

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
des Universitätsklinikums Tübingen  
Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Die Bedeutung der Biofilmbildung von  
*Staphylococcus aureus* für die bakterielle Persistenz im  
Respirationstrakt von Patienten mit der Erbkrankheit  
Mukoviszidose**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Kathrin Brigitte Gertrud Ziegler  
aus  
Sindelfingen  
2006

**Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen**

**1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Döring**

**2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Stern**

## Inhaltsverzeichnis

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1.1       | Biofilm .....  | 1         |
| 1.2       | Biofilmbildung von <i>Staphylokokken</i> .....   | 4         |
| 1.3       | Biofilm- assoziierte <i>S. aureus</i> Infektionen .....  | 9         |
| 1.4       | Cystische Fibrose.....   | 12        |
| 1.5       | Ziel der Arbeit.....   | 12        |
| <b>2.</b> | <b>Material und Methoden</b> .....   | <b>14</b> |
| 2.1       | Reagenzien und Chemikalien .....   | 14        |
| 2.2       | Antikörper.....  | 16        |
| 2.3       | Geräte .....   | 16        |
| 2.4       | Medien und Stammlösungen.....  | 16        |
| 2.5       | Computerprogramme .....  | 18        |
| 2.6       | Etablierung eines Phagozytoseassays mit adhären-<br>ten Einzelzellen und<br>Mikrokolonien von <i>Staphylococcus aureus</i> ..... | 18        |
| 2.6.1     | Mikrokolonie- und Biofilmbildung .....   | 18        |
| 2.6.2     | Bakterien .....  | 20        |
| 2.6.3     | Isolierung von Polymorphkernigen Neutrophilen<br>Granulozyten<br>(PMN) .....   | 20        |
| 2.6.4     | Phagozytoseassay .....   | 21        |
| 2.7       | Elektronenmikroskopie .....  | 25        |
| 2.8       | Indirekte Immunfluoreszenz .....   | 27        |
| 2.9       | Vitalitätstest.....  | 28        |
| 2.10      | Bestimmung der Superoxidanionen ( $O_2^-$ )-<br>Bildung durch PMN .....  | 30        |
| 2.11      | Statistische Analyse .....   | 30        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b> .....  | <b>31</b> |
| 3.1       | Etablierung eines Testes zur Untersuchung von <i>S. aureus</i><br>Einzelzellen, Mikrokolonien und Biofilm .....                  | 31        |
| 3.2       | Vitalitätstest.....  | 33        |
| 3.3       | Einfluß der Mikrokoloniebildung und PIA-<br>Produktion von <i>S. aureus</i> auf<br>die Phagozytose.....                          | 34        |
| 3.4       | Einfluß der Mikrokoloniebildung und PIA-<br>Produktion auf die<br>Produktion von Superoxidanionen .....                          | 40        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion</b> .....  | <b>42</b> |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung</b> .....   | <b>46</b> |
| <b>6.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b> .....  | <b>47</b> |
| <b>7.</b> | <b>Abkürzungen</b> .....   | <b>61</b> |

# 1. Einleitung

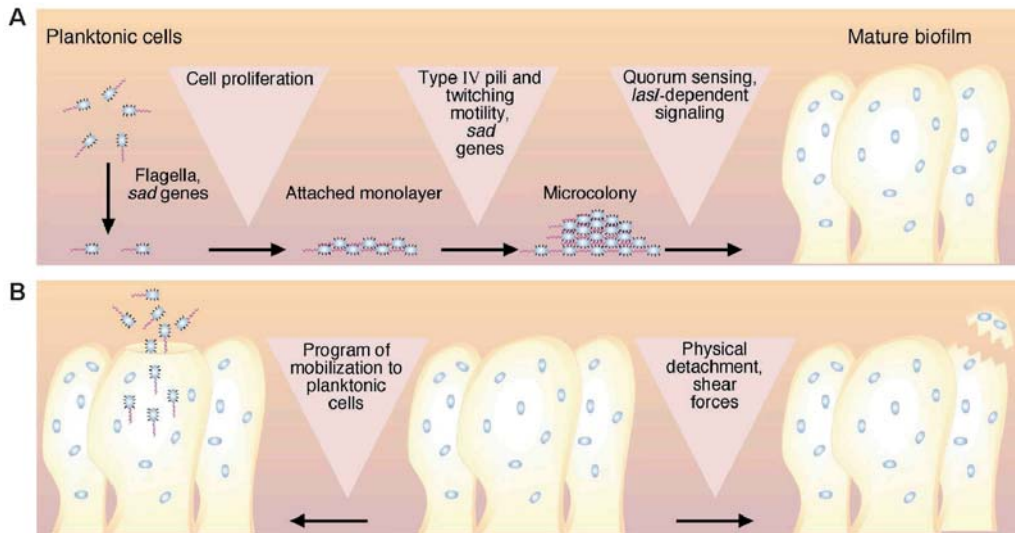
## 1.1 Biofilm

Biofilme werden definiert als sessile Gemeinschaften mikrobieller Zellen, die an einem Substrat oder einer Oberfläche und untereinander adhären sind, in eine von ihnen produzierte extrazelluläre Matrix aus polymeren Substanzen eingebettet sind und sich phänotypisch bezüglich Gentranskription und Wachstumsrate von ihren planktonischen Verwandten deutlich unterscheiden (22). Sie werden von verschiedensten Mikroorganismen vor allem in Wasser und wasserhaltigen Systemen gebildet und sind durch ein ubiquitäres Vorkommen gekennzeichnet (12). Beim Menschen stellen Biofilme bei der Entwicklung chronischer Infektionen und Besiedlung von Kathetern ein ernstzunehmendes Problem dar (14). Die Konversion planktonischer Zellen in eine Biofilmproduzierende Gemeinschaft adhärenter Zellen wird unter anderem durch Umweltstressfaktoren stimuliert. Die Bildung von Biofilmen ermöglicht Bakterien somit, auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren, um ihr Wachstum und Überleben zu gewährleisten. Als Umweltfaktoren, welche die Bildung von Biofilm beeinflussen können, wurden unter anderem Temperatur, pH-Wert, Osmolarität, Eisengehalt (65,20), Zuckergehalt (42) und Sauerstoffgehalt (16,95) des Mediums beschrieben. So produzieren zum Beispiel *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen vermehrt Biofilm (16,33,95). *Escherichia coli* O157:H7 scheint Biofilm unter Nährstoffmangel zu produzieren, während *E. coli* K-12 in Anwesenheit von Aminosäuren in Minimalmedium Biofilm bildet (20). Knobloch et al. zeigten, dass die Zugabe verschiedener Zucker zu Tryptone Soya Broth - Medium den Anteil Biofilmproduzierender *S. aureus*- Stämme signifikant erhöht (42).

Die Entwicklung des Konfokalen Laser Scanning Mikroskops ermöglichte die Untersuchung der Struktur nativer Biofilme (27,76). Die Zellen im

Biofilm existieren als traubenförmig angeordnete, gruppiert liegende Zellverbände, sogenannte Mikrokolonien, die Grundeinheiten des Biofilms (13,22,65). Diese Mikrokolonien sind eingebettet in eine von ihnen produzierte Exopolysaccharidmatrix, die reich an Wasser und fibrösen Strukturen ist und deren chemische Zusammensetzung speziesspezifisch ist (13,85). Zwischen den matrixumschlossenen Mikrokolonien durchziehen Wasserkanäle den gesamten Biofilm und stellen eine offene Verbindung zwischen oberflächlichen und tiefen Schichten des Biofilms dar. Diese Kanäle ermöglichen den Nährstofftransport vom umgebenden Medium in den Biofilm und den Abtransport metabolischer Produkte (20,13, 22, 76) (Abb.1).

Die Biofilmbildung scheint in mehreren Schritten abzulaufen (14,52,34,35,20,28) (Abb.1). Zunächst adhären die Bakterien mit Hilfe von Adhäsinen auf einer Oberfläche. *P. aeruginosa* benötigt dafür sowohl Flagellen, um in Kontakt mit der Oberfläche zu treten, als auch die in der Zellwand gramnegativer Bakterien verankerten Lipopolysaccharidkomplexe (LPS). Bei *E. coli*-Spezies erfordert die initiale Adhärenz das Vorhandensein von Flagellen und Typ I- Pili (20). In der Akkumulationsphase vermehren sich die Keime, bilden Mikrokolonien und produzieren die charakteristische Exopolysaccharidmatrix. Diese Phase ist ebenfalls an komplexe Regulationsprozesse gebunden. *P. aeruginosa* beispielsweise reduziert die Flagellarsynthese und exprimiert *algC*, ein Gen, das für die Produktion von Alginat, dem Exopolysaccharid von *P. aeruginosa* kodiert, drei- bis fünfmal so stark wie planktonische *Pseudomonaden* (20,65). Schließlich entsteht ein vielschichtiger, dichter Biofilm aus Mikrokolonien, die von einer Exopolysaccharidmatrix umgeben sind (14) (Abb.1).



**Abb. 1** A) Entstehungsmodell eines *P. aeruginosa* Biofilms aus planktonischen Zellen. Zuerst adhären die *Pseudomonaden* mit Hilfe von Flagella auf einer Oberfläche, auf der sie sich mit Typ IV- Pili (schwarz) bewegen können. Aus einschichtigen Bakterienlagen entstehen dann mehrschichtige, traubenförmig angeordnete Mikrokolonien. Über komplexe Regulationssysteme (hier *lasI*-abhängig) entsteht schließlich ein dichter, mehrschichtiger Biofilm aus Mikrokolonien, die von einer dichten Exopolysaccharidmatrix umgeben sind.

B) Ablösung von Bakterien aus dem Biofilm. Es werden zwei verschiedene Mechanismen angenommen, die zur Ablösung von Bakterien aus einem Biofilm führen können. 1. Eine programmierte Ablauffolge im Biofilm führt zu einer lokalen Hydrolyse der Extrazellulärmatrix und zur Konversion einer Subpopulation in planktonische Zellen, die den Biofilm verlassen. 2. Durch physikalische Scherkräfte werden Mikrokoloniefragmente aus dem Biofilm abgelöst und von der umgeben Strömung zu einem anderen Ort fortgetragen, an dem sie eine neue sessile Population bilden können (14).

Die Bakterien in adhären Biofilmen unterscheiden sich hinsichtlich vieler Merkmale deutlich von ihren planktonischen Verwandten. Sessile Zellen exprimieren verschiedene Gene stärker oder exprimieren zum Teil andere Gene als planktonische Bakterien (4,54,2). Als Beispiele hierfür seien das bereits erwähnte *algC* von *P. aeruginosa* und die in 1.2. beschriebenen Gene des *ica*- Locus von *S. epidermidis* und *S. au-*

*reus* genannt. Auch phänotypische Unterschiede konnten am Beispiel von *S.aureus* gezeigt werden: adhärente *S. aureus* sind kleiner, haben eine dickere Zellwand und enthalten weniger Gesamtprotein. Sie vermehren sich- wie planktonische *S. aureus*- zunächst exponentiell, jedoch mit einer nur etwa halb so hohen Wachstumsrate und treten dann in die stationäre Wachstumsphase ein (93).

Biofilmbakterien leben in dichten mikrobiellen Verbänden, in Mikronischen, in denen die Verfügbarkeit von Nährstoffen und die Konzentration giftiger Abfallprodukte von der metabolischen Aktivität der Nachbarzelle beeinflusst wird. Der Sauerstoffgehalt in den Mikrokolonien ist sehr gering, zum Teil herrschen sogar anaerobe Bedingungen (13,95).

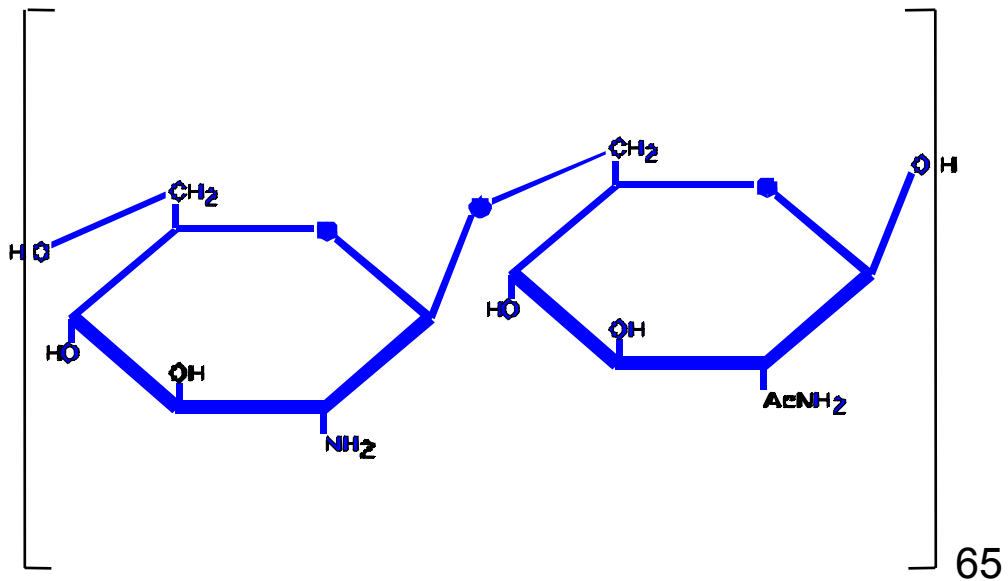
Durch die offenen Fließverbindungen werden Nährstoffe zwar in den Biofilm transportiert, gelangen aber aufgrund von Diffusionsbarrieren oft nicht bis ins Zentrum der Mikrokolonien. Es gibt Hinweise, dass im Biofilm vor allem in zentralen Anteilen Nährstoffmangel herrscht und die Zellen sich aufgrunddessen langsamer vermehren (7,93,22). Im Biofilm sind die Organismen gut geschützt gegen die Immunabwehr und resistent gegen Antibiotika (37,84,14) (1.3.).

## **1.2 Biofilmbildung von *Staphylokokken***

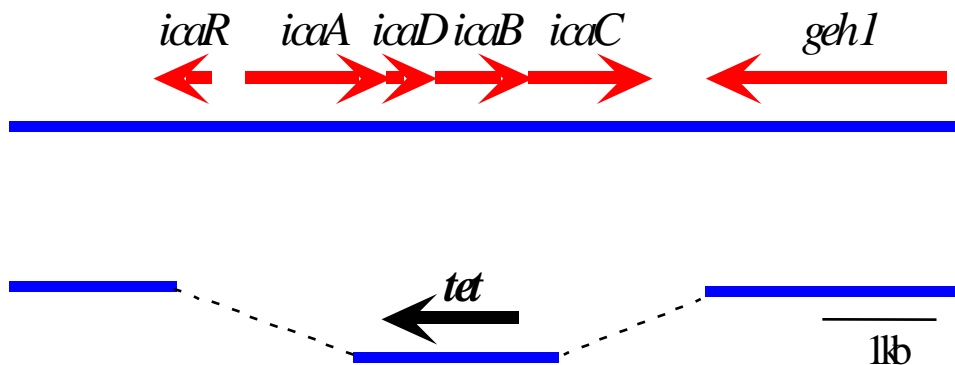
*Staphylokokken* sind grampositive Kokken, die fakultativ anaerob wachsen und unbeweglich sind. Bedeutung als Krankheitserreger beim Menschen haben vor allem *S. aureus*, der eine Plasmakoagulase produziert, und *S. epidermidis*, der zur Gruppe der koagulasenegativen *Staphylokokken* gehört (44). Sowohl *S. aureus* als auch *S. epidermidis* produzieren Biofilm (15,59,28,34,35). Bei *S. epidermidis* wurde das bei der Biofilmbildung produzierte Exopolysaccharid identifiziert als linear  $\beta$ -1,6- verknüpftes N- acetylglucosaminoglycan (53). Diese Substanz wurde Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) genannt (Abb.2). PIA führt zur Zell- Zell- Adhäsion und ist notwendig für die Biofilmproduktion (34). *S. aureus* produziert ein strukturell ähnliches Polysaccharid, ein

poly-N-succinyl- $\beta$ -1,6- verknüpftes Glucosamin (PNSG) (59). Es gibt jedoch deutliche Hinweise, dass diese beiden Substanzen tatsächlich identisch sind. Spezifische Antikörper gegen *S. epidermidis*- PIA und *S. aureus*- PNSG erkennen jeweils beide Antigene (16) und PNSG ist als Vakzine auch gegen Infektionen durch koagulasenegative *Staphylokokken* wirksam (59). Die Succinylgruppen von PNSG scheinen Artefakte zu sein (28). Neuere chemische Analysen konnten das Vorhandensein von Succinylgruppen in PNSG ebenfalls nicht bestätigen und identifizierten das Polysaccharid von *S. aureus* als  $\beta$ -1,6- verknüpftes N- acetylglucosamin (PNAG), welches in seiner chemischen Struktur eng mit PIA verwandt ist und sich hauptsächlich in der molekularen Größe von PIA unterscheidet (55). Mittels Herstellung von Transposon- Insertionsmutanten, die Biofilm- negativ waren, wurde der *intercellular adhesion locus* (*ica*- Locus) identifiziert (Abb.3), welcher für Bestandteile kodiert, aus denen PIA synthetisiert wird (34). Der *ica*- Locus ist sowohl in den meisten *S. aureus* als auch in *S. epidermidis* enthalten (15,34,35,2,74). Das Operon besteht aus einem *icaR* (Regulator) Gen und *icaADBC* (Biosynthese) Genen. Was über die Funktionen der einzelnen Genabschnitte bisher bekannt ist, ist in Tabelle 1 zusammengefasst (28,29,11,91). In vitro jedoch bildet oft nur ein Teil der *Staphylokokken* PIA und Biofilm, obwohl sie den *ica*- Locus besitzen (59,24,2,74).





**Abb. 2** Zwei  $\beta$ -1,6-verknüpfte Untereinheiten von PIA. Ein PIA- Molekül besteht aus circa 130 Untereinheiten, d. h. 65 dieser Zweiergruppen ergeben ein PIA- Molekül.



**Abb. 3** *ica*- Locus. *IcaA* und *icaD* synthetisieren Oligomere aus UDP-N-acetylglucosamin mit einer maximalen Länge von 20 Residuen. In Gegenwart von *icaC* werden längere Oligomere gebildet, die mit PIA- spezifischem Antiserum reagieren. *IcaB* kodiert für das Oberflächenprotein IcaB, welches über Deacetylierung von PIA die positive Oberflächenladung des Polymers erhöht. Dies führt zur verbesserten Oberflächenadhärenz von *S. epidermidis* und ist wichtig für die Biofilmbildung (91). *IcaR* kodiert für einen Transkriptionsrepressor, über dessen Regulation (vermehrte oder verminderte Expression) vermutlich die umweltabhängige *ica*- Transkription ermöglicht wird (28,11,91). Cramton et al. hatten durch Deletion des *ica*- Locus und Einsetzen einer Tetracyclinresistenz (*tet*) eine *ica*- negative Mutante hergestellt. Eine solche Mutante wurde auch in dieser Arbeit verwendet (2.6.2).

**Tab. 1** Funktionen der Genabschnitte auf dem *ica*- Locus

| Genabschnitt | Funktion   |
|--------------|--|
| <i>icaR</i>  | - Repressorgen (Deletion in <i>icaR</i> von <i>S. epidermidis</i> O-47 führt zu vermehrter Pia- Expression)  |
| <i>icaA</i>  | - N-acetylglucosaminyl-Transferase Aktivität, bildet zusammen mit <i>icaD</i> kurze Oligomere aus N-acetylglucosaminen   |
| <i>icaD</i>  | - erhöht Transferase Aktivität von <i>icaA</i> um ein Zwanzigfaches<br>- evtl. für korrekte Faltung und Membraninsertion von <i>icaA</i> verantwortlich<br>- dient vermutlich als Verbindungsglied von <i>icaA</i> und <i>icaC</i> |
| <i>icaC</i>  | - sorgt bei Ko-Expression mit <i>icaA</i> und <i>D</i> für die Produktion längerer Oligomere   |
| <i>icaB</i>  | - Deacetylierung von PIA, dadurch Erhöhung der positiven Oberflächenladung und Verbesserung der Oberflächenadhärenz. Somit entscheidender Faktor für Oberflächenkolonisierung und Biofilmbildung.                                  |

Neben dem *ica*- Locus wurden folgende *S. aureus* Gene und Genprodukte entdeckt, die Einfluss auf die Biofilmbildung haben. Das Biofilm assoziierte Protein (Bap) ist ein Oberflächenprotein, das aus 2 276 Aminosäuren besteht und im Gegensatz zu PIA zusätzlich zur Zell-Zell-Adhäsion auch für die Primäradhärenz von *S. aureus* an Oberflächen von Bedeutung ist. *Bap*- negative Mutanten adhären im Modell schlechter an abiotische Substanzen, produzieren keinen Biofilm und bilden glatte Kolonien. Nur ein kleiner Teil der *S. aureus* Isolate (5 % der bovinen und 0 % der humanen Isolate) besitzt das *bap*- Gen, aber alle *bap*- positiven *S. aureus* sind starke Biofilmbildner (17). Initial adhären jedoch auch viele *bap*- negative Mutanten, was auf eine Interferenz von Bap mit den

sogenannten MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) zurückzuführen ist. MSCRAMM-Proteine sind Oberflächenadhäsine, die mit zahlreichen menschlichen Geweben, Serumproteinen und Polypeptiden der Extrazellulärmatrix interagieren. Diese Interaktionen ermöglichen *Staphylokokken* unter anderem die Adhärenz an Serumproteine, welche medizinische Implantate schon bald nach dem Einbringen in den menschlichen Körper bedecken (18). Weiterhin wurde die Beteiligung von  $\sigma^B$  (SigB) an der Regulation der Biofilmbildung gezeigt.  $\sigma^B$  ist ein Transkriptionsfaktor, der bisher als globaler Regulator bei der Stressreaktion von *S. aureus* beschrieben wurde und Virulenz-assoziierte Gene beeinflusst (26,47). Rachid et al. demonstrierten, dass nach Inaktivierung des *sigB*-Gens keine Biofilmbildung mehr nachweisbar ist, wobei sich die *ica*-Transkription analog zur Biofilmproduktion verhält (69). Im Widerspruch dazu stehen neuere Untersuchungen, bei denen *sigB*-negative Mutanten lediglich eine leicht verminderte *ica*-Transkription zeigen, die PIA- und Biofilmproduktion jedoch nicht beeinflusst ist. Vielmehr wurde ein weiterer Faktor beschrieben, der Einfluss auf die *S. aureus* Biofilmbildung hat. Der akzessorische *Staphylokokken*-Regulator SarA kontrolliert die Produktion von *S. aureus* Virulenzfaktoren und ist essentiell für die Biofilmbildung. *SarA*-negative Mutanten produzieren signifikant weniger PIA und bilden keinen Biofilm (88). Vuong et al. beschrieben den *agr*-Locus, ein *S. aureus* Genregulatorsystem, das an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt ist und die Produktion des hämolytischen  $\alpha$ -Toxins stimuliert. *S. aureus*, die den *agr*-Locus nicht besitzen, produzieren deutlich mehr Biofilm (92). Bezüglich des  $\alpha$ -Toxins, welches vom *hla*-Gen kodiert wird und ebenfalls Einfluss auf die Adhärenz und Biofilmbildung zu haben scheint, existieren widersprüchliche Untersuchungen. Nach Caiazza et al. führt das Fehlen des *hla*-Gens zur reduzierten Oberflächenadhärenz und fehlenden Biofilmbildung, während nach Vuong et al. das  $\alpha$ -Toxin die Adhärenz an Polystyren vermindert (8,92). Das *dltABCD* Operon, welches für die Resistenz von *S. aureus* gegen humane Defensine von entscheidender Bedeutung ist (1.3.), beeinflusst über eine veränderte Oberflächenladung die Bindungskapazität an Polystyren oder Glas. Fehlt das *dltABCD* Operon, ist die Adhärenz an genannte Oberflächen nicht mehr möglich (31).

Becker et al. identifizierten 5 Gene, die von adhärennten im Vergleich zu planktonischen *S. aureus* verstärkt exprimiert werden. Drei dieser Gene kodieren für Glykolyse- Enzyme, eines für eine threonyl-tRNA-Synthetase und eines für eine ClpC-ATPase. Über die genaue Bedeutung dieser Enzyme für die Biofilmproduktion kann bisher nur spekuliert werden (4).

### **1.3 Biofilm- assoziierte *S. aureus* Infektionen**

*S. aureus* ist einer der häufigsten Krankheitserreger des Menschen und verursacht ein breites Spektrum von Infektionen, angefangen von kleineren Haut- und Wundinfektionen bis hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie Pneumonie, Endokarditis, Meningitis, Osteomyelitis und Sepsis. Vor allem bei nosokomial erworbenen Infektionen steht *S. aureus* als Erreger an erster Stelle (51,1). Ein wichtiger Virulenzfaktor von *S. aureus* ist hierbei die Fähigkeit, an verschiedenste medizinische Implantate zu adhären und Biofilm zu bilden (70).

Biofilme sind assoziiert mit einer Vielzahl von Krankheiten wie Cystische Fibrose, Endocarditis, Osteomyelitis und nosokomialen Infektionen von z. B. zentralen Venenkathetern, Urinkathetern, künstlichen Herzklappen, Herzschrittmachern und orthopädischen Implantaten (20,81,5,80,56,63,38,57,30). Bakterien in Biofilmen sind gut geschützt gegen die Immunabwehr und in hohem Masse resistent gegen Antibiotika (37,14,41,84,43). Selbst durch eine hochdosierte und gezielte Antibiotikatherapie können viele Biofilme nicht eliminiert werden (41,84). Eine der Ursachen für die bis zu tausendfach erhöhte Antibiotikaresistenz, verglichen mit planktonischen Bakterien der gleichen Art, ist wahrscheinlich die verminderte Wachstumsrate, da viele Antibiotika bakterio-statisch wirken und nur in der Vermehrung befindliche Bakterien abtöten können. Weiterhin wird vermutet, dass phänotypische Veränderungen zur erhöhten Resistenz führen und extrazelluläre Polymere oder modifizierende Enzyme produziert werden, die Antibiotika inaktivieren können. Biofilmbakterien lösen durch Freisetzung löslicher Antigene eine Immunantwort aus, die jedoch den Biofilm nicht suffizient zu bekämpfen vermag. Vielmehr wird durch die Entzündungsreaktion

das umliegende Gewebe zusätzlich geschädigt (20). Haupteffektorzellen des Immunsystems im Kampf gegen *Staphylokokken*- Infektionen sind polymorphkernige Granulozyten (PMN). Sie werden chemotaktisch angezogen, phagozytieren und töten die aufgenommenen Mikroorganismen mit oxidativen (Sauerstoffradikalproduktion) und nicht-oxidativen (Defensinausschüttung) Mechanismen (62,25). Erstgenannter Mechanismus führt über die Bildung toxischer Sauerstoffradikale durch Enzyme wie Myeloperoxidase und NADPH-Oxidase zur Zerstörung der phagozytierten Bakterien (64). Defensine sind kleine kationische antimikrobielle Peptide (CAMPs), die ubiquitär in der Natur vorkommen und in erster Linie die bakterielle Zytoplasmamembran schädigen. Dies führt über die Erhöhung der Permeabilität und Zusammenbruch des Membranpotentials zum Zelltod (9,25,89,96,79). Als Beispiele seien die humanen neutrophilen Proteine (HNP 1-3) genannt, die in den Granula humaner PMN gespeichert sind und nach der Ingestion von Mikroorganismen ausgeschüttet werden (25).

*S. aureus* ist resistent gegen eine Vielzahl von Defensinen und bakteriolytischen Enzymen (68). Die Entdeckung zweier *S. aureus* Gene, *dlt* und *mprf*, zeigte, dass vor allem die Oberflächenladung der Zellmembran eine Rolle spielt. Das Vorhandensein des *dltABCD* Operons (1.2.) führt zum vermehrten Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren der bakteriellen Zellwand. Das *mprf*-Gen kodiert für MprF, welches die Modifikation von Membranlipiden mit L-Lysin vermittelt. Beide Mechanismen reduzieren die Oberflächennegativität von *S. aureus*, erschweren somit die Bindung der positiv geladenen Defensine und stellen entscheidende Resistenzfaktoren gegen nicht-oxidative Abwehrmechanismen von PMN dar (66,10,31,45,46,67). Auch die Ladung der CAMPs scheint von Bedeutung zu sein. *S. aureus* ist resistent gegen die humanen  $\beta$ -Defensine HBD1 und HBD2, die von diversen menschlichen epithelialen Zellen produziert werden (78). Es konnte jedoch ein drittes  $\beta$ -Defensin HBD3 aus epidermalen Keratinozyten von Psoriasis-Patienten isoliert werden, welches bakterizide Aktivität gegen *S. aureus* besitzt (40). HBD3 unterscheidet sich neben der höheren Affinität zur Dimerbildung in Lösungen durch eine höhere positive Oberflächenladung von HBD1+2, was als Ursache für die Bakterizidität gegen *S. aureus* vermutet wird (78).

Gegen toxische Sauerstoffmetabolite sind planktonische *S. aureus* Einzelzellen in vitro sensibel und werden von PMN effizient abgetötet, wenn die Produktion von Sauerstoffradikalen gewährleistet ist (10). Sind PMN jedoch nicht in der Lage toxische Sauerstoffmetabolite zu bilden, können *S. aureus* nicht suffizient abgetötet werden. Dies wurde am Beispiel von Patienten entdeckt, die an einer chronischen septischen Granulomatose (engl. chronic granulomatous disease) leiden und deren PMN aufgrund eines erblichen Defektes keine Sauerstoffradikale bilden können (50).

Adhärente *S. aureus* hingegen induzieren im Vergleich zu planktonischen *S. aureus* eine reduzierte Superoxidanionenproduktion von PMN (71). Auch bei *P. aeruginosa* führt die Adhärenz und Biofilmbildung zu einer deutlich reduzierten oxidativen Antwort von PMN (39). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Alginate per se die Sauerstoffradikalproduktion der PMN reduziert (48). Untersuchungen mit dem Oralbakterium *Streptococcus mutans* zeigten, dass die Produktion von Exopolysacchariden die bakterizide Aktivität von PMN durch Formation einer physiologischen Barriere und Reduktion der Sauerstoffradikalproduktion vermindert (82).

Leid et al. zeigten in einem in-vitro Modell, dass humane Leukozyten an einen sieben Tage alten *S. aureus* Biofilm adhären und auch tief in den Biofilm eindringen können, wenn dieser unter dem Einfluss laminärer Scherkräfte gebildet wurde. Sie sind jedoch nicht in der Lage, die *Staphylokokken* im Biofilm zu phagozytieren, wohingegen planktonische *S. aureus* aktiv phagozytiert werden. Erfolgt die Biofilmbildung unter statischen Bedingungen, können die Leukozyten zwar an die Oberfläche eines 2 Tage alten Biofilms binden, ihn aber nicht penetrieren (49). *S. aureus* bildet unter statischen Bedingungen deutlich mehr Biofilm und dieser enthält mehr extrapolymeres Substrat (in diesem Fall PIA) als ein unter dem Einfluss von Scherkräften entstandener Biofilm (83,49). Vuong et al. zeigten, dass PIA per se *S. epidermidis* vor Phagozytose durch humane PMN schützt (90). Somit bildet die Biofilmbildung eine Art mechanischen Schutz gegen Angriffe des menschlichen Immunsystems und zusätzlich besteht die Vermutung, dass PIA *S. aureus* direkt vor Phagozytose schützt.

## 1.4 Cystische Fibrose

Die Cystische Fibrose (CF, Synonym: Mukoviszidose) ist mit einer Prävalenz von circa 1:2500-3000 die häufigste autosomal- rezessive Erbkrankheit der weißen Bevölkerung (21,87). Ungefähr jeder Zwanzigste ist Träger des defekten Genes, es erkranken jedoch nur homozygote Merkmalsträger (94). Die Diagnose der Cystischen Fibrose wird gestellt, wenn der Natriumchloridchloridgehalt im Schweiß eines Patienten über 60 meq/L beträgt und eine passende Lungen- oder Pankreaserkrankung oder beides besteht (21). Alle Patienten, die das klinische Bild der Mukoviszidose zeigen, haben Mutationen in beiden Allelen eines Gens, das auf dem langen Arm des Chromosoms 7 lokalisiert ist. Die häufigste Mutation ist die Deletion eines Tripeptids, das für Phenylalanin kodiert ( $\Delta F_{508}$ ) und bei 70% aller CF- Patienten weltweit vorliegt (21). Das mutierte Gen kodiert für einen cAMP- regulierten Chloridkanal, den "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" (CFTR) (75). Der Defekt dieses Chloridkanals führt zur reduzierten Chloriddurchlässigkeit apikaler Epithelzellmembranen (72). Die gestörte Chloridsekretion führt zur erhöhten Natriumabsorption und schließlich zur verminderten Wasserkonzentration in den Bronchialsekreten (6). Folge davon ist die Viskositätszunahme des Bronchialsekretes und die Sekretretention. Dies führt zu chronischer Obstruktion und rezidivierenden bakteriellen Infekten oft schon kurz nach der Geburt.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die Erkrankung der Lunge ist die häufigste Todesursache bei CF- Patienten (21). *S. aureus* verursacht bei über 36 % der CF- Patienten aller Altersgruppen Lungeninfektionen und wird bei dieser Erkrankung zusammen mit *P. aeruginosa* als häufigstes Lungenisolat gefunden (3,58,19). Sowohl *S. aureus* als auch *P. aeruginosa* besitzen die Fähigkeit, unter Produktion eines Exopolysaccharids (PIA bzw. Alginate) Biofilm zu bilden, wobei die Biofilmproduktion unter anaeroben Bedingungen noch verstärkt wird. Im Mucus der CF- Lunge herrschen hypoxische bis anaerobe Bedingungen (95) und es konnten sowohl *S. aureus*- als auch *P. aeruginosa*- Biofilme nachgewiesen werden (59,95). Am Beispiel von *P.*

*aeruginosa* wurde bereits gezeigt, dass die Phagozytose solcher Biofilme frustan ist, obwohl CF- Patienten keinen Immundefekt aufweisen. Die chronische bakterielle Infektion führt zum massiven Einstrom von PMN in das infizierte Gewebe, und hohe Konzentrationen von PMN- Elastase führen zur Zerstörung des Lungengewebes. Die PMN dominieren den chronischen Infektions- bzw. Entzündungsverlauf in den Atemwegen der CF- Patienten, sind jedoch nicht in der Lage, von Alginat umgebene Mikrokolonien zu zerstören und den Keim zu eliminieren (23,61). Somit stellt die Biofilmbildung einen entscheidenden Faktor für die Persistenz der Bakterien im Respirationstrakt von CF- Patienten dar. Vuong et al. zeigten, dass PIA per se *S. epidermidis* vor Abtötung durch PMN schützt (90). Für *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass Alginat direkt zu einer erhöhten Resistenz gegen Sauerstoffradikale von PMN führt (48). Daher stellte sich die Frage, ob PIA auch *S. aureus* vor der Abtötung durch PMN schützt, und ob PIA dabei - wie Alginat bei *P. aeruginosa*- den oxidativen Abtötungsmechanismus der PMN hemmt. Dazu wurde ein Phagozytoseassay mit adhärennten Einzelzellen und Mikrokolonien von *S. aureus* etabliert und der Einfluss von PIA auf die Sauerstoffradikalproduktion von PMN untersucht.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Reagenzien und Chemikalien**

Agar (Bacto Agar, Becton Dickinson, Heidelberg)

Anaerobiertopf (Gas Pak- System, Merck, Darmstadt)

Anaerocult (Merck, Darmstadt)

Anaerotest (Merck, Darmstadt)

BCECF, AM (Mo Bi Tec, Göttingen)

Butterfly-21 (Abbott GmbH, Wiesbaden- Delkenheim)

Casamino Acid (Becton Dickinson, Heidelberg)

Cellstar Gewebekulturröhrchen (Nr. 163160, Greiner Labortechnik, Frickenhausen)

Chamberslides (Falcon Culture Slide, 8 Chambers, Becton Dickinson, Heidelberg)

Columbia Blut Agar Platten (Heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim)

Cytochrom C (Sigma, Deisenhofen )

DAKO Fluorescent Mounting Medium ( DAKO, Hamburg)

DAPI (Boehringer Mannheim)

Dextran T 500 (Pharmacia AB, Uppsala, Schweden)

DMSO (Sigma, Deisenhofen)

Einmalkanülen (0,9 x 40 mm, Braun Melsungen AG, Melsungen)

Einmalspritze 10 ml / 20 ml (Braun Melsungen AG, Melsungen)

Epon (Roth, Karlsruhe)

Eppendorff- Röhrchen (1,5 und 2 ml, Eppendorff, Hamburg)

Essigsäure (99- 100 %, Merck, Darmstadt)

Ethanol (99,8 %, Merck, Darmstadt)

EDTA (Merck, Darmstadt)

Falcon, 50 ml konisches Röhrchen mit Verschuß (Becton Dickinson, Heidelberg)

Ficoll- Lösung (Biocoll Separation Solution, Biochrom KG, Berlin)

Formaldehyd (37 %, Merck, Darmstadt)

Glucose (Merck, Darmstadt)

Glutaraldehyd (25 %, Sigma, Deisenhofen)  
Glycerophosphat (AppliChem, Darmstadt)  
Heparin Liquemin 2500 (Hoffmann- LaRoche AG, Grenzach- Whylen)  
Insert (Cell Culture Insert, Becton Dickinson, Heidelberg)  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Darmstadt)  
Kollagen Typ I (Rat Tail, Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA, U.S.A.)  
Kollagenase Typ I (Sigma, Deisenhofen)  
Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht)  
Mikrotiterplatte, 24 well (Becton Dickinson, Heidelberg)  
NaCl (Merck, Darmstadt)  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt)  
NaOH- Plätzchen (NaOH, Merck, Darmstadt)  
 $\text{OsO}_4$  (Sigma, Deisenhofen)  
Oxyrase (Oxyrase Inc., Mansfield, OH, U.S.A.)  
PMA (Sigma, Deisenhofen)  
RPMI 1640 Medium (Gibco, Life Technologies, Paisley, Schottland)  
Serum von Pseudomonas aeruginosa- Antikörper negativ getesteten CF- Patienten  
SOD (Sigma, Deisenhofen)  
Sterilfilter Millex- GS (0,22  $\mu\text{m}$  Porengröße, Millipore Corporation, Bedford, MA, U.S.A.)  
Thermanox- Zellkultur- Deckgläschen (steril, Thermanox Plastik,  $\varnothing$  13 mm, Nalge Nunc International, Rochester, NY, U.S.A.)  
Triton X 100 (Sigma, Deisenhofen)  
Tryptone Soya Broth (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, G. B.)  
Tween 20 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)  
Yeast Extract (Becton Dickinson, Heidelberg)

## **2.2 Antikörper**

Anti- Polysaccharide- Intercellular- Adhesin (anti- PIA, Kaninchen, polyklonal, Geschenk von Gerald B. Pier, Channing Laboratory, Harvard, Boston, MA, U.S.A.)

CY 3- konjugierter Ziege- Antikörper gegen Kaninchen IgG (DAKO, Hamburg)

## **2.3 Geräte**

Axioplan Lichtmikroskop mit Kamera AxioCam (Zeiss, Jena)

Zentrifuge GR 4- 12 (Jouan, St. Nazaire, Frankreich)

Zentrifuge 3 K 10 (Sigma, Deisenhofen)

REM

TEM

## **2.4 Medien und Stammlösungen**

CYPG : 10 g Casamino Acid, 5 g NaCl und 10 g Yeast Extract in 935 ml aqua dest lösen, gut mischen und autoklavieren. Vor Gebrauch 25 ml Glucose 20 % und 40 ml Glycerophosphat 1,5 M steril zufüllen.

Dextranlösung : 2,5 g Dextran auf 50 ml NaCl 0,9 % lösen, dabei leicht erwärmen, da schwer löslich. Steril filtrieren und im Kühlschrank aufbewahren.

EDTA 0,1 M : 14,6 g EDTA in 500 ml aqua dest geben und mit NaOH Plätzchen (für 500 ml ca. 10 g) pH 8 einstellen, da sich EDTA erst dann löst, autoklavieren.

Essigsäure 0,02 N : 1,14 ml der 99- 100 %igen Stammlösung zu 1000 ml aqua dest geben, mischen.

Ethanol 96 % : 40 ml aqua dest zu 960 ml Ethanol 99,9 % geben.

Formaldehyd 4 % : 1,08 ml Formaldehyd 37 % zu 8,92 ml PBS geben (im Kühlschrank nur wenige Tage haltbar, da lichtempfindlich, immer frisch herstellen).

Glucose 20 % : 20 g Glucose in 100 ml aqua dest lösen und steril filtrieren.

Glutaraldehyd 2,5 % : 25 %ige Ausgangslösung 1:10 in PBS verdünnen.

Glycerophosphat 1,5 M : 46g Glycerophosphat in 100 ml aqua dest lösen und steril filtrieren.

Kollagen : Stammlösung 1:100 mit Essigsäure 0,02 N verdünnen.

Kollagenase :

Stammlösung 0,5 %ig : 25 mg Collagenase in 5 ml PBS lösen, bei -18°C im Gefrierschrank aufbewahren

Gebrauchslösung 0,1 %ig : Stammlösung 1:5 in PBS verdünnen.

Phosphatpuffer (PBS) :

20 fache Stammlösung : 85,00 g NaCl, 14,23 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 1,35 g KH<sub>2</sub>P in 500 ml aqua dest lösen, gut mischen.

1 fache Gebrauchslösung : 50 ml der Stammlösung auf 1000 ml mit aqua dest auffüllen, gut mischen.

PBS/Tween 20 : 1 ml Tween zu 1000 ml PBS geben, vermischen.

PMA :

Stammlösung : 1 mg/ml DMSO

Gebrauchslösung : Stammlösung 1:1000 in PBS verdünnen auf

Konzentration 1 µg/ml. Zur Aufbewahrung : Stammlösung 1:10 in PBS verdünnen (100 µg/ml), bei -20°C einfrieren.

Puffer für die Cytochrom C- Methode : PBS + 1 Vol.% Glucose

SOD : Konzentration 2000 Units/ml Puffer (PBS+ 1 Vol.% Glucose), bei -20°C aufbewahren, nur einmal verwenden!

TSA : 30 g Tryptone Soya Broth in 1000 ml aqua dest lösen, 1 % Bacto Agar zugeben, autoklavieren.

## 2.5 Computerprogramme

AxioVision (Zeiss, Jena)

AnalySIS (REM- Bilder, SIS, Leinfelden- Echterdingen)

## 2.6 Etablierung eines Phagozytoseassays mit adhärennten Einzelzellen und Mikrokolonien von *Staphylococcus aureus*

### 2.6.1 Mikrokolonie- und Biofilmbildung

Zunächst wurde eine Flüssigkultur von *S. aureus* angelegt. Dazu wurde eine Öse Koloniematerial in 5 ml CYPG übertragen und diese Kultur über Nacht in einem sterilen Glasröhrchen bei 37°C im Schüttelbrutschrank inkubiert. Ausgehend von der optischen Dichte dieser Übernachtskultur von *S. aureus* wurde eine Tagkultur mit einer OD<sub>600nm</sub> von 0,05 hergestellt.

Diese Tagkultur wurde in einem sterilen Reagenzglas angesetzt und für 2- 4h bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1- 3 im Schüttelbrutschrank inkubiert. Ab einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 befinden sich *S. aureus* in der exponentiellen Wachstumsphase. Da bekannt ist, dass bei *S. aureus* die meisten membranständigen Proteine (Adhä-sine) in der postexponentiellen Phase durch den globalen Regulator *agr* herunterreguliert werden (77), wurde die exponentielle Wachstumsphase für die Adhärenzversuche gewählt. Während der Inkubation bis zur gewünschten OD<sub>600nm</sub> wurde die benötigte Anzahl von Chamberslides 45 min. mit Kollagen beschichtet, dann 3x mit PBS gewaschen und mit PBS bedeckt im Kühlschrank aufbewahrt. Die Beschichtung kann auch im voraus für mehrere Versuche vorbereitet werden, wichtig ist hierbei, dass die beschichteten Kammern immer mit Flüssigkeit bedeckt sind und im Kühlschrank gelagert werden. Anschließend wurde in

die Kammern beschrifteter Chamberslides 500 µl CYPG vorgelegt und die Menge des Aliquots berechnet, welches aus der Tagkultur zugegeben werden muß, um eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 zu erreichen, was ungefähr einer Bakterienzahl von  $2 \times 10^7$  entspricht. Entsprechend wurden die Kammern beimpft und für 2h aerob bei 37°C inkubiert, um die Adhärenz von Einzelzellen zu erreichen (Abb. 5). Anschließend wurde 3x mit PBS gewaschen und somit nicht adhärente Bakterien entfernt.

Um die Bildung von Mikrokolonien zu induzieren, wurden die Einzelbakterien in den Chamberslides 2 Tage anaerob bei 37°C inkubiert (Abb. 5). Zur Herstellung der Anaerobiose wurden drei verschiedene Methoden verwendet : 1. Bedecken der Bakterien in den Kammern mit 500 µl CYPG + 100 µl Oxyrase. 2. Überschichten der Kammern mit 700 µl 1 %igem TSA : das TSA wurde nach dem Autoklavieren abgekühlt, bis es lauwarm aber immer noch flüssig war, in die Kammern gegeben und nach Erhärten des Agars in den Brutschrank gestellt. Nach 2 Tagen wurde die feste Agarschicht dann sehr vorsichtig entfernt. 3. Verwendung eines Anaerobiertopfes : ein Anaerocult wurde gemäß Anleitung mit 30 ml aqua dest. befeuchtet und in den Anaerobiertopf gestellt. Die Chamberslides wurden in den Topf gestellt und vor Schließen des Deckels wurde ein befeuchtetes Anaerotest- Stäbchen an die Wand des Topfes gelegt.

Die Verwendung eines Anaerobiertopfes erwies sich als günstig und wurde deshalb für alle weiteren Versuche verwendet, da bei der Entfernung des Agar Bakterien mitgelöst werden und somit die Objektträger nur noch zur optischen Darstellung und nicht mehr zur Quantifizierung genutzt werden können. Die Oxyrase- Methode ergab trotz Anaerobiose ein vermehrtes Bakterienwachstum und bezüglich der PIA- Produktion sehr unterschiedliche Ergebnisse bei den beiden verschiedenen *S. aureus* Stämmen.

Bei Inkubationszeiten über mehrere Tage könnten die Kammern austrocknen weshalb immer eine Schale mit Wasser in den Brutschrank gestellt und feuchte Tücher neben die Chamberslides gelegt wurden.

Zur Produktion von Biofilm wurden die Bakterien 5 Tage im anaeroben Milieu bei 37°C inkubiert (Abb. 5). Während dieser Zeit musste jeden Tag der Anaerobiertopf kurz geöffnet werden um das Medium zu wechseln, da eine Kontrollfär-

bung mit BCECF, AM (2.8.) ergeben hatte, dass ein Großteil der Bakterien ohne Mediumwechsel nach 5 Tagen abgestorben waren. Nach Austauschen des Mediums musste dann jeweils ein neues Anaeropak verwendet werden um die Anaerobiose wieder herzustellen.

### **2.6.2 Bakterien**

Für die Adhärenzversuche wurden zwei verschiedene *Staphylococcus aureus*-Stämme verwendet : der Laborstamm ATCC 35556 (SA 113 ) und SA 7, ein stark Biofilm- bildendes CF- Patientenisolat

Weiterhin wurden mit SA 113 und seiner isogenen PIA- negativen Mutante ATCC 35556 $\Delta$ *ica::tet* (*ica*-Mutante) Kontrollversuche in Flüssigkultur durchgeführt. Bei der Mutante ist der *ica*- Locus gegen eine Tetracyclinresistenz ausgetauscht (Abb. 3). Somit kann der Keim unter Anwesenheit von Tetracyclin selektiv angezüchtet werden, es ist aber nur eine sehr geringe Adhärenz an Kollagen möglich (16).

### **2.6.3 Isolierung von Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (PMN)**

Die Isolierung erfolgte mit der Ficoll- Gradienten- Methode (60). Zuerst wurde eine 20 ml Einmalspritze mit 2 ml Dextran und ca. 200  $\mu$ l Heparin vorbereitet, mit 10 ml Vollblut von gesunden Probanden gefüllt und mit der Öffnung nach oben 45 min. unter dem Sterilabzug belassen. Dadurch separiert sich der Zellbestandteil vom Serum, wobei die PMN durch Zugabe des Dextran im Überstand bleiben. Währenddessen wurden 4 ml Ficoll- Lösung in ein Cellstar- Röhrchen vorgelegt. Der Überstand des sedimentierten Blutes wurde dann vorsichtig und langsam durch den Schlauch eines Butterfly- Systems auf die Ficoll- Lösung gefüllt. Wichtig ist hierbei, dass hierbei keine Blasen entstehen und der Überstand sich nicht mit der Ficoll- Lösung vermischt. Durch eine Zentrifugation mit 2000 Umdrehungen pro Minute (UpM) für 30 min. ohne Bremse erfolgte die Trennung des Überstandes in Fraktionen. Nun wurde mit einer 10 ml Pipette vorsichtig zuerst die deutlich sichtbare weiße Lymphozytenschicht abgesaugt und dann erst der restliche Überstand bis auf das Pellet entfernt. Da die Zellen

schnell austrocknen, wurden sofort ca. 500 µl PBS zugegeben. Um die PMN im Pellet zu isolieren und die osmotisch empfindlichen Erythrozyten zu entfernen, wurden diese in mehreren Lyseschritten zerstört. Für eine Lyse wurde für 30 sec. 2 ml aqua dest. zugefüllt, vorsichtig gemischt und die Lyse dann durch Zugabe von 2 ml NaCl 1,8 % beendet. Anschließend wurde 10 min. bei 1000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Lysen so oft wiederholt bis das Pellet weiß erschien und nur noch von einem schmalen roten Saum umrandet war. Dann wurde 1 ml PBS zugegeben und die PMN auf Eis gelagert. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe einer Neubauer- Zählkammer und die PMN wurden im Mikroskop mit 20facher Vergrößerung ausgezählt. Um das Auszählen zu erleichtern, wurde die Zählsuspension 1:10 mit PBS verdünnt. Die Umrechnung auf die tatsächliche Anzahl/ml berechnete sich mit folgender Formel:

$$\text{PMN/ml} = (n \times 4 \times 10 \times 100) / 4 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = n \times 10^5$$

n = gezählte PMN in 16 Quadraten

Die durchschnittliche Anzahl PMN/ml PBS betrug  $1,4 \times 10^7$  ( $0,6 - 1,8 \times 10^7$ ).

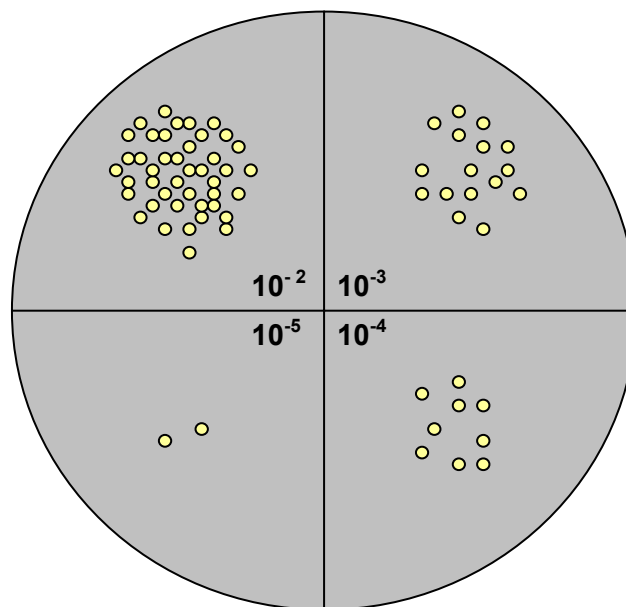
#### **2.6.4 Phagozytoseassay**

Um die Unterschiede in der Phagozytose von *S. aureus* Einzelzellen und Mikrokolonien durch PMN nach 2 Stunden und nach 2 Tagen darzulegen, wurden zu genannten Zeitpunkten Phagozytoseassays durchgeführt (Abb. 5).

Hierfür wurden zunächst alle Kammern mit Einzelzellen bzw. Mikrokolonien 3x mit PBS gewaschen und aus einigen Kammern die Bakterienzahl bestimmt, um einen Ausgangswert für den Erfolg der Phagozytose zu haben. Zur Quantifizierung der Bakterienzahl wurden die Kammern mit 500 µl Kollagenase 0,1 % für 10 min. bei 37°C inkubiert, um die auf Kollagen adhärenen Bakterien vom Glaskammerboden zu lösen. Mikrokolonien müssen für 10 min. bei 37°C mit Kollagenase 0,1 % und EDTA 0,1 M inkubiert werden, da die Bakterienverbände aufgrund ihrer Adhärenz nach 2 Tagen Anaerobiose sonst nicht ausreichend zu lösen sind. Die restlichen Kammern wurden für diese Zeit mit PBS befüllt um



eine Austrocknung zu vermeiden. Direkt aus den Kollagenase / Bakterien-Gemischen wurden dann Verdünnungsreihen hergestellt und die Verdünnungsstufen  $1:10^2$  bis  $1:10^7$  auf eine Blutagarplatte ausplattiert. Dazu wurde die Agarplatte zunächst auf der Rückseite in ausreichend große Sektoren unterteilt, die Verdünnungsstufen beschriftet und dann vorsichtig  $10\ \mu\text{l}$  der jeweiligen Verdünnung auf den entsprechenden Sektor aufgetropft. Erst wenn die Tropfen getrocknet und nicht mehr sichtbar sind, darf die Platte umgedreht werden. Nach der Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht, konnten die gewachsenen Kulturen gezählt und die ungefähre Anzahl der Bakterien berechnet werden (Abb. 4).



**Abb. 4** Bewachsene Blutagarplatte nach Auftropfen der Verdünnungsreihen und Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht.  
 $10^{-2}$ : 43 Kolonien,  $10^{-3}$ : 16 Kolonien,  $10^{-4}$ : 9 Kolonien,  
 $10^{-5}$ : 2 Kolonien

$$\text{Rechenbeispiel: } (43 \times 10^2 + 160 \times 10^2 + 900 \times 10^2 + 2000 \times 10^2)/4$$

$$= 775,75 \times 10^2 = 7,8 \times 10^4.$$

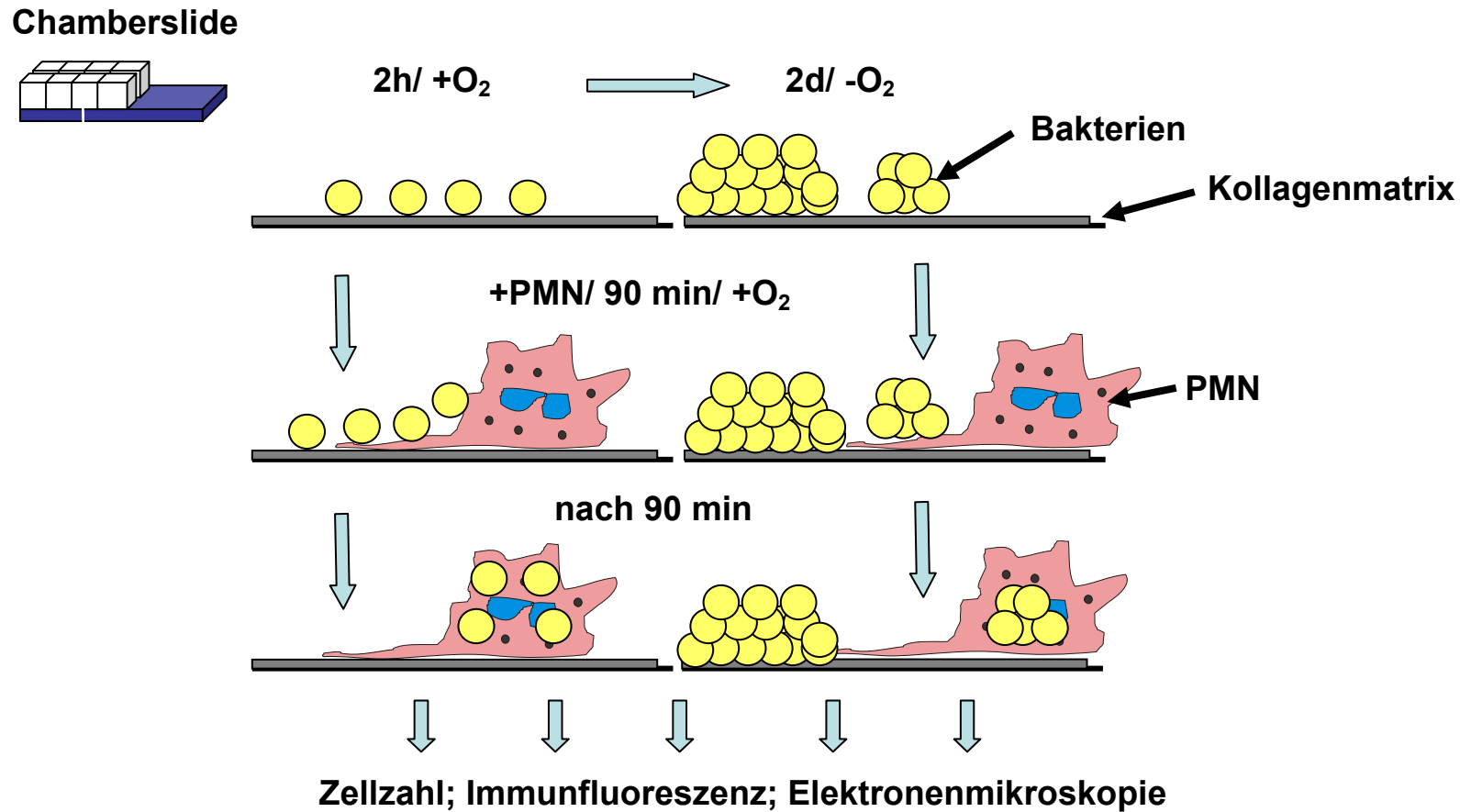
Diese Zahl muss noch mit 100 multipliziert werden, da nur  $10\ \mu\text{l}$  aufgetropft wurden.

$$= 7,8 \times 10^6 \text{ KBE/ml}$$

Bei SA 113 waren nach 2 Stunden durchschnittlich  $5,0 \times 10^7$ /ml adhären, nach 2 Tagen circa  $2,4 \times 10^7$ /ml. Die Anzahl von SA 7 betrug nach 2 Stunden  $9,6 \times 10^8$ /ml, nach 2 Tagen im Durchschnitt  $6,3 \times 10^6$ /ml.

Entsprechend wurde für die Phagozytose die Anzahl von PMN so gewählt, dass das Verhältnis von Bakterien zu PMN 100:1 oder 10:1 betrug.

Die Bakterien wurden zunächst 30 min. bei 37°C mit 1:10 verdünntem humanem Serum inkubiert und somit opsoniert. Dann wurde 3x mit PBS gewaschen, in die Kammern 500 µl RPMI vorgelegt, die PMN dazugegeben und die Chamberslides für 1,5 Stunden bei 37°C / 5 %CO<sub>2</sub> unter aeroben Bedingungen inkubiert (Abb.5). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgehoben und 10 min. mit Kollagenase 0,1 % / EDTA 0,1 M bei 37°C inkubiert um die Bakterien zu lösen, die PMN zu zerstören und dann Verdünnungsreihen herstellen zu können. Am nächsten Tag konnte somit die Bakterienzahl vor und nach der Phagozytose bestimmt werden. Die Anzahl abgetöteter Bakterien wurde in Prozent vom Inokulum angegeben.



**Abb. 5** Herstellung von adhärenenten *S. aureus* Einzelzellen und Mikrokolonien und anschließend vergleichende Phagozytoseversuche. Für die Adhärenz von Einzelzellen wurden SA 113 und SA 7 für 2 Stunden aerob auf Chamberslides inkubiert (2h/+O<sub>2</sub>). Die Mikrokoloniebildung wurde durch 2tägige Inkubation im anaeroben Milieu induziert (2d/-O<sub>2</sub>). Anschließend wurden jeweils PMN für 90 Minuten unter aeroben Bedingungen mit den Einzelzellen bzw. Mikrokolonien inkubiert (+PMN/90 min/+O<sub>2</sub>). Aus diesen Präparaten wurde die Zellzahl bestimmt bzw. nach entsprechender Fixierung die Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie durchgeführt.

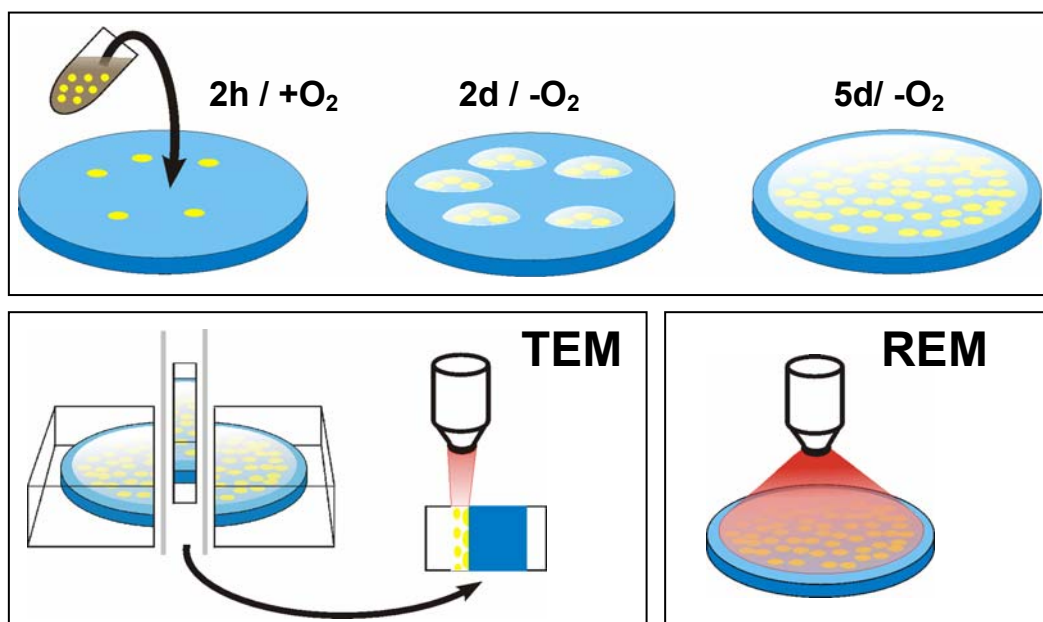
Zusätzlich zu den Phagozytoseversuchen mit adhärenenten Bakterien wurden Kontrollversuche mit planktonischen Bakterien durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden SA 113 und die PIA-negative *ica*-Mutante in Flüssigkulturen bei 37°C im Schüttelbrutschrank anaerob (2 Tage, im Anaerobiertopf, 2.6.1.) und aerob (über Nacht) bebrütet. Von diesen Kulturen wurden 1,5 ml in ein 2 ml- Eppendorff- Cup abgefüllt, 5 min. bei 5000 UpM zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, 1 ml PBS zugegeben und kräftig gemischt. Dann wurde wieder zentrifugiert, PBS zugegeben und so 3x insgesamt mit PBS gewaschen. Nach Bestimmung der  $OD_{600nm}$  wurden die Bakterien auf Eis gelagert und mit der PMN-Isolierung begonnen (2.6.2.). Während der Lyseschritte wurden die Bakterien erneut zentrifugiert und 30 min. mit Serum opsoniert. Anschließend wurde 3x mit PBS gewaschen und die Suspensionen in Cellstar- Gewebekulturröhrchen mit PBS auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,05 verdünnt, was ungefähr einer Bakterienzahl von  $1 \times 10^7$ /ml entspricht. Daraus wurden 10  $\mu$ l für Verdünnungsreihen entnommen und direkt mit der Verdünnungsstufe 1:10<sup>2</sup> begonnen.

Gemäß dem angestrebten Verhältnis von Bakterien zu PMN = 10:1, wurden 10<sup>6</sup> PMN/ml zugegeben und die Röhrchen 1,5 Stunden bei 37°C / 5 %CO<sub>2</sub> inkubiert. Während der Phagozytose sollte die Flüssigkeit immer leicht hin- und herbewegt werden, weshalb die Röhrchen im Brutschrank auf einer Wippe fixiert wurden. Nach der Inkubationszeit wurden die Röhrchen kräftig gemischt, um die PMN zu zerstören und eine gleichmäßige Bakterienverteilung zu erreichen. Dann wurden Verdünnungsreihen hergestellt und am nächsten Tag die beimpften Agarplatten ausgezählt.

## 2.7 Elektronenmikroskopie

Für die Herstellung elektronenmikroskopischer Präparate wurden Thermanox-Deckgläschen in die Vertiefungen von 24- Well- Platten eingelegt und mit einer  $OD_{600nm}$  von 0,1 beimpft. Dann wurden- wie in 2. 6. 1. beschrieben- Präparate mit adhärenenten *S. aureus* Einzelbakterien, Mikrokolonien und Biofilm hergestellt und nach 2 Stunden Adhärenz und 2 Tagen Anaerobiose zusätzlich Phagozytoseassays durchgeführt (Abb. 6). Nach den Versuchen wurde 3x mit PBS ge-

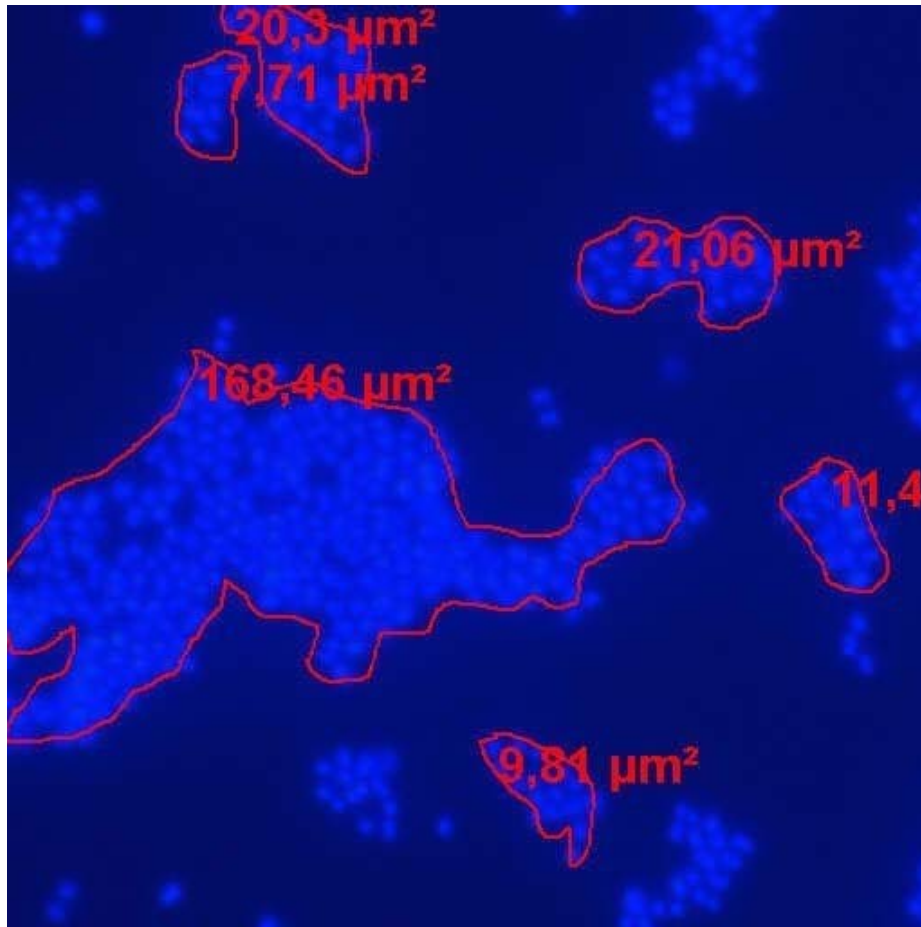
waschen und über Nacht im Kühlschrank mit kaltem Glutaraldehyd 2,5% fixiert. Am nächsten Tag wurde 3x mit PBS gewaschen und die Präparate mit PBS bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Für die REM- Analyse wurde mit  $\text{OsO}_4$  (1 %) auf Eis 1 h fixiert. Nach Dehydratasierung mittels aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol) und Trocknung bis zum kritischen Punkt wurden die Präparate betrachtet (Abb. 6). Für die TEM- Untersuchungen wurden Präparate mit Formaldehyd 4 % fixiert, mit  $\text{OsO}_4$  nachfixiert und in Epon eingebettet. Ultradünnschnitte wurden auf Kupfer- oder Nickel- Netzen befestigt und mit Uranyl- Acetat kontrastiert (Abb. 6).



**Abb. 6** Herstellung von *S. aureus* Präparaten für die Elektronenmikroskopie. Für die Adhärenz von Einzelzellen wurden SA 113 und SA 7 für 2 Stunden aerob auf Thermanox- Deckgläschen inkubiert (2h/+O<sub>2</sub>). Die Mikrokoloniebildung wurde durch 2tägige Inkubation im anaeroben Milieu induziert (2d/-O<sub>2</sub>). Nach 5tägiger anaerober Inkubation hatte sich ein Biofilm gebildet (5d/-O<sub>2</sub>). Diese Präparate wurden sowohl im Rasterelektronenmikroskop als auch nach Anfertigung von Ultradünnschnitten im Transmissionselektronenmikroskop betrachtet.

## 2.8 Indirekte Immunfluoreszenz

Es wurden- wie in 2.6.1. beschrieben- Chamberslides mit *S. aureus* Einzelzellen, Mikrokolonien sowie den entsprechenden Phagozytoseversuchen (2.6.4., Abb.5) hergestellt, mit Ethanol 96 % fixiert und bis zur Färbung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Färbung wurde in den Kammern der Chamberslides durchgeführt. Zunächst wurden die Präparate mit humanem IgG (1:10 verdünnt in PBS/Tween 20) 30 min. bei Raumtemperatur abgesättigt, 3x mit PBS/Tween gewaschen und mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen Polysaccharid- Interzellulär- Adhäsion (PIA) (1:20 in PBS/Tween verdünnt) 1 Stunde inkubiert. Um eine unspezifische Adhärenz des 2. Antikörpers auszuschließen, wurden Kontrollpräparate ohne den 1. Antikörper mitgefärbt. Anschließend wurden die Präparate mit einem 1:500 verdünnten Cy3- konjugierten Antikörper (Ziege, anti- Kaninchen- IgG) für 40 min. in einer dunklen Kammer inkubiert. Ab diesem Schritt wurden immer im Dunkeln gearbeitet um die Fluoreszenz nicht abzuschwächen. Dann wurde nach 3x Waschen mit PBS/Tween die DNA der Bakterien mit DAPI (Konz. 1µg/ml) für 5 min. gefärbt. Nach 3x Waschen mit aqua dest wurden die Kammern vom Objektträger der Chamberslides gelöst und die Präparate in DAKO Fluorescent Mounting Medium eingebettet. Es erwies sich als sinnvoll, die Präparate über Nacht im Kühlschrank dunkel zu lagern, da bei zu frühem Betrachten unter dem Fluoreszenzmikroskop das Einbettmedium noch zu flüssig ist und die Präparate bei der Betrachtung mit Immersionsöl zerstört werden könnten. Mit Hilfe der AxioKamera auf dem Fluoreszenzmikroskop und der Software Axiovision konnten dann digitale Bilder erstellt werden. Um eine Vorstellung von Verteilung, Anzahl und Größe der Kolonien zu bekommen, wurden DAPI- gefärbte Einzelzellen und Mikrokolonien auf je 10 Bildausschnitten mit einer Kantenlänge von 87 x 69 µm gezählt und die Fläche ausgemessen (Abb. 7). Nach der Flächenmessung der Einzelzellen wurde festgelegt, dass Bakterienflächen ab einer Größe von 20 µm<sup>2</sup> als Mikrokolonien zu bezeichnen sind.



**Abb. 7** Flächenmessung von *S. aureus* Mikrokolonien nach 2 Tagen Inkubation unter anaeroben Bedingungen. Originalvergrößerung: x 1000.

## 2.9 Vitalitätstest

Um festzustellen, ob ein Teil der Bakterien während der Biofilmbildung abstirbt, wurde am Beispiel eines Stammes ein Vitalitätstest durchgeführt.

Hierfür wurde auf 8 Chamberslides zunächst eine Einzelzelladhärenz durchgeführt (2.6.1.) und alles 3x mit PBS gewaschen. Die Bakterien wurden dann bis zu 5 Tage bei 37°C im Anaerobiertopf inkubiert. Zum Vergleich des Einflusses von Anaerobiose und anaeroben Bedingungen plus Nährstoffmangel auf das Absterben der Keime wurde in einigen Kammern das Medium jeden Tag gewechselt, in den anderen Kammern belassen. Nach festgelegten Zeitpunkten (nach 2 Stunden, 1 Tag, 2 Tagen, 3 Tagen und nach 4 Tagen) wurde dann jeweils die Bakterienzahl bestimmt sowie eine Färbung mit BCECF, AM durchgeführt.

BCECF, AM ist ein Ester, dessen Estergruppe durch lebende Bakterien abgespalten wird (Esterhydrolyse) und somit ein grün fluoreszierender Farbstoff entsteht. Wie in 2.6.4. beschrieben, wurden die zu quantifizierenden Bakterien in den Kammern 3x mit PBS gewaschen und nach 2 Stunden für 10 min. mit Kollagenase 0,1 % (in PBS), ab dem 1. Tag Anaerobiose mit Kollagenase und EDTA 0,1 M bei 37°C inkubiert, Verdünnungsreihen hergestellt und ausplattiert. Die zu färbenden Kammern wurden ebenfalls 3x mit PBS gewaschen, 100 µl BCECF, AM (6,66 µM) aufgegeben und sofort im Dunklen 30 min. bei 37°C inkubiert. Ab diesem Schritt wurde immer im Dunklen gearbeitet. Dann wurde 2x mit PBS gewaschen und 100 µl DAPI (Konz. 1µg/ml) 5 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde- wie nach der indirekten Immunfluoreszenz (2.8.) - 3x mit aqua dest gewaschen, in DAKO Fluorescent Mounting Medium eingebettet und die Bakterien sofort oder am nächsten Morgen mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, da die Fluoreszenz von BCECF, AM schwach ist. Es wurde im Computerprogramm AxioVision ein 35x 35 µm großer Gesichtsfeldausschnitt festgelegt und dann die mit DAPI gefärbten Bakterien (DAPI färbt sowohl die DNA lebender als auch toter Bakterien) gegen die mit BCECF, AM gefärbten Bakterien (nur lebende Bakterien) ausgezählt. Es wurden so viele Gesichtsfelder gezählt bis mindestens 400 DAPI gefärbte Bakterien gezählt waren und mit folgender Formel das relative Überleben der Bakterien bestimmt:

$$\frac{\text{BCECF, AM gefärbte Bakterien}}{\text{DAPI gefärbte Bakterien}} \times 100 = \text{Lebende Bakterien}$$

Nach 2 Stunden Adhärenz wurde von einem 100 %igen Überleben ausgegangen. Nach 1 Tag Anaerobiose wurde in 3 der 6 verbliebenen Chamberslides das Medium gewechselt, nach 2 Tagen in 2 der 4 verbliebenen Chamberslides usw. Dazu wurden die Anaerobiertöpfe täglich etwa um die gleiche Uhrzeit geöffnet, in einigen Chamberslides das Medium gewechselt und jeweils ein neues Anaerocult (2.6.1.) zur Herstellung von anaeroben Bedingungen verwendet.



## 2.10 Bestimmung der Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)- Bildung durch PMN

Um zu untersuchen, ob PIA die Superoxidanionenproduktion der PMN beeinflusst, wurde ein Cytochrom C- Test durchgeführt.

Chambersslides mit adhärennten Einzelzellen, Mikrokolonien und leeren Kammern wurden nach folgendem Pipettierschema (Tab. 2) befüllt und 60 min. bei 37°C im Dunklen inkubiert. Es wurden PMN in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$ /ml RPMI verwendet. Während dieser Zeit wurden 2 ml Eppendorff-Röhrchen mit je 1 ml PBS vorbereitet und auf Eis gestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Kammerinhaltes zum eiskalten PBS gestoppt und die Röhrchen für 10 min. bei 1000 UpM und 4°C zentrifugiert um die PMN abzutrennen. Die OD<sub>550nm</sub> wurde dann aus 1 ml Überstand gegen den Leerwert (PMN, PBS und Cyt. C) gemessen und daraus indirekt auf die Menge der produzierten Superoxidanionen geschlossen.

**Tab. 2** Pipettierschema für den Cytochrom C- Test

|      | EZ    | MK    | Pos.  | Neg.  | Leer  |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CytC | 40µl  | 40µl  | 40µl  | 40µl  | 40 µl |
| SOD  | —     | —     | —     | 40µl  | —     |
| PMA  | —     | —     | 40µl  | —     | —     |
| PBS  | 260µl | 260µl | 220µl | 220µl | 260µl |
| PMN  | 100µl | 100µl | 100µl | 100µl | 100µl |

EZ: Einzelzellen

MK: Mikrokolonien

Pos.: Positivkontrolle

Neg.: Negativkontrolle

Leer: Leerwert

## 2.11 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm Excel 6.0 (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA) durchgeführt. Es wurde der gepaarte Student's T- Test verwendet. Als signifikant wurden p -Werte von weniger als 0,05 bezeichnet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

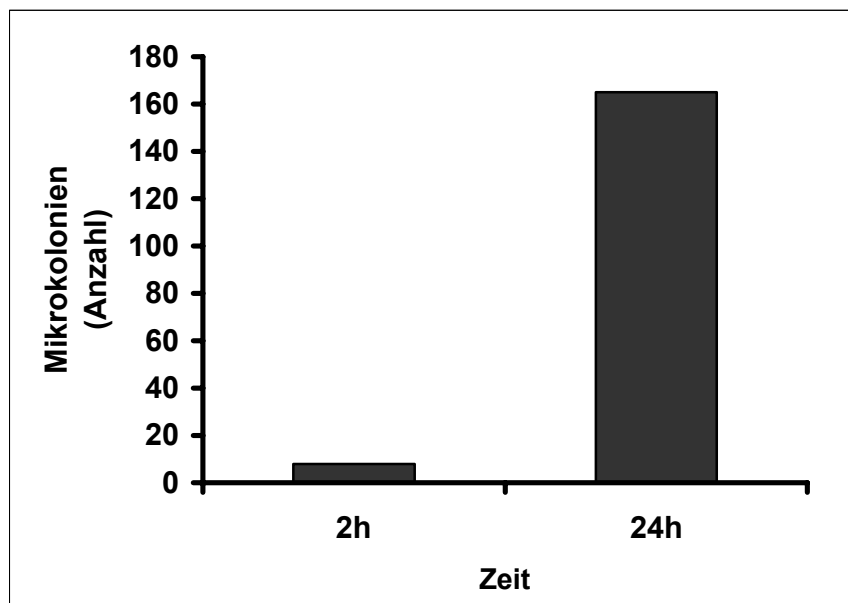
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung eines Testes zur Untersuchung von *S. aureus* Einzelzellen, Mikrokolonien und Biofilm

Nachdem kollagenbeschichtete Chamberslides unter aeroben Bedingungen 2 Stunden mit den *S. aureus*- Stämmen SA 113 und SA 7 inkubiert wurden, erhielt man adhärente Einzelzellen, was sowohl rasterelektronenmikroskopisch als auch mit Hilfe einer DAPI- Markierung gezeigt werden konnte (Abb.11 A, Abb.12 B). Es adhärten im Mittel  $5,0 \times 10^7 \pm 6,8 \times 10^7$  SA 113 und  $9,8 \times 10^8 \pm 1,2 \times 10^9$  SA 7. Wurden diese adhärenen Einzelzellen anschließend 2 Tage im anaeroben Milieu inkubiert, formierten sich bei SA 113 und bei SA 7 Mikrokolonien. Dies wurde sowohl raster- und transmissionselektronenmikroskopisch als auch mittels einer DAPI- Färbung dargestellt (Abb.11 B,G, Abb.12 D,H). Das Ausmessen und Auszählen der Koloniefächen verdeutlichte, dass durch eine 2tägige anaerobe Inkubation die Bildung von Mikrokolonien (Bakterienaggregate mit einer Fläche  $\geq 20 \mu\text{m}^2$ ) induziert wurde: nach 2 Tagen waren insgesamt 165 Mikrokolonien mit Flächen von 20,02- 208,28  $\mu\text{m}^2$  und einer mittleren Fläche von 53,67  $\mu\text{m}^2$  entstanden. Als Kontrolle wurden die Flächen der adhärenen Einzelzellen ausgemessen: es hatten sich im Vergleich nur 8 Aggregate mit einer durchschnittlichen Fläche von 25,98  $\mu\text{m}^2$  und Flächen zwischen 20,95- 38,29  $\mu\text{m}^2$  gebildet (Abb.8). Die Quantifizierung der nach 2 Tagen anaerober Inkubation adhärenen Mikrokolonien ergab  $2,4 \times 10^7 \pm 4,3 \times 10^7$  SA 113 und  $6,3 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^6$  SA 7. Die Lebendkeimzahlen nach 2 Stunden aerober Inkubation und 2 Tagen anaerober Inkubation zeigten somit keine signifikanten Unterschiede (SA 113  $p=0,31$  , SA 7  $p=0,1$ ). Nach Verlängerung der anaeroben Inkubationszeit von 2 auf 5 Tage bildete sich bei beiden Stämmen ein mehrdimensionaler, mehrschichtiger, dichter Biofilm, welcher rasterelektronenmikroskopisch und im Ultradünnschnitt im TEM dargestellt wurde (Abb.11 C,H). Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz und einem spezifischen Antikörper gegen PIA konnte gezeigt werden, dass die Bakterien in den Mikrokolonien deutlich PIA- positiv sind (Abb.11 E, Abb.12 C,G). Durch weitere Inkubation im anaeroben Milieu wurde das Signal noch deutlich verstärkt und die Biofilme wa-

ren bei beiden Stämmen stark PIA- positiv (Abb.11 F). Bezüglich der PIA- Produktion unter aeroben Bedingungen nach 2 Stunden gab es jedoch Unterschiede zwischen den beiden Stämmen. Die adhärenen Einzelzellen von Laborstamm SA 113 waren PIA- negativ, die PIA- Bildung ließ sich jedoch durch Inkubation im anaeroben Milieu induzieren. Die adhärenen Einzelzellen von Patientenisolat SA 7 waren nach 2 Stunden aerober Adhärenz schon PIA- positiv, was durch Inkubation unter anaeroben Bedingungen aber noch deutlich verstärkt werden konnte (Abb.12). Der als Kontrolle mitgeführte, PIA- negative, *ATCC 35556*  $\Delta$ *ica::tet* war immer PIA- negativ, bildete keinen Biofilm und wurde daher nicht dargestellt.

**Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mikrokoloniebildung und PIA- Produktion von *S. aureus* in Chamberslides durch anaerobe Inkubation induziert werden kann und dass die Biofilmbildung PIA- abhängig erfolgt.**



**Abb. 8** Mikrokoloniebildung von *S. aureus* nach aerober und anaerober Inkubation. Nach 2 Tagen anaerober Inkubation (24h,  $-O_2$ ) haben sich deutlich mehr Mikrokolonien (Bakterienaggregate mit einer Fläche  $\geq 20 \mu m^2$ ) gebildet als nach 2 Stunden aerober Adhärenz (2h,  $-O_2$ ).

### 3.2 Vitalitätstest

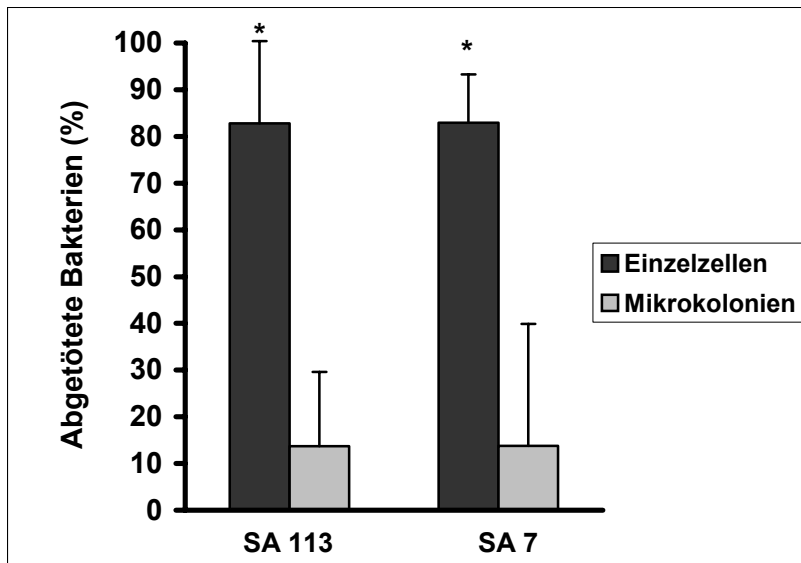
Die *S. aureus* Lebenkeimzahlen nach 2stündiger aerober Inkubation und nach 2tägiger anaerober Inkubation zeigten keine signifikanten Unterschiede. Mikroskopisch waren nach 2 Tagen anaerober Inkubation in der DAPI- Färbung jedoch deutlich mehr Bakterien sichtbar als nach 2stündiger aerober Inkubation. Um zu untersuchen, ob ein Teil der Bakterien bei der Biofilmbildung abstirbt, wurde ein Vitalitätstest durchgeführt. Die Vitalitätsfärbung zeigte, dass nach 2 Tagen die Zahl überlebender Bakterien auf bis zu 24 % (nach 4 Tagen) absinkt, mit Mediumwechsel lässt sich die Zahl auf circa 60 % halten. Zusätzlich wurde eine Lebendkeimbestimmung durchgeführt, welche vergleichbare Ergebnisse zeigte. Für die Lebendkeimzahlbestimmung nach erfolgtem Phagozytoseversuch bedeutet dies, dass die Anzahl abgetöteter Bakterien in Prozent vom Inokulum nach 2 Stunden bzw. 2 Tagen angegeben werden muss.

**Diese Ergebnisse zeigen, dass mit zunehmender Inkubationsdauer ein Teil der Bakterien im Biofilm vermutlich aufgrund des Nährstoffmangels abstirbt. Für die Phagozytose sind daher die Lebendkeimzahlen entscheidend.**

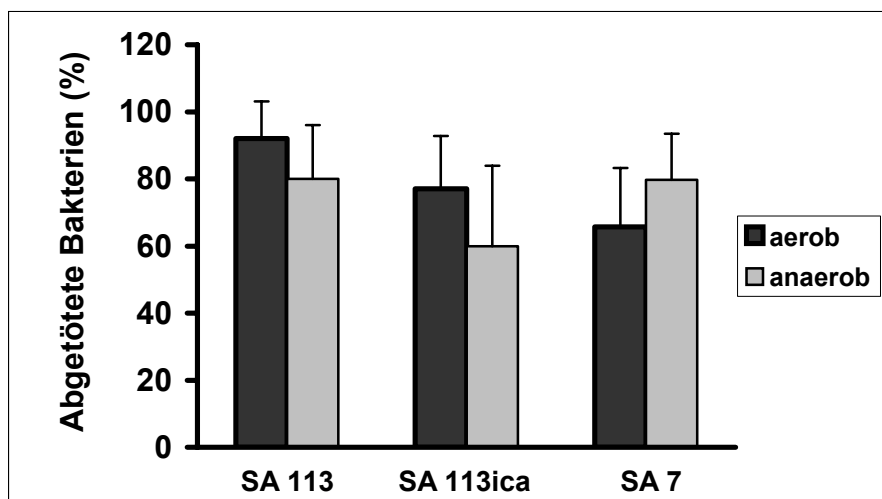
### 3.3 Einfluß der Mikrokoloniebildung und PIA- Produktion von *S. aureus* auf die Phagozytose

Um den Einfluß der Mikrokoloniebildung auf die Phagozytose zu testen, wurde unter aeroben Bedingungen ein Phagozytoseassay mit adhärennten Einzelzellen und Mikrokolonien durchgeführt. Die Lebendkeimzahlbestimmungen auf den Chamberslides vor und nach der Inkubation mit PMN ergaben, dass signifikant mehr Einzelzellen abgetötet werden als Mikrokolonien ( $p < 0,05$ ) (Abb. 9). Es gab hierbei keinen signifikanten Unterschied zwischen SA 113 und SA 7. SA 113 Einzelzellen wurden im Mittel zu 83 % (66-98 %) abgetötet, SA 113 Mikrokolonien hingegen nur zu 14 % (0-30 %). Die Abtötungsrate von SA 7 Einzelzellen betrug durchschnittlich 83 % im Vergleich zu 14 % (0 – 53 %) von SA 7 Mikrokolonien. Da das Patientenisolat SA 7 schon nach 2 Stunden PIA produziert, lässt sich daraus schließen, dass PIA adhärennte *S. aureus*- Einzelzellen nicht vor Phagozytose unter aeroben Bedingungen schützt.

Vergleichende Phagozytoseversuche mit planktonischen, aerob und anaerob kultivierten *S. aureus* SA 113, ATCC 35556 $\Delta$ *ica::tet* und SA 7 ergaben, dass planktonische Bakterien besser phagozytiert werden als adhärennte Mikrokolonien (Abb.9 und Abb.10). Weiterhin zeigten sich hier nach anaerober Inkubation zwischen dem PIA- positiven SA 113 und seiner PIA- negativen Mutante ATCC 35556 $\Delta$ *ica::tet* keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Abtötungsraten, die zwischen 33% und 99% schwankten ( $p = 0,09$ ). Da planktonisch kultivierte Bakterien ebenfalls überwiegend als Einzelzellen vorliegen, die PIA- Bildung jedoch unter anaeroben Bedingungen verstärkt wird und keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Abtötungsraten bestehen, kann vermutet werden, dass PIA planktonische *S. aureus* nicht vor Phagozytose schützt, wenn die Phagozytoseversuche unter aeroben Bedingungen durchgeführt werden.



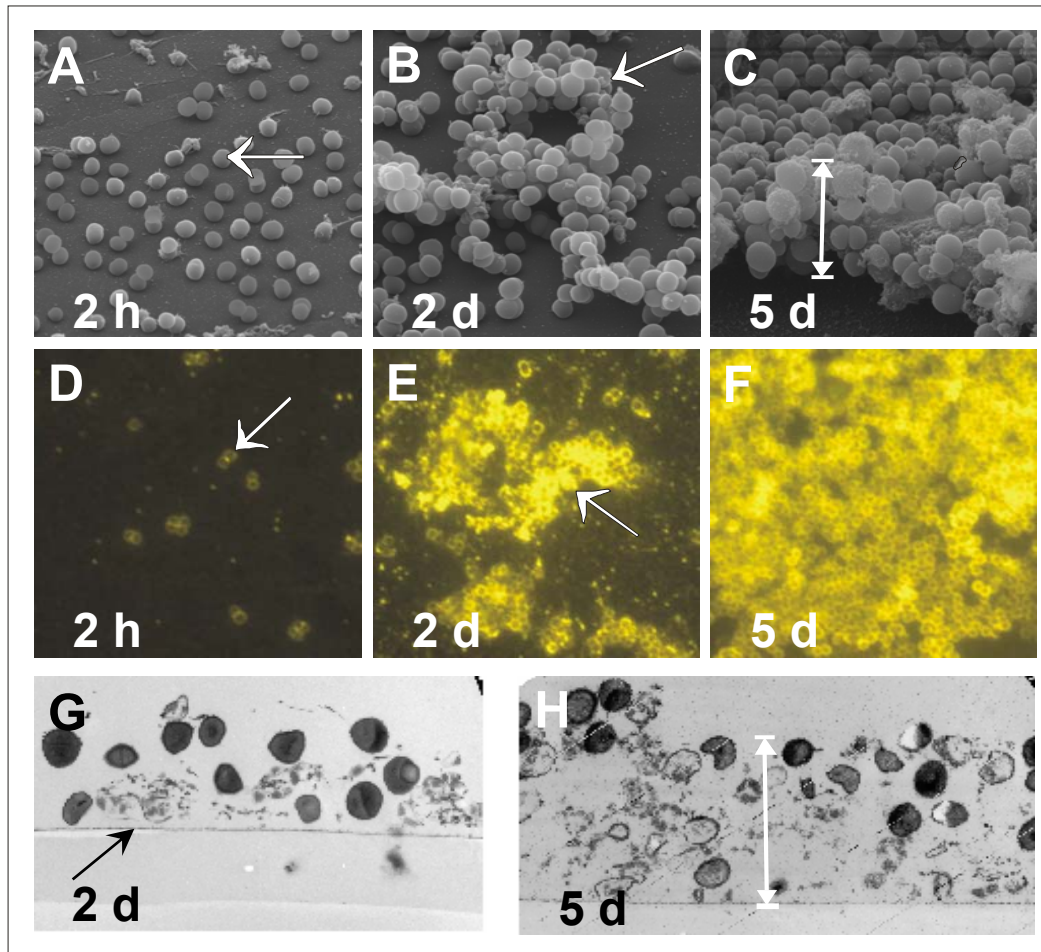
**Abb. 9** Abtötung von *S. aureus* Mikrokolonien versus adhärenenten Einzelzellen nach Inkubation mit PMN unter aeroben Bedingungen in kollagenbeschichteten Chamberslides. Mikrokolonien sind im Vergleich zu adhärenenten Einzelzellen Phagozytose-resistenter und werden signifikant schlechter abgetötet (SA 113  $p=0,0060$ , SA 7  $p=0,008$ ). Durchschnittlicher Ausgangswert (100 %) waren bei SA 113  $5,0 \times 10^7$  Einzelzellen,  $2,4 \times 10^7$  Mikrokolonien und bei SA 7  $9,8 \times 10^8$  Einzelzellen,  $6,3 \times 10^6$  Mikrokolonien.



**Abb. 10** Abtötung planktonischer, zuvor aerob und anaerob kultivierter *S. aureus* Stämme nach aerober Inkubation mit PMN. Nach anaerober Inkubation zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Abtötungsrate zwischen dem PIA-positiven SA 113 und seiner PIA-negativen Mutante ATCC 35556 $\Delta$ *ica::tet* (SA 113 ica). Auch der schon unter aeroben Bedingungen PIA-bildende SA 7 wird nicht signifikant schlechter abgetötet.

Um die Phagozytose bildlich darzustellen und zu überprüfen ob Mikrokolonien in PMN aufgenommen werden, wurden raster- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Diese zeigten, dass PMN auf der Kollagenmatrix adhären und nach der Stimulation mit Serum in der Lage sind, sich auf dieser Matrix fortzubewegen, wie die extreme Streckung und Ausbildung von Pseudopodien im REM zeigte (Abb.13 A,C). Die Phagozytose findet vermutlich statt, indem die PMN mit ihren Pseudopodien unter die Bakterien kriechen und sie dann phagozytieren (Abb. 13 C,D,E; Abb. 5). Im Ultradünnschnitt konnte gezeigt werden, dass sowohl Einzelzellen als auch kleinere Mikrokolonien von PMN aufgenommen werden. Mikrokolonien scheinen jedoch im Gegensatz zu Einzelzellen nur bis zu einer gewissen Größe aufgenommen und abgetötet zu werden.

**Diese Ergebnisse zeigen, dass PIA per se *S. aureus* nicht vor Phagozytose durch PMN schützt, wenn diese unter aeroben Bedingungen d. h. unter Anwesenheit von Sauerstoffradikalen durchgeführt wird. Vielmehr scheint die Größe der Mikrokolonien ein limitierender Faktor für die Aufnahme in PMN zu sein und könnte somit eine Ursache für die Phagozytose-Resistenz sein.**



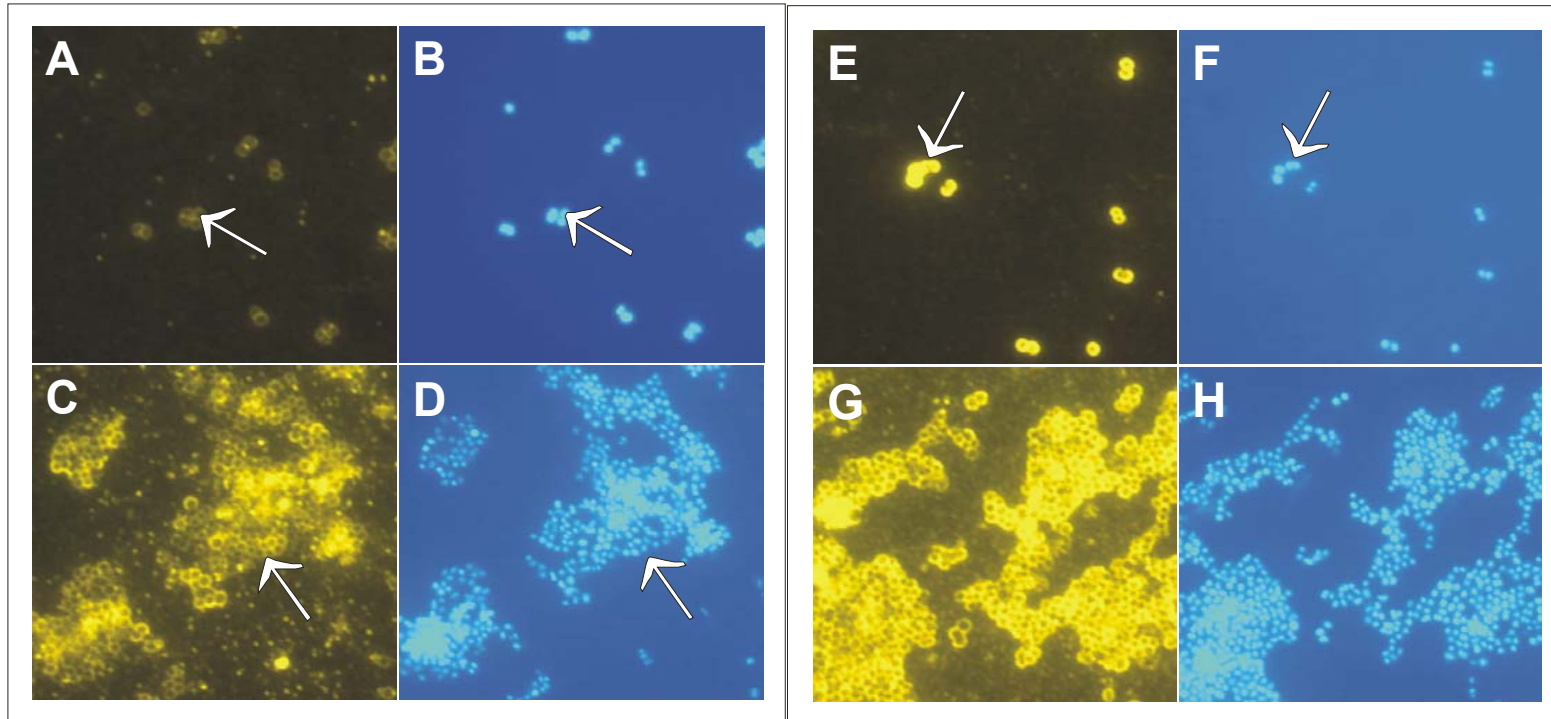
**Abb.11**

REM- Bilder (A-C), Immunfluoreszenzbilder (D-F) und TEM- Bilder (G,H) von SA 113. Nach 2 Stunden aerober Inkubation adhäreren einzelne *S. aureus* (A, Pfeil) auf Kollagen- beschichteten Thermanox- Deckgläschen (A), die Markierung mit einem Anti- körper gegen PIA nach 2 Stunden zeigt paarweise liegende, PIA- negative Bakterien (D, Pfeil). Nach 2 Tagen Inkubation im anaeroben Milieu for- mieren sich mehrschichtige, traubenförmig angeord- nete Mikrokolonien (B, Pfeil), die PIA- positiv sind (E, Pfeil). G zeigt einen Ultradünnschnitt einer bis zu drei Bak- teriensichten hohen Mikrokolonie von SA 113. Am unteren Rand der TEM- Bilder ist jeweils das Deck- gläschen als als feine Linie (G, Pfeil) zu erkennen, Die Schicht darunter zeigt das Epon, in welches die Präparate vor dem Schneiden eingebettet wurden. Nach 5 Tagen anaerober Inkubation bildet sich ein dichter, vielschichtiger, die Deckgläschen rasenartig bedeckender Biofilm (C, Doppelpfeil). Im dazugehö- rigen TEM- Bild (H) ist ein Vertikalschnitt durch einen aus bis zu 7 Schichten bestehenden Biofilm (H, Doppelpfeil) zu sehen. Die Fluoreszenz kann noch- mals verstärkt werden, was auf eine gesteigerte PIA- Bildung hinweist (vgl. E und F).

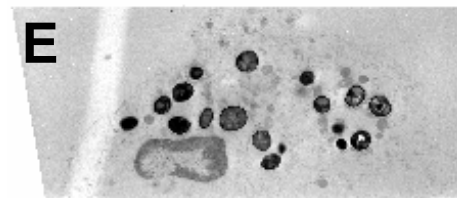
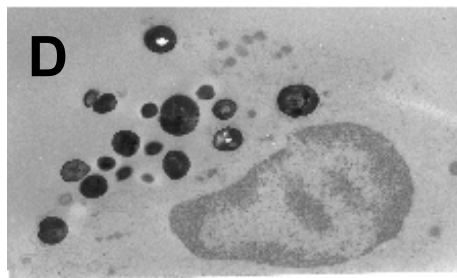
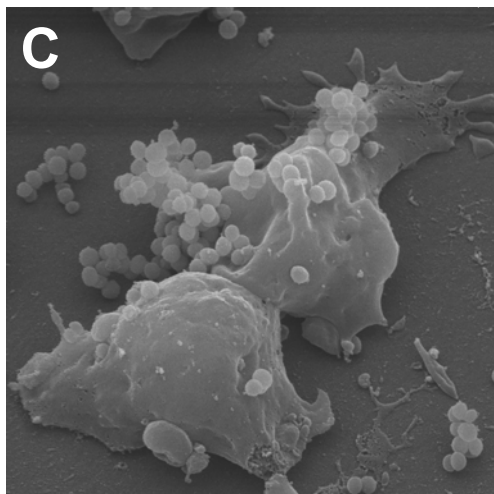
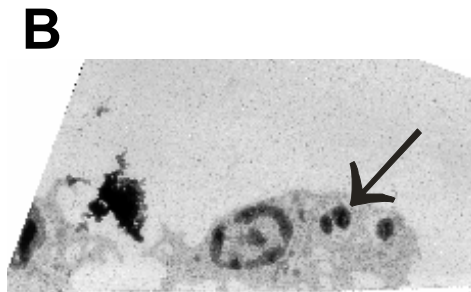
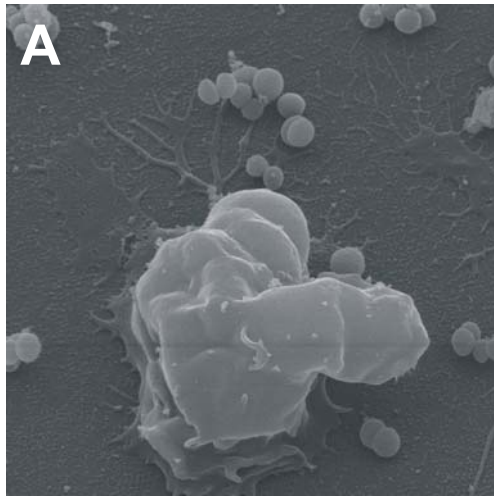


***S. aureus* ATCC 35556**

***S. aureus* Patientenisolat**



**Abb. 12** Fluoreszenzmikroskopische Bilder von SA 113 (A-D) und SA 7 (E-H). Jeweils neben den mit einem Antikörper gegen PIA markierten Bildern (A,C,E,G) sind die DNA- Färbungen mit DAPI (B,D,F,H) zu sehen. Nach 2 Stunden aerober Inkubation sind die adhärenenten Einzelzellen von SA 113 PIA- negativ (A), während SA 7- Einzelzellen nach dem gleichen Zeitraum schon PIA- positiv sind (E). Durch 2 Tage Inkubation im anaeroben Milieu lässt sich die PIA- Produktion von SA 7- Mikrokolonien noch verstärken (G), während die PIA- Produktion von SA 113 durch anaerobe Bedingungen induziert werden.



**Abb.13**

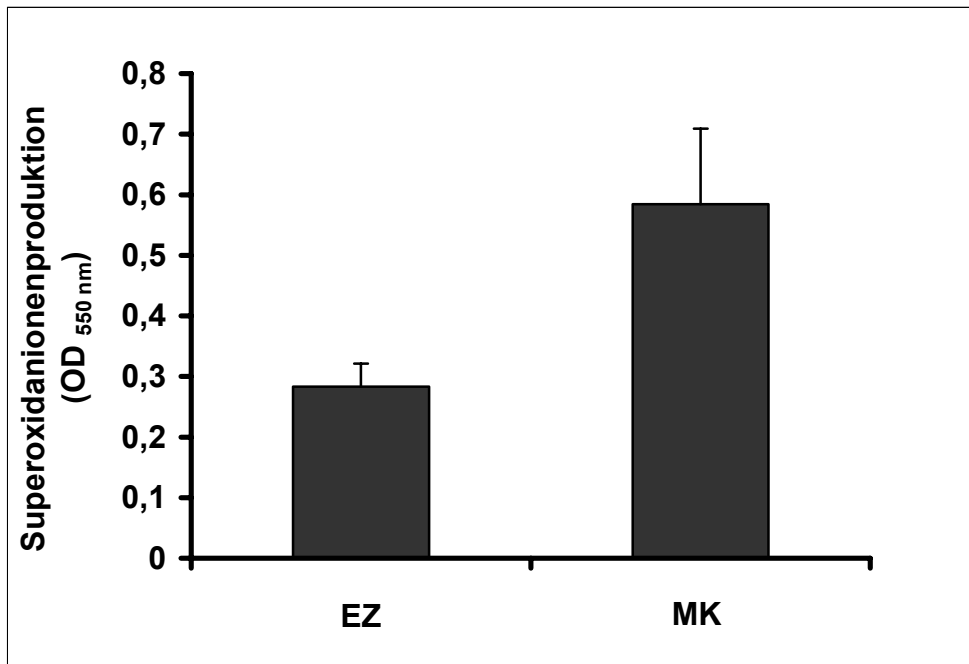
Bilder der Phagozytose von Einzelzellen (A,B) und Mikrokolonien (C,D,E). REM- Bild A zeigt einen auf der Kollagenmatrix adhären- ten, gestreckten PMN mit Pseudopodien, umgeben von einzelnen *S. aureus*. Im TEM- Bild B sind phagozytierte Einzelzellen in einem PMN zu sehen (Pfeil).

C zeigt die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines deutlich gestreckten PMN, der sich mit Hilfe seiner Pseudopodien unter Mikrokolonien geschoben hat. Im Ultradünnschnitt konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich PMN mit ihren Pseudopodien zunächst unter die Mikrokolonien schieben und diese während einer Phagozytosedauer von 1,5 Stunden auch ingestieren können (E zeigt eine phagozytierte Mikrokolonie). Originalvergrößerung x 1000

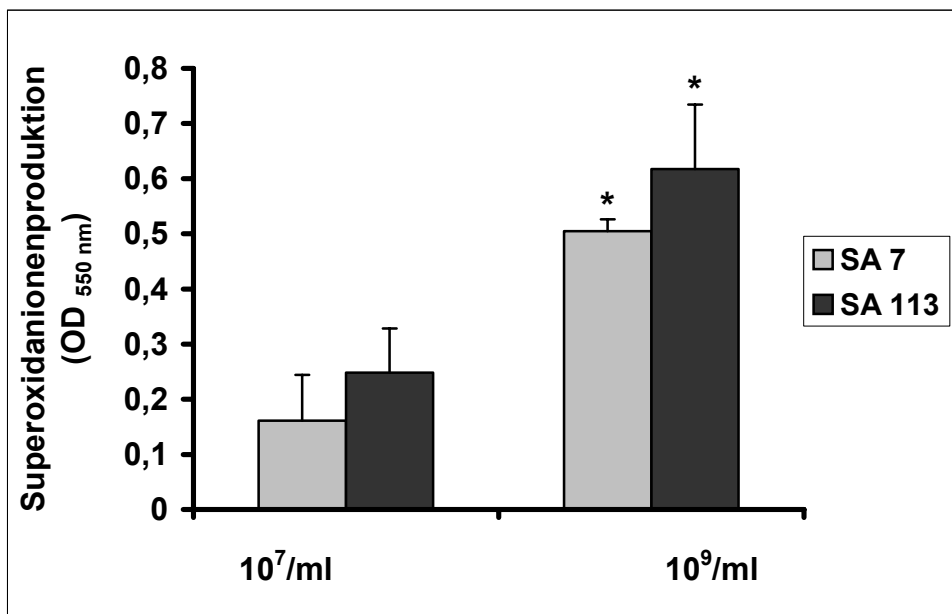
### **3.4 Einfluß der Mikrokoloniebildung und PIA- Produktion auf die Produktion von Superoxidanionen**

Um die Annahme zu überprüfen, dass Exopolysaccharide- also bei *S. aureus* PIA- die Sauerstoffradikalproduktion von PMN reduzieren (48,82), wurde die Superoxidanionenproduktion von PMN mit dem Cytochrom C- Test quantifiziert. Dieser Test ergab, dass PMN, die durch SA 113 Mikrokolonien (PIA- positiv) stimuliert wurden, signifikant mehr Superoxidanionen produzieren als solche, die durch SA 113 Einzelzellen (PIA- negativ) stimuliert wurden ( $p = 0,005$ ) (Abb. 14). Um zu überprüfen, ob lediglich die Anzahl der Bakterien oder die mit der Mikrokoloniebildung verbundene PIA- Expression hierfür ursächlich ist, wurde der Test nochmals mit planktonischen *S. aureus* SA 113 und SA 7 in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Dies ergab, dass PMN, die durch  $1 \times 10^9$  KBE/ml stimuliert wurden, signifikant mehr Superoxidanionen produzieren als durch  $1 \times 10^7$  KBE/ml stimulierte PMN ( $p = 0,006$ ) (Abb.15). Da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem stets PIA- produzierenden SA 7 und dem unter aeroben Bedingungen PIA- negativen SA 113 ergeben, lässt sich daraus schließen, dass die Anzahl der Bakterien der entscheidende Faktor für die Superoxidanionen- Produktion sind.

**Diese Ergebnisse zeigen, dass PIA keinen Einfluss auf die Höhe der Sauerstoffradikalbildung von PMN hat. Abhängig ist die Menge der gebildeten Sauerstoffradikale jedoch von der Anzahl der vorhandenen Bakterien.**



**Abb. 14** Superoxidationenproduktion von PMN nach Stimulation durch adhärenzte *S. aureus* SA 113 Einzelzellen (EZ) und Mikrokolonien (MK). PMN produzieren bei Stimulation durch Mikrokolonien signifikant mehr Superoxidationen im Vergleich zur Stimulation durch Einzelzellen.



**Abb. 15** Superoxidationenproduktion von PMN nach Inkubation mit *S. aureus*- Keimzahlen von 10<sup>7</sup> KBE / ml und 10<sup>9</sup> KBE / ml. PMN, die mit höheren Keimzahlen (10<sup>9</sup> KBE / ml) inkubiert wurden, produzieren signifikant mehr Superoxidationen als solche, die mit 10<sup>7</sup> KBE/ml inkubiert wurden.

#### 4. Diskussion

Obwohl in der Lunge von CF- Patienten mit chronischen *S. aureus*- Infektionen eine heftige, von polymorphkernigen Granulozyten (PMN) dominierte Abwehrreaktion stattfindet und klinisch eine hochdosierte, gezielte Antibiotikatherapie eingesetzt wird, können die *Staphylokokken* nicht eliminiert werden. Unter den dort herrschenden anaeroben Bedingungen produziert *S. aureus* PIA und bildet einen mehrschichtigen Biofilm mit Mikrokolonien, was eine wesentliche Ursache für die Persistenz des Keimes und den chronischen Verlauf der Infektion zu sein scheint. Um den Einfluss dieser Mikrokolonieformation und Biofilmbildung von *S. aureus* auf die Phagozytose durch PMN zu untersuchen, wurde ein Phagozytoseassay mit adhärenen *S. aureus* Einzelzellen und Mikrokolonien entwickelt. Zusätzlich wurde der Einfluss der PIA- Produktion von *S. aureus* auf die Phagozytose untersucht. Die Mikrokolonie- und Biofilmbildung erfolgte wie in der CF-Lunge unter anaeroben Bedingungen und ohne den Einfluss laminarer Scherkräfte. Da *S. aureus* unter statischen Bedingungen mehr Biofilm bildet als unter dem Einfluss laminarer Scherkräfte und dieser im Vergleich mehr extrapolymeres Substrat (in diesem Fall PIA) enthält (83,49), ist das Bakterium gegen äussere Einflüsse besonders gut geschützt und die Phagozytose erschwert. Sowohl *S. aureus* (73) als auch PMN (86) besitzen die Fähigkeit, auf Kollagen zu adhären, und PMN können sich in einer Kollagenmatrix auf eine chemotaktische Quelle hinzubewegen (32). Weiterhin ist bekannt, dass auf Kollagen adhären PMN eine höhere bakterizide Aktivität besitzen und adhären *S. aureus* effektiver abtöten können als auf Albumin adhären PMN (36). Daher wurden die Phagozytoseversuche auf kollagenbeschichteten Oberflächen durchgeführt. Übereinstimmend mit der bisherigen Literatur (14,28,22,20,34,35,52,65) erfolgte die Entstehung eines Biofilms in mehreren Phasen. Nach 2 Stunden aerober Inkubation waren einzelne *S. aureus* auf Kollagen adhären, die 2tägige anaerobe Inkubation induzierte die PIA-vermittelte Mikrokoloniebildung, und die Verlängerung der anaeroben Inkubation auf 5 Tage führte zur Produktion eines mehrschichtigen, flächendeckenden Biofilms. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz und einer spezifischen Antikörpermarkierung von PIA wurde dargestellt, dass die Inkubation im anaeroben Milieu,

abhängig vom jeweiligen Bakterienstamm, die Produktion von PIA induzieren bzw. verstärken kann. Dies stimmt überein mit den Untersuchungen von Cramton et al., die zeigten, dass Inkubation im anaeroben Milieu die PIA- Produktion von *S. aureus* induziert (16). Das Vorhandensein des *ica*- Locus ist somit zwar Voraussetzung für die Produktion von PIA, die tatsächliche Bildung von PIA bzw. Biofilm scheint jedoch von Umweltfaktoren getriggert zu werden. Diese Ergebnisse könnten die Beobachtungen erklären, dass in vitro oft nur ein Teil der *Staphylokokken* PIA und Biofilm produzieren, obwohl sie den *ica*- Locus besitzen. (59,24,2,74). Auch in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Laborstamm SA 113 nach 2 Stunden aerober Inkubation kein oder sehr wenig PIA bildet, die PIA- Bildung kann jedoch durch Inkubation im anaeroben Milieu induziert werden. Das Patientenisolat SA 7 hingegen produziert auch nach 2stündiger aerober Inkubation schon PIA. Es existieren also auch interindividuelle Unterschiede zwischen Bakterien derselben Art, deren Regulationsmechanismen noch geklärt werden müssen.

Es ist bekannt, dass Biofilme in hohem Maße resistent sind gegen die menschliche Immunabwehr (14,49). Leid et al. zeigten erstmals, dass Leukozyten zwar an einen unter statischen Bedingungen gebildeten *S. aureus* Biofilm adhären, ihn aber nicht penetrieren können, während planktonische *S. aureus* aktiv phagozytiert und abgetötet werden (49). Übereinstimmend damit zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass adhärenente Mikrokolonien signifikant schlechter abgetötet werden als planktonische *S. aureus*. Erstmals konnte gezeigt werden, dass Mikrokolonien auch signifikant schlechter abgetötet werden als adhärenente *S. aureus* Einzelzellen. Mikrokolonien sind also Phagozytose- resistenter. Mit Ultradünnschnitten konnte dargestellt werden, dass sowohl Einzelzellen als auch Mikrokolonien von PMN aufgenommen werden. Mikrokolonien scheinen jedoch nur bis zu einer gewissen Größe aufgenommen werden zu können. Somit scheint die Größe der Mikrokolonien ein wesentlicher Faktor für ihre verminderte Abtötung zu sein.

Im Mucus der Lunge von CF- Patienten herrschen hypoxische bis anaerobe Bedingungen, unter denen *S.aureus* viel PIA produziert und dichte Biofilme mit Mikrokolonien bildet (95, 59). In diesen Biofilmen ist der Sauerstoffgehalt ebenfalls sehr gering, zum Teil herrschen auch hier anaerobe Verhältnisse. Aufgrund dieses Sauerstoffmangels stehen den PMN nur nicht-oxidative Mechanismen, d.h. Defensine, zur Abtötung der *S. aureus* Biofilme zur Verfügung. Die oxidative Abtötung der *S.aureus* durch Sauerstoffradikale ist nicht möglich. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass *S. aureus* durch verschiedene Schutzmechanismen, zum Beispiel Reduktion der Oberflächennegativität durch Veränderung der Zellwand, gegen eine Vielzahl von Defensinen resistent ist (66-68,10,31,45,46). Da die *S. aureus*- Lungeninfektion bei CF- Patienten chronisch verläuft, ist anzunehmen, dass *S.aureus* Biofilme gegen Defensine resistent sind.

Verschiedene frühere Untersuchungen zeigten, dass die bei der Biofilmbildung produzierten Exopolysaccharide an sich vor Phagozytose schützen (90,82,39, 48). Dies wurde sowohl für PIA von *S. epidermidis* als auch für Alginate von *P. aeruginosa* beschrieben (90,39). Learn et al. zeigten weiterhin, dass Alginate die Sauerstoffradikalproduktion der PMN reduziert. Daher stellte sich die Frage, ob PIA zusätzlich zu einer Resistenz gegen Sauerstoffradikale führt. Es zeigte sich jedoch bei der Durchführung der Phagozytose unter aeroben Bedingungen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Abtötungsraten adhärenter, PIA-negativer SA 113 Einzelzellen und adhärenter, PIA- positiver SA 7 Einzelzellen. Aerobe Phagozytoseversuche mit planktonischen *S. aureus* ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Abtötungsraten von anaerob inkubierten SA 113 (PIA- positiv) im Vergleich zu der PIA- negativen Mutante ATCC 35556  $\Delta$ ica::tet. Auch der schon unter aeroben Bedingungen PIA- bildende SA 7 wurde nicht signifikant schlechter abgetötet. Mit dem Cytochrom C-Test wurde ausserdem gezeigt, dass PIA keinen Einfluss auf die Superoxid-anionenproduktion der PMN hat, sondern dass die Anzahl der Bakterien, mit denen die PMN vorinkubiert werden, entscheidend ist für die Produktion von Sauerstoffradikalen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde zunächst vermutet, dass PIA per se *S. aureus* nicht vor Phagozytose schützt. Inzwischen wurde in

weiterführenden Untersuchungen allerdings gezeigt, dass PIA- positive *S. aureus* im Vergleich zu PIA- negativen *S. aureus* signifikant schlechter bzw. fast nicht abgetötet werden, wenn die Phagozytoseversuche unter anaeroben Verhältnissen durchgeführt werden (persönliche Mitteilung M. Ulrich). Unter anaeroben Verhältnissen stehen den PMN wie bereits erwähnt nur Defensine zur Abtötung zu Verfügung. Daraus lässt sich schließen, dass PIA *S. aureus* zusätzlich zu den bereits bekannten Resistenzmechanismen vor Defensinen schützt. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von Vuong et al., die zeigten, dass PIA *S. epidermidis* vor Defensinen schützt, die Sensivität gegenüber Sauerstoffradikalen jedoch unbeeinflusst bleibt (90).

**Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PIA *S. aureus* nicht vor Phagozytose schützt, wenn diese unter aeroben Bedingungen, d.h. unter Anwesenheit von Sauerstoffradikalen durchgeführt wird. In den Atemwegen von CF-Patienten ist *S. aureus* jedoch resistent gegen die Abtötung durch PMN, weil die dort herrschenden anaeroben Umgebungsbedingungen die Mikrokolonie- und Biofilmbildung des Pathogens induzieren, wodurch die Aufnahme in PMN ab einer gewissen Größe eingeschränkt wird.**



## 5. Zusammenfassung

Patienten mit Mukoviszidose (synonym: CF) leiden häufig an chronischen *S. aureus*-Lungeninfektionen. Obwohl eine heftige, von PMN dominierte Abwehrreaktion stattfindet, können die *S. aureus* nicht eliminiert werden. Unter den in der CF-Lunge herrschenden anaeroben Wachstumsbedingungen bildet *S. aureus* unter Produktion eines extrazellulären Polysaccharids (PIA) einen dichten, mehrschichtigen Biofilm mit Mikrokolonien. Um den Einfluss der Mikrokolonieformation und Biofilmbildung von *S. aureus* auf die Phagozytose durch PMN zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit erstmals ein Phagozytoseassay mit adhären *S. aureus* Einzelzellen und Mikrokolonien entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass Mikrokolonien signifikant schlechter abgetötet werden als adhären *S. aureus* Einzelzellen und vermutlich nur bis zu einer bestimmten Größe in PMN aufgenommen werden können. Weiterhin wurde untersucht, ob PIA per se einen Einfluss auf die Phagozytose hat. Aerobe Phagozytoseversuche in Suspension ergaben keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Abtötungsraten von PIA-positiven und PIA-negativen *S. aureus*. PIA scheint also *S. aureus* unter aeroben Bedingungen (d.h. unter Anwesenheit von Sauerstoffradikalen) nicht vor Phagozytose durch zu schützen. Auf die Sauerstoffradikalproduktion von PMN zeigte PIA keinen Einfluss; diese war lediglich abhängig von der Menge der vorhandenen Bakterien. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *S. aureus* in der CF-Lunge in erhöhtem Maße resistent ist gegen die Abtötung durch PMN, weil durch die dort herrschenden anaeroben Bedingungen die Mikrokolonie- und Biofilmbildung des Pathogens induziert wird, wodurch die Aufnahme in PMN ab einer gewissen Größe eingeschränkt wird.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Archer G. L.** *Staphylococcus aureus: A Well-Armed Pathogen.* 1998. Clin. Infect. Dis. 26: 1179-1181.
2. **Arciola C. A., Baldassarri L., Montanaro L.** Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of *Staphylococcal* Strains from Catheter-Associated Infections. 2001. J. Clin. Microbiol. 39: 2151-2156.
3. **Bauernfeind A., Bertele-Harms R. M., Harms K., Hörl G., Jungwirth R., Petermüller C., Pryzlenk B., Weisslein-Pfister C.** Qualitative and quantitative microbial analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis. 1987. Infection. 15: 270-277.
4. **Becker P., Hufnagle W., Peters G., Herrmann M.** Detection of Differential Gene Expression in Biofilm-Forming versus Planctonic Populations of *Staphylococcus aureus* Using Micro-Representational-Difference Analysis. 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2958-2965.
5. **Benn M., Hagelskjaer L. H., Tvede M.** Infective endocarditis, 1984 through 1993: a clinical and microbiological survey. 1997. J. Intern. Med. 242: 15-22.
6. **Boucher R., Stutts M., Knowles M., Cantely L., Gatzky J.** Na<sup>+</sup> Transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. 1986. J. Clin. Invest. 78: 1245-1252.
7. **Brown M. R., Williams P.** Resistance of bacterial biofilms: a growth related effect? 1988. J. Antimicrob. Chemother. 22: 777-780.
8. **Caiazza N. C., O`Toole G. A.** Alpha-Toxin is required for Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. 2003. J. Bacteriol. 185: 3214-3217.

9. **Cohen M. S.** Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. 1994. *J. Clin. Infect. Dis.* 18: 170-179.
10. **Collins L. V., Kristian S. A., Weidenmaier C., Faigle M., van Kessel K. P. M., van Strijp J. A. G., Götz F., Neumeister B., Peschel A.** *Staphylococcus aureus* Strains Lacking D-Alanine Modifications of Teichoic Acids Are Highly Susceptible to Human Neutrophil Killing and Are Virulence Attenuated in Mice. 2002. *J. Infect. Dis.* 186: 214-219.
11. **Conlon K. M., Humphreys H., O`Gara J. P.** *IcaR* Encodes a Transcriptional Repressor Involved in Environmental Regulation of *ica* Operon Expression and Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis*. 2002. *J. Bacteriol.* 184: 4400-4408.
12. **Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M.** Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995. 49: 711-745.
13. **Costerton J. W., Lewandowski Z., DeBeer D., Caldwell D., Korber D., James G.** Minireview: Biofilms, the Customized Microniche. 1994. *J. Bacteriol.* 176: 2137-2142.
14. **Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. 1999. *Science.* 284: 1318-1322.
15. **Cramton S. E., Gerke C., Schnell N. F., Nichols W. W., Götz F.** The *intercellular adhesion locus (ica)* locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. 1999. *Infect. Immun.* 67: 5427-5433.

16. **Cramton S. E., Ulrich M., Götz F., Döring G.** Anaerobic Conditions Induce Expression of Polysaccharide Intercellular Adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. 2001. Infect. Immun. 69: 4079-4085.
17. **Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I., Penades J. R.** Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. 2001. J Bacteriol. 183: 2888-2896.
18. **Cucarella C., Tormo M. A., Knecht E., Amorena B., Lasa I., Foster T. J., Penades J. R.** Expression of Biofilm- Associated Protein Interferes with Host Protein Receptors of *Staphylococcus aureus* and Alters the Infective Process. 2002. Infect. Immun. 70: 3180-3186.
19. **Cystic Fibrosis Foundation.** Patient Registry Annual Data Report, Bethesda, Maryland. 1996.
20. **Davey M. E., O`Toole G. A.** Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. 2000. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 847-867.
21. **Davis P. B., Drumm M., Konstan M. W.** State of the Art: Cystic Fibrosis. 1996. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 154: 1229-1256.
22. **Donlan R. M., Costerton W.** Review: Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. 2002. Clin. Microbiol. 15: 167-193.
23. **Döring G.** Respiratory Bacterial Infections in Patients with Cystic Fibrosis: Pathogenicity and Implications for Serine Proteinase Inhibitor Therapy. Molecular Biology of the Lung. Vol. 1: Emphysema and Infection 1997, Chapter 12: 199-214.

24. **Fowler V. G., Fey P. D., Reller L. B., Chamis A. L., Corey G. R., Rupp M. E.** The intercellular adhesion locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. 2001. *Med. Microbiol. Immunol.* 189: 127-131.
25. **Ganz T., Selsted M. E., Szklarek D., Harwig S. S. L., Daher K., Bainton D. F., Lehrer R. I.** Defensins – Natural Peptide Antibiotics of Human Neutrophils. 1985. *J. Clin. Invest.* 76: 1427-1435.
26. **Gertz S., Engelmann S., Schmid R., Ohlsen K., Hacker J., Hecker M.** Regulation of *sigmaB*-dependent transcription of *sigB* and *asp23* in two different *Staphylococcus aureus* strains. 1999. *Mol. Gen. Genet.* 261: 558-566.
27. **Gorman S. P., Mawhinney W. M., Adair C. G.** Confocal laser scanning microscopy of adherent microorganisms, biofilms and surfaces. In: *Microbial Biofilms: Formation and Control* (Denyer S. P., Gorman S. P., Sussman M., eds) 1993. pp 95-107. Blackwell Scientific Publications, London.
28. **Götz F.** MicroReview: *Staphylococcus* and biofilms. 2002. *Mol. Microbiol.* 43: 1367-1378.
29. **Götz F., Peters G.** Colonization of Medical Devices by Coagulase-Negative *Staphylococci*. In: Waldvogel F. A., Bisno A. L. *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*. 3. Auflage. 2000. ASM Press, Washington D. C.
30. **Gristina A. G., Shibata Y., Giridhar G., Kreger A., Myrvik Q. N.** The glycocalyx, biofilm, microbes, and resistant infections. 1994. *Semin. Arthroplasty.* 5: 160-170.

31. **Gross M., Cramton S. E., Götz F., Peschel A.** Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. 2001. Infect. Immun. 69: 3432-3426.
32. **Haddox J. L., Pfister R. R., Sommers C. I.** A visual assay for quantitating neutrophil chemotaxis in a collagen gel matrix. 1991. J. Immunolog. Meth. 141: 41-52.
33. **Hassett D. J.** Anaerobic Production of Alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: Alginate Restricts Diffusion of Oxygen. 1996. J. Bacteriol. 178: 7322-7325.
34. **Heilmann C., Gerke C., Perdreau-Remington F., Götz F.** Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. 1996. Infect. Immun. 64: 277-282.
35. **Heilmann C., Schweitzer O., Gerke C., Vanittanakom N., Mack D., Götz F.** Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. 1996. Mol. Microbol. 20: 1083-1091.
36. **Herrmann M., Jaconi M. E. E., Dahlgren C., Waldvogel F. A., Stendahl O., Lew D. P.** Neutrophil Bactericidal Activity against *Staphylococcus aureus* on Biological Surfaces. 1990. J. Clin. Invest. 86: 942-951.
37. **Hoyle B. D., Costerton J. W.** Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. 1991. Prog. Drug Res. 37: 91-105.
38. **Hyde J. A., Darouiche R. O., Costerton J. W.** Strategies for prophylaxis against prosthetic valve endocarditis: a review article. 1998. J. Heart Valve Dis. 7: 316-326.

39. **Jensen T. E., Kharazmi A., Høiby N., Costerton J. W.** Some bacterial parameters influencing the neutrophil oxidative burst response to *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. 1992. APMIS. 100: 727-733.
40. **Jia H. P., Schutte B. C., Schudy A. Linzmeier R., Guthmiller J. M., Johnson G. K., Tack B. F., Mitros J. P., Rosenthal A., Ganz T., McCray P. B. , Jr.** Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. 2001. Gene. 263: 211-218.
41. **Jones S. M., Morgan M., Humphrey T. J., Lappin-Scott H.** Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. 2001. Lancet. 357: 40-41.
42. **Knobloch J. K.-M., von Osten H., Horstkotte M. A., Rohde H., Mack D.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. 2002. Med. Microbiol. Immunol. 191: 101-106.
43. **Knobloch J. K.-M., von Osten H., Horstkotte M. A., Rohde H., Mack D.** Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative *Staphylococcus epidermidis*. 2002. Med. Microbiol. Immunol. 191: 107-114.
44. **Köhler W., Eggers H. J., Fleischer B., Marre R., Pfister H., Pulverer G.** Medizinische Mikrobiologie. 8. Auflage. 2001. Urban & Fischer Verlag München, Jena.
45. **Koprivnjak T., Peschel A., Gelb M. H., Liang N. S., Weiss J. P.** Role of Charge Properties of Bacterial Envelope in Bactericidal Action of Human Group IIA Phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. 2002. J. Biol. Chem. 277: 47636-47644.

46. **Kristian S. A., Dürr M., van Strijp J. A. G., Neumeister B., Peschel A.** MprF-Mediated Lysinlation of Phospholipids in *Staphylococcus aureus* Leads to Protection against Oxygen-Independent Neutrophil Killing. 2003. Infect. Immun. 71, No. 1: 546-549.
47. **Kullik L., Giachino P., Fuchs T.** Deletion of the alternative sigma factor  $\sigma$ B in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. 1998. J. Bacteriol. 180: 4814-4820.
48. **Learn D. B., Brestel E. P., Seetharma S.** Hypochlorite Scavenging by *Pseudomonas aeruginosa* Alginate. 1987. Infect. Immun. 55: 1813-1818.
49. **Leid J. G., Shirliff M. E., Costerton J. W., Stoodley P.** Human Leukocytes Adhere to, Penetrate, and Respond to *Staphylococcus aureus* Biofilms. Nov. 2002. Infect. Immun. 70: 6339-6345.
50. **Liese J.G., Jendrossek V., Jansson A.** Chronic granulomatous disease in adults. 1996. Lancet. 347: 220-223.
51. **Lowy F. D.** *Staphylococcus aureus* infections. 1998. N. Engl. J. Med. 339: 520-532.
52. **Mack D.** Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. 1999. J. Hosp. Infect. 43: 113-125.
53. **Mack D., Fischer W., Krokotsch A., Leopold K., Hartmann R., Egge H., Laufs R.** The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear  $\beta$ -1,6- linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. 1996. J. Bacteriol. 178: 175-183.



54. **Mack D., Rohde H., Dobinsky S., Riedewald J., Nedelmann M., Knobloch J. K.-M., Elsner H.-A., Feucht H.** Identification of Three Essential Regulatory Gene Loci Governing Expression of *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin and Biofilm Formation. 2000. Infect. Immun. 68: 3799-3807.
55. **Maira-Litran T., Kropec A., Abeygunawardana C., Joyce J., Mark III G., Goldmann D. A., Pier G. B.** Immunochemical Properties of the *Staphylococcal* Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide. 2002. Infect. Immun. 70: 4433-4440.
56. **Marrie T. J., Nelligan J., Costerton J. W. A** Scanning and Transmission Electron Microscopic Study of an Infected Endocardial Pacemaker Lead. 1982. Departments of Medicine and Microbiology, Dalhousie University, and the Victoria General Hospital, Halifax, Nova Scotia, and the Department of Biology, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada. Circulation. 66 No. 6: 1339-1340.
57. **Marrie T. J., Costerton J. W.** Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. 1984. J. Clin. Microbiol. 19: 687-693.
58. **May T. B., Shinabarger D., Maharaj R., Kato J., Chu L., DeVault J. D., Roychoudhury S., Zielinski N. A., Berry A., Rothmel R. K., Misra T. K., Chakrabarty A. M.** Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenetic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. 1991. Clin. Microbiol. Rev. 4: 191-206.
59. **McKenney D., Pouliot K. L., Wang Y., Murthy V., Ulrich M., Döring G., Lee J. C., Goldmann A., Pier G. B.** Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo- expressed antigen. 1999. Science. 284: 1523-1527.

60. **Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, Root RK.** Laboratory manual of neutrophil function. 1986. Raven Press, New York.
61. **Meyer K. C., Zimmermann J.** Neutrophil mediators, *Pseudomonas*, and pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. 1993. J. Lab. Clin. Med. 121: 654-661.
62. **Miyasaki K. T.** The neutrophil: mechanism of controlling periodontal bacteria. 1991. Journ. Periodontol. 62: 761-774.
63. **Morris N. S., Stickler D. J., Mc Lean R. J.** The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. 1999. World J. Urol. 17: 345-350.
64. **Nauseef W. M.** Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency. 1998. J. Mol. Med. 76: 661-668.
65. **O'Toole G., Kaplan H. B., Kolter R.** Biofilm Formation as Microbial Development. 2000. Annu. Rev. Microbiol. 54: 49-79.
66. **Peschel A., Otto M., Jack R. W., Kalbacher H., Jung G., Götz F.** Inactivation of the *dlt* Operon in *Staphylococcus aureus* Confers Sensitivity to Defensins, Protegrins, and Other Antimicrobial Peptides. 1999. J. Biol. Chem. Vol. 274, No. 13: 8405-8410.
67. **Peschel A., Jack R. W., Otto M., Collins L. V., Staubitz P., Nicholson G., Kalbacher H., Nieuwenhuizen W. F., Jung G., Tarkowski A., van Kessel K. P. M., van Strijp J. A. G.** *Staphylococcus aureus* Resistance to Human Defensins and Evasion of Neutrophil Killing via the Novel Virulence Factor MprF Is Based on Modification of Membrane Lipids with L-Lysine. 2001. J. Exp. Med. Vol. 193, No. 9: 1067-1076.

68. **Peschel A., Collins L. V.** *Staphylococcal resistance* to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. 2001. *Peptides* 22: 1651-1659.
69. **Rachid S., Ohlsen K., Wallner U., Hacker J., Hecker M., Ziebuhr W.** Alternative Transcription Factor  $\sigma B$  is involved in Regulation of Biofilm Expression in a *Staphylococcus aureus* Mucosal Isolate. 2000. *J Bacteriol.* 182: 6824-6826.
70. **Reid G.** Biofilms in infectious disease and on medical devices. 1999. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 11: 223-226 ; Diskussion 237-239.
71. **Riber U., Espersen F., Skinhøj P., Kharazmi A.** Induction of oxidative burst response in human neutrophils by adherent *staphylococci*. Comparison between *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. 1993. *APMIS.* 101: 55-60.
72. **Rich D. P., Anderson M. P., Gregory R. J., Cheng S. H., Paul S., Jefferson D., McCann J. D., Klinger K. W., Smith A. E., Welsh M. J.** Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithel cells. 1990. *Nature.* 347: 358-363.
73. **Rich R. L., Deivanayagam C. C. S., Owens R. T., Carson M., Höök A., Moore D., Yang V. W.-C., Sthanam, Narayana V. L., Höök M.** Trench-shaped Binding sites Promote Multiple Classes of Interactions between Collagen and the Adherence Receptors,  $\alpha 1\beta 1$  Integrin and *Staphylococcus aureus* Cna MSCRAMM. 1999. *J. Biol. Chem.* 274: 24906-24913.

74. **Rohde H., Knobloch J. K. M., Horstkotte M. A., Mack D.** Correlation of *Staphylococcus aureus icaADBC* Genotype and Biofilm Expression Phenotype. 2001. J. Clin. Microbiol. 39: 4595-4596.
75. **Rommens J. M., Iannuzzi M. C., Kerem B., Drumm M. L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J. L., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan J. R., Tsui L. C., Collins F. S.** Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. 1989. Science. 245: 1059-1065.
76. **Sanford, B. A., de Fejter A. W., Wade M. H., Thomas V. L.** A dual fluorescence technique for visualization of *Staphylococcus epidermidis* biofilm using scanning confocal laser microscopy. 1996. Journ. Ind. Microbiol. 16: 48-56.
77. **Saravia Otten P., Mueller H. P., Arvidson S.** Transcription of *S. aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by *agr* and *agr*-independent mechanism. 1997. J. Bacteriol. 179 (17): 5259-5263.
78. **Schibli D. J., Hunter H. N., Aseyev V., Starner T. D., Wiencek J. M., McCray P. B., Jr., Tack B. F., Vogel H. J.** The Solution Structures of the Human  $\beta$ -Defensins Lead to a Better Understanding of the Potent Bactericidal Activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. 2002. J. Biol. Chem. Vol. 277, No. 10: 8279-8298.
79. **Shimoda M., Ohki K., Shimamoto Y., Kohashi O.** Morphology of Defensin-Treated *Staphylococcus aureus*. 1995. Infect. Immun. Vol. 63, No. 8: 2886-2891.
80. **Shirtliff M. E., Mader J. T.** Osteomyelitis. 2000. p. 375-396. In J. Nataro, M. J. Blaser and S. Cunningham-Rundles (ed.), Persistent bacterial infections. ASM Press, Washington D. C.

81. **Singh, P. K., Schaefer A. L., Parsek M. R., Moninger T. O., Welsh M. J., Greenberg E. P.** Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. 2000. *Nature*. 407: 762-764.
82. **Steinberg D., Poran S., Shapira L.** The effect of extracellular polysaccharides from *Streptococcus mutans* on the bactericidal activity of human neutrophils. 1999. *Arch. Oral Biol*. 44: 437-444.
83. **Stepanović S., Vuković D., Ježek P., Pavlović M., Švabic-Vlahović M.** Influence of Dynamic Conditions on Biofilm Formation by *Staphylococci*. 2001. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 20: 502-504.
84. **Stewart P. S., Costerton J. W.** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. 2001. *Lancet*. 358: 135-138.
85. **Sutherland I. W.** Minireview: Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. 2001. *Microbiology*. 147: 3-9.
86. **Takada Y., Wayner E. A., Carter W. G., Hemler M. E.** Extracellular matrix receptors, ECMRII and ECMRI, for collagen and fibronectin correspond to VLA-2 and VLA-3 in the VLA family of heterodimers. 1988. *J. Cell. Biochem*. 37: 385-393.
87. **Tsui L. C., Buchwald M., Barker D., Braman J. C., Knowlton R. R., Schumm J. W., Eiberg H., Mohr J., Kennedy D., Plavsic N., Zsiga M., Markiewicz D., Aktos G., Brown V., Helms C., Gravins T., Parker T., Rediker K., Donis-Keller H.** Cystic fibrosis locus is defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. 1985. *Science*. 230: 1054-1057.
88. **Valle J., Toledo-Arana A., Berasain C., Ghigo J.-M., Amorena B., Penadés J. R., Lasa I.** *SarA* and not  $\sigma^B$  is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. 2003. *Mol. Microbiol*. 48: 1075-1087.

89. **Vorland L. H., Ulvatne H., Rekdal Ø., Svendsen J. S.** Initial Binding Sites of Antimicrobial Peptides in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. 1999. Scand. J. Infect. Dis. 31: 467-473.
90. **Vuong C., Voyich J. M., Fischer E. R., Braughton K. R., Whitney A. R., DeLeo F. R., Otto M.** Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. 2004. Cell. Microbiol. 6: 269-275.
91. **Vuong C., Kocianova S., Voyich J. M., Yao Y., Fischer E. R., DeLeo F. R., Otto M.** A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune invasion, and virulence. 2004. JBC Papers in Press. Manuscript M411374200.
92. **Vuong C., Saenz H. L., Götz F., Otto M.** Impact of the *agr* Quorum Sensing System on Adherence to Polystyrene in *Staphylococcus aureus*. 2000. J. Infect. Dis. 182: 1688-1693.
93. **Williams I., Paul F., Lloyd D., Jepras R., Critchley I., Newman M., Warrack J., Giokarini T., Hayes A. J., Randerson P. F., Venables W. A.** Flow cytometry and other techniques show that *Staphylococcus aureus* undergoes significant physiological changes in the early stages of surface- attached culture. 1999. Microbiol. 145: 1325-1333.
94. **Wood R. E., Boat T. F., Doershuk C. F.** State of the art: cystic fibrosis. 1976. Am. Rev. Respir. Dis. 113: 833-878.

95. **Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M., Schwab U., Cekici A., Meyer K. C., Birrer P., Bellon G., Berger J., Weiss T., Botzenhart K., Yankaskas J. R., Randell S., Boucher R. C., Döring G.** Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. 2002. J. Clin. Invest. 109: 317-325.
96. **Yeaman M. R., Bayer A. S., Koo S.- P., Foss W., Sullam P. M.** Platelet Microbicidal Proteins and Neutrophil Defensin Disrupt the *Staphylococcus aureus* Cytoplasmic Membrane by Distinct Mechanisms of Action. 1998. J. Clin. Invest. Vol 101, No. 1: 178-187.

## 7. Abkürzungen

BCECF, AM = 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester

Cy- 3 = Indocarbocyanin- 3- labeled goat anti- rabbit IgG

Cyt C = Cytochrom C

d = Tag

DAPI = Diamedin- 2- phenylindol- dihydrochlorid

DMSO = Dimethylsulfoxid

EDTA = Ethylendinitrilotetraessigsäure

Epon = 1,2-Epoxypropan

h = Stunde

*ica* = Intercellular- Adhäsion

KBE = Kolonie- bildende Einheiten

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  = Kaliumdihydrogenphosphat

min. = Minute

MSCRAMMs = Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules

NaCl = Natriumchlorid

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  = Natriumhydrogenphosphat- Dodecahydrat

NaOH = Natriumhydroxid

OD = Optische Dichte

$\text{OsO}_4$  = Osmiumtetroxid

PBS = Phosphat- gepufferte Saline

PIA = Polysaccharid- Interzellulär- Adhäsion

PMA = Phorbol- Myrestat- Acetat

PMN = Polymorphkernige (= neutrophile) Granulozyten

REM = Rasterelektronenmikroskop

RT = Raumtemperatur

SA = *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* = *Staphylococcus aureus*

sec. = Sekunde



SOD = Superoxid- Dismutase

TEM = Transmissionselektronenmikroskop

TSA = Tryptone Soya Agar

TSB = Tryptone Soya Broth

UpM = Umdrehungen pro Minute

**Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Hygiene- Institutes in Tübingen bedanken, die mir stets sehr hilfsbereit und freundlich zur Seite standen. Mein besonderer Dank gilt Fr. Dr. M. Ulrich und Prof. Dr. G. Döring, die mich sehr zuverlässig, kompetent und immer freundlich betreut haben.**

**Weiterhin danke ich meinen Eltern und meinem Bruder Michael sowie meinem Freund Johannes, die durch ihre moralische Unterstützung ebenfalls wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.**

## **Lebenslauf**

### Persönliche Daten

Name Kathrin Brigitte Gertrud Ziegler  
Geboren am 4.12.1977 in Sindelfingen  
Staatsangehörigkeit deutsch

### Schulbildung

1984 – 1988 Pestalozzi- Schule in Stuttgart  
1988 – 1997 Hegel- Gymnasium in Stuttgart  
Juni 1997 Allgemeine Hochschulreife 20.06.1997

### Studium

1997 – 1999 Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Sept. 1999 Ärztliche Vorprüfung am 10.09.1999  
1999 - 2003 Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
22.03.2001 1. Abschnitt der Ärztl. Prüfung  
09.04.2003 2. Abschnitt der Ärztl. Prüfung  
07.05.2004 3. Abschnitt der Ärztl. Prüfung

### Berufserfahrung

März 2000 Famulatur Allgemeinchirurgie Marienhospital, Stuttgart  
August 2000 Famulatur Unfallchirurgie BG Unfallklinik, Tübingen  
Sept. 2000 Famulatur Orthopädische Praxis Dr. Ziegler, Stuttgart  
März 2002 Famulatur Neurolog. Praxis Dr. Gottwald, Stuttgart  
August 2002 Famulatur Dermatologische Praxis Dr. Datz, Tübingen  
April 2003 – Praktisches Jahr (Wahlfach Orthopädie) am Städt. KH  
April 2004 Sindelfingen / Spital Wil, Schweiz  
Juli – Okt. 2004 Ärztin im Praktikum Städt. KH Sindelfingen (Orthopädie)  
Seit Okt. 2004 Assistenzärztin Städt. KH Sindelfingen (Orthopädie)