stör anfälliger war als die Chemilumineszenz. Im Rahmen des letzteren Assays wurden außerdem die extra- und die intrazelluläre Myeloperoxidase gemessen, die Superoxid-Anionen nur extrazellulär. Zum Einfluß von intra- und extrazellulären Prozessen fehlen noch genauere Untersuchungen. Eine Beeinflussung der Immunantwort scheint ebenso durch die Biofilmglykokalix selbst zu bestehen. Insbesondere ist hier der Alginat-Gehalt von Bedeutung. Es scheint viele Komponenten in Biofilmen zu geben, die die Antwort des Immunsystems beeinflussen. Dennoch ist hierüber bis jetzt wenig bekannt.

6.3 Diskussion der eigenen Ergebnisse

6.3.1 Mikrotiterplattenversuche

6.3.1.1 Testung der unterschiedlichen Bakterienstämme

6.3.1.1.1 *S. epidermidis* als potentester Biofilmbildner

In den hier durchgeführten Versuchen erwies sich *S. epidermidis* als stärkster Biofilmbildner, was sich mit den Befunden im klinischen Alltag deckt. Hier werden die koagulase-negativen Staphylokokken, insbesondere *S. epidermidis*, als Verursacher von hartnäckigen und schwer behandelbaren Biofilminfektionen beschrieben (3,18,19,38). Orientierend an der Dissertation von Becker (5), den Untersuchungen von Christensen et al. (16) und Gelosia et al. (27), wurde *S. epidermidis* RP62A als Positivkontrolle in den hiesigen Mikrotiterplattenversuchen verwendet. Eine durchschnittliche optische Dichte von 0,961 wurde ermittelt. Im Bereich von 48 und 72 Stunden lagen die OD-Werte über eins, womit kein linearer Zusammenhang mehr zwischen optischer Dichte und der Zahl der adhärenierten Zellen anzunehmen ist. Dennoch zeigte sich eindeutig, dass es sich um den stärksten der in meiner Arbeit verwendeten Biofilmbildner handelte. Bei Beckers Untersuchungen (5) bot nur *S. aureus* SA 113 vergleichbare bzw. noch höhere Werte. Diese Tatsache könnte als Hinweis gelten SA 113 für weitere Untersuchungen zu verwenden, die bezogen auf die Biofilmbildung von *S. aureus* erfolgen.

6.3.1.1.2 Die Rolle von *clpC* bei der Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus*

Wie im Ergebnisteil dargestellt wurde, ist der *S. aureus*-Stamm DSM20231 ein schwacher Biofilmbildner, der Klassifikation von Christensen et al. (16) folgend. Er erreichte eine durchschnittliche optische Dichte von 0,214. Becker (5) stuft ihn anhand ihrer Ergebnisse als starken Biofilmbildner ein. Dies weist auf eine eingeschränkte Vergleichbarkeit der Messergebnisse hin, da Becker bei der diesbezüglichen Einteilung der Erreger nicht streng der Klassifikation von Christensen et al (16) folgte. Den Durchschnittswert der optischen Dichte betrachtet, der bei der *clpC*-defizienten Mutante gemessen wurde -nämlich 0,215- lässt sich kein Unterschied zum Wildtyp feststellen. Der dann bei der wieder komplementierten Mutante gemessene Wert betrug allerdings nur noch 0,173. Worauf diese deutliche Diskrepanz zum Wildtyp beruht ist unklar, da davon ausgegangen werden könnte, dass bei Komplementierung des deletierten Gens ähnliche Werte wie beim Wildtyp erreicht werden würden. Bei der Erörterung der Werte des Wildtyps und der Mutante stellt sich die Frage, ob

clpC überhaupt eine Rolle in der Biofilmentstehung oder -unterhaltung zugesprochen werden sollte. Laut Becker, Hufnagle, Peters und Herrmann ist dies durchaus gerechtfertigt (4). Bei der Durchführung einer Micro-Representational-Difference-Analysis fanden sie Unterschiede zwischen planktonischen und Biofilmbakterien von *S. aureus* DSM20231 bezüglich der Expression von Genen für eine Threonyl-tRNA-Synthetase, eine Phosphoglycerat-Mutase, eine Alkohol-Dehydrogenase und interessanterweise für die ClpC-ATPase. Die Expression des *clpC*-Gens wurde bei den Versuchen hochreguliert. Wie bereits in der Einleitung unter 2.6.6.1 kurz angesprochen wurde, handelt es sich bei der von *clpC* kodierten ClpC-ATPase um ein generelles Streß-Protein, das bei einer großen Zahl von Pro- und Eukaryonten vorkommt. Es ist von erheblicher Bedeutung bei der Degradation von falsch-gefalteten Proteinen, bei der Sporulation, Zellteilung, der Regulation einiger Kompetenz-Gene und verschiedener Virulenzfaktoren. Zum Beispiel erkannten Nair et al. (55) bei Experimenten mit *Listeria monocytogenes*, dass die Anwesenheit von ClpC für die Invasion von Hepatozyten *in vivo* notwendig ist. Es wird von einer ClpC-abhängigen Regulation von für die Invasion bedeutsamen Virulenzfaktoren ausgegangen. O'Toole und Kolter (58) zeigten, dass *clpP* anscheinend essentiell für die Biofilmbildung von *Pseudomonas fluorescens* ist. Da ClpC als der ATPase-Partner der ClpP-Protease bei der Degradation von Proteinen zu agieren scheint, ist nicht ausgeschlossen, dass *clpC* ebenso eine Bedeutung bei der Biofilmbildung dieses Bakteriums zukommt. Die Ergebnisse von Becker et al. veranlaßten Chatterjee et al. (13 und in: Mack et al., 46) dazu, noch genauer auf die Bedeutung von ClpC einzugehen: Durch Beobachtung des Effekts von ClpC bei planktonischen Kulturen des DSM20231, speziell des Effekts beim Wildtyp und der *clpC*-defizienten Mutante, zeigte sich, dass nach dem normalen Durchlauf der exponentiellen, stationären Wachstumsphasen und einer post-exponentiellen Absterbephase bei dem Wildtyp nach der Absterbephase erneut Wachstum erfolgte. Dies war bei der Mutante nicht der Fall. Bei der Überprüfung der Glukose- und Acetatspiegel der beiden Bakterienstämme war offensichtlich, dass bei dem Wildtyp nach Aufbrauchen der Glukose zeitweilig der Acetatspiegel anstieg, dieser aber dann wieder abfiel. Bei der *clpC*-defizienten Mutante war dies nicht zu beobachten. Bei ihr blieben die Acetatspiegel erhöht. Diese Erkenntnisse suggerieren einen Einfluß von ClpC auf einen funktionellen Tricarbonsäuren-Zyklus, es wird angenommen, dass ClpC eventuell modulierend auf die Transkription oder direkt auf ein Enzym, wie z. B. die Aconitase wirkt. Der Aktivität dieses Tricarbonsäure-Zyklusses wird eine modulierende Wirkung auf einige Virulenzfunktionen von *S. aureus* zugesprochen, daher kann man zumindestens von einem indirekten Einfluß von ClpC auf die Virulenzfunktionen ausgehen. Ebenfalls eindeutige Bezüge konnten Frees et al.

(26) herstellen. Bei ihren Untersuchungen zeigte sich, dass die Anwesenheit von ClpC für die Vermehrung von Bakterien innerhalb tierischer Epithelzellen und bei hohen Temperaturen unentbehrlich war. Frees et al. beobachteten weiterhin, dass die Abwesenheit von ClpC eine Verminderung der Biofilmbildung zur Folge hatte. Die Abwesenheit der ClpP-Peptidase hatte bei den Untersuchungen an *S. aureus* eine biofilmfördernde Wirkung im Gegensatz zu den Ergebnissen, die bei Untersuchungen an *P. fluorescens* durch O'Toole und Kolter (57) gefunden wurden. Weiterhin sprechen Frees et al. (26) ClpX, einer Clp-ATPase mit wichtigen Funktionen im Bereich der Expression von Virulenzfaktoren, eine Rolle bei der Biofilmbildung zu. Seine Abwesenheit hatte nämlich wie bei ClpC eine Abnahme der Biofilmbildung bei *S. aureus* zur Folge.

6.3.1.1.3 Ergebnisse der Testung der Glukosekonzentrationen

Wie bereits im Ergebnisteil unter 4.1.2 erörtert wurde, zeigte sich bei einer Zugabe von 1,5 % Glukose und bei einer Zugabe von 2 % Glukose die stärkste Biofilmbildung unter statischen Bedingungen. Die Veröffentlichungen von Christensen et al. (16), Knobloch et al. (40), Lim et al. (44), Gelosia et al. (27), Dobinsky et al. (20), Mack et al. (48) und Rohde et al. (67) waren der Anlaß TSB für die eigenen Untersuchungen als Nährmedium zu verwenden. Vor der Testung des DSM20231 im MRD sollten Glukosekonzentrationen, die für die *in vitro*-Biofilmbildung speziell dieses Stammes günstig sind im Vorfeld getestet werden. Besonders bezüglich *S. aureus* können keine eindeutigen Empfehlungen gegeben werden, da hier unter den einzelnen Stämmen eine große Variabilität besteht und auch eine große Abhängigkeit von äußeren Einflüssen nämlich z. B. von Nährmedium und Glukosekonzentration. Knobloch et al. zeigten 2002 (40), dass die meisten klinischen *S. aureus*-Isolate in einem TSB-Glukose-Medium im Rahmen von Mikrotiterplattenversuchen biofilmpositiv waren. Bei *S. epidermidis* scheint die starke Abhängigkeit von äußeren Faktoren ebenfalls gegeben zu sein, dennoch nicht in so ausgeprägtem Maß wie bei *S. aureus* (40). Dennoch gibt es auch über *S. epidermidis* Berichte, dass die Glukosekonzentration im Nährmedium einen Einfluß auf das Maß der Biofilmbildung hat (20,48). Es sollen sogar Unterschiede zu beobachten sind, wenn das gleiche Nährmedium von unterschiedlichen Herstellern verwendet wird (48). Die Abhängigkeit vom Hersteller des Nährmediums beobachteten auch Rohde et al. (67). All diese Variablen gilt es bei der geplanten *in vitro*-Herstellung von Biofilmen zu beachten. Durch Mikrotiterplattenversuche über 72 Stunden, wurde versucht den Einfluß der Glukosekonzentration im TSB-Nährmedium auf die Biofilmbildung des *S. aureus* DSM20231 unter statischen Bedingungen zu verifizieren. Es zeigte sich bis zu einer

Glukosekonzentration von 1,5 % mit steigender Glukosekonzentration im Medium ein Anstieg der optischen Dichte des Biofilms. Bei 2 % Glukose war bereits ein Abfall der optischen Dichte zu verzeichnen. Dieser Abfall setzte bis zu einer Glukosekonzentration von 5 % fort. Bei 5 % war der niedrigste Messwert -nämlich 0,282- zu erheben. Offensichtlich besteht ein Glukose-Konzentrations-Optimum von 1 % bis 2 % für die Ausbildung von Biofilmen; ungeklärt bleibt nur, welche Mechanismen (z. B. metabolisch-adaptive Mechanismen, pH-Verschiebungen durch primäre Verstoffwechslung von Glukose, Generation von Exopolymeren wie PIA) zu dieser Glukose-Abhängigkeit beitragen. Für die weiteren Untersuchungen im MRD wurde entschieden, TSB-Medium mit einem Glukose-Zusatz von 2 % zu verwenden.

6.4 Ergebnisse der Parametertestung im modifizierten Robbins Device

6.4.1 Positionseffekt

Wie im Ergebnisteil unter 4.3.1 dargelegt wurde, hat die Position der Silikonscheibchen im Fließkanal auf das Ausmaß der Besiedelung mit Staphylokokken Einfluß. Von dem Stempel in Position eins entnommene Silikonscheibchen zeigten im Durchschnitt nach 24 Stunden eine Besiedelung von $1,74 \times 10^2$ CFU/ml. Bis zur Position vier war ein deutlicher Anstieg der Zahl an CFU zu verzeichnen, nämlich bis zu $4,92 \times 10^3$ CFU/ml. Dies stellte den größten gefundenen Wert dar. Von Position fünf bis neun waren die Ergebnisse sehr uneinheitlich, die Werte schwankten zwischen 10^1 und 10^3 CFU/ml. Der zweithöchste Wert wurde in Position zehn gefunden ($3,14 \times 10^3$ CFU/ml). Nach Position zehn wurden nicht mehr so hohe Werte erreicht, es waren keine Werte mehr im Bereich von 10^3 zu finden. Hieraus lässt sich ableiten, dass in den ersten zehn Positionen die größte Ausbeute an CFU/ml zu erwarten ist. Ein deutlicher Abfall der Zahl an gewonnen CFU/ml lässt sich nach Position zehn konstatieren. Der Einfluß der Positionierung im Fließkanal auf die Bakterienbesiedelung der Silikonscheibchen war nach statistischer Testung als signifikant einzustufen (siehe 3.2.5.6). Der Abfall der Besiedelung mit Erregern in den hinteren Stempel-Positionen läßt sich durch die Bedingungen im Strom innerhalb des Fließkanals begründen: Neben einem Inokulum-Effekt, der über weiter distal positionierten Scheibchen möglicherweise niedriger ist als über Scheibchen im proximalen Teil der Kammer ist hin und wieder eine geänderte Beschaffenheit des Mediums (Gradienten von Nährstoffen, Abbauprodukte und/oder Sauerstoffspannung über die Länge der Fließkammer) zu berücksichtigen. Wie bereits unter 5.1.1 erwähnt wurde, beobachteten Linton et al. (45) auch einen Positionseffekt. Sie erklärten sich die Abnahme der Zahl der adhärenierten Bakterien ebenfalls durch Sedimentation oder alternativ durch

Dezimierung einer adhärennten Subpopulation von Bakterien im Interaktionsstrom. Interessant im Kontext der *in vitro*-Biofilmherstellung mittels eines MRD wäre zu überlegen, ob die Laufzeit einen Einfluß auf den Effekt der Stempelposition hat, nämlich wie sich die Verteilung der adhärennten Bakterien auf die Stempel nach z. B. 48, 96 oder noch mehr Stunden verhalten würde, d. h. ob dieser Effekt weniger, stärker oder gleich bleibend vorhanden wäre.

6.4.2 Effekt von TSB bzw. TSB + 2 % Glukose

Es wurde der Effekt eines gebräuchlichen Nährmediums, also TSB (Grund-Glukoseanteil von 0,25 %) mit TSB, dem weitere 2 % hinzugefügt worden waren, verglichen. Dies erfolgte im MRD nach 3.2.3.1 bis 3.2.3.5. Es zeigte sich, dass bei Versuchen, bei denen der *S. aureus*-Stamm DSM20231 und TSB mit dem Grundgehalt an Glukose von 0,25 % getestet wurden, geringere Zahlen von CFU/ml über die Versuchsdauer von 96 Stunden zu beobachten waren. Nach 24 Stunden wurden $1,67 \times 10^4$ CFU/ml gezählt, nach 48 Stunden $7,20 \times 10^3$ CFU/ml, nach 72 Stunden $2,56 \times 10^5$ CFU/ml und nach 96 Stunden $5,24 \times 10^5$ CFU/ml. Bei Verwendung von TSB, dem weitere 2 % Glukose zugefügt wurde, war das Keimwachstum besser: Nach 24 Stunden $3,15 \times 10^4$ CFU/ml, nach 48 Stunden $4,92 \times 10^4$ CFU/ml, nach 72 Stunden $3,29 \times 10^6$ CFU/ml und nach 96 Stunden $7,56 \times 10^6$ CFU/ml. Diese Ergebnisse lassen schließen, daß durch die Glukosekonzentration im Nährmedium eine Beeinflussung der Biofilmbildung stattfindet. Von Interesse sind hierbei die Vorgänge auf molekularer Ebene.

6.4.2.1 Die Rolle der *ica*-Gene und ihre Beeinflussung durch Glukose

Dem *icaADBC*-Genlocus wird die kodierende Funktion für die an der Synthese des Polysaccharid-Intercellular-Adhesin beteiligten Enzyme zugeschrieben. Es liegt ein regulatorisches Netzwerk vor, welches die *ica*-Gene, PIA und die Biofilmbildung involviert. *icaADBC* kommt bei phänotypisch Biofilm-positiven und Biofilm-negativen *S. epidermidis*-Stämmen vor, wie Rohde et al (67) zeigten. Es wurden jedoch keine Stämme gefunden, die nicht über den *ica*-Genlocus verfügten und trotzdem Biofilm-positiv waren. Da es aber Stämme gibt, die über diesen Locus verfügen und trotzdem Biofilm-negativ sind, liegt die Vermutung nahe, dass noch zusätzliche Faktoren involviert sind, die dann determinieren, ob ein Stamm Biofilm-positiv oder -negativ ist. Bei *S. aureus* geht man inzwischen davon aus, dass alle *S. aureus*-Stämme über den *icaADBC*-Locus verfügen (40). Somit bestätigt sich nun wieder die Annahme, daß andere Faktoren zusätzlich involviert sein müssen, die einen Stamm als Biofilmbildner charakterisieren. Wäre nur der *ica*-Locus erforderlich, dann träfe

dies für alle *S. aureus* Stämme zu. Dennoch zeigt sich *S. aureus* diesbezüglich als sehr empfindlich. Er ist in seinem Biofilmphänotyp sehr stark durch Umweltbedingungen beeinflussbar, insbesondere auch durch die Glukosekonzentration im Nährmedium. Da letztere den Phänotyp hinsichtlich der Biofilmbildung beeinflusst, wird eine Wirkung auf Ebene der *ica*-Transkription angenommen. Im Falle von *S. aureus* scheint (wie schon in der Einleitung unter 2.6.1 erwähnt) der *agr*-Lokus einen starken Einfluß auf die Biofilmbildung zu haben, obwohl wiederum die PIA-Expression nicht direkt durch den *agr*-Lokus beeinflusst zu werden scheint. Bei Versuchen mit *S. epidermidis* von Dobinsky et al. (20) konnte der Einfluß von Glukose auf die *ica*-Ebene bestätigt werden. Bei Anwesenheit von Glukose im Nährmedium konnte PIA nachgewiesen werden und ein Biofilm-positiver Phänotyp. Interessanterweise war aber die *ica*-Transkription in der postexponentiellen und in der stationären Wachstumsphase herunterreguliert. Die maximale Transkription wurde bei Abwesenheit von Glukose in der stationären Phase des Wachstums beobachtet, hier ließen sich aber keine PIA-Entstehung und keine Biofilmbildung nachweisen. Beides konnte durch nachträgliches Hinzufügen von Glukose induziert werden. Zu den Messpunkten an denen PIA nicht nachweisbar war, konnten dennoch deutliche Mengen an *ica*-mRNA nachgewiesen werden. Biofilm-positive Kulturen zeigten zum gleichen Zeitpunkt signifikant weniger *ica*-mRNA. Diese Feststellungen lassen vermuten, daß Glukose zuerst eine Hoch- und dann eine Herunterregulation der *ica*-Transkription bewirkt. Trotz Herunterregulation der Transkription ist PIA nachweisbar. Dies bedeutet, daß *ica*-Genprodukte anscheinend nicht kontinuierlich erforderlich sind für die Akkumulation von PIA.

6.4.2.2 PS/A und PIA

Bei den meisten Autoren herrscht Einigkeit darüber, dass die Anwesenheit von Biofilm auch die von PIA bedingt, was unter anderem Rohde et al (67) darstellten. Unabhängig vom Nährmedium in ihren Experimenten mit *S. epidermidis* und dem Ausmaß der Biofilmbildung war festzustellen, daß immer eine Korrelation zwischen Biofilmbildung und der Nachweisbarkeit von PIA vorlag. Die Anwesenheit von Glukose scheint die Biofilmbildung - wie oben erwähnt- zu fördern über die Regulation des *ica*ADBC-Lokus. Wie inzwischen bekannt ist wird die Bildung von PIA über die Genprodukte von 1. *icaA*, die für eine N-Acetylglucosamine-Transferase kodiert, 2. von *icaC* und *icaD*, die für ein Membranprotein kodieren, und 3. *icaB*, welches für ein Signalpeptid kodiert, reguliert. Somit spielt Glukose auch aus dieser Sicht eine Rolle für die Bildung von PIA. Nicht abgeschlossen ist die Diskussion darüber, ob wirklich ein Unterschied zwischen PS/A und PIA vorliegt. Eventuell

soll es sich um das gleiche Polymer handeln. Bei Untersuchung dieser Fragestellung waren zwar Unterschiede in der Molekülgröße und den Substitutionen an den Glukosaminomolekülen vorhanden. Beide Polymere werden jedoch von den Genprodukten des *ica*-Lokus hergestellt und spielen anscheinend eine Rolle bei der Akkumulation (30,47,53,67). Die meisten Autoren tendieren deswegen aktuell dazu beide Polymere als identisch oder zumindest nahe verwandt anzusehen.

6.4.2.3 *rsbU*, *sigB* und IcaR

Bei *rsbU* handelt es sich um das erste Gen im *sigB*-Operon. RsbU und RsbV scheinen als positive Regulatoren von *sigB* zu fungieren, RsbW als negativer Regulator. Knobloch et al. (41) entdeckten, dass bei Anwesenheit von RsbU bei untersuchten *S. epidermidis*-Stämmen keine Biofilmbildung zu beobachten war. Bei Abwesenheit von RsbU wurde jedoch die Biofilmbildung induziert. Da RsbU ein positiver Regulator von *sigB* ist, war eine Schlußfolgerung, daß *rsbU* und *sigB* hemmenden Einfluß auf die Biofilmbildung haben könnten. Ein Phänomen, das sich bei den *rsbU*-negativen Mutanten beobachten ließ, war die Tatsache, dass subinhibitorische Alkoholkonzentrationen die Biofilmbildung förderten. Die Erklärung ist laut Knobloch et al. (4) wie folgt: Ein ebenfalls in die Inhibition der Biofilmbildung verwickelter Faktor scheint IcaR zu sein. IcaR wird anscheinend durch *sigB* gehemmt. Fällt die Wirkung von *sigB* weg, wie in den *rsbU*-negativen Mutanten, dann wird IcaR wirksam im Sinne einer Inhibition der Biofilmbildung durch eine Herunterregulation der *icaA*-Transkription. Bei Ethanol-Zugabe scheint eine Hemmung von IcaR zu entstehen. Es entwickelt sich wieder Biofilm. Zusätzlich beobachteten Knobloch et al. (4) auch eine Down-Regulation der Transkription des *icaADBC*-Lokus trotz Biofilmbildung. Das würde wiederum für einen weiteren, unbekanntem Regulator der PIA-Synthese sprechen. Knobloch et al. äußerten anhand ihrer Ergebnisse die Überlegung, dass es sich hierbei um einen Glukose-abhängigen Regulator handeln könnte. Das würde so wieder die große Wichtigkeit von Glukose für die Entwicklung von Biofilm bei Staphylokokken verdeutlichen. Bei *S. aureus* scheint *sarA* (siehe in der Einleitung unter 2.6.2) eine wesentlichere Funktion bei der Biofilmbildung zu haben als bei *S. epidermidis*. Genau gegensätzlich scheint es sich mit *sigB* für *S. epidermidis* zu verhalten. *sigB* erscheint hier von größerer regulatorischer Bedeutung als bei *S. aureus* (40,41). Zusammenfassend wird deutlich, daß Erkenntnisse über *S. epidermidis* nicht vorbehaltlos auf *S. aureus* übertragen werden sollten und umgekehrt.

6.4.2.4 *rbf*

Der regulator of biofilm formation wurde von Lim et al. (44) an *S. aureus* untersucht. Es wird vermutet, dass der Genlokus zumindest in ähnlicher Form auch in dem Genom von *S. epidermidis* zu finden ist. Wahrscheinlich handelt es sich um einen Transkriptionsregulator. Lim et al. sprechen *rbf* eine Aufgabe bei der Biofilmbildung auf Polystyrenen und Glas zu, insbesondere in den späteren Stadien des Biofilms. Bewiesen wurde eine Funktion bei der Biofilmbildung in Anwesenheit von Glukose und hohen Kochsalzkonzentrationen. Für Ethanol konnte dies nicht festgestellt werden. Wahrscheinlich liegt eine *ica*-unabhängige Funktionsweise vor.

6.5 Zusammenfassende Bewertung

Als abschließende Stellungnahme zu der Fragestellung aus der Einleitung dieser Arbeit läßt sich feststellen: Das MRD ließ sich zur Generation von Biofilmpopulationen von *S. aureus* etablieren. Eine besondere Herausforderung stellte die Lösung des Kontaminationsproblems dar (siehe 5.2.2.2). Es ließ sich eine Abhängigkeit des Bakterienwachstums und der Biofilmbildung im Gerät von der Glukosekonzentration im Nährmedium (siehe 5.3.2), der Position der untersuchten Scheibchen im Fließkanal (5.3.1) und der Versuchslaufzeit (5.4) zeigen. Bei den *in vitro* generierten Bakterienpopulationen handelt es sich tatsächlich um komplexe, dreidimensionale, in exopolymeren Substanzen eingebettete Biofilm-Organismen, wie im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt (5.1 bis 5.5). Die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen ist unter Verwendung eines MRD jedoch mit Einschränkungen gegeben (siehe 5.4). Nicht zu vernachlässigen ist ebenfalls der erhebliche zeitliche Aufwand im Vergleich zur routinemäßigen Generierung von planktonischen Populationen, der mit der Nutzung dieser Methode einhergeht (siehe 5.5). Klinisch bedeutsame Infektionen sind jedoch nahezu immer Infektionen mit sessilen, häufig mit Biofilm-Organismen. Daher ist zusammenfassend anzumerken, dass das MRD eine wertvolle Möglichkeit darstellt, die aus medizinischer Sicht ernstzunehmende Problematik von Infektionen mit biofilmbildenden Erregern detailliert *in vitro* zu untersuchen. Eventuell lassen sich anhand dieser *in vitro*-Versuche neue, erfolgreichere Therapiansätze als bisher entwickeln.

7 Literaturverzeichnis

1. Acharya KR, Passalacqua EF, Jones EY, Harlos K, Stuart DI, Brehm RD, Tranter HS (1994) Structural basis of superantigen action inferred from crystal structure of toxic-shock syndrome toxin-1. *Nature* 367: 94-97
2. Adams JL, McLean RJ (1999) Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 65: 4285-4287
3. Baker AS, Schein OD (1994) Ocular Infections. In: Bisno AL, Waldvogel FA (eds) *Infections associated with indwelling medical devices*. ASM Press, Washington, D. C., pp 111-134
4. Becker P, Hufnagle W, Peters G, Herrmann M (2001) Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis. *Appl Environ Microbiol* 67: 2958-2965
5. Becker P (2002) *Komprehensive Genexpressions-Analyse sessiler und planktonischer Populationen von Staphylococcus aureus DSM20231: Genetische und funktionelle Charakterisierung des clpC Gens als Paradigma differentiell exprimierter Transkripte*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster
6. Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Blevins JS, Smeltzer MS (2004) Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186: 4665-4684
7. Bernheimer AW, Rudy B (1986) Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 864: 123-141
8. Bhakdi S, Trantum-Jensen J (1991) Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* 55: 733-751
9. Blanco L, Choi EM, Connolly K, Thompson MR, Bonventre PF (1990) Mutants of staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1: mitogenicity and recognition by a neutralizing monoclonal antibody. *Infect Immun* 58: 3020-3028

10. Bohach GA, Dinges MM, Mitchell DT, Ohlendorf DH, Schlievert PM (1997) Exotoxins. In: Crossley KB, Archer GL (eds) *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York Edinburgh London Madrid Melbourne San Francisco Tokyo, pp 83-111
11. Boyd A, Chakrabarty AM (1994) Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 60: 2355-2359
12. Brown EJ (1986) The role of extracellular matrix proteins in the control of phagocytosis. *J Leukoc Biol* 39: 579-591
13. Chatterjee I, Becker P, Grundmeier M, Bischoff M, Somerville GA, Peters G, Sinha B, Harraghy N, Proctor RA, Herrmann M (2005) *Staphylococcus aureus* ClpC is required for stress resistance, aconitase activity, growth recovery, and death. *J Bacteriol* 187: 4488-4496
14. Cheung AI, Projan SJ, Edelstein RE, Fischetti VA (1995) Cloning, expression, and nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* gene (*fbpA*) encoding a fibrinogen-binding protein. *Infect Immun* 63: 1914-1920
15. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH (1982) Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 37: 318-326
16. 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: 996-1006
17. Christensen GD, Barker LP, Mawhinney TP, Baddour LM, Simpson WA (1990) Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 58: 2906-2911
18. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 67: 5427-5433

-
19. Dickinson GM, Bisno AL (1989) Infections associated with indwelling devices: concepts of pathogenesis; infections associated with intravascular devices. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 597-601
 20. Dobinsky S, Kiel K, Rohde H, Bartscht K, Knobloch JK, Horstkotte MA, Mack D (2003) Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J Bacteriol* 185: 2879-2886
 21. Domingue G, Ellis B, Dasgupta M, Costerton JW (1994) Testing antimicrobial susceptibilities of adherent bacteria by a method that incorporates guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *J Clin Microbiol* 32: 2564-2568
 22. Duthie ES (1954) The production of free staphylococcal coagulase. *J Gen Microbiol* 10: 437-444
 23. Evans RC, Holmes CJ (1987) Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 889-894
 24. Flock JI, Froman G, Jonsson K, Guss B, Signas C, Nilsson B, Raucci G, Hook M, Wadstrom T, Lindberg M (1987) Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Embo J* 6: 2351-2357
 25. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 42: 872-874
 26. Frees D, Chastanet A, Qazi S, Sorensen K, Hill P, Msadek T, Ingmer H (2004) Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 54: 1445-1462
 27. Gelosia A, Baldassarri L, Deighton M, van Nguyen T (2001) Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. *Clin Microbiol Infect* 7: 193-199
 28. Gilbert P, Das J, Foley I (1997) Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 11: 160-167

-
29. Goguen JD, Hoe NP, Subrahmanyam YV (1995) Proteases and bacterial virulence: a view from the trenches. *Infect Agents Dis* 4: 47-54
 30. Heilmann C, Peters G (2000) Biology and pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis*. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferreti JJ, Portnoy DA, Rood JI (eds) *Gram-positive pathogens*. ASM Press, Washington, D. C., pp 442-449
 31. Hill LR, Silvestri LG, Ihm P, Farchi G, Lanciani P (1965) Automatic Classification of *Staphylococci* by Principal-Component Analysis and a Gradient Method. *J Bacteriol* 89: 1393-1401
 32. Hof H, Müller RL, Dörries R (2000) *Duale Reihe, Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
 33. Höök M, Foster TJ (2000) *Staphylococcal surface proteins*. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferreti JJ, Portnoy DA, Rood JI (eds) *Gram-positive pathogens*. ASM Press, Washington, D. C., pp 386-391
 34. Hoyle BD, Costerton JW (1991) Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res* 37: 91-105
 35. Hussain M, Becker K, von Eiff C, Schrenzel J, Peters G, Herrmann M (2001) Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J Bacteriol* 183: 6778-6786
 36. Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA, Pier GB (2004) The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 186: 2449-2456
 37. Jensen ET, Kharazmi A, Hoiby N, Costerton JW (1992) Some bacterial parameters influencing the neutrophil oxidative burst response to *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Apmis* 100: 727-733
 38. Karchner AW, Gibbons GW (1994) Infections of prosthetic heart valves and vascular grafts. In: Bisno AL, Waldvogel FA (eds) *Infections associated with indwelling medical devices*. ASM Press, Washington, D. C., pp 213-250

-
39. Kharazmi A, Giwercman B, Hoiby N (1999) Robbins device in biofilm research. *Methods Enzymol* 310: 207-215
40. Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D (2002) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 191: 101-106
41. Knobloch JK, Jäger S, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D (2004) RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infect Immun* 72: 3838-3848
42. Lee PK, Vercellotti GM, Deringer JR, Schlievert PM (1991) Effects of staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1 on aortic endothelial cells. *J Infect Dis* 164: 711-719
43. Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley AP (2002) Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 70: 6339-6345
44. Lim Y, Jana M, Luong TT, Lee CY (2004) Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 186: 722-729
45. Linton CJ, Sherriff A, Millar MR (1999) Use of a modified Robbins device to directly compare the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* RP62A to surfaces. *J Appl Microbiol* 86: 194-202
46. Mack D, Becker P, Chatterjee I, Dobinsky S, Knobloch JK, Peters G, Rohde H, Herrmann M (2004) Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int J Med Microbiol* 294: 203-212
47. Mack D, Nedelmann M, Krokotsch A, Schwarzkopf A, Heesemann J, Laufs R (1994) Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* 62: 3244-3253

-
48. 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: 2048-2057
49. Maki DG (1994) Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy. In: Bisno AL, Waldvogel FA (eds) *Infections associated with indwelling medical devices*. ASM Press, Washington, D. C., pp 155-212
50. Marrack P, Kappler J (1990) The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248: 705-711
51. McClean D (1943) Methods of assay of hyaluronidase and their correlation with skin diffusing activity. *J Biochem* 37: 169-175
52. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ (1994) Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 11: 237-248
53. McKenney D, Hübner J, Muller E, Wang Y, Goldmann DA, Pier GB (1998) The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect Immun* 66: 4711-4720
54. Møller S, Pedersen AR, Poulsen LK, Arvin E, Molin S (1996) Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Appl Environ Microbiol* 62: 4632-4640
55. Nair S, Milohanic E, Berche P (2000) ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 68: 7061-7068
56. O'Toole GA, Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295-304
57. O'Toole GA, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28: 449-461
58. Pedersen K (1982) Method for studying microbial biofilms in flowing-water systems. *Appl Environ Microbiol* 43: 6-13

-
59. Poulsen LK, Ballard G, Stahl DA (1993) Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl Environ Microbiol* 59: 1354-1360
60. Projan SJ, Novick RP (1997) The molecular basis of pathogenicity. In: Crossley KB, Archer GL (eds) *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York Edinburgh London Madrid Melbourne San Francisco Tokyo, pp 55-81
61. Prosser BL, Taylor D, Dix BA, Cleeland R (1987) Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1502-1506
62. Rachid S, Ohlsen K, Wallner U, Hacker J, Hecker M, Ziebuhr W (2000) Alternative transcription factor σ^B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J Bacteriol* 182: 6824-6826
63. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W (2000) Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 3357-3363
64. Rahme LG, Ausubel FM, Cao H, Drenkard E, Goumnerov BC, Lau GW, Mahajan-Miklos S, Plotnikova J, Tan MW, Tsongalis J, Walendziewicz CL, Tompkins RG (2000) Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8815-8821
65. Ramphal R, Vishwanath S (1987) Why is *Pseudomonas* the colonizer and why does it persist? *Infection* 15: 281-287
66. Robinson DL, Fowler VG, Sexton DJ, Corey RG, Conlon PJ (1997) Bacterial endocarditis in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 30: 521-524
67. Rohde H, Knobloch JK, Horstkotte MA, Mack D (2001) Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 190: 105-112

-
68. Ross RA, Onderdonk AB (2000) Production of toxic shock syndrome toxin 1 by *Staphylococcus aureus* requires both oxygen and carbon dioxide. *Infect Immun* 68: 5205-5209
69. Ruzickova V (1994) A rapid method for the differentiation of *Staphylococcus aureus* hemolysins. *Folia Microbiol (Praha)* 39: 112-114
70. Sanford BA, Thomas VL, Mattingly SJ, Ramsay MA, Miller MM (1995) Lectin-biotin assay for slime present in in situ biofilm produced by *Staphylococcus epidermidis* using transmission electron microscopy (TEM). *J Ind Microbiol* 15: 156-161
71. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184: 1140-1154
72. Schleifer KH, Fischer U (1982) Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Intern J System Bacteriol* 32: 153-156
73. Schultz CL, Pezzutti MR, Silor D, White R (1995) Bacterial adhesion measurements on soft contact lenses using a Modified Vortex Device and a Modified Robbins Device. *J Ind Microbiol* 15: 243-247
74. Scott P (1993) IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* 260: 496-497
75. Shirtliff ME, Mader JT, Camper AK (2002) Molecular interactions in biofilms. *Chem Biol* 9: 859-871
76. Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH (1999) Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasins via fibronectin bridging to integrin $\alpha_5 \beta_1$. *Cell Microbiol* 1: 101-117
77. Supersac G, Prevost G, Piemont Y (1993) Sequencing of leucocidin R from *Staphylococcus aureus* P83 suggests that staphylococcal leucocidins and γ -hemolysin are members of a single, two-component family of toxins. *Infect Immun* 61: 580-587
78. Trulear MG, Characklis WG (1982) Dynamics of biofilm processes. *J WPCF* 54: 1288-1301

-
79. Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, Penades JR, Lasa I (2003) SarA and not σ^B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 48: 1075-1087
80. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 9: 978-984
81. Verhoef J (1997) Host defence against infection. In: Crossley KB, Archer GL (eds) *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York Edinburgh London Madrid Melbourne San Francisco Tokyo, pp 213-232
82. Von Eiff C, Heilmann C, Peters G (1998) *Staphylococcus epidermidis*: Why is it so successful. *Clin Microbiol Infect* 4: 297-300
83. Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M (2000) Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 182: 1688-1693
84. Wadstrom T, Mollby R (1971) Studies on extracellular proteins from *Staphylococcus aureus*. VII. Studies on -haemolysin. *Biochim Biophys Acta* 242: 308-320
85. Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP (2004) Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186: 1838-1850

8 Veröffentlichung

1. Niamh Harraghy, Sarah Seiler, Karin Jacobs, Matthias Hannig, Michael D. Menger, Mathias Herrmann (2005) Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. Eingereicht bei: International Journal of Artificial Organs.

2. SEM-Bilder von Staphylokokken-Biofilmen publiziert in: U. Geipel, M. Herrmann (2004) Das infizierte Implantat (Der Orthopäde 2004, 33: 1411-1428)

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

In erster Linie danke ich Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, für das lange, ausgiebige Erörtern von Problemen bei der Umsetzung und schnelle, wirksame Hilfestellungen.

Indranil Chatterjee danke ich für das Einarbeiten in Labortechniken und die Mitbetreuung meiner Arbeit.

Karin Hilgert, Sylvain Kerdudou, Astrid Sobke und Niamh Harraghy danke ich für wertvolle Ratschläge und Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Dr. rer. nat. M. Klotz und Dr. rer. nat. W. K. Jung für die Beratung bei der Sterilisation von Arbeitsmaterialien, Ratschläge zum Versuchsaufbau und Anregungen zur Behebung von Kontaminationsproblemen.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Pedro Mestres für die Erlaubnis zur Nutzung des Scanning Elektronenmikroskops in der Anatomie. Hier danke ich besonders dem technischen Mitarbeiter Norbert Pütz für die Hilfe bei dem mühevollen und zum Teil auch schwierigen Unterfangen Aufnahmen von Biofilmpopulationen anzufertigen.

Univ.-Prof. Dr. Matthias Hannig und seinem Laborteam in der Zahnklinik für die Unterrichtung in der Technik zur Vorbereitung von Proben für die Betrachtung von Staphylokokken-Biofilm unter dem Scanning Elektronen Mikroskop.

Dr. Sarah Cramton für Auskunft über die Fähigkeit zur Biofilmbildung von diversen Staphylococcus-aureus-Stämmen.

Petra Becker für Auskünfte über die Vorarbeit mit dem Robbins Device an der Universität Münster.

Meinen Eltern für das Ermöglichen meines Medizinstudiums und für ihren wesentlichen Beitrag zu meinem Werdegang durch ihre große Anteilnahme an meinem Leben.

Meinen Freunden, hier insbesondere Till Brombach und Michael Filser, die mir bei Computer-Fragen und dem Arbeiten mit Word sehr hilfreich waren und allen anderen zu meinem Freundeskreis Gehörigen, für aufmunternde Worte in jeder Lebenslage und eine tolle Studienzeit.

10 Lebenslauf

Name: Sarah Seiler

Geburtsdatum: 14.10.1980

Geburtsort: Neunkirchen/Saar

Eltern: Prof. Dr. med. Johannes Seiler
Koula Seiler, geb. Melas

Konfession: Evangelisch

Familienstand: Ledig

Schule: 1986-1990 Grundschulbesuch in Neunkirchen und
Wadgassen
1990-1992 Besuch der Orientierungsstufe der Wilhelm-
Raabe-Schule in Bremerhaven
1992-1996 Besuch des Gymnasiums der Georg-Büchner-
Schule II in Bremerhaven
1996-1999 Besuch der Gymnasialen Oberstufe des
Schulzentrums Carl-von-Ossietzky

Studium: 1999 Immatrikulation für das Studium der Humanmedizin
an der Universität des Saarlandes
2002 Ärztliche Vorprüfung
2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005 Immatrikulation an der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg
2005-2006 Absolvierung des Praktischen Jahres am
Universitätsklinikum Heidelberg

1. Tertial: Innere Medizin
2. Tertial: Dermatologie
3. Tertial: Chirurgie

2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Heidelberg, den 14.11.05

Sarah Seiler

