

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut

für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

**Untersuchung zur Prävalenz von Antikörpern gegen das
extracellular matrix binding protein in Seren von Patienten
mit Infektionen nach Gelenkersatz**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

von

Martina Joanna Kohns

aus Hannover

Hannover 2013

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 30.04.2014

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg

Prüfungsausschuss, der/ die Vorsitzende: PD Dr. H. Rohde

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. M. Hentschke

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. A. Niemeier

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINFÜHRUNG	1
1.1 STAPHYLOKOKKEN	1
1.2 DIAGNOSTISCHER NACHWEIS VON <i>STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS</i> IM RAHMEN ENDOPROTHESENASSOZIIERTER INFEKTIONEN.....	4
1.3 PATHOGENESE FREMDKÖRPERASSOZIIERTER INFEKTIONEN UND BIOFILMBILDUNG DURCH <i>S. EPIDERMIDIS</i>	5
1.4 Das EXTRAZELLULÄR-MATRIXBINDENDE PROTEIN (EMBP; <i>EXTRACELLULAR MATRIX BINDING PROTEIN</i>)	8
1.5 ZIELSETZUNG	10
2 MATERIAL.....	12
2.1 LABORGERÄTE.....	12
2.2 ÄKTA-SYSTEM	13
2.3 CHEMIKALIEN.....	13
2.4 MEDIEN	13
2.5 PUFFER UND LÖSUNGEN	13
2.6 BAKTERIENSTÄMME	16
2.7 ANTIKÖRPER.....	16
2.8 HUMANE SERUMPROBEN	17
3 METHODEN.....	17
3.1 PROTEINEXPRESSION UND HIS-TRAP-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	17
3.2 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	18
3.3 ELISA (ENZYM-LINKE IMMUNO SORBENT ASSAY).....	20
3.3.1 Durchführung des ELISA	20
3.3.2 ELISA mit Unterstützung des GENESIS Freedom 200	21
3.4 ELISA MESSUNG VON ANTI-EMBP-IGG IN PATIENTEN- UND BLUTSPENDERSEREN	22
4 ERGEBNISSE.....	22
4.1 REKOMBINANTE EXPRESSION DER SPEZIFISCHEN EMBP-SUBDOMÄNE REMBP6599.....	22
4.2 ANALYSE DER PROTEINBANDEN VON REMBP6599 MITTELS SDS- POLYACRYLAMID- GELELEKTROPHORESE.....	23
4.3 ELISA	23
4.4 NACHWEIS VON ANTI-EMBP-IGG IN PATIENTENSEREN.....	25
4.5 NACHWEIS VON ANTI-EMBP-IGG IN BLUTPENDERSEREN	26
4.6 NACHWEIS VON ANTI-EMBP-IGG IN SEREN ALTER PATIENTEN OHNE ENDOPROTHESENINFEKTION.....	27

5	DISKUSSION	31
6	ZUSAMMENFASSUNG	36
7	LITERATURVERZEICHNIS	38
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	44
9	LEBENS LAUF	47
10	ERKLÄRUNG	48
11	DANKSAGUNG	49

1 Einführung

1.1 Staphylokokken

Staphylokokken sind grampositive, fakultativ anaerobe Bakterien von etwa 0,8-1,2 µm Durchmesser, die sich bei Betrachtung unter dem Lichtmikroskop als haufen- oder traubenförmig darstellen. Staphylokokken können durch den Nachweis einer Prothrombin-aktivierenden Plasmakoagulase in koagulasepositive (*Staphylococcus aureus*) und koagulasenegative Spezies wie *Staphylococcus epidermidis* unterteilt werden (1). Koagulasenegative Staphylokokken sind Teil der normalen Hautflora des Menschen und besitzen in der Regel nur ein geringes pathogenes Potential (2). Als typische Habitate mit höchster Populationsdichte stellen sich hierbei Areale der Haut und Schleimhäute, Schweißdrüsen, Haartalgdrüsen und Nasenschleimhäute dar (3). Insgesamt finden sich 14 der bekannten KNS-Spezies beim Menschen an (3). *Staphylococcus epidermidis* ist der wichtigste Vertreter dieser Gruppe. Er kommt auf der gesamten Körperoberfläche vor und bildet den größten Anteil der isolierten Staphylokokkenspezies (4). *Staphylococcus epidermidis* gehört außerdem zu den am häufigsten in klinischen Materialien isolierten Staphylokokkenspezies. Im Gegensatz dazu tritt *Staphylococcus aureus* nur bei 20-40% der Menschen auf (3). Da das humanpathogene Potential von *S. aureus* seit langem bekannt ist, wird dieses bei einem Nachweis auf klinischem Material in der Regel als der infektionsverursachende Erreger angesehen. Diese Erregerspezies ist hierbei für eine Vielzahl von Erkrankungen wie Wundinfektionen, Endokarditiden oder auch Pneumonien verantwortlich. Das Auftreten von *Staphylococcus epidermidis* auf klinischen Materialien hingegen galt lange Zeit als Kontaminationszeichen (5). Erst in den letzten Jahren wurde dabei vor dem Hintergrund der Bedeutung von *S. epidermidis* bei fremdmaterialassoziierten Infektionen die These der vollständigen Apathogenität dieser Spezies verworfen. In nahezu allen Fachbereichen der modernen Medizin ist die Nutzung von Implantaten zu einem grundlegenden Bestandteil der Patientenversorgung geworden. Betrachtet man die Zahl von mehr als 2.500.000 jährlich allein in Deutschland in Form von Gelenkprothesen,

künstlicher Herzklappen oder auch Kathetern implantierter Fremdkörper lässt sich die immense Relevanz dieser therapeutischen Hilfsmittel nachvollziehen (6,7).

Tabelle 1: Medizinische Instrumente und die Häufigkeit ihrer Anwendung^a

Implantat / Instrument	Anzahl der verwendeten Fremdmaterialien ^b
Intravaskuläre Katheter peripher und zentralvenös	150-200 Millionen/Jahr
Blasen-Katheter	4-5 Millionen/Jahr
Liquorableitungen	> 80.000/Jahr
Herzschrillmacher	115.000- 130.000/Jahr
Gefäßprothesen	> 60.000/Jahr
Prothetische Herzklappen	> 100.000/Jahr
Künstliche Herzen	230 (1969-1991)
Urogenitale Prothesen	150.000, total
Totale Hüftgelenksendoprothesen	222.000/Jahr
Totale Kniegelenksendoprothesen	110.000/Jahr
Zahnimplantate	436.000/Jahr

^aNach Anderson J., Marchant R. *Biomaterials: Factors Favoring Colonization and Infection*. Aus: Waldvogel F, Bisno A, Herausgeber. *Infection associated with indwelling medical devices*. 3rd edition. Washington: American Society for Microbiology Press; 2000. P. 173-209

^b Die Zahlen basieren auf Daten aus den USA.

Primär ist der Einsatz von Implantaten für den Patienten von großem Nutzen. Allerdings werden Patienten durch Maßnahmen, die den permanenten oder intermittierenden Einsatz von Implantaten beinhalten, auch dem Risiko des Auftretens unerwünschter Nebenwirkungen ausgesetzt. Hierbei stellt die Entstehung einer Infektion eine besonders schwerwiegende Komplikation dar. Diese Infektionen treten zwar nur mit einer niedrigen Rate von etwa 1–5% auf (7), vor dem Hintergrund des ansteigenden Einsatzes von Implantaten muss jedoch alleine in Deutschland mit bis zu 100.000 Infektionen pro Jahr gerechnet werden (8). Neben *Staphylococcus aureus* stellen Koagulase-negative Staphylokokken und insbesondere *Staphylococcus epidermidis* die am häufigste im Kontext Implantat-assoziiierter Infektionen nachgewiesene Spezies dar. So stieg beispielsweise im Verlauf der achtziger Jahre trotz der bei Fremdkörperimplantationen regelhaft durchgeführten peri- und postoperativen

Wundinfektionsprophylaxe die Zahl der durch KNS induzierten, nosokomialen Infektionen um das 1,5–8,5-Fache (9,10). Weiterhin zeigt sich in einer Studie des NNIS (*National Nosocomial Infections Surveillance System*) in den USA über einen Zeitraum von 1992 bis 1998 auf Intensivstationen, dass KNS bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen die mit Abstand häufigste Spezies (39%) der isolierten Erreger darstellten (11). Die Diagnose einer *S. epidermidis*-assoziierten Infektion stellt den Kliniker wie auch den klinischen Mikrobiologen vor große Herausforderungen. Als besonders problematisch erweist sich im Alltag bei Nachweis von *S. epidermidis* in einem klinischen Untersuchungsmaterial die eindeutige Unterscheidung zwischen einer Kontaminante und einem invasiven (und damit klinisch wie auch therapeutisch relevanten) Isolat. Etwa 75–90% der aus Patientenmaterial isolierten koagulasenegativen Staphylokokken müssen derzeit als Kontamination durch Verunreinigung des Probenmaterials mit Bestandteilen der Hautflora des Patienten angesehen werden (8,12). Bedenkt man die enormen therapeutischen Konsequenzen nach Diagnose einer Implantat-assoziierten Infektion (etwa die Notwendigkeit, orthopädische Implantate operativ zu entfernen), so wird deutlich, dass die Entwicklung von Untersuchungsmethoden zum spezifischen Nachweis einer *S. epidermidis* Infektion von enormer klinischer Bedeutung ist.

1.2 Diagnostischer Nachweis von *Staphylococcus epidermidis* im Rahmen endoprothesenassoziierter Infektionen

Auch heute noch stellt die Diagnostik einer Fremdkörper-assoziierten Infektion sowohl behandelnde Ärzte als auch Mikrobiologen vor große Schwierigkeiten. Die Diagnose einer Endoprotheseninfektion erfolgt hierbei über den direkten Erregernachweis im infizierten Gelenk, beispielsweise durch Gelenkpunktion. Ein solcher Erregernachweis ist nicht nur für den endgültigen Beweis einer Infektion, sondern auch für Resistenztestungen bei einer geplanten Antibiotikatherapie von größter Bedeutung. Fremdkörper-assoziierte Infektionen stellen sich häufig als schwer therapierbar und mit klinisch schwerem Verlauf dar. Als Konsequenz ergibt sich daraus meist eine Entfernung der Endoprothese, um eine endgültige Sanierung des Infektionsherdes gewährleisten zu können (13). Dies ergibt sich durch den Umstand, dass eine antibiotische Therapie aufgrund von Resistenzen der kausalen Stämme gegen Antibiotika häufig stark eingeschränkt ist. So weisen zum Beispiel 80% der *S. epidermidis* Isolate eine Resistenz gegenüber Methicillin auf (14). Die zu beobachtende Antibiotikaresistenz ist daher ein weiterer Faktor für das erhöhte Auftreten von nosokomialen Infektionen durch KNS. Um im Rahmen einer Endoprothesen- oder ZVK-assoziierten Infektion zwischen einer Kontamination und einem klinisch signifikanten Isolat unterscheiden zu können, wurden Richtlinien für die Klassifikation der klinischen Signifikanz von *S. epidermidis* formuliert (12,15). Als Kriterium für die Unterscheidung von Kontaminante und klinisch signifikantem Isolat wird daher der mindestens zweifache Nachweis klonal identischer Stämme aus mindestens zwei unabhängig voneinander gewonnenen Proben verwendet. Allerdings ist dieses Prozedere im klinischen Alltag zum Teil nur schwer umzusetzen, sodass bei Verdacht einer fremdkörperassozierten Gelenkinfektion die Kombination mehrerer diagnostischer Methoden genutzt wird (16). Dabei wird neben der Auswertung klinischer Aspekte auch auf Blutlaborwerte wie Entzündungsparameter (CRP, Leukozytenzahlen), in einigen Fällen auch auf bildgebende Verfahren zurückgegriffen, die eine Hilfe bei der Bewertung einer möglichen Infektion durch den eingebrachten Fremdkörper darstellen können. Nichtsdestotrotz ist bei Anwendung dieser diagnostischen Hilfsmittel weder der definitive Ausschluss

noch die gesicherte Diagnose einer Protheseninfektion möglich (17,18). Aus diesem Grund ist die Identifikation neuer Biomarker, die mit hoher Sensitivität und Spezifität *S. epidermidis* Infektionen identifizieren können, von hohem klinischem Interesse. Um solche Biomarker zu identifizieren wurde der Pathogenese von Fremdmaterial-assoziierten Infektionen und den an diesem Prozess beteiligten Faktoren in den letzten drei Jahrzehnten große Aufmerksamkeit gewidmet.

1.3 Pathogenese fremdkörperassoziiierter Infektionen und Biofilmbildung durch *S. epidermidis*

Die enge Verbindung zwischen Implantation von Endoprothesen und einer darauf folgenden Infektion durch *S. epidermidis* lässt vermuten, dass diese Spezies über Fähigkeiten verfügt, die die Anheftung an Polymeroberflächen von Fremdmaterial entscheidend begünstigen. Und tatsächlich beruht das pathogene Potential von *S. epidermidis* im Wesentlichen in der Fähigkeit dieses Erregers begründet, an Materialien wie beispielsweise Kunststoffoberflächen mehrschichtige Bakterienzellorganisationen zu bilden (19). Dies wurde zunächst Schleimbildung genannt, heute jedoch als Biofilmbildung bezeichnet (20). Bei einem Biofilm handelt es sich um eine Organisationsform bakteriellen Wachstums, die Bakterien günstige Lebensbedingungen und Schutz vor schädlichen Umwelteinflüssen bietet (21). Ein Biofilm besteht aus einer Gruppe von Bakterien, die von einer selbst synthetisierten, polymeren Matrix umgeben und fest an einer Oberfläche haftend organisiert sind (22). Diese Fähigkeit der Biofilmbildung wird als Hauptgrund des persistierenden Verlaufs Staphylokokken-assoziiierter Endoprotheseninfektionen aufgefasst. So konnte in der Vergangenheit nachgewiesen werden, dass Biofilme durch Mechanismen wie Inhibierung der humoralen Immunantwort als Barriere für das Immunsystem des Wirts agieren (23,24). Außerdem weisen Erreger, die in Biofilmen organisiert sind, eine signifikant reduzierte Empfindlichkeit von Antibiotika auf (25). Hieraus folgt, dass bei zunehmender Ausbreitung resistenter *S. epidermidis* Stämme wie beispielsweise MRSE, die Fähigkeit zur Biofilmbildung als eine direkte Ursache für das Versagen einer antibiotischen

Therapie und damit als Grund für die regelhafte Notwendigkeit einer Implantatentfernung betrachtet werden kann. Der Prozess der *S. epidermidis* Biofilmbildung wird in drei Phasen unterteilt: 1. Anheftung an die zu besiedelnde Oberfläche (primäre Adhärenz), 2. Akkumulation und Reifung zu einem differenzierten Biofilm sowie 3. Freisetzung und Verbreitung planktonischer Zellen. Die Biofilmbildung beginnt mit einer initialen Adhäsion von Zellen an die Oberfläche des implantierten Fremdmaterials. Diese Anheftung an abiotische Oberflächen hängt hauptsächlich von einer Reihe unspezifischer Faktoren wie der Beschaffenheit der Oberfläche oder auch von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Bakterien- und Polymeroberfläche ab (26). Zudem tragen *in vivo* zusätzliche Interaktionen mit wirtseigenen Proteinen wie beispielsweise Albumin, Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen und Vitronectin zu dieser primären Adhäsion bei (27,28). Nach der initialen Adhäsion prägen sich Biofilme durch interzelluläre Aggregation von proliferierenden Bakterienzellen aus. In den verschiedenen Phasen der Biofilmbildung besitzen die jeweiligen Faktoren eine definierte Rolle (19). Beispielsweise konnte dem Kapselpolysaccharid PS/A eine wesentliche Rolle für die Bindung von *S. epidermidis* an Silikonkathetern zugewiesen werden (29), wohingegen das *S. epidermidis* Autolysin die Bindung an das extrazelluläre Matrixprotein Vitronectin und an Polystyroloberflächen vermittelt (30,31). Eine wesentliche Rolle für die Biofilmbildung spielt zudem das extrazelluläre-matrixbindende Protein (Embp; *extracellular matrix binding protein*). Dieses interagiert mit Fibronectin und kann hierüber die Bindung an implantierte Fremdkörper realisieren (32). Als weiterer Faktor scheinen Teichonsäuren an der Fibronectin-Interaktion beteiligt zu sein (33). An die primäre Bindung von *S. epidermidis* bei der Biofilmbildung schließt sich die akkumulative Phase an, in welcher sich der mehrschichtige Biofilm formiert. In dieser sekundären Phase haben nur noch einige wenige Zellen direkten Kontakt zu der Polymeroberfläche des implantierten Fremdmaterials, werden jedoch durch interzelluläre Adhäsion im Zellverband immobilisiert (19). Einen wichtigen Faktor während dieses zweiten Schrittes der Biofilmbildung stellt das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA; *polysaccharide intercellular adhesin*) dar (34). Es handelt sich hierbei um ein lineares Homoglykan, das aus β -1,6-verknüpften N-

Acetylglukosaminresten aufgebaut ist. Mack *et al.* gelang der Nachweis zweier unterschiedliche Polysaccharidisformen: PIA I, das 80% dieser Polysaccharide ausmacht, zeichnet sich durch sowohl positive als auch negative Ladung aus. PIA II zeigt enge strukturelle Ähnlichkeiten mit PIA I, weist aber einen höheren Gehalt an Phosphat und Succinat, sowie einen leicht anionischen Charakter auf (35,36). Zudem konnte im weiteren Verlauf ein Zusammenhang zwischen quantitativer PIA-Synthese und Stärke der Biofilmbildung nachgewiesen werden (36). Wichtige Funktionen während der zweiten Phase der Biofilmbildung werden zudem dem Akkumulation assoziierten Protein (*accumulation associated protein*, Aap) zugeschrieben. Es handelt sich hierbei um ein interzelluläres Adhäsins, das PIA während der akkumulativen Phase der Biofilmbildung funktionell ersetzen kann (37). Aap hat eine Größe von 220 kDa, und ist, aus einer Domäne A und einer Domäne B bestehend, auf der Oberfläche von *S. epidermidis* nachweisbar (37,38). Hussain *et al.* konnten 1997 belegen, dass Aap-positive Stämme, im Gegensatz zu Aap-negativen Stämmen, in der Lage sind stärkere Biofilme auszubilden (39). In der sich der Akkumulation anschließenden dritten Phase der *S. epidermidis* Biofilmbildung können sich schließlich einzelne bakterielle Zellen aus der äußeren Schicht des Biofilms herauslösen und kolonisieren entferntere Bereiche über erneute Biofilmbildung (19). Jüngere Arbeiten zeigen, dass die Auflösung des Biofilms an seiner apikalen Seite entscheidend durch die Expression von kurzen amphiphatischen Peptiden gesteuert wird, die gleichsam wie ein Detergenz in der Lage sind, aggregierte Zellen zu lösen (40).

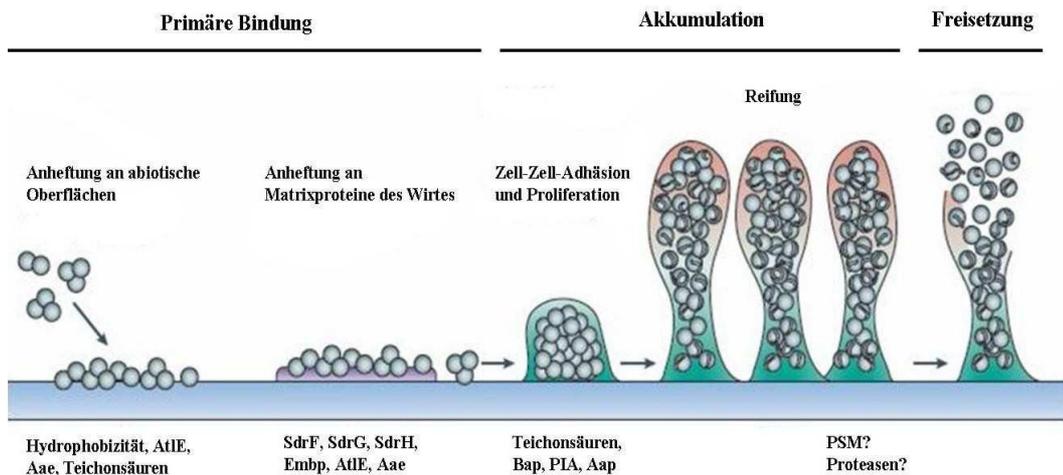


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Biofilmbildung von *S. epidermidis*. Die Anheftung an unbeschichtetes Material hängt hauptsächlich von der Hydrophobizität der Zelloberfläche ab, während bestimmte bakterielle Oberflächenproteine die Adhäsion an medizinische Fremdkörper vermittelt, die mit Matrixmolekülen des Wirts bedeckt sind. Nach der Adhäsion an die Oberfläche kommt es über Exopolysaccharide, wie zum Beispiel PIA, und spezifischen Proteinen wie Aap, Embp und Bap sowie zu einem kleinen Teil über akzessorische Makromoleküle (zum Beispiel Teichonsäuren) zur interzellulären Aggregation und im Anschluss zur Reifung zu einem differenzierten Biofilm. Der letzte Schritt beinhaltet die Freisetzung planktonischer Bakterien oder kleinerer Zellaggregate. Verändert nach (19).

1.4 Das Extrazelluläre-matrixbindende Protein (Embp; *extracellular matrix binding protein*)

Neben PIA und Aap wurde mit dem extrazellulär-matrixbindenden Protein ein weiteres multifunktionelles Zelloberflächenprotein identifiziert, das bei der Biofilmbildung in *S. epidermidis* eine wesentliche Rolle spielt. Bei Embp handelt es sich um das größte in *S. epidermidis* nachweisbare Protein: Das errechnete Molekulargewicht beträgt 1 MDa (41). Im Rahmen der Untersuchung des *S. epidermidis* Stamms 1585v, einer im Labor erzeugten Variante des *S. epidermidis* Stamms 1585, der spontan große Mengen Embp überexprimiert, konnte genetische Evidenz für die funktionelle Bedeutung von Embp bei der Biofilmbildung erzeugt werden (41). Zum einen spielt Embp eine Rolle bei der primären Adhärenz, da das Protein Fibronectin-bindende Eigenschaften aufweist und somit die Anlagerung von *S. epidermidis* an implantierte Fremdmaterialien unterstützen kann (41). Daneben übernimmt Embp Funktion in der akkumulativen Phase der *S. epidermidis* Biofilmbildung, indem es wie auch PIA

eine die Bakterien umgebende extrazelluläre Matrix bildet und hierüber den Biofilm stabilisiert (42). Diese könnte auch Ursache für die Embp-vermittelte Protektion von *S. epidermidis* gegenüber Makrophagen sein (42). Somit erscheint es möglich, dass Embp an der Induktion einer chronisch-persistierenden Fremdmaterial-assoziierten Infektion beteiligt sein könnte. Durch bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenz konnte gezeigt werden, dass Embp durch einen ausgeprägt modularen Aufbau gekennzeichnet ist. Im Wesentlichen lassen sich 5 unterschiedliche Regionen des Proteins abgrenzen:

1. ein N-terminales Exportsignal, YSIRK
2. 59 FIVAR (*found in various architectures*) Domänen
3. 38 GA (*protein G-related albumin binding*) Domänen
4. 4 Domänen unbekannter Funktion 1542 (DUF1542, *domain of unknown function 1542*)
5. eine C-terminale Transportdomäne

Das N-terminale Signalpeptid ist für die gezielte Ausschleusung des Proteins verantwortlich (43). Während diese Funktion klar bei anderen *S. epidermidis* Proteinen belegt werden konnte, ist die Funktion der FIVAR- und GA-Domänen weniger gut charakterisiert. Erste Untersuchungen unter Verwendung rekombinanter Proteine konnten jedoch zeigen, dass FIVAR-Domänen Fibronectin-bindende Eigenschaften aufweisen. Hierbei scheint ein neuer, bislang noch nicht beschriebener, molekularer Mechanismus bedeutsam zu sein (41).

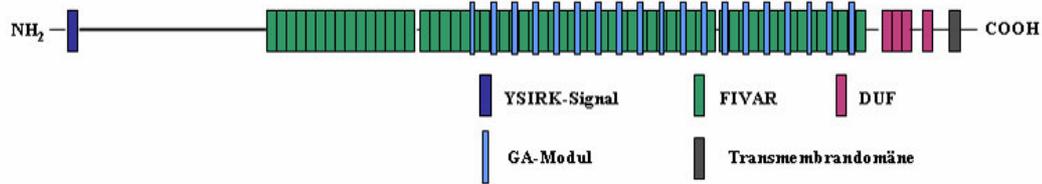


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus des *S. epidermidis*-Proteins Embp. Fivar- und GA-Domänen bilden hierbei den Großteil dieses Riesenproteins. Am N-Terminus ist das YSIRK-Export Motiv dargestellt. (41).

In klinischen *S. epidermidis* Populationen kann Embp in fast 90% der Isolate gefunden werden (44,45). Umso erstaunlicher ist es, dass unter *in vitro* Bedingungen Embp nur schwach oder aber gar nicht exprimiert wird (41). Die Ursache hierfür ist die Überexpression des staphylococcal accessory regulators (*sar*)A, die unter *in vitro* Bedingungen die Expression von Embp unterdrückt (41). Unter *in vivo* Bedingungen scheint diese Repression von Embp keine Rolle zu spielen. Hierauf weist zumindest der Befund hin, dass bei Wachstum in Serum die *sar*A Expression herunter reguliert wird, während es zu einer Induktion der Embp-Expression kommt (41). Somit erscheint es möglich, dass Embp unter *in vivo* Bedingungen, also auch während einer Infektion, gebildet wird.

1.5 Zielsetzung

Nach wie vor ist die Diagnose einer *S. epidermidis* verursachten fremdmaterialassoziierten Infektion schwierig. Für die definitive Diagnose sind, vor allem bei endoprothesenassoziierten Infektionen, invasive diagnostische Maßnahmen wie eine Gelenkpunktion zum kulturellen Erregernachweis notwendig. Aus diesem Grund besteht ein hoher Bedarf an biologischen Markern, deren Nachweis im Serum schnell und sicher eine Infektion anzeigt oder aber ausschließt. Durch die detaillierte Kenntnis der an der Pathogenese von *S. epidermidis* Infektionen beteiligten bakteriellen Faktoren ist es jetzt möglich geworden den Nachweis von spezifischen, gegen definierte *S. epidermidis*

Faktoren gerichteten Antikörpern als einen solchen Marker zu evaluieren. Das *extracellular matrix binding protein* Embp vermittelt die Bindung von *S. epidermidis* an Fibronectin und ist an der akkumulativen Phase der *S. epidermidis* Biofilmbildung beteiligt. Das Embp kodierende Gen ist in invasiven *S. epidermidis* Populationen weit verbreitet. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, Embp als Zielstruktur diagnostischer Tests zu evaluieren. Vor diesem Hintergrund waren die Ziele dieser Arbeit:

1. Aufbau eines auf einem rekombinant exprimierten Embp-Fragment basierendem *Enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA) Systems zum Nachweis von anti-Embp Antikörpern in humanen Serumproben.
2. Bestimmung der Prävalenz und Titerhöhen von anti-Embp Antikörpern in Seren von Patienten mit *S. epidermidis* und *S. aureus* Endoprotheseninfektionen sowie Kontrollpopulationen.

2 Material

2.1 Laborgeräte

Während dieser Arbeit wurden folgende Laborgeräte verwendet:

Tabelle 2:

Gerät	Hersteller
Zentrifuge, Centrifuge 5414 D	Eppendorf (Hamburg)
Photometer, Smart Spec™ 3000	BioRad, Hercules (USA)
Brutschrank	Heraeus (Osterode)
Waage, Kern 572	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Digital- pH- Meter, Ino Lab	WTW
Ultraschallgerät, Digital Sonifier®	Branson (Danbury, USA)
Amicon Ultra-15 Zentrifugenfilter	Millipore (Billerica, MA)
96- Loch Mikrotiterplatten, Nunclon	Nunc (Roskilde)
Deep- Well- Block, Low Profile 96	Ratiolab (Dreieich)
Gel- System, Mini- PROTEAN- Tetra- System	Bio- Rad (München)
ELISA Reader, Tecan Infinite M 200	Tecan (Crailsheim)
Gefrierschrank, -80 °C	Kryotek (Hamburg)
Gefrierschränke, -20 °C	Liebherr (Biberach a.d. Riss)
Kühlschränke	Liebherr (Biberach a.d. Riss)
Magnetrührer	Gerhardt (Königswinter)

Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettus, Accu-Jet® Pro	Brand (Wertheim)
Vortexer, Reax Top	Heidolph (Schwabach)
GENESIS Freedom 200	Tecan

2.2 ÄKTA-System

In dieser Arbeit wurde das System ÄKTApurifier™ 10 der Firma GE Healthcare (München) verwendet. Zur Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine wurde hierbei folgende Affinitätssäule verwendet:

HiTrap Chelating HP Ni₂₊, 5 ml Säulenvolumen (Firma GE- Healthcare)

2.3 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden analyserein von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

2.4 Medien

LB (Luria-Bertani) -Medium: 10 g/l Bacto Tryptone, 5 g/Bacto
Yeast extract, 10 g/l NaCl, pH 7,0

2.5 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit ddH₂O angesetzt und durch 15-minütiges Autoklavieren sterilisiert.

Allgemein:

HIS-Binding Buffer	20 mM	NaPo ₄	pH 7,4
	500 mM	NaCl	
	40 mM	Imidazol (Merck)	

PBS (20 x) <i>(phosphate buffered saline)</i>	159,54 g/l	NaCl	pH 7,4
	3,95 g/l	KCl	
	23,57 g/l	Na ₂ HPO ₄	
	7,21 g/l	KH ₂ PO ₄	

PBS-T	PBS
	0,05 % (v/v) Tween-20

BSA	Albumin bovine Fractio V, Serva (Heidelberg)	pH 7,0
------------	---	--------

SDS-PAGE:

NuPAGE® SDS-Puffer (20 x)	Invitrogen	(Karlsruhe)
--------------------------------------	------------	-------------

NuPAGE® LDS-Puffer (4 x)	Invitrogen	(Karlsruhe)
---------------------------------	------------	-------------

Coomassie-Färbung:

Coomassie Brilliant Blue	R250	Roth
---------------------------------	------	------

Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine:

HIS Binding Buffer	20 mM	NaPo ₄	pH 7,4
	500 mM	NaCl	
	40 mM	Imidazol (Merck)	

HIS Elution Buffer	20 mM	NaP o ₄	pH 7,4
	500 mM	NaCl	
	250 mM	Imidazol (Merck)	

ELISA:

Substratpuffer	0,1 M	Glycin	pH 10,4
	1 mM	MgCl ₂	
	1 mM	ZnCl ₂	

Substratlösung	1,45 mg/ml	Phosphatase
	Substrat (Sigma 4744)	
	Substratpuffer	

Tween 20-Waschpuffer:	Tween 20 in PBS; 0,5 % (vol/vol)
------------------------------	----------------------------------

2.6 Bakterienstämme

Tabelle 3:

Stamm	Referenz	
<i>E. coli</i> BL21AI pDEST6599	Christner	2010
Rekombinante Expression einer Embp-Subdomäne bestehend aus FIVAR und GA Domänen fusioniert mit einem His ₆ Tag.		

2.7 Antikörper

Tabelle 4:

Antikörper	Eigenschaften	Quelle
Anti-Kaninchen-IgG	Alkalische Phosphatase konjugiert	Sigma
Anti-Human-IgG	Alkalische Phosphatase konjugiert	Dianova
Polyvalentes Kaninchen anti- Embp6599-Antiserum	Antiserum gegen gereinigtes rEmbp6599	Christner 2010
Präimmunserum korrespondierend zu anti-rEmbp6599	Zum Anti-rEmbp6599-Antiserum korrespondierendes Präimmunserum	Christner 2010

2.8 Humane Serumproben

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 75 Patientenserumproben untersucht, die uns von Herrn Dr. Siemssen (ENDO-Klinik, Hamburg) zur Verfügung gestellt wurden. Alle Patienten wiesen mikrobiologisch gesicherte Infektionen nach Hüft- oder Kniegelenkersatz mit *S. aureus* oder *S. epidermidis* auf (45). Weiterhin wurden zur Kontrolle der erhaltenen Ergebnisse 29 Serumproben gesunder Blutspender untersucht, die vom Blutspendezentrum Hamburg Eppendorf zur Verfügung gestellt wurden. Zudem wurden 17 weitere Kontrollserumproben analysiert und mit den Werten der Patienten- wie auch Blutspenderkohorte verglichen. Sowohl Patienten als auch die untersuchten Personen der Kontrollgruppen hatten im Durchschnitt ein Lebensalter von 70 Jahren.

3 Methoden

3.1 Proteinexpression und His-Trap-Affinitätschromatographie

Um das Zielprotein rEmbp6599 aufzureinigen, wurden in dieser Arbeit im ersten Schritt die Methoden der Proteinexpression und His-Trap-Affinitätschromatographie angewandt. Hierzu wurden zur Herstellung einer Vorkultur zunächst 20 ml LB-Medium mit einer Kolonie des *E. coli* Stamms BL21AI (pDeST6599) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Hiermit wurde die Hauptkultur auf OD₆₀₀ 0,05 angeimpft und 100 mg/ml Ampicillin hinzugefügt. Es folgte eine erneute Inkubation bei 37°C und 200 rpm. Bei Erreichen einer A₆₀₀ von 0,3–0,4 wurde durch Zugabe von L-Arabinose die rEmbp6599 Expression induziert. Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C und 200 rpm wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C für 20 Minuten geerntet. Das hierbei entstandene Pellet wurde in 50 µl Binding Buffer pro ml Hauptkultur resuspendiert. Die suspendierten Bakterienzellen wurden in 14 ml Falcon Tubes überführt. Anschließend wurden die Bakterien durch Ultraschallbehandlung (vier mal zehn Sekunden, 70% Leistung) aufgeschlossen. Die Bakterienzelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm für 20 Minuten pelletiert und der so gewonnene Überstand durch einen Filter

(0,45 µm Porengröße) steril filtriert. Der so geklärte Überstand wurde für die weitere Proteinaufreinigung verwendet. Hierbei kam eine Affinitätschromatographie über immobilisierte Metallionen (IMAC, *immobilized metal affinity chromatography*) zur Anwendung. Diese beruht auf einer spezifischen Wechselwirkung zwischen dem HIS-Tag des rekombinanten Proteins und den Ni²⁺- bzw. Zn²⁺-Ionen, die sich auf der Oberfläche der Säulenmatrix befinden. Beim Auftragen eines Proteingemisches auf die Säule bindet hierbei der Imidazol-Ring des Histidins an die Matrix-Ionen, alle übrigen, nicht erwünschten Proteine werden jedoch aus der Säule ausgespült (*flow through*). Wichtig hierbei ist außerdem, dass im verwendeten Bindepuffer eine geringe Menge Imidazol vorhanden ist, sodass Metalloproteasen oder andere histidinhaltige Proteine, die mit der Matrix interagieren, jedoch kein HIS-Tag besitzen, von der Säule gespült werden können. Im nächsten Schritt wurde das an die Matrix gebundene Protein durch eine gezielte Veränderung der Pufferverhältnisse von der Säule eluiert. Es folgte die Vereinigung der das rEmbp6599-enthaltenden Proteinfractionen, die daraufhin über Amicon Ultra-15 Zentrifugenfilter (Millipore, Billerica, MA) aufkonzentriert und in PBS umgepuffert wurden. Das aufgereinigte rEmbp6599 wurde schließlich in 5 ml Aliquots bei -80°C gelagert.

3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur weiteren Untersuchung der im vorherigen Schritt durch die His-Trap-Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinfractionen des rEmbp6599 wurde in dieser Arbeit eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Diese beruht auf dem Prinzip der Auftrennung von Gemischen verschiedener Proteine in Abhängigkeit ihrer Molekulargröße. Die Proteinproben werden hierbei auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und in Anwesenheit des Detergenz SDS elektrophoretisch getrennt. Durch die SDS-Bindung erfolgt eine starke negative Ladung der Proteine, die somit im elektrischen Feld zum Pluspol wanderten. Das Polyacrylamidgel bewirkt dabei, dass kleine Proteine schneller wandern als große. Proteinfragmente trennen sich hierbei in Banden auf, die durch Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen erkennbar gemacht werden. Im ersten Schritt zum Aufbau

der Gelelektrophorese wurden zunächst Trenn- und Sammelgele angefertigt. Diese unterscheiden sich sowohl im Hinblick auf Ionenstärke, Porengröße als auch den pH-Wert. Im Verlauf dieser Arbeit wurden 10%-ige Trenngele gegossen, die Sammelgele wurden in 4%-iger Form hergestellt. Die Geldicke betrug 1 mm. Es folgte eine Versetzung der Proben mit 4 x LDS-Probenpuffer (N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz, Invitrogen, Karlsruhe), die anschließend bei 72°C für 10 Minuten denaturiert wurden. Danach wurden 24 µl des Gemisches auf das zuvor hergestellte Gel aufgetragen. Die Elektrophorese fand bei 150 V für 45 min statt, als Laufpuffer wurde der NuPAGE® MES SDS Running Buffer (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Im weiteren Verlauf erfolgte eine 15-minütige Anfärbung des SDS-Gels mit Coomassie-Brillant-Blau R-250. Diese Färbemethode dient der semi-quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration (46). Überschüssiger Farbstoff wurde hierbei mehrfach mit Entfärberlösung und anschließend mit ddH₂O gewaschen. Abschließend wurde das Gel auf Filterpapier aufgetragen und im Gelrockner getrocknet.

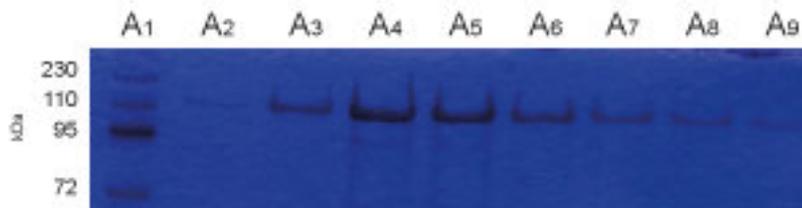


Abbildung 3: Analyse der Elutionsfraktionen nach His-Trap-Aufreinigung von rEmbp6599 mittels SDS-PAGE. Nach Anfärbung des SDS-Gels mit Coomassie-Brillant-Blau R-250 stellten sich die Proteinfractionen A4, A5 und A6 deutlich mit einer Bande bei ca. 110 kDa dar.

3.3 ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay)

Ziel der Arbeit war es, durch einen neu zu entwickelnden ELISA spezifische Anti-rEmbp6599-Antikörper nachzuweisen und somit in kulturell bestätigten Seren von Patienten mit Hüft- bzw. Knieendoprotheseninfektion eine *S. epidermidis*- Infektion feststellen zu können. Bei einem ELISA handelt es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Hierbei wird die zu bestimmende Substanz zunächst auf eine Mikrotiterplatte immobilisiert. Es folgt die Inkubation mit einem spezifischen Antikörper. Anschließend wird ein zweiter Antikörper aufgetragen, der zusätzlich an ein Indikatorenzym gekoppelt ist. Abschließend kann nach der Entfernung überschüssiger Reagenzien die gebundene Enzymmenge durch eine Enzymreaktion nachgewiesen werden. Dabei ist die Menge gebundener, spezifischer Antikörper direkt proportional zur gemessenen Absorption.

3.3.1 Durchführung des ELISA

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (Firma Nunc) wurde zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen des in der Proteinexpression gewonnenen Proteins rEmbp6599 beschichtet. Hierzu wurden zunächst geometrische Verdünnungsreihen erstellt, um diejenige Proteinkonzentration zu ermitteln, die zu einer Sättigung der Oberfläche führt. Unterschiedliche Konzentrationen des Proteins rEmbp6599 wurden in PBS gelöst und jeweils 100 µl dieses Gemisches auf die zu beladende Mikrotiterplatte aufgebracht. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Platte ausgeschlagen und dreimal mit PBS- T gewaschen. Anschließend erfolgte das einstündige Blocken mit BSA bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurde die Platte wiederum dreimal mit PBS-T gewaschen und jeweils 100 µl eines PBS-T-Antikörper-Gemisches (3ml PBS-T plus 3 µl des anti-rEmbp6599 Antiserums) in die Vertiefungen B2-B11 und C2-C11 einpipettiert. Die Vertiefungen D2-D11 und E2-E11 wurden zur Negativkontrolle mit einem Präimmunserum beschickt. Es folgte eine erneute Inkubation der Platte bei Raumtemperatur für eine Stunde. Anschließend wurden

je 100 µl alkalische Phosphatase konjugierte anti-Kaninchen-IgG (1:10000 in PBS-T) in die zuvor genutzten Vertiefungen zugegeben. Die Platte wurde nun für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte stets das dreimalige Waschen mit PBS-T. Schließlich wurde 100 µl Substratpuffer pro Vertiefung einpipetiert und die Platte bei 37°C inkubiert. Alle 30 Minuten erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm.

3.3.2 ELISA mit Unterstützung des GENESIS Freedom 200

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde nach Etablierung des ELISA mit den von Hand durchgeführten Verdünnungsreihen auf die maschinelle Bearbeitung durch den Pipetierroboter GENESIS Freedom 200 (Tecan) zurückgegriffen. Die oben erwähnten Arbeitsschritte wurden hierbei übernommen. Im Wesentlichen wurde bei der automatisierten Abarbeitung des ELISA dem oben beschriebenen, manuellen Protokoll gefolgt. Nach Beschickung der Mikrotiterplatten mit rEmbp6599 und Inkubation über Nacht wurden diese auf das Arbeitsfeld des GENESIS Freedom 200 überführt. Es folgte die Bestückung der Platten mit Präimmunserum sowie anti-rEmbp6599, die in einer Verdünnung von 1:512 eingesetzt wurden. Die nun verwendeten Patientenseren wurden in einem Verhältnis von 1:64 in P-BST gelöst und bei Raumtemperatur vom Roboterarm aufgetragen. Hierfür wurden Deep-Well-Block-Platten (Ratiolab) mit den benötigten Gemisch-Verdünnungen vorbereitet. Auch das Anfertigen der Verdünnungsreihen wurde in diesen Schritten maschinell durchgeführt. Gleiches gilt für das Zuführen des PBS-T/Anti-Rabbit-IgG-Gemisches, das in einem Verhältnis von 1:10000 in PBS-T gelöst vorlag. Das Auswaschen der Platten zwischen den einzelnen Beimpfungsschritten erfolgte per Hand. Es folgte die Zugabe von Substrat und Substratlösung mit anschließender Inkubation und photometrischer Messung der Absorption wie oben beschrieben.

3.4 Messung von anti-Embp-IgG in Patienten- und Blutspenderseren

Eine Kooperation mit der ENDO- Klinik Hamburg ermöglichte die Untersuchung von 75 Seren, die im Zeitraum von 2001–2004 bei Patienten mit Knie- oder Hüftendoprotheseninfektion in der ENDO-Klinik Hamburg behandelt wurden. Mit dem zuvor etablierten ELISA sollte nun das Auftreten und gegebenenfalls die Titerhöhe von anti-Embp-IgG in diesen Patientenseren ermittelt werden. Serologische Verlaufskontrollen des Patientenmaterials waren zuvor nicht möglich, da von jedem Patienten jeweils nur zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Seren gewonnen wurden. Dies bedingt den Ausfall klassischer Kriterien zur serologischen Diagnose einer aktiven Infektion, wie etwa signifikante Titeranstiege oder –abfälle. Als Kontrollgruppe wurden Seren von 29 Blutspendern verwendet, die vom Blutspendedienst des UKE zur Verfügung gestellt wurden. Weiterhin wurden 17 zusätzliche Kontrollseren zur Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse untersucht. Die Seren dieser Gruppen stammen aus einem Patientenkollektiv ohne nachgewiesene Endoprotheseninfektion mit durchschnittlichem Lebensalter von etwa 70 Jahren. Die ELISA- Signale dieser drei Kohorten sollten im Verlauf mit denen der Patienten mit gesicherter Endoprothesen- Infektion verglichen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Rekombinante Expression der Embp-Subdomäne rEmbp6599

Ziel dieser Arbeit war es, einen ELISA zur spezifischen Detektion von anti-rEmbp-Antikörpern zu etablieren. Im weiteren Verlauf sollten diese anti-rEmbp-Antikörper-Titer in Seren von Patienten mit kulturell bestätigten *S. epidermidis*-Infektionen nach Gelenkersatz bestimmt werden. In diesem Zusammenhang erfolgte zunächst die rekombinante Expression einer spezifischen Embp Subdomäne in *E. coli* (rEmbp6599;41) und deren Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie. Die Expression fand wie in Kapitel 3.1 beschrieben statt. Die anschließende Aufreinigung wurde mittels HiTrap Chelating Säulen durchgeführt. Das Elutionsprofil zeigte nach der Injektion von 5 ml *E. coli*-Zelllysate einen Peak, der sich über ein Volumen von etwa 20 ml erstreckte. Dieser als flow through (ft) bezeichnete Bereich enthielt alle nicht an die Säulenmatrix gebundenen Proteine. Nachdem durch Spülen mit PBS alle nur unspezifisch an die Säulenmatrix gebundenen Proteine ausgewaschen worden waren, erfolgte

durch Erhöhung der Konzentration des verwendeten Elutionspuffers auf 100% die Elution des über sein His-Tag an die Säule gebundenen rEmbp6599. Durch Zusammenführung der rEmbp6599 enthaltenden Fraktionen konnte in einer Aufreinigung etwa 4 ml gereinigtes rEmbp6599 gewonnen werden.

4.2 Analyse des gereinigten Proteins rEmbp6599 mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur weiteren Untersuchung des durch Proteinexpression gewonnenen rEmbp6599 erfolgte die Untersuchung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Versuchsdurchführung gestaltete sich wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Nach Anfärbung des SDS-Gels mit Coomassie-Brillant-Blau R-250 stellten sich die in den Fraktionen A4, A5 und A6 eine kräftige Bande von etwa 110 kDa dar. Es konnten keine relevanten ko-eluierten, kontaminierenden Proteine nachgewiesen werden. Somit wurden die Fraktionen vereinigt und zur Beschichtung der ELISA-Platten verwendet.

4.3 ELISA

Um das Ziel, einen ELISA zum Nachweis von anti-rEmbp-IgG aufzubauen, zu erreichen, sollte zunächst die optimale Konzentration des Proteins rEmbp6599 für die Beschichtung eines Mikrotiternapfes ermittelt werden. In diesem Zusammenhang wurde weiterhin untersucht, inwiefern es dem ELISA gelingen konnte, zwischen Seren mit und ohne anti-rEmbp-IgG zu unterscheiden. Hierzu wurde rEmbp6599 auf eine Maxisorpplatte aufgetragen und ein ELISA, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde ein spezifisches, durch Immunisierung mit rEmbp6599 erzeugtes Kaninchenserum verwendet, um auf der Oberfläche gebundenes rEmbp6599 darzustellen. Als Negativkontrolle wurde das zum anti-rEmbp6599 korrespondierende Präimmenserum verwendet. Der Cut-Off zur Unterscheidung eines positiven und eines negativen Signals wurde hierbei auf einen Wert von 0,3 bei einem Absorbationswert A 405 nm (Referenzwellenlänge A 492 nm) festgelegt. Die rEmbp6599 Lösung wurde in PBS auf eine Konzentration

von 100 µg/ml eingestellt. Mit 100 µl dieser wurde die Maxisorpplatte beladen und so rEmbp6599 auf der Oberfläche passiv immobilisiert. Sowohl das anti-rEmbp6599-Antiserum als auch das Präimmunserum wurden zunächst 1:200 verdünnt eingesetzt und gebundene IgG durch einen anti-Kaninchen-IgG dargestellt. Es zeigte sich, dass das ELISA-Signal der mit Präimmunserum beschickten Mikrotiternäpfchen unter 0,3 lag, also als negativ betrachtet werden konnte (Abbildung 4). Bei Verwendung des anti-rEmbp6599 Antiserums hingegen wurde eine Absorption größer 2,5 aufgezeichnet. Daher wurde, um die niedrigste zur Beschickung der ELISA-Platte notwendige rEmbp6599 Konzentration zu ermitteln, die rEmbp6599 Lösung weiter verdünnt und Maxisorpplatten mit diesen Verdünnungen beschickt. Bei dem Nachweis des hierbei immobilisiertem rEmbp6599 zeigte sich, dass es ab einer Konzentration von 50 µg/ml rEmbp6599 zu einem Konzentrationsabhängigen Abfall des ELISA-Signals kam (Abbildung 4). Aus diesem Grund wurde in den weiteren Versuchen eine rEmbp6599 Lösung mit einer Konzentration von 50 µg/ml zur Beschichtung der ELISA-Platten eingesetzt.

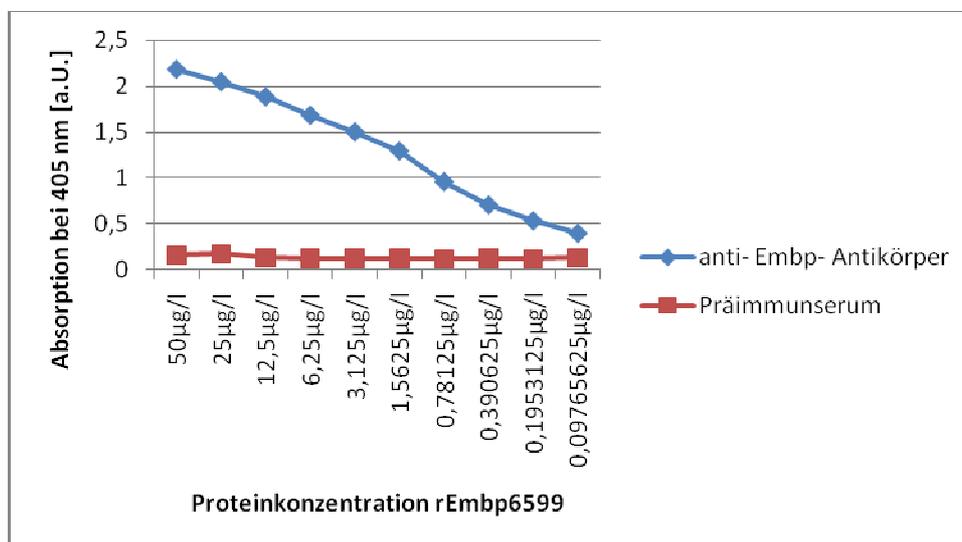


Abbildung 4: Untersuchung der Bindung des Proteins rEmbp6599 an eine Mikrotiter-Oberfläche (Nunclon). Hierbei konnte bei einer konstanten Verdünnung des anti-rEmbp6599 Antiserums sowie des korrespondierenden Präimmunserums ein Zusammenhang zwischen der Stärke des ELISA-Signals und der Konzentration der zur Beschichtung der ELISA-Platte eingesetzten rEmbp6599 Lösung beobachtet werden. Es handelt sich bei den angegebenen Datenpunkten um Mittelwerte aus vier Messreihen gleicher Proteinverdünnung (50 µg/ml).

4.4 Nachweis von anti-Embp-IgG in Patientenseren

75 Patientenseren mit positivem Befund auf Endoprotheseninfektion wurden mit Hilfe des zuvor etablierten ELISA auf anti-Embp-IgG untersucht. Alle Seren wiesen hierbei Antikörper gegen Embp auf (Abbildung 5). Auffällig war, dass bei einer mittleren Titerhöhe von 1:2243 (Median 1:512) die Titerhöhen in einzelnen Seren mit Werten zwischen 1:64 und 1:8192 sehr breit gestreut waren (Tabelle 5, Abbildung 5).

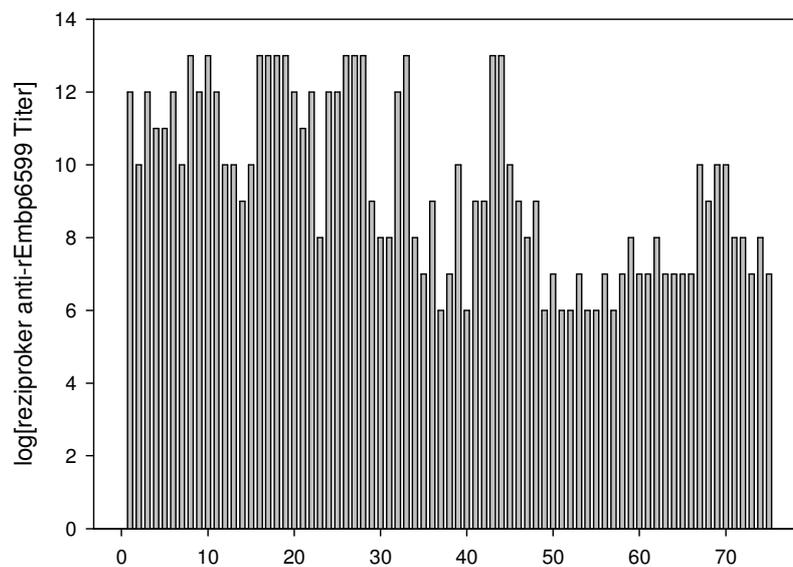


Abbildung 5: Nachweis von anti-rEmbp6599-IgG. In allen Patientenseren konnten Antikörper gegen das gereinigte Protein rEmbp6599 nachgewiesen werden. Die Balken repräsentieren die anti-rEmbp6599 Titerhöhe in individuellen Patientenseren.

Tabelle 5: Mittelwert, Median und Standardabweichung des erhobenen anti-Embp-IgG in 75 Patientenseren

Patienten

n= 75

Mittelwert	2242,56
------------	---------

Median	512
--------	-----

Standardabweichung	2959,65
--------------------	---------

4.5 Nachweis von anti-Embp-IgG in Blutpenderseren

Auch im Kollektiv der Blutpenderseren konnte in allen Fällen anti-Embp-IgG nachgewiesen werden (Abbildung 6). In dieser Versuchsreihe lag die mittlere Titerhöhe bei 1:2242 (Median 1:1024) (Tabelle 6). Jedoch zeigte sich auch hier eine breite Streuung der Titerhöhen der einzelnen Spenderseren mit Werten zwischen 1:64 und 1:16384 (Abbildung 6).

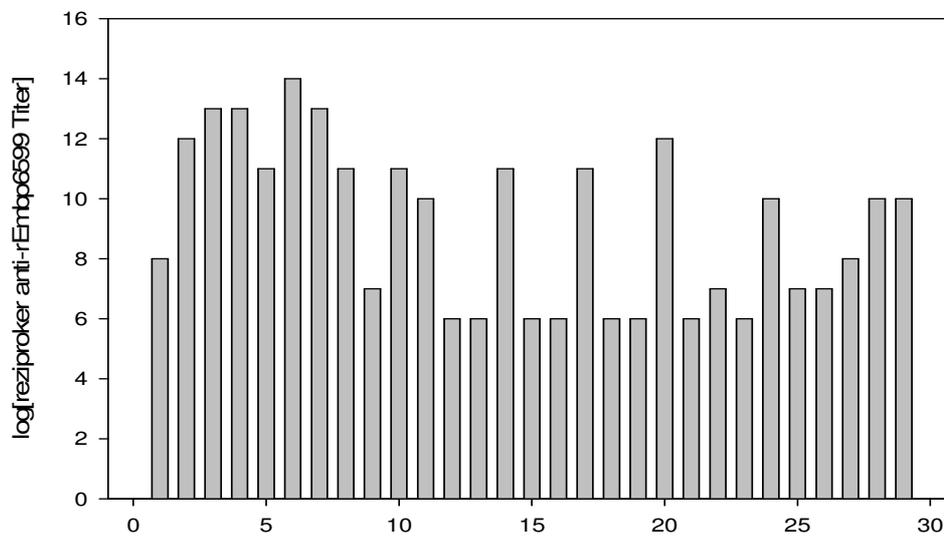


Abbildung 6: Nachweis von anti-rEmbp6599-IgG in 29 Blutpenderseren. Wie auch bei den zuvor untersuchten Patientenseren zeigte sich eine breite Streuung in der Höhe der Antikörpertiter. Die Balken repräsentieren die anti-rEmbp6599 Titerhöhe in individuellen Seren.

Tabelle 6: Mittelwert, Median und Standardabweichung des erhobenen anti-Embp-IgG in 29 Blutpenderseren

Blutspender

n= 29

Mittelwert	2242,21
Median	1024
Standardabweichung	3521,14

4.6 Nachweis von anti-rEmbp-IgG in Seren alter Patienten ohne Endoprotheseninfektion

Bei allen untersuchten Seren dieser Gruppe konnte anti-Embp-IgG nachgewiesen werden (Abbildung 7). Die mittlere Titerhöhe betrug 1:594 (Median 1:384), die Standardabweichung lag bei einem Wert von 1:590 (Tabelle 7). Die im Gegensatz zu Patienten- und Blutspenderseren sowohl deutlich geringere Varianz als auch absolute Höhe der gemessenen Titer (1:64–1:2048) lässt sich hierbei durch die kleinere Probenzahl erklären.

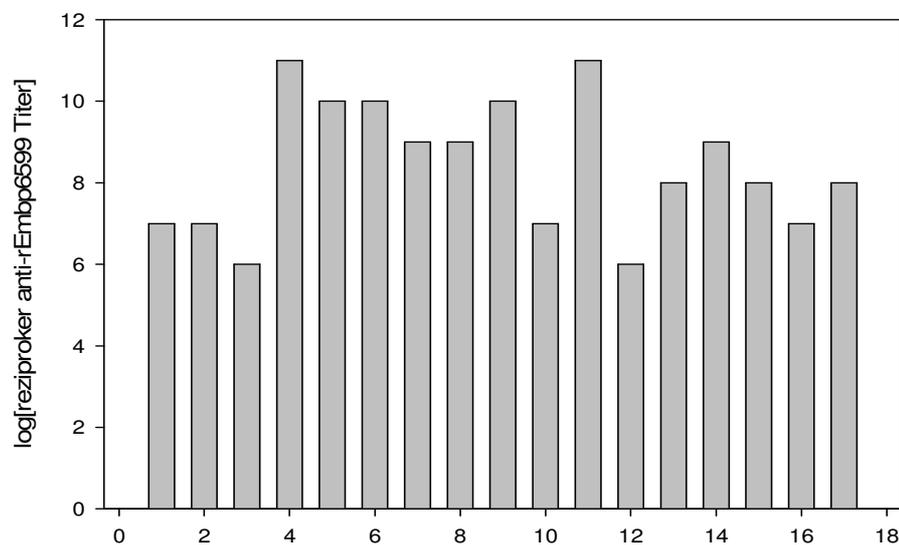


Abbildung 7: Messung von anti-rEmbp6599-IgG bei 17 Kontrollseren. Alle Seren dieses Kollektivs wiesen Antikörper auf. Die Balken repräsentieren die anti-rEmbp6599 Titerhöhe in individuellen Seren.

Tabelle 7: Mittelwert, Median und Standardabweichung des erhobenen anti-rEmbp-IgG in 17 Kontrollseren

Kontrollseren

n= 17

Mittelwert	594,82
Median	384
Standardabweichung	590,2

Da sowohl in sämtlichen Patienten- als auch Kontrollseren anti-Embp-IgG nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass *S. epidermidis* tatsächlich Embp *in vivo* bildet. Bei einem näheren Vergleich der Titer dieser Gruppen konnte allerdings festgestellt werden, dass die Patientenseren im Mittel keine statistisch signifikant ($p > 0,001$, T-Test) höheren Antikörpertiter aufwiesen als die Seren der gesunden Kontrollgruppen.

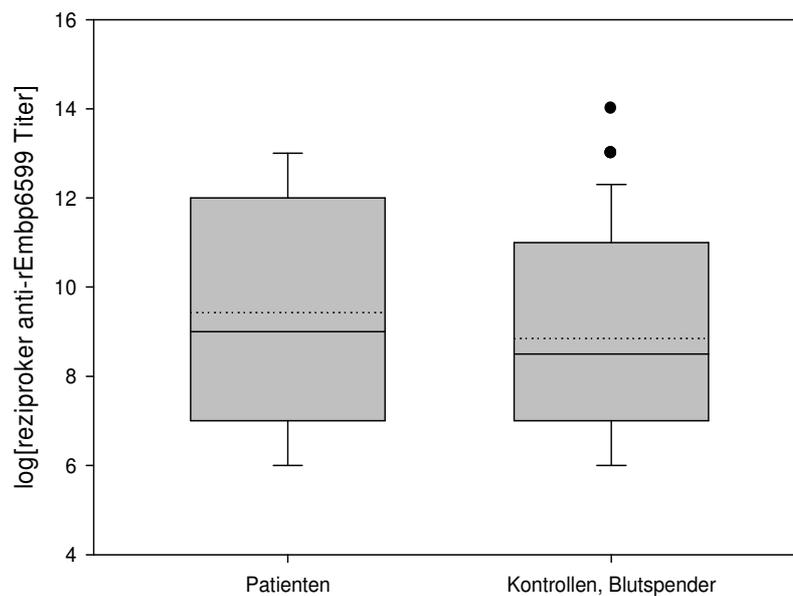


Abbildung 8: Dargestellt ist die Verteilung der anti-Embp-IgG-Titer von Patienten- und Kontrollgruppenseren im Boxed-Plot. Die Boxen werden hierbei durch das 25%- und 75%-Quantil begrenzt. Innerhalb der Box erfolgt die Darstellung des Median als durchgezogene und die des Mittelwertes als gestrichelte Linie. Die waagerechten Markierungen ober- und unterhalb der Boxen legen das 10%- und das 90%-Quantil fest. Extremwerte, die außerhalb dieses Bereiches liegen, sind als separate Punkte dargestellt. Zwischen Patientenseren und dem Kontrollgruppenkollektiv konnte hierbei kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,2$) bezüglich der Höhe der anti-rEmbp-IgG-Titer nachgewiesen werden.

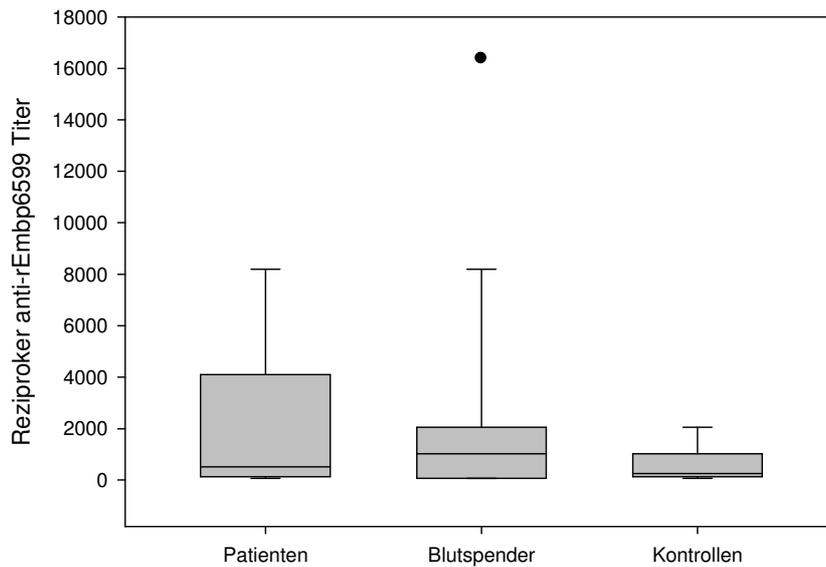


Abbildung 9: Anti-rEmbp6599-IgG-Titer von Blutspendern und Kontrollseren ohne Endoprotheseninfektion wurden mit Titern bei Patienten mit Endoprothesen verglichen. Alle Gruppen wiesen Antikörpertiter auf. Patienten- und Blutspenderseren stellten sich hierbei mit einem vergleichbaren Medianwert dar. Auch in diesem Vergleich zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Höhe der anti- rEmbp6599-IgG-Titer.

Auch bei der isolierten Betrachtung des Patientenkollektivs in Abhängigkeit der Erregerspezies ließ sich dieses Ergebnis bestätigen. Patienten mit nachgewiesener *S. epidermidis*- Infektion wiesen keine signifikante höheren anti-rEmbp6599-IgG-Titer auf als Patienten mit Endoprotheseninfektionen durch andere Staphylokokken-Spezies ($p=0,031$, T-Test). Hierbei zeigte sich sogar, dass Patienten mit *S. aureus* induzierten Infektionen einen im Durchschnitt höheren Titerwert aufwiesen, als solche mit einer *S. epidermidis*- Infektion. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Diagnose einer *S. epidermidis* verursachten Fremdmaterialassoziierten Infektion mittels Nachweises von anti-rEmbp-IgG nicht geeignet erscheint.

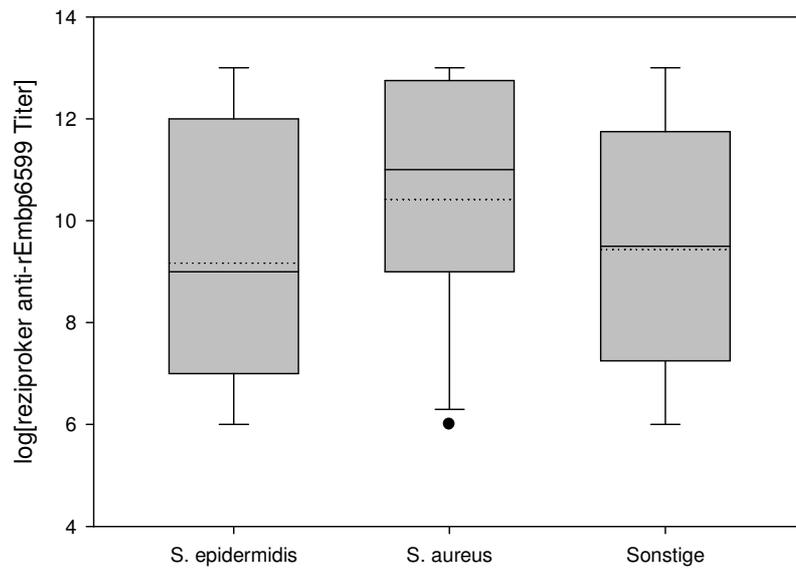


Abbildung 10: Darstellung der anti-rEmbp6599-IgG-Titer im Patientenkollektiv, unterteilt nach Infektionen mit *S. epidermidis*, *S. aureus* sowie aller anderen Staphylokokkenspezies (*S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. caprae*). Diejenigen Patienten mit *S. epidermidis*-Infektion wiesen hierbei keinen statistisch signifikant höheren Titer ($p=0,031$) auf als der Rest dieser Gruppe.

5. Diskussion

In der modernen Medizin wird der Einsatz implantierbarer Fremdmaterialien kontinuierlich bedeutender (47). Hierbei spielen neben solchen Materialien, die nur über kurze Zeiträume in den Patienten eingebracht werden, gerade derartige Implantate eine Rolle, die dauerhaft, zum Teil viele Jahre, Organfunktionen ersetzen. Hierzu gehören insbesondere Endoprothesen, die zum Ersatz von Gelenken im Patienten angewendet werden (48). Der Einsatz eines Fremdmaterials setzt den Patienten jedoch einem nicht unerheblichen Risiko aus. Hierbei ist das Auftreten einer Infektion sicher als eine der schwerwiegendsten Komplikationen zu betrachten (49). Gleichwohl Infektionen einer Endoprothese einer spezifischen und komplexen Therapie bedürfen, so können diese klinisch nur schwer von anderen Fehlfunktionen des Implantats, vor allem der aseptischen Lockerung, unterschieden werden (49). Die mikrobiologisch-kulturelle Diagnostik wird vor allem dadurch erschwert, dass Endoprotheseninfektionen in der überwiegenden Zahl der Fälle durch kommensale Bakterien der Haut hervorgerufen werden und daher Kontaminationen der Proben im Rahmen ihrer Gewinnung nicht oder nur schwer von klinisch signifikanten Isolaten unterschieden werden können (2). Des Weiteren besitzen kommensale Bakterien wie *S. epidermidis* nur ein niedriges pathogenes Potential, das sich im spezifischen Kontext einer Endoprotheseninfektion in einer nur schwachen entzündlichen Aktivität äußert. Folglich ist es im Alltag häufig schwer Infektionen eindeutig anhand klinischer Merkmale oder entzündungsspezifischer Laborparameter zu diagnostizieren. Hierzu sind derzeit in der Regel invasive Maßnahmen mit dem Ziel eines Erregernachweises notwendig. Um dem Patienten diese selbst nicht komplikationslose und zudem nur mäßig sensitive Methode zu ersparen, ergibt sich die Forderung nach der Identifikation von serologischen Surrogatmarkern, die sich im Serum des Patienten nachweisen lassen. Besonders attraktiv erscheint hierbei der Nachweis von spezifischen Antikörpern, da hierdurch nicht nur die Diagnose einer Infektion, sondern gleichzeitig auch die mikrobiologische Diagnose gelingen kann. Wesentliches Ziel der Erforschung der molekularen Pathogenese von Fremdmaterial-assoziierten Infektionen ist daher auch die Identifikation neuer putativer Marker zur Optimierung der Diagnostik.

Fremdmaterial-assoziierte Infektionen werden meistens durch Koagulase-negative Staphylokokken, vor allem *Staphylococcus epidermidis*, hervorgerufen. Die Pathogenität von *S. epidermidis* beruht auf der Fähigkeit, auf der Oberfläche von Implantaten Biofilme auszubilden (50,51). Die Bildung dieses mehrschichtigen Biofilms kann hierbei in drei Schritte unterteilt werden. Zunächst erfolgt die primäre Anheftung an die jeweilige Polymeroberfläche. Anschließend kommt es zur Akkumulation und damit zur eigentlichen Anordnung einer Biofilmmatrix. In einem letzten Schritt folgt die Ablösung einzelner Bakterien mit Kolonisation weiterer Oberflächen und damit der erneuten Bildung eines Biofilms (22). Die mit der Biofilmbildung verbundenen Vorteile *S. epidermidis* wie der erhöhten Resistenz gegenüber Antibiotika (25) und des Schutzes vor der angeborenen wie auch der adaptativen Immunantwort (21,22) führen bei Infektion einer Endoprothese in letzter Konsequenz zumeist zur Entfernung selbigen Implantats (13). Ein wesentlicher Pathogenitätsfaktor, der im Rahmen von *S. epidermidis*-assoziierten Fremdkörperinfektion Relevanz besitzt, ist das *extracellular matrix binding protein* Embp. Embp ist an der akkumulativen Phase der *S. epidermidis* Biofilmbildung beteiligt und in invasiven Populationen weit verbreitet (41,44,50,52). Weiterhin stellt dieses Protein mit einer Größe von 1 MDa das größte *S. epidermidis*-eigene Protein dar. Vergleichbare Riesenproteine vermitteln innerhalb anderer humanpathogener Erreger meist Bindungsprozesse oder scheinen für hämolytische Aktivitäten verantwortlich zu sein (53). So wurde beispielsweise eine Fibronectin-bindende Wirkung des Homologs Ebh von *S. aureus* ermittelt, die auch in dem in *S. epidermidis* auftretende Embp nachgewiesen werden konnte (54). Weiterhin stellt sich Embp als saures und hydrophiles Protein dar. Die damit verbundene Fähigkeit, eine Adhäsion von Kationen und Wasser zu ermöglichen, vermittelt somit einen entscheidenden Aspekt des pathogenen Wirkmechanismus der *S. epidermidis* Biofilmbildung (22,55). Zudem lässt auch der strukturelle Aufbau von Embp auf dessen Relevanz während der akkumulativen Phase schließen. Weitestgehend treten hierbei FIVAR- und GA-Domänen auf. In diesem Kontext gelang es Christner *et al.* durch Zugabe eines aus FIVAR- und GA-Domänen bestehenden rekombinant exprimierten Embp-Fragments die Induktion eines biofilmpositiven Phänotyps in

zuvor biofilmbegleitenden *S. epidermidis* Wildtypstämmen zu erzielen. Beim Einsatz lediglich aus FIVAR-Domänen bestehender rekombinanter Embp-Fragmente kam es dagegen nicht zur Ausbildung eines Biofilms (41). Dies lässt darauf schließen, dass das simultane Auftreten beider Domänen für die Entwicklung eines Biofilms notwendig ist. Embp erscheint zusammenfassend daher als geeigneter Faktor zur Untersuchung molekularer Prozesse im Rahmen des Auftretens des *S. epidermidis*-Biofilms. Weiterführend ergäbe dies die Möglichkeit der Etablierung neuer Methoden, die diesen Erreger als auslösenden Keim einer Endoprotheseninfektion nachweisbar machen. In diesem Zusammenhang erfolgte in dieser Arbeit zunächst die rekombinante Expression einer spezifischen Embp Subdomäne in *E. coli* (41) und deren Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie. Im weiteren Verlauf wurde ein ELISA etabliert, der sowohl Prävalenz als auch Titerhöhen von anti-Embp-IgG in Seren von Patienten mit *S. epidermidis* Endoprotheseninfektionen aufzeigen sollte. Die hierbei erzielten Ergebnisse wurden mit den Resultaten der Messungen zweier Kontrollgruppen verglichen. Ziel der Arbeit war es hierbei, das nachgewiesene anti-Embp-IgG als möglichen Marker zu etablieren, dessen Nachweis im Serum schnell und sicher eine Endoprotheseninfektion mit *S. epidermidis* aufzeigen beziehungsweise ausschließen lässt. Bei der Versuchsauswertung konnte in sämtlichen untersuchten Seren dieses Patientenkollektives anti-Embp-IgG nachgewiesen werden, jedoch stellten sich die erfassten Titerhöhen breit gestreut dar. Diese Ergebnisse ließen zunächst darauf schließen, dass die Embp-Synthese tatsächlich *in vivo* erfolgt, der Nachweis dieser spezifischen anti-Embp-IgG also als indirekter Hinweis auf eine Embp-Synthese zu interpretieren ist. Interessanterweise konnte im weiteren Vergleich auch in allen mittels ELISA untersuchten Proben des Kontrollkollektives aus Blutspendern sowie in einer weiteren Kontrollgruppe aus Patienten ohne Endoprotheseninfektion anti-Embp-IgG nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich eine breite Streuung der Titerhöhen. Weitere Auswertungen zeigten zudem, dass im Mittel keine statistisch signifikant höheren anti-Embp-IgG-Titer der *Staphylokokken*-positiven Kohorte zu den untersuchten Kontrollkollektiven nachgewiesen werden konnten ($p > 0,001$, T-Test). Dies lässt Embp in diesen Versuchen zusammenfassend als ungeeignet

und zu wenig spezifisch für den Nachweis einer *S. epidermidis* verursachten fremdmaterialassoziierten Infektion erscheinen. Im Kontext der Biofilmbildung wird Embp bislang vor allem eine Rolle in der akkumulativen Phase der Biofilmbildung von *S. epidermidis* zugewiesen. Da jedoch im Laufe dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass auch beide Kontrollgruppen ohne mikrobiologisch gesicherte Infektionen mit *S. epidermidis* anti-Embp-IgG synthetisieren, scheint dieses nicht nur spezifisch bei dem Aufbau dieser mehrschichtigen Bakterienzellorganisationen aufzutreten. Vielmehr lassen die erzielten Ergebnisse darauf schließen, dass Embp dauerhaft und auch in apathogenen Stämmen von *S. epidermidis* gebildet wird. Für das weitere Verständnis der Genexpression in *S. epidermidis* spielt zudem die Tatsache, dass es sich bei Embp um ein *in vivo* nicht aber *in vitro* exprimierbares Protein handelt eine entscheidende Rolle. Christner *et al.* konnten 2009 anhand von Untersuchungen an dem Embp-positiven *S. epidermidis*-Wildtyp 1585 nachweisen, dass dessen *in vitro* Kultivierung eine deutliche Reduzierung der Embp-Expression nach sich zog (41). Ähnliche Ergebnisse wurden zudem anhand von *S. epidermidis* 1457 sowie 20 weiteren, infektionsverursachenden Embp-positiven Stämmen erzielt, bei denen die *in vitro* Kultivierung eine generell verminderte Embp-Expression aufwies (Rohde, nicht publizierte Daten). Diese Ergebnisse zeigen zudem eine mögliche Erklärung für die Schwierigkeit Embp als an der Biofilmbildung beteiligtes interzelluläres Adhäsins zu identifizieren. Zudem stellte sich die Zugabe eines Immunsersums als entscheidender Faktor heraus, der zur Ausbildung der Embp-Expression führte (56). Die Hypothese einer solchen *in vivo* Situation wird zudem durch Versuche mit dem *S. epidermidis*-Protein Fbe unterstrichen. Es handelt sich hierbei um ein weiteres Adhäsionsmolekül, das sich für Bindungen an Fibronectin, Fibrinogen und Collagen verantwortlich zeigt (56). Wie auch Embp zeigte sich dieses Oberflächenprotein lediglich in Anwesenheit von Immunsereen exprimierbar (57). Ein weiterer wesentlicher Faktor, der die Entstehung von *S. epidermidis* Biofilmen unterstützt, ist das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsins PIA. In diesem Kontext gelang es Mack *et al.* einen direkten Zusammenhang zwischen PIA-Produktion und Biofilmbildung in *S. epidermidis*-Stämmen nachzuweisen (36). Weiterhin stellte sich in verschiedenen

Tiermodellen zu Fremdmaterialinfektion die Produktion von PIA als eine für die *S. epidermidis*-assoziierte Infektion notwendige Voraussetzung dar (58,59). Aus früheren Untersuchungen stellte sich bei *S. epidermidis*- Infektionen das breite Auftreten von PIA heraus, sodass über einen auf PIA-Basis bestehenden Impfstoff gegen *S. epidermidis* diskutiert wurde (23,60). Im Tierversuch zeigten sich jedoch im Zusammenhang mit fremdkörperassoziierten *S. epidermidis*-Infektionen widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des *in vivo* Auftretens von PIA (61). Weitere Studien belegten, dass der PIA-assoziierte *icaADBC* lediglich in einer Prävalenz von 50% in durch klinisch signifikante *S. epidermidis*-Stämme ausgelösten Endoprotheseninfektionen auftrat (62,63). Daraus lässt sich ableiten, dass sowohl PIA als auch sein Transkriptionsort keine notwendigen Voraussetzungen für das Auftreten von *S. epidermidis*-vermittelten Fremdkörperinfektionen darstellen. Als weiterer Ansatzpunkt zur Identifikation infektionsassoziiierter *S. epidermidis*-Pathogenitätsfaktoren untersuchten Rohde *et al.* die Domäne-B-vermittelte Biofilmbildung durch das Akkumulations-assoziierte Protein (Aap) (37,38). Dieses stellt neben PIA eine weitere Komponente dar, die an den Mechanismen der akkumulativen Phase der *S. epidermidis*-Biofilmbildung beteiligt zu sein scheint. Hierbei zeigte sich durch die Zugabe einer rekombinanten Domäne-B eine 90%-ige Inhibierung der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 5179-R1 (37). Zudem ließ sich bei klinischen *S. epidermidis* Isolaten, die einen PIA-unabhängigen Biofilm ausbildeten, eine Inhibierung der Biofilmbildung durch Aap-Domäne-B-spezifische Antikörper nachweisen (37). Aap stellt somit vermutlich einen PIA-unabhängigen Faktor dar, der maßgeblich an der *S. epidermidis*-Biofilmbildung beteiligt ist (37). Trotzdem lässt sich auch bei Aap- negativen *S. epidermidis*-Stämmen auf Biofilmbildung beruhende Infektionen von Endoprothesen beobachten, sodass die Darstellung weiterer, an der Biofilmbildung beteiligter Proteine notwendig zu sein scheint. Insgesamt scheinen somit eine große Anzahl weiterer Faktoren an der Entstehung bakterieller Biofilme beteiligt zu sein. Die für Embp vermutlich gegebene und auch in dieser Arbeit beobachtete *in vivo* Situation unterstreicht daher, dass es momentan noch an wesentlichen Kenntnissen der Genexpression bei endoprothesenassoziierten Infektionen mangelt. In diesem Zusammenhang ergibt

sich demnach die Notwendigkeit für die Identifikation weiterer Zielstrukturen, die vor allem auch die Analyse der differentiellen Genexpression bei Kolonisation und Infektion ermöglicht. Ein dadurch vertieftes Verständnis der molekularen Prozesse in Bezug auf Embp im Speziellen und *S. epidermidis* im Allgemeinen lassen große Fortschritte bezüglich Therapie aber auch Prävention endoprothesenassoziierter Infektionen erwarten.

6 Zusammenfassung

Die Nutzung von Fremdkörperimplantaten spielt im Bereich der modernen Medizin eine immer wichtigere Rolle. Speziell Endoprothesen sind im Rahmen des künstlichen Gelenkersatzes zu einem grundlegenden Bestandteil der Patientenversorgung geworden. Parallel zu deren vermehrter Verwendung steigt jedoch auch die Anzahl postoperativer Endoprotheseninfektionen; sowohl Morbidität als auch Mortalität sind bei betroffenen Patienten deutlich erhöht. Verantwortlich für eine solche Infektion zeigt sich in diesem Zusammenhang insbesondere der ubiquitär beim Menschen auftretende Keim *S. epidermidis*. Dieser zeichnet sich vor Allem durch seine Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen aus. Diese mehrschichtige Bakterienzellorganisationen begünstige die Anheftung an Polymeroberflächen von Fremdmaterial entscheidend. Der definitive Nachweis einer explizit von *S. epidermidis* verursachten Infektion gestaltet sich jedoch vor dem Hintergrund häufiger Kontamination mit diesem Hautkeim als schwierig. Ziel der Mikrobiologie ist es daher, geeignete Methoden zu etablieren, die einen definitiven Erregernachweis ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dabei das extrazellulär-matrixbindenden Protein Embp untersucht, das die Bindung von *S. epidermidis* an Fibronectin vermittelt und an der akkumulativen Phase der *S. epidermidis* Biofilmbildung beteiligt ist. Vor diesem Hintergrund sollte auf einem rekombinat exprimierten Embp-Fragment basierendes ELISA-System zum Nachweis von anti-Embp Antikörpern aufgebaut werden. Anschließend erfolgte die Untersuchung von Prävalenz und Titerhöhen von anti-Embp-IgG in Seren von Patienten mit *S. epidermidis* und *S. aureus* Endoprotheseninfektionen sowie Kontrollpopulationen. Nach Auswertung dieser Versuchsreihen zeigte sich

bezüglich der IgG-Titer kein signifikanter Unterschied zwischen infiziertem Patientenkollektiv und Kontrollgruppen. Ein Rückschluss auf eventuelle Biofilmbildung ist somit nicht gegeben. Embp scheint daher als geeignetes Markerprotein zum Nachweis einer endoprothesenassoziierten Infektion auszuscheiden. Zusätzlich lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass es sich bei Embp um ein *in vivo*, nicht aber *in vitro* exprimierbares Protein handelt. Es scheint daher notwendig, weitere Indikatorkriterien für Zielstrukturen zu etablieren und in zusätzlichen Arbeiten Analysen bezüglich der differentiellen Genexpressionen solcher in *S. epidermidis* auftretenden Proteine durchzuführen.

7 Literaturverzeichnis

1. Sperber, W. H. and S. R. Tatini. (1975) Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **29**:502-505.
2. Rupp, M.E. and Archer, G.L. (1994) Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* **19**: 231-243.
3. Kloos, W.E., and Bannerman, T.L. (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **7**: 117-140.
4. Nobel, W.C. 1997. Staphylococcal Carriage and Skin and Soft Tissue Infection in Staphylococci. In *Human Disease*. Crossley, K.B. and Archer, G.L. (eds). New York: Churchill Livingstone: **pp.** 401-412.
5. Archer, G.L. 2000. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R. (eds). Philadelphia: Churchill Livingstone, **pp**: 2092-2100.
6. Rupp, M.E., Sloat, N., Meyer, H.G., Han, J., and Gattermann, S. (1995) Characterization of the hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **172**: 1509-1518.
7. Mack, D., Rohde, H., Harris, L.G., Davies, A.P., Horstkotte, M.A., and Knobloch, J.K. (2006b) Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* **29**: 343-359.
8. Fidalgo, S., F. Vazquez, M.C. Mendoza, F. Perez, and F.J. Mendez. 1990. Bacteremia due to *Staphylococcus epidermidis*: microbiologic, epidemiologic, clinical, and prognostic features. *Rev. Infect. Dis.* **12**: 520-528.
9. Baddour, L.M., L.P. Barker, G.D. Christensen, J.T. Parisi, and W.A. Simpson. 1990. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* in infection of transvenous endocarp-dial pacemaker electrodes. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 676-679.
10. Schaberg, D.R., D.H. Culver, and R.P. Gaynes. 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med.* **91**: 72-75.
11. Richards, M.J., J.R. Edwards, D.H. Culver, and R.P. Gaynes. 2000. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **21**: 510-515.
12. Herwaldt, L.A., M. Geiss, C. Kao, and M.A. Pfaller. 1996. The positive predictive value of isolating coagulase-negative staphylococci from blood cultures. *Clin. Infect. Dis.* **22**: 14-20.

13. Younger, J. J., G. D. Christensen, D. L. Bartley, J. C. Simmons, and F. F. Barrett. 1987. Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal to clinical outcome. *J.Infect.Dis.* **156**:548-554.
14. Archer, G.L., and M.W. Climo. 1994. Antimicrobial susceptibility of coagulase- negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**: 2231-2237.
15. Weinstein, M.P., L.B. Reller, J.R. Murphy, and K.A. Lichtenstein. 1983. The clinical significance of positive blood cultures: A comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Rev. Infect. Dis.* **5**: 35-53.
16. Ringberg,H., Thoren,A., and Bredberg,A. (1991) Evaluation of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. A prospective clinical and microbiological study. *Scand J Infect Dis* **23**: 315-323.
17. Spangehl,M.J., Masri,B.A., O'Connell,J.X., and Duncan,C.P. (1999) Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am* **81**: 672-683.
18. Spangehl,M.J., Younger,A.S., Masri,B.A., and Duncan,C.P. (1998) Diagnosis of infection following total hip arthroplasty. *Instr Course Lect* **47:285-95.**: 285-295.
19. Otto, M. 2009. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nat.Rev.Microbiol.* **7**:555-567.
20. Bayston, R., and S.R. Penny. 1972. Excessive production of mucoid substance in *Staphylococcus SHA*: Possible factor of colonisation of Holter shunts. *Dev. Med. Child. Neurol.* **14 (Suppl. 27)**: 25-28.
21. Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, and P. Stoodley. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat.Rev.Microbiol.* **2**:95-108.
22. Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-1322.
23. Cerca, N., K.K. Jefferson, T. Maira-Litrán, D.B. Pier, C. Kelly-Quintos, D.A. Goldmann, J. Azeredo, and G.B. Pier. 2007. Molecular basis for preferential protective efficacy of antibodies directed to the poorly acetylated form of staphylococcal poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. *Infect Immun.* **7**: 3406-3413.
24. Costerton, J.W., R. Veeh, M. Shirtliff, M. Pasmore, C. Post, and G. Ehrlich. 2003. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest.* **112**: 1466-1477.

25. Knobloch, J.K.M., M.A. Horstkotte, H. Rohde, P.M. Kaulfers, and D. Mack. 2002a. Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**: 683-687.
26. Vacheethasane, K., J. S. Temenoff, J. M. Higashi, A. Gary, J. M. Anderson, R. Bayston, and R. E. Marchant. 1998. Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. *J. Biomed. Mater. Res.* **42**:425-432.
27. Vaudaux, P., D. Pittet, A. Haeberli, E. Huggler, U.E. Nydegger, D.P. Lew, and F.A. Waldvogel. 1989. Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J. Infect. Dis.* **160**: 865-875.
28. Espersen, F., M. Wurr, L. Corneliussen, A.L. Hog, V.T. Rosdahl, N. Frimodt-Moller, and P. Skinhoj. 1994. Attachment of staphylococci to different plastic tubes in vitro. *J. Med. Microbiol.* **40**: 37-42.
29. Muller, E., S. Takeda, D.A. Goldmann, and G.B. Pier. 1991. Blood proteins do not promote adherence of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *Infect. Immun.* **59**: 3323-3326.
30. Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, and F. Götz. 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* **20**: 1083-1091.
31. Heilmann, C., G. Thumm, G.S. Chhatwal, J. Hartleib, A. Uekotter, and G. Peters. 2003. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **149**: 2769-2778.
32. Williams, R.J., B. Henderson, L.J. Sharp, and S.P. Nair. 2002. Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **70**: 6805-6810.
33. Hussain, M., C. Heilmann, G. Peters, and M. Herrmann. 2001. Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb. Pathog.* **31**: 261-270.
34. Mack, D., Nedelmann, M., Krokotsch, A., Schwarzkopf, A., Heesemann, J., and Laufs, R. (1994) Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* **62**: 3244-3253.

35. Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, and R. Laufs. 1996a. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* **178**: 175-183.
36. Mack, D., M. Haeder, N. Siemssen, and R. Laufs. 1996b. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J. Infect. Dis.* **174**: 881-884.
37. Rohde, H., C. Burdelski, K. Bartscht, M. Hussain, F. Buck, M. A. Horstkotte, J.K. Knobloch, C. Heilmann, M. Herrmann, and D. Mack. 2005. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.* **55**:1883-1895.
38. Conrady, D. G., C. C. Brescia, K. Horii, A. A. Weiss, D. J. Hassett, and A. B. Herr. 2008. A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:19456-19461.
39. Hussain, M., M. Herrmann, C. von Eiff, F. Perdreau-Remington, and G. Peters. 1997. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect. Immun.* **65**:519-524.
40. Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J.M., Yao, Y., Fischer, E.R., DeLeo, F.R., and Otto, M. (2004a) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* **279**: 54881-54886.
41. Christner, M., G. Franke, N. Schommer, U. Wendt, K. Wegert, P. Pehle, G. Kroll, C. Schulze, F. Buck, D. Mack, M. Aepfelbacher, and H. Rohde. 2010. The giant extracellular matrix binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol. Microbiol.*
42. Schommer, N., M. Christner, M. Hentschke, K. Ruckdeschel, M. Aepfelbacher, and H. Rohde. 2011. *Staphylococcus epidermidis* Uses Distinct Mechanisms of Biofilm Formation To Interfere with Phagocytosis and Activation of Mouse Macrophage-Like Cells 774A.1
43. Palmer, T., B.C. Berks. 2012. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat. Rev. Microbiol.* 10:483-496.

44. Rohde, H., M. Kalitzky, N. Kroger, S. Scherpe, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, A. R. Zander, and D. Mack. 2004. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J.Clin.Microbiol.* **42**:5614-5619.
45. Rohde, H., E. C. Burandt, N. Siemssen, L. Frommelt, C. Burdelski, S. Wurster, S. Scherpe, A. P. Davies, L. G. Harris, M. A. Horstkotte, J. K. M. Knobloch, C. Rangunath, J. B. Kaplan, and D. Mack. 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**:1711-1720.
46. Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, and W. Erhardt. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**:255-262.
47. Darouiche, R.O. 2004. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J. Med.* **350**: 1422-1429.
48. Geipel, U., and Herrmann, M. (2005) [The infected implant: bacteriology]. *Unfallchirurg* **108**: 961-975.
49. Lentino, J.R. (2003) Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis* **36**: 1157-1161.
50. Rohde, H., D. Mack, M. Christner, C. Burdelski, G. Franke, and J. K. M. Knobloch. 2006. Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Reviews in Medical Microbiology* **17**.
51. Mack, D., H. Rohde, L.G. Harris, A.P. Davies, M.A. Horstkotte, and J.K.M. Knobloch. 2006. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* **29**: 343-359.
52. Clark, N.C., L.M. Weigel, J.B. Patel, and F.C Tenover. 2002. Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* **1**: 470-472.
53. Reva, O., and B. Tümmler. 2008. Think big--giant genes in bacteria. *Environ Microbiol.* **3**: 768-777.
54. Tanaka, Y., S. Sakamoto, M. Kuroda, S. Goda, Y. G. Gao, K. Tsumoto, Y. Hiragi, M. Yao, N. Watanabe, T. Ohta, and I. Tanaka. 2008. A helical string of alternately connected three-helix bundles for the cell wall-associated adhesion protein Ehb from *Staphylococcus aureus*. *Structure.* **16**:488-496.

55. O'Toole, G., J.B. Kaplan, and R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 49-79.
56. Sellman, B.R., Howell, A.P., Kelly-Boyd, C., and Baker, S.M., 2005. Identification of immunogenic and serum binding proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect immune* **73**: 6591-6600.
57. Hartford, O., L. O'Brien, K. Schofield, J. Wells, and T. J. Foster. 2001. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology* **147**:2545-2552.
58. Rupp,M.E., Ulphani,J.S., Fey,P.D., Bartscht,K., and Mack,D. (1999a) Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun* **67**: 2627-2632.
59. Rupp,M.E., Ulphani,J.S., Fey,P.D., and Mack,D. (1999b) Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun* **67**: 2656-2659.
60. Kelly-Quintos, C., L.A. Cavacini, M.R. Posner, D. Goldmann, and G.B. Pier. 2007. Characterization of the opsonic and protective activity against *Staphylococcus aureus* of fully human monoclonal antibodies specific for the bacterial surface polysaccharide poly-N-acetylglucosamine. *Infect Immun.* **5**: 2742-2750.
61. Francois,P., Tu Quoc,P.H., Bisognano,C., Kelley,W.L., Lew,D.P., Schrenzel,J. *et al.* (2003) Lack of biofilm contribution to bacterial colonisation in an experimental model of foreign body infection by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 135-140.
62. Klug, D., F. Wallet, S. Kacet, and R.J. Courcol. 2003. Involvement of adherence and adhesion *Staphylococcus epidermidis* genes in pacemaker lead-associated infections. *J Clin Microbiol.* **41**: 3348-3350.
63. Frank, K.L., A.D. Hanssen, and R. Patel. 2004. *icaA* is not a useful diagnostic marker for prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* **42**: 4846-4849.

8 Abkürzungsverzeichnis

A

A	Absorption
AaP	Accumulation-associated-protein

B

BSA	Rinderserumalbumin (englisch: bovine serum albumin)
BaP	Biofilm-assoziiertes Protein

C

CRP	C-reaktives Protein
-----	---------------------

D

ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DUF1542	domain of unknown function 1542

E

E.	Escherichia
ELISA	englisch: enzyme-linked immunosorbent assay
Embp	Gen des Fibronectin-bindenden Proteins (englisch: extra matrix binding protein)

F

Fbe	Fibronectin binding protein
FIVAR	found in various architectures

G

g	Gramm
GA	protein G-related albumin binding
°C	Grad Celsius

I

Ig	Immunglobulin
----	---------------

IMAC	immobilized metal affinity chromatography
ica	Gen des interzellulären Adhäsins (englisch: intercellular adhesin)

K

kDa	Kilodalton
KNS	koagulase negative Staphylokokken

L

l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium

M

M	Mol
MDa	Megadalton
mM	Millimol
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
MRSE	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus epidermidis</i>

N

nm	Nanometer
----	-----------

O

OD ₆₀₀₍₄₀₅₎	optische Dichte bestimmt bei einer Wellenlänge von 600 (405) nm
------------------------	---

P

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: phosphate buffered saline)

PIA interzelluläres Polysaccharid Adhäsion
(englisch: polysaccharide intercellular adhesion)

PS/A Kapselpolysaccharid
(englisch: capsular polysaccharide/adhesion)

R _____

rpm Umdrehungen pro Minute (englisch: rounds per minute)

S _____

SDS sodium dodecal sulfate

V _____

V Volt

vol/vol Volumen pro Volumen

9 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

10 Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichten Dissertation mit dem Titel:

Untersuchung zur Prävalenz von Antikörpern gegen das *extracellular matrix binding protein* in Seren von Patienten mit Infektionen nach Gelenkersatz

in der Arbeitsgruppe des Institutes für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene unter der Leitung von Prof. Dr. med. Aepfelbacher ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hannover, 15.10.2013

M. Kohns

11 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Aepfelbacher für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene durchführen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Leiter der Arbeitsgruppe Herrn PD Dr. med. Holger Rohde. Mit viel Humor, unermüdlicher Geduld und Hilfsbereitschaft hat er einen entscheidenden Anteil am Gelingen dieser Arbeit. Eine bessere Betreuung kann ich mir nicht vorstellen. Vielen Dank!

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der AG Rohde, allen voran Frau Gesche Kroll und Herrn Martin Christner.

Herrn Lars Otto sowie Herrn Dennis Eick danke ich für die Hilfe bei Formatierung und statistischen Problemen. Auch kurzfristig konnte ich stets auf sie zählen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie: Meinen Eltern Andreas und Renata Kohns, die immer an mich geglaubt haben und ohne deren Unterstützung weder mein Studium noch das Verfassen dieser Arbeit möglich gewesen wären. Außerdem meiner Schwester Angelika Kohns, für Korrekturlesen und herausragende Anmerkungen. Ich liebe euch!

Ganz besonders danke ich meinen Freunden, die immer für mich da waren und die ich niemals missen möchte: Lena Bliedung, Jella Brockmann und Laura Weber für die wunderbare Zeit auch über die Schule hinaus, sowie Inga Cordes, Livia Fuhrmann, und Kira Renzelmann, die mir die Zeit in Hamburg so unvergesslich gemacht haben.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinem Freund Jan-Henrik Rinne. Mit viel Liebe und Geduld war er immer für mich da und hat so manche Laune während Studium, Examen und Dissertation ertragen. Ich weiß mein Glück zu schätzen!