



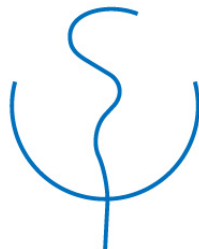
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

KLINIK FÜR ORTHOPÄDIE UND SPORTORTHOPÄDIE DES
KLINIKUMS RECHTS DER ISAR

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Dissertation

Elisabeth Maria Maier





FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

KLINIK FÜR ORTHOPÄDIE UND SPORTORTHOPÄDIE DES
KLINIKUMS RECHTS DER ISAR

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Einfluss von Stoffwechselprodukten von
Staphylococcus aureus und *Staphylococcus
epidermidis* auf die osteogene
Differenzierung primärer humaner
Osteoblasten**

Elisabeth Maria Maier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines **Doktors der Medizin (Dr. med.)** genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Rainer Burgkart
2. Priv.-Doz. Dr. Jochen Schneider

Die Dissertation wurde am 17. Dezember 2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14. Juli 2020 angenommen.

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der Fakultät für Medizin der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel ‚Einfluss von Stoffwechselprodukten von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* auf die osteogene Differenzierung primärer humaner Osteoblasten‘ an der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie des Klinikums Rechts der Isar unter der Anleitung und Betreuung durch apl. Prof. Dr. Rainer Burgkart ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt. Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt. Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert. Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

München, 14. Juli 2020

Elisabeth Maria Maier

Danksagungen

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mir die Vollendung meiner Dissertation ermöglicht haben. Ganz besonders danke ich Herrn Professor Dr. med. Rainer Burgkart, der es mir ermöglicht hat trotz einiger Anfangsschwierigkeiten diese Arbeit durchzuführen und mich stets unterstützt hat.

Frau Jutta Tübel und Herrn PD Dr. med. Jochen Schneider danke ich besonders für die hervorragende Betreuung und ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinen Eltern, Geschwistern und meinem Freund möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Zusammenfassung

Mit einer steigenden Anzahl an Prothesenimplantationen steigen die Fälle bakterieller implantat-assoziiertes Infektionen. Für die langwierige und komplexe Therapie mit multiplen operativen Eingriffen einhergehend ist ein besseres Verständnis der Interaktion von Pro- und Eukaryonten entscheidend. 70% aller Knocheninfektionen werden von *Staph. aureus* (SA) und *Staph. epidermidis* (SE), zwei häufigen Biofilmbildnern, verursacht. Bakterien in ihrer nicht-planktonischen Form sezernieren eine Vielzahl an Molekülen: Biofilm-formende Polysaccharide, Lipide, extrazelluläre DNA sowie Toxine. In dieser Arbeit wurde der Einfluss dieser löslichen Biofilmfaktoren auf den Metabolismus, die Mineralisierung, die osteogene Differenzierung, sowie die Produktion von Osteopontin primärer humaner Osteoblasten (phOB) untersucht.

Biofilm-konditioniertes Medium (BCM) wurde durch 4-tägige Inkubation von SA und SE hergestellt. Der entstandene Biofilm wurde für 72h in osteogenem Medium (OM) inkubiert und steril filtriert. Für die Messung der metabolischen Aktivität (WST-1-Assay), der Proliferation (CyQuant) der Mineralisierung (Alizarin Red Färbung), der osteogenen Differenzierung (PCR) und dem Osteopontin ELISA wurden hOB 24h bzw. 72h mit BCM in 100%-iger und 50%-iger Konzentration inkubiert. Als Kontrolle diente unbehandeltes OM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Einstichproben-t-Test und zweifaktorieller Varianzanalyse.

Die Inkubation mit BCM beider Keime verringerte signifikant den Zellmetabolismus und die Zellzahl zeit- und konzentrationsabhängig. Unter SA zeigte sich die osteogene Genexpression uneinheitlich: *RUNX2* und *SPP1* waren zumeist hochreguliert, *COL1A1* und *BGLAP* zumeist herunterreguliert, während *ALP* sich nicht änderte. Für SE zeigte sich eine Herabregulation von *ALP*, sowie ein Anstieg der Expression von *BGLAP* und *COL1A1*. Auch die Mineralisierung zeigte sich bei beiden Keimen, jedoch insbesondere durch SE, deutlich reduziert.

Diese Veränderungen könnten die Ursache von geringerer Knochenstabilität und Mineralisierung sein, sowie Osteoklasten und die Zellzyklusregulation beeinflussen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass lösliche, potentiell weit reichende Biofilm-Produkte osteogene Prozesse in einer ähnlich wesentlichen Art beeinflussen, wie direkter Kontakt mit Bakterien.

Abstract

A rise in prosthesis implantation also increases the number of periprosthetic bacterial infections. Treatment is complicated, lengthy and often requires multiple surgical procedures. As approx. 70% of all bone infections are caused by *Staph. aureus* (SA) and *Staph. epidermidis* (SE), two common biofilm-producers, it is crucial to better understand the interaction between prokaryotes and eukaryotes. Bacteria in non-planktonic form secrete a variety of molecules: biofilm forming Polysaccharides, lipids, extracellular DNA as well as toxins. We investigated the impact that soluble biofilm factors had on metabolism, mineralization, osteogenic differentiation and the production of Osteopontin of primary human osteoblasts (phOB).

Biofilm-conditioned media (BCM) was produced by incubating SA and SE over 4 days. The resulting biofilm was incubated in osteogenic media (OM) for 72h and filtered sterile. Parallel we isolated primary human osteoblasts from the cancellous bone from 8 different patients with the Explant-method and cultivated them in OM. For measuring metabolic activity (WST-1-Assay), proliferation (CyQuant), mineralization (Alizarin red stain), osteogenic differentiation (Gene expression assay) and Osteopontin ELISA phOB were seeded and incubated 24h respectively 72h with BCM in a 100% and 50% concentration. Non-treated OM served as control. Statistical analysis was performed using one-sample t-test and two-way anova.

Incubation with BCM of both species significantly decreased cell metabolism and cell quantity time and concentration dependent. For SA osteogenic gene expression showed a mixed picture with *RUNX2* and *SPP1* mostly upregulated, *COL1A1* and *BGLAP* mostly downregulated and *ALP* not altered. Whereas SE seems to downregulate *ALP* and upregulate *BGLAP* and *COL1A1*. Overall mineralization was decreased, especially when treated with SE.

These changes may account for less bone stability and mineralization and may impact osteoclast and cell cycle regulation in infection sites. Concluding this data suggests that soluble, potentially far-reaching biofilm-factors influence osteogenic processes similar substantial to direct attachment of bacteria.

Akronyme

Aap	accumulation-associated protein
ALP	nicht-gewebsspezifische Alkalische Phosphatase der Leber, des Knochens und der Niere
AM	Assaymedium
AP	gewebsspezifische alkalische Phosphatase
BAP	knochenspezifische Alkalische Phosphatase
Bap	biofilm-associated protein
BCM	Biofilm-konditioniertes Medium
BCM100	Biofilm-konditioniertes Medium in 100%-iger Konzentration
BCM50	Biofilm-konditioniertes Medium in 50%-iger Konzentration, verdünnt mit KO
cDNA	komplementäre DNA
Coa	Staphylocoagulase
Cq	<i>quantification cycle</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eDNA	extrazelluläre DNA
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Embp	extracellular matrix binding protein
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen

Akronyme

EZM	extrazelluläre Matrix
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
IaI	Implantat-assoziierte Infektionen
KO	Kontrollmedium
MRSA	multiresistente Keime
MSC	mesenchymale Stammzellen
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
OAM	Osteogenes Assaymedium
OB	Osteoblasten
OC	Osteocalcin
OD	optische Dichte
OPM	Osteogenes Proliferationsmedium
OPN	Osteopontin
PAMP	pathogen associated molecular pattern
phOB	primäre humane Osteoblasten
PIA	polysaccharide intercellular adhesin
PM	Proliferationsmedium
PSM	phenol-soluble modulin
PVL	Panton-Valentine-Leukozidin
qPCR	quantitative Real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure

Akronyme

RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative Real-time PCR
RUNX2	Runt related Transcription Factor 2
sBf	lösliche Biofilmprodukte
SCV	small colony variants
spA	Staphylokokken-Protein A
<i>Staph. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staph. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TEP	Totalendoprothese
TSB	Tryptic Soy Broth

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract	v
Akronyme	vi
1 Einleitung	1
1.1 Motivation	1
1.2 Ziel der Arbeit	3
2 Grundlagen	5
2.1 Knochen	5
2.1.1 Remodeling und osteogene Differenzierung	6
2.1.2 <i>RUNX2</i>	8
2.1.3 <i>SPP1</i>	8
2.1.4 <i>ALPL</i>	9
2.1.5 <i>BGLAP</i>	10
2.1.6 <i>COL1A1</i>	11
2.2 Osteomyelitis und periprothetische Infektionen	11
2.3 Biofilm	12
2.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.3.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	15
2.4 bakterieller Einfluss auf Osteoblasten	16
3 Material und Methoden	18
3.1 Kits, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	18

Inhaltsverzeichnis

3.2	Zellen und Bakterienstämme	20
3.2.1	primäre humane Osteoblasten	20
3.2.2	Bakterienstämme	21
3.3	Kulturmedien	21
3.3.1	Proliferationsmedium	21
3.3.2	Assaymedium	21
3.4	Primer	22
3.5	Software	22
3.6	Geräte	23
3.7	Produktion des Biofilm-konditionierten Mediums	23
3.8	Zellkultur	26
3.9	Proben und Assays	27
3.9.1	Genexpressionsanalyse	27
3.9.2	WST-1 Assay	29
3.9.3	CyQuant-Assay	30
3.9.4	Mineralisierungsassay	31
3.10	Statistische Analyse	33
4	Ergebnisse	34
4.1	pH	34
4.2	Metabolische Aktivität	35
4.2.1	<i>S. aureus</i>	35
4.2.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	36
4.2.3	Vergleich von <i>Staph. aureus</i> und <i>Staph. epidermidis</i>	36
4.3	CyQuant	37
4.3.1	<i>Staph. aureus</i>	38
4.3.2	<i>Staph. epidermidis</i>	38
4.3.3	Vergleich von <i>Staph. aureus</i> und <i>Staph. epidermidis</i>	39
4.4	Genexpression: osteogene Differenzierung	39
4.4.1	<i>Staph. aureus</i>	40
4.4.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (<i>Staph. epidermidis</i>)	40
4.4.3	Vergleich von <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staph. aureus</i>) und <i>Staph. epidermidis</i>	42
4.5	ELISA: Osteopontin	42

Inhaltsverzeichnis

4.6 Mineralisierung	43
5 Diskussion	46
5.1 Limitationen	53
5.2 Ausblick	54
6 Schlussfolgerung	55
Abbildungsverzeichnis	56
Tabellenverzeichnis	58
Literatur	59

1 Einleitung

1.1 Motivation

Demographische Veränderungen und Fortschritte in der Medizin führten in den letzten Jahren zu einer rapiden Zunahme an Operationen, bei denen Fremdmaterial in den Körper eingebracht wird (Otto-Lambertz et al. 2017) (Montanaro, Speziale et al. 2011). Zu den häufigsten zählen Totalendoprothesen (TEPs) der Hüfte, des Knies und der Schulter, Sehnen- und Bänderrekonstruktionen und Osteosynthesematerialien. Die Relevanz des Themas wird beispielhaft anhand der Totalendoprothetik erläutert. Allein in Deutschland wurden im Jahr 2011 pro 100.000 Einwohner 284 Hüft-TEPs und 206 Knie-TEPs durchgeführt (Wengler et al. 2014). Bei der primären Hüftendoprothetik kommt es in 2 bis 10% der Fälle zu Komplikationen. Nach der aseptischen Lockerung und der Luxation ist die Infektion mit 15,3% die dritthäufigste Komplikation (Otto-Lambertz et al. 2017). Gründe für die Infektionen können intraoperative Kontaminationen oder hämatogene Streuung bei anderem Fokus sein. Nach 10 Jahren liegt das kumulative Infektionsrisiko bei 1,4% mit einem deutlichen Gipfel von 70% innerhalb der ersten zwei post-operativen Jahre (Banke et al. 2015). Im Falle einer Revision steigt das Risiko auf 5%, bei septischen Revisionen sogar auf bis zu 30% (Otto-Lambertz et al. 2017) (Gutowski et al. 2016). Das Risiko unterscheidet sich je nach Lokalisation der Prothese, der Art der Grunderkrankung und auch der patientenspezifischen Vorerkrankungen (Urquhart et al. 2010). Wichtige Risikofaktoren sind Übergewicht, Alkohol- und Nikotinkonsum sowie Diabetes mellitus (Pulido et al. 2008) (Harrasser et al. 2016) (Lamagni 2014). Ältere Menschen zeigen eine erhöhte Mortalität sowie ein erhöhtes Risiko der Infektion mit multiresistenten Keimen (Morgenstern et al. 2016). Betroffene leiden akut unter Fieber, Ergüssen und Eiterbildung und langfristig unter Prothesenlockerungen, Stabilitätsverlust, Gelenksdestruktion und dadurch an starken Schmerzen (Brandt et al. 1997).

Problematisch neben der Häufigkeit ist, dass therapeutisch eine alleinige Antibiotikagabe meist nicht ausreicht (H. Wu et al. 2015). Um den Infekt einzudämmen wird ein weitreichendes

1 Einleitung

chirurgisches Débridement durchgeführt, das Implantat entfernt und in schwerwiegenden Fällen das Gelenk versteift (Parvizi et al. 2012). Aus sozioökonomischer Sicht führen diese drastischen Maßnahmen durch prolongierte Hospitalisierungszeiten, erhöhter Mortalität (Gundtoft et al. 2017) und Patiententrauma zu einem enormen Anstieg der Kosten im Gesundheitssystem (Campoccia et al. 2006) (Kurtz et al. 2012). Trotz steigender Sensibilisierung für die Prävention von Infektionen und stark erhöhten Hygienestandards, stagnieren die Infektionsraten (Lentino 2003). Zur Verbesserung dieser Situation sind genaue Kenntnisse über Infektionswege und Erregerspektrum elementar. Bei Implantat-assoziierten Infektionen (IaI) sind Staphylokokken bei weitem die häufigsten Erreger. Insbesondere zwei Spezies, *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis* sind zusammen für zwei Drittel der Infektionen verantwortlich. Andere Keime wie Pseudomonaden, Enterokokken oder Streptokokken machen einen im Vergleich geringeren Anteil aus (Campoccia et al. 2006) (Pulido et al. 2008).

Die rasche Zunahme von Antibiotikaresistenzen (Ventola 2015) und die Fähigkeit der beiden Keime Biofilme zu bilden verhindert eine adäquate Wirkung von klassischen Antibiotika. Lösungsstrategien beinhalten im Moment die Beschichtung der Implantate mit antimikrobiellen Substanzen wie Silber oder Naturprodukten, elektrische Vorbehandlung oder eine Antibiotikabeschichtung, die allerdings das Risiko einer Resistenzbildung birgt (Oliveira et al. 2018). Diese Schleimschicht, die auf den meisten explantierten Prothesen nachweisbar ist, schützt die darin enthaltenen Erreger vor äußeren Einflüssen und ist sehr schwer zu bekämpfen (Zimmerli et al. 2004). Durch die Anpassungsfähigkeit an diverse Umgebungen, den komplexen Aufbau und der engen Einbindung der Bakterien sind alleinige selektive Analysen der Matrix bis heute schwierig (Flemming, Wingender 2010). Offen bleibt welche Rolle darin enthaltene Virulenzfaktoren bei Reaktionen der menschlichen Zellen spielen. Um neuartige Behandlungsmöglichkeiten zu erforschen wird zunächst ein tieferes Verständnis der Bedeutung der nichtzellulären Matrix benötigt. In unserem Versuchsaufbau kann durch räumliche Trennung selektiv der Einfluss der Stoffwechselprodukte im Biofilmstadium ohne

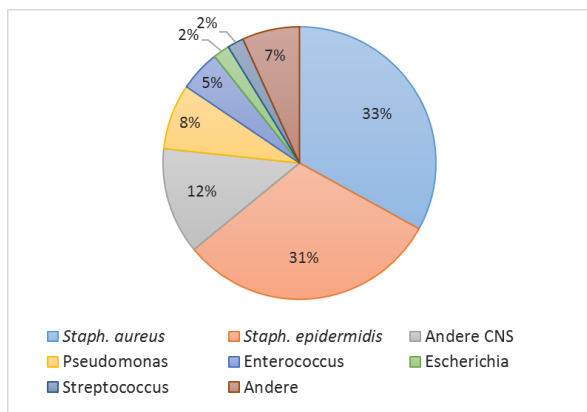


ABB. 1.1 Erreger der Implantat-assoziierten Infektionen nach (Campoccia et al. 2006)

anwesende Mikroorganismen und Matrix betrachtet werden.

1.2 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Interaktion von primären humanen Osteoblasten mit den häufigsten Knocheninfektionserregern weiter beleuchtet werden. Während die Internalisierung und die direkte Interaktion von planktonischen Prokaryonten mit Eukaryonten bereits zahlreich untersucht worden ist, gibt es kaum Literatur zur Interaktion in anderen Stadien. *In vivo* herrscht bei implantat-assoziierten Infektionen allerdings der Biofilm-Phänotyp vor. Niedrige Teilungsraten und Diffusionsbarrieren schwächen die Wirkung klassischer Antibiotika. Auf der Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten der langwierigen Infektionen muss zunächst verstanden werden, wodurch die Pathogenität verursacht wird. In einem vereinfachten Modell betrachten wir selektiv den Einfluss von löslichen Stoffwechselprodukten von Biofilmen auf primäre humane Osteoblastenkulturen *in vitro*. Hier wird bewusst auf die zelluläre Komponente der Erreger verzichtet um den Einfluss von Zell-Zellkontakten auszuschließen.

Veränderungen der Zellviabilität, des Zellmetabolismus und der osteogenen Differenzierung mit Mineralisierung wurden auf Unterschiede zwischen

- *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis*,
- den Zeitpunkten,
- der Konzentration
- und innerhalb der Zellspender

untersucht.

Es wird zunächst näher auf die biologischen Voraussetzungen eingegangen, der aktuelle Stand der Forschung erläutert und anschließend die eigenen Experimente vorgestellt und diskutiert.

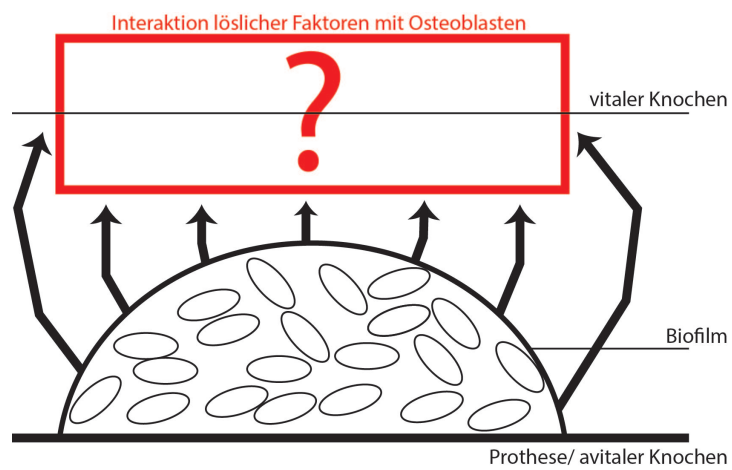


ABB. 1.2 Modell der Interaktion löslicher Faktoren von Biofilmen mit vitalem Knochengewebe

2 Grundlagen

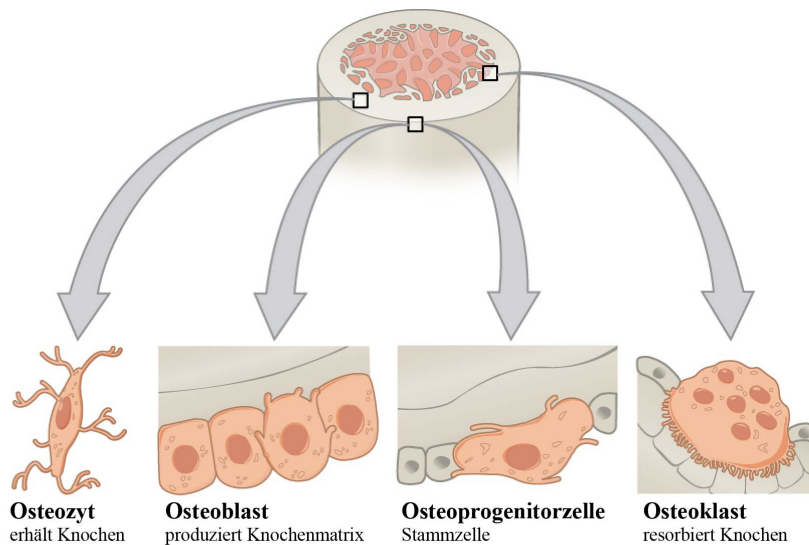
Im folgenden Kapitel wird näher auf die biologischen Grundlagen und Voraussetzungen für unser Projekt eingegangen und der aktuelle Stand der Forschung erläutert.

2.1 Knochen

Mehr als 200 Knochen formen im menschlichen Körper den Bewegungs- und Stützapparat. Zusätzlich zu den biomechanischen Aufgaben und dem Schutz der inneren Organe ist Knochen ein wichtiger Mineralspeicher und mit seinem Mark Ort der Hämatopoese. Makroskopisch kann man eine feste Knochenschicht außen, die Kompakta, von dem inneren Gitterwerk aus Trabekeln, der Spongiosa, unterscheiden (Lüllmann-Rauch 2008) (Seeman, Delmas 2006). Diese Anordnung und die Kombination aus Kollagenfasern (= 30% der Trockenmasse) und eingelagerten Mineralien, insbesondere Hydroxylapatit (=70% der Trockenmasse) verleiht Knochen die geforderten Ansprüche an Härte und der gleichzeitigen Elastizität (Benninghoff et al. 2008).

Ca. 10% des Knochens besteht aus Zellen. Der Großteil besteht aus den von Matrix umschlossenen Osteozyten mit ihren Ausläufern, die als Mechanosensoren und ‚Wächter‘ des Knochens fungieren. Sie stellen die engültige Differenzierungsstufe der knochenbildenden Osteoblasten dar, die aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs) hervorgehen. Da Knochenmatrix immer auf schon mineralisierter Matrix abgelagert wird, liegen Osteoblasten (OB) stets einer freien knöchernen Oberfläche an. Als syntheseaktive Zellen produzieren sie das sogenannte Osteoid aus Kollagenfasern (Typ I), nicht-kollagenen Proteinen (Osteocalcin (OC), Osteopontin (OPN), Osteonectin) sowie Proteoglykanen bzw. Glykosaminoglykanen. Nach der vollständigen Mineralisierung des Osteoids stirbt der Großteil der OB ab. Aus Osteoprogenitorzellen in den Knochenkanälchen, Periost oder Knochenmark können sie jedoch stets nachgebildet werden (ElSayed SA 2018). Eine komplementäre Funktion dazu erfüllen Osteoklasten. Sie sind aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehende Makrophagen, die Knochen resorbieren und

Mineralien freisetzen (Lüllmann-Rauch 2008) (Aumüller et al. 2017).



©OpenStax College
CC-BY-3.0

ABB. 2.1 Knochenzellen und ihre Anordnung adaptiert nach OpenStax College (Anatomy, Jun 19 2013 2013)

Knochengewebe ist sehr dynamisch: es reagiert nicht nur auf Verletzungen oder Infektionen, sondern befindet sich physiologisch stets im Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau, was als ‚remodeling‘ bezeichnet wird (Lüllmann-Rauch 2008). Im Erwachsenen wird jährlich ca. 10% des gesamten Skeletts resorbiert und ausgetauscht (Manolagas, Jilka 1995) (Cohen Jr 2006). Aufgrund der komplexen Regulierungsmechanismen gibt es zahlreiche Einflussfaktoren, deren Veränderungen die Homöostase stören können. Beispiele sind Hormone z.B. Östrogen oder Vitamine, Medikamente z.B. Glucocorticoide oder körperliche Inaktivität (Cohen Jr 2006).

2.1.1 Remodeling und osteogene Differenzierung

Das komplexe remodeling erfordert die Rekrutierung von MSCs, die Regulation der Produktion und Mineralisierung der extrazellulären Matrix (EZM), sowie die Steuerung der Osteoklastenaktivität. Man kann das remodeling in vier Phasen unterteilen (ElSayed SA 2018):

1. Aktivierung des remodelings an einer bestimmten Stelle mit Rekrutierung der Osteoklastenvorstufen
2. Knochenresorption und gleichzeitige Rekrutierung von Osteoprogenitoren

3. Differenzierung der Osteoblasten und Matrixproduktion
4. Mineralisierung der Matrix

Dieser Prozess ist nur durch eine strenge Regulation der Genaktivierung und -repression möglich. Betrachtet man nur die osteogene Differenzierung ist der früheste und spezifischste Transkriptionsfaktor *RUNX2* (M.-H. Lee et al. 1999) (K.-S. Lee et al. 2000), der eine typische Expressionskurve wie in Abbildung 2.2 zeigt. Neben *RUNX2*, spielen auch noch andere Transkriptionsfaktoren wie *HLH*, *MSX2*, *DLX5*, *cFos/cJun* und *Fra2/JunB* eine Rolle. Neben Transkriptionsfaktoren sind Wachstumsfaktoren (BMP), Zytokine, Steroide und Peptidhormone genauso wichtig bei Knochenbildung und Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase (G. S. Stein, Lian et al. 2004).

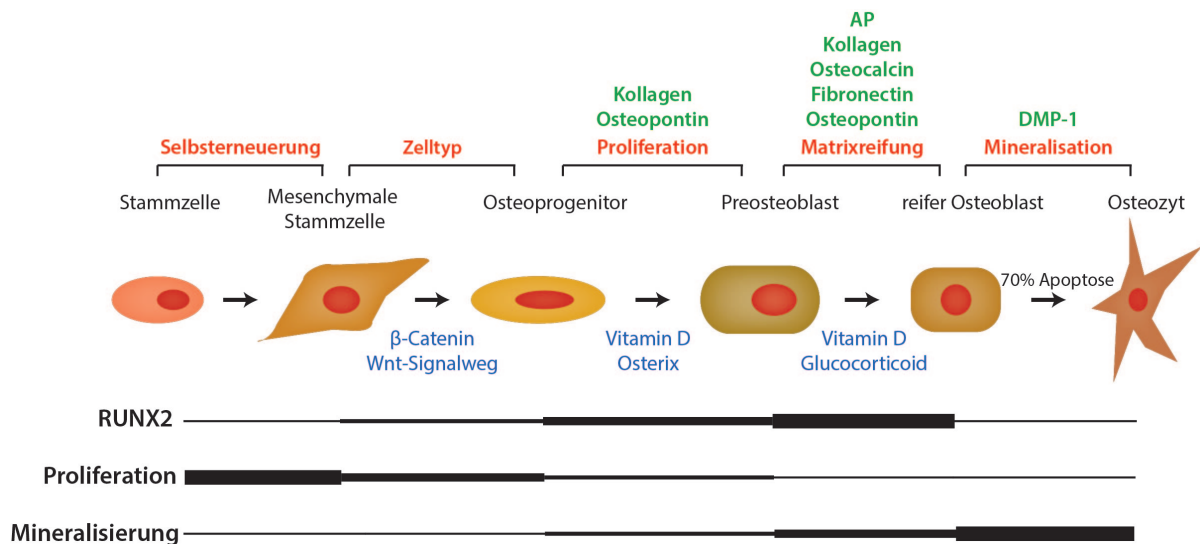


ABB. 2.2 Transkriptionsfaktoren und Marker der osteogenen Differenzierung adaptiert nach Stein (G. S. Stein, Lian et al. 2004) und Komori (Komori 2006)

Die Zellen exprimieren in jedem Stadium spezifische Marker, anhand derer sie eingeteilt werden können. Als frühe osteogene Marker gelten Osteopontin (Komori 2006), Kollagen I und die alkalische Phosphatase. Späte Marker sind Osteocalcin und mineralisierte extrazelluläre Matrix (Komori 2006) (Cohen Jr 2006). Andere wichtige Marker sind Osteonectin und bone sialoprotein (Nakashima, Crombrughe 2003).

Im folgenden werden die, für unsere Versuche verwendeten, osteogenen Marker aufgeführt und näher erläutert.

2.1.2 *RUNX2*

Runt related Transcription Factor 2 (*RUNX2*), auch *CBF α 1* genannt, ist ein Teil der Transkriptionsfaktoren der *RUNX*-Familie und codiert für ein Kernprotein mit einer Runt DNA-bindenden Domäne. *RUNX2* gilt als multifunktionaler Hauptregler der skelettalen Entwicklung (NCBI 2019d).

RUNX2 ist verantwortlich für die Verlangsamung des Zellwachstum, was den Austritt aus dem Zellzyklus unterstützt (Galindo et al. 2005). Veränderungen seiner Expression spielen eine Rolle in der Proliferationszeit und onkogenem Potential von Osteosarkomen (Lucero et al. 2013).

Er führt zur Beibehaltung der Entwicklung in Richtung Osteoblasten und Chondrozyten und durch Aktivierung von spezifischen Genen zu deren Reifung (G. S. Stein, Lian et al. 2004). In den Frühphasen der Differenzierung führt er, durch Bindung an deren Promotoren, zu einer hohen Expression von Osteopontin, Osteocalcin und α 1-Kollagen. Dies führt zur Ausbildung des osteoblastischen Phänotyps und gleichzeitig zur Bewahrung in unreifen Stadien, hat jedoch keinen Einfluss auf die Expression von Kollagen I oder Osteopontin in reifen OB (Komori 2010). *RUNX2* erhält so den Vorrat an Stammzellen aufrecht (Komori 2006). Zwei unterschiedliche Promotoren führen zu den zwei verschiedenen Isoformen *RUNX2 I* und *RUNX2 II* mit eigenen Funktionen. Der Zeitpunkt und die Höhe ihrer Expression bestimmt maßgeblich den Ablauf der osteogene Differenzierung. Das konstitutiv in mesenchymalen Geweben und in Osteoblast-Progenitorzellen exprimierte *RUNX2 I* reguliert die Frühphase der mesenchymalen Zellentwicklung, während *RUNX2 II* vermehrt während der Differenzierung von primären Osteoblasten exprimiert wird. (Banerjee et al. 2001) (Bruderer et al. 2014) (G. S. Stein, Lian et al. 2004)

Auch ein Teil der Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten findet durch *RUNX2* statt. Durch die aktivierte Expression von Osteoprotegrin und RANK-Ligand, wird die Differenzierung von Osteoklasten beeinflusst (Thirunavukkarasu et al. 2000). In nicht osteogenen Zelllinien trägt *RUNX2* zu Zellmigration und zur Zelldifferenzierung bei (G. S. Stein, Lian et al. 2004).

2.1.3 *SPPI*

Das Gen *SPPI* codiert für das Glykophosphoprotein Osteopontin (auch bone sialoprotein 1 oder Secreted Phosphoprotein 1). OPN wird durch Osteoklasten und Osteoblastenvorläufer

sezerniert und ist daher ein Marker der frühen osteogenen Differenzierung. Seine Expression wird durch 1,25 Dihydroxyvitamin D3 und Wachstumsfaktoren stimuliert. OPN ist auch in anderen Geweben wie der Plazenta, den distalen Nierentubuli und im ZNS nachweisbar (Ayad et al. 1998a). OPN kommt in freier Form, z.B. im Blut, und in gebundener Form, v.a. im Knochen, vor. Es spielt bei der Knochenresorption, der Wundheilung, im Immunsystem, bei der Angiogenese, im Zellzyklus und in der Tumorbilogie eine Rolle (Ayad et al. 1998a). In mehreren Zelltypen schützt OPN vor Apoptose, induziert Überleben und Proliferation (Standal et al. 2004). Im Knochen beeinflusst OPN den ‚remodeling‘-Prozess, da es in die Mineralisierung und Osteoklastenaktivität eingreift. OPN bindet mit hoher Affinität an Osteocalcin, Kollagen I und Hydroxylapatit. Dadurch wird das Wachstum der Hydroxylapatitkristalle inhibiert und der Mineralisierungsprozess gehemmt (Steitz et al. 2002) (Pampena et al. 2004). Hochkonzentriertes OPN lässt sich an Orten finden, wo neu geformter Knochen auf bereits existierenden trifft und an den Knochenrändern (Standal et al. 2004). Daher ist es wahrscheinlich in die Bindung der Osteoklasten an mineralisierte Knochenmatrix involviert, die über den Vitronectin Rezeptor der Osteoklasten vermittelt wird (NCBI 2018). Die Bindung an $\alpha_v\beta_3$ -Integrine und die Steigerung der CD44 Expression stimuliert die Osteoklasten Migration (Faccio et al. 1998) (M. Chellaiah, Hruska 2003) (M. A. Chellaiah et al. 2003). OPN-defiziente Osteoklasten migrieren nicht und können keinen Knochen resorbieren (Tani-Ishii et al. 1997). Zudem scheint es die Osteoklastogenese *in vitro* zu steigern (Yamate et al. 1997). OPN wirkt auch als Zytokin, das die Expression von Interferon- γ und Interleukin-12 hochreguliert (NCBI 2018).

An Infektionsherden ist die Expression von OPN erhöht und führt dadurch eventuell zur Anlockung von Monozyten und Makrophagen und derer Differenzierung (Denhardt et al. 2001).

2.1.4 ALPL

Das Gen *ALPL* kodiert für die nicht-gewebsspezifische Alkalische Phosphatase der Leber, des Knochens und der Niere (ALP). Das ubiquitär vorkommende, membranständige Glykoenzym ist Teil von 4 Isoenzymen mit eigenem Genlocus. Die anderen sind die gewebsspezifischen alkalischen Phosphatasen (APs) der Keimbahn, des Ileums und der Plazenta (NCBI 2019a). Die ALP macht mehr als 80% des Serum-APs aus (NCBI 2019a). Trotz der weiten Verbreitung ist die Funktion der AP zum Großteil unbekannt. Die pathologisch erhöhte Serum-AP wird klinisch zur Diagnose von Erkrankungen mit erhöhtem Knochenumsatz (z.B. postmenopausale Osteoporose, Knochenmetastasen) und Leber- und Gallenwegserkrankungen (Lowe D 2018) eingesetzt.

Durch unterschiedliche Glykolisierung in der Leber und im Knochen, kann die knochenspezifische Alkalische Phosphatase (BAP) separat von der der Leber untersucht werden. Die BAP ist ein früher und hochspezifischer Marker der Knochenbildung durch Osteoblasten und deren Differenzierung (Dresner-Pollak et al. 1996). Physiologisch werden maximale Konzentrationen der BAP während der Matrixreifung erreicht (G. S. Stein, Lian 1993). Auch ist die BAP ein wichtiger Faktor der Mineralisierung. Sie stellt wahrscheinlich die benötigten hohen lokalen Konzentrationen anorganischen Phosphats bereit, die für die spontane Kristallisation nötig sind (Lüllmann-Rauch 2008). In homozygoten ‚Knock-out‘-Mäusen bleibt sie trotz normaler Differenzierung der Osteoblasten aus (Wennberg et al. 2000). Mutationen des *ALPL*-Gens führen zu Osteomalazie (Wennberg et al. 2000) und zu Hypophosphatämie (NCBI 2019a), beides Störungen der Mineralisierung.

2.1.5 *BGLAP*

Das Gen *BGLAP* kodiert für Osteocalcin, ein γ -carboxyliertes Protein, das 10 bis 20% aller nicht-kollagenen Proteine stellt. Die Produktion durch Osteoblasten ist Vitamin K abhängig und wird systemisch durch Hormone wie z.B. 1,25-Dihydroxy-Vitamin D stimuliert (Ayad et al. 1998b). Es dient als später Marker der Knochenbildung (A. L. Boskey et al. 1985), da es vor der Knochenmineralisierung nur in Spuren detektierbar ist, aber bei skelettalem Umbau deutlich ansteigt (Ayad et al. 1998b). Das Protein hat mehrere Funktionen (Neve et al. 2013):

OC reguliert die Knochenhomöostase, indem es Einfluss auf Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität nimmt. Knochenbildung wird durch OC gefördert und beschleunigt (Neve et al. 2013). Gleichzeitig wirkt OC auf Osteoklasten: Es erhöht die Chemotaxis und Aktivität (DeFranco et al. 1991) (Mundy, Poser 1983), fördert die Differenzierung der Osteoklastenprogenitorzellen (Malone et al. 1982) (Liggett Jr et al. 1994) und beeinflusst die Osteoklastenreifung, insbesondere in späteren Stadien (Ishida, Amano 2004).

Zweitens bindet die γ -Carboxylglutamat-Domäne stark an Calcium und daraufhin an Hydroxylapatit, die Mineralkomponenten des Knochens (NCBI 2019b). Die Hypothese, dass OC die Knochenmineralisierung reguliert bleibt kontrovers. Während frühere Studien zeigten, dass OC das Wachstum der Hydroxylapatitkristalle hemmt (Menanteau et al. 1982) (Romberg et al. 1986) (Hunter et al. 1996), beziehungsweise bereits die Nukleation der Kristalle inhibiert (Hunter et al. 1996), zeigten neuere, dass OC die Reifung der Knochenmineralisierung beeinflusst (A. Boskey et al. 1998) und das Wachstum der Kristalle (dadurch auch die Knochenhärte) fördert (Kavukcuoglu et al. 2009).

Drittens wirkt OC als Peptidhormon auf den Energiemetabolismus und auf die Testosteronproduktion. Durch z.B. niedrigen pH-Wert im Resorptionsbereich von Osteoklasten wird Osteocalcin decarboxyliert und kann an seinen Rezeptor Gprc6a binden. Dieser befindet sich in den β -Zellen des Pankreas, wo er die Insulinexpression und -sekretion, sowie die Proliferation der β -Zellen fördert (Wei, Karsenty 2015), und in den Leydigzellen des Hodens, wo er die Testosteronproduktion induziert (Oury et al. 2011). So könnten Serum-Osteocalcinlevel negativ mit dem Metabolischen Syndrom korreliert sein (NCBI 2019b).

Es besteht eine positive Rückkopplung zwischen *RUNX2* und Serum-OC: Die OC-Promotorsequenz (osteoblastic-specific element 2 = *RUNX2*-Konsensus-Sequenz) bindet *RUNX2* (Ducy et al. 1997) und führt dadurch zu einer Promotorinduktion von *BGLAP*.

2.1.6 *COL1A1*

Kollagene sind mit 30% die häufigsten Proteine des menschlichen Körpers. Sie kommen in Haut, Sehnen, Faszien, Knochen, Bindegewebe Knorpeln, inneren Organen, der Sclera und im Dentin vor. Im Knochen macht das fibrilläre Kollagen I 90-95% der organischen Matrix aus. Um das vollständige Kollagen I bilden zu können werden zwei Genloci benötigt: *COL1A1* auf Chromosom 17 und *COL1A2* auf Chromosom 7. Beide Gene kodieren für eine α -Kette, die sich nach post-translationaler Modifikationen zu einer Tripelhelix aus zwei $\alpha 1$ und einer $\alpha 2$ zusammenlagern. Nach einem aktiven Transport in den Extrazellularraum werden die Helices durch kovalente Bindungen quervernetzt und bilden so dicke Kollagenfibrillen, die sehr zugfest sind. Störungen in der Kollagen-I-Synthese führen z.B. zu den Erbkrankheiten Osteogenesis imperfecta und Formen des Ehlers-Danlos-Syndroms. (NCBI 2019c)

Bei der natürlichen Knochenheilung wird zunächst eine kollagene Brücke (Kallus) gebildet, in die nach und nach Osteoblasten einwandern und diese verknöchern (Lüllmann-Rauch 2008).

Kontakt von MSC mit Kollagen I und generell der EZM über Integrine induziert deren osteogene Differenzierung (Salasznyk et al. 2004). Unreife Osteoblasten und Präosteoblasten zeigen zunächst eine schwache Expression von *COL1A1*, die während der Differenzierung hochreguliert wird (Aubin, Triffitt 2002).

2.2 Osteomyelitis und periprothetische Infektionen

Eine Osteomyelitis (OM) ist eine akute oder chronische Entzündung des Knochens und Knochenmarks, die meist durch eine bakterielle Infektion verursacht wird (Walter et al. 2012).

Periprothetische Infektionen sind Osteomyelitiden um implantierte Fremdkörper. Mit einer zunehmend alternden Gesellschaft und den erweiterten Möglichkeiten moderner Medizin, nimmt die Häufigkeit der Eingriffe und damit das Risiko einer Infektion zu. Ursächlich sind das Eindringen der Bakterien über den Blutstrom oder von außen, deren Absiedlung, Vermehrung und schließlich eine Biofilmbildung. Hierbei kann man langsame, weniger virulente (low-grade) von aggressiveren, schnell destruierenden (high-grade) Infekten unterscheiden. Verursacher sind mit ca 75-80% Staphylokokken, darunter zu 32-50% *Staph. epidermidis*, vor allem beim Knie- und Hüftersatz, und zu 34-43% *Staph. aureus*, insbesondere bei Fixateuren (Montanaro, Speziale et al. 2011) (Campoccia et al. 2006). Die Diagnostik gestaltet sich schwierig, da die Symptome unspezifisch sind und stets in der Zusammenschau gewertet werden müssen. (Walter et al. 2012)

Beim Frühinfekt spielt die initiale Keimzahl und die bislang erfolgte Integration der Prothese in das Gewebe die größte Rolle für den Erfolg des Implantats (sog. ‚race for the surface‘) (Subbiahdoss et al. 2009) (Busscher et al. 2012).

2.3 Biofilm

Als Biofilm bezeichnet man eine schleimartige Matrix aus Extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und Wasser, die sessile Bakterien untereinander und an Biomaterialien binden (Montanaro, Speziale et al. 2011). Biofilme sind auf Oberflächen in der Natur und in technischen Systemen weit verbreitet. (Flemming et al. 1994)

Im Körper können Biofilme auf Implantaten oder Herzklappen bereits aus einem einzelnen Bakterium entstehen. Die Biofilmbildung erfolgt in bestimmten Schritten: Initiale Bindung an die Oberfläche, Formation von Mikrokolonien, Reifung der typischen Biofilmarchitektur und schließlich die Freisetzung einzelner Bakterien, die einen erneuten Beginn des Kreislaufes an einem anderen Ort ermöglichen. (Flemming et al. 1994) (Jamal et al. 2018) (Monds, O’Toole 2009) (Arciola et al. 2015) (Archer et al. 2011) Im Folgenden wird auf die einzelnen Schritte näher eingegangen.

Erste bakterielle Bindungen zum Gewebe sind meist unspezifisch und wirken über Hydrophobie (Legeay et al. 2006), elektrische Ladung oder Van-der-Waals Kräfte. Daher sind hydrophobe und nicht-polare Materialien wie Teflon oder andere Plastikarten stärker gefährdet. Aktive Bindungen erfolgen durch Adhesine, deren Produktion bereits während des planktonischen Wachstums im Blut hochreguliert wird und bei manchen Arten durch Mikropillie oder Flagellen.

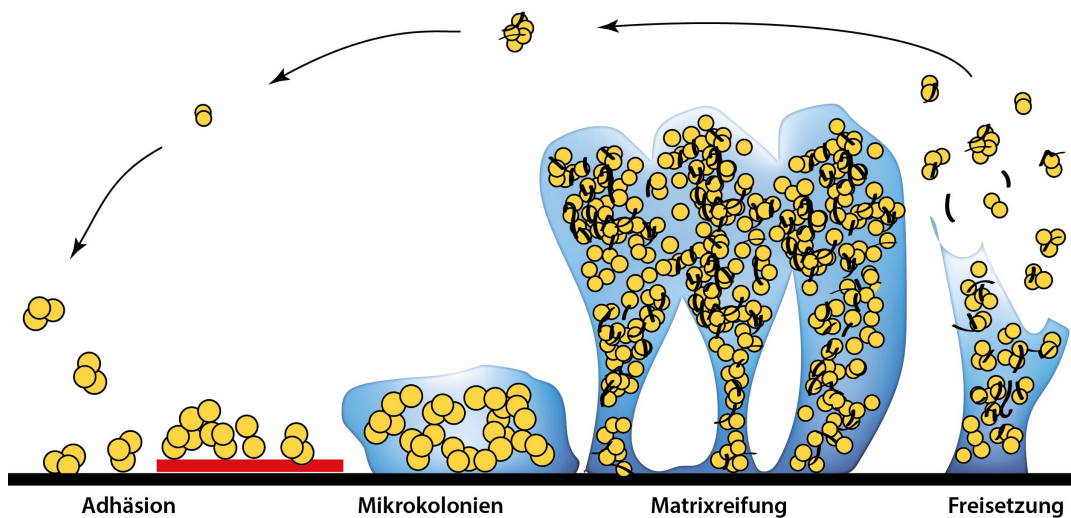


ABB. 2.3 Modell der Biofilmentstehung adaptiert nach (Otto 2013)

Diese verankern die Prokaryonten auf künstlichen Oberflächen und der extrazellulären Matrix (insbesondere Fibrinogen, Fibrin, Osteopontin, Kollagen und Elastin) (Arrecubieta et al. 2006) (Resch et al. 2006) (Campoccia et al. 2006).

Dort bilden sie mehrere Mikrokolonien, die untereinander über autoinduzierte Signale und Zell-Zell Verbindungen, sogenanntes *Quorum sensing*, kommunizieren und jeweils lebenswichtige Substrate für die anderen produzieren. Nun werden Proteine, Exopolysaccharide, extrazelluläre DNA (eDNA), RNA und Ione in einer komplexen dreidimensionalen Struktur produziert und freigesetzt. *Quorum sensing* reguliert die Nährstoffversorgung und Abfallentsorgung über ein Kreislaufsystem aus mit Wasser gefüllten Kanälchen. Durch unterschiedliche Umweltbedingungen innerhalb des Biofilms wie Sauerstoff-, Nährstoff- und Elektronenakzeptorgradienten kommt es zu einer sehr heterogenen Genexpression der Bakterien (Archer et al. 2011). Eine vollständige Reifung des Biofilms benötigt bis zu 4 Wochen (Walter et al. 2012). Small colony variants (SCV) oder einzelne sich wieder schnell teilende Bakterien können sich von alleine oder durch Scherkräfte abtrennen, im Körper an einer neuen Stelle adhären und dort einen weiteren Herd bilden.

Der evolutionäre Vorteil einer Biofilmbildung liegt in ihrer Resilienz gegenüber dem Immunsystem und Antibiotika. Zum einen wird durch Exopolysaccharide eine Diffusionsbarriere errichtet, die vor antimikrobiellen Substanzen, zellulärer und humoraler Immunantwort schützt und diese teilweise auch aktiv degradieren oder abtransportieren kann (Singh et al. 2010). Zum

anderen eradizieren Antibiotika bei niedrigen Stoffwechsel- und Proliferationsraten Bakterien nicht mehr effektiv. Insgesamt scheint der Großteil der Bakterien nicht resistenter zu sein als ihre planktonischen Gegenstücke, jedoch überleben im Biofilm stets wenige resistente Zellen, die ansonsten vom Immunsystem eliminiert werden würden. Eine ausreichend lange Therapie ist unabdingbar um die Entwicklung von Resistenzen zu unterbinden. (Lewis 2001)

Ca. 65% aller bakteriellen Infektionen sind mit Biofilmen assoziiert (Lewis 2001). Insbesondere in festen Gewebe, wie Knochen, und in chronischen Infektionen werden gehäuft Erreger mit Biofilm-formenden Eigenschaften isoliert (Sánchez et al. 2013).

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ist ein gram-positives, ubiquitäres, Biofilm bildendes Bakterium. In 20-35% der Bevölkerung besiedelt er die vorderen Nasenhöhlen. Typisch sind eitrige Entzündungen von Organen oder der Haut mit Abszessbildung, die durch Schmierinfektion übertragen werden. Er gilt als der häufigste Erreger der Osteomyelitis und der Prothesen-assoziierten Infektionen (Campoccia et al. 2006).

Schnelle Resistenzbildung, vermehrtes Auftreten multiresistenter Keime (MRSA) und die Gefahr der Chronifizierung machen *Staph. aureus* zu einem der gefährlichsten Keime für den Menschen. Charakteristisch für *Staph. aureus* ist seine Aggressivität und Invasivität, die über zahlreiche Virulenzfaktoren vermittelt wird. Koagulase, Clumping Factor A und Peptidoglykane bewirken die Bildung eines Schutzwalls aus Fibrin und Fibrinogen, die ähnlich wie bei der Biofilmproduktion, zu einer Immunevasion führen. Zusätzlich blockiert Staphylokokken-Protein A (spA) die Fc-Rezeptoren von Antikörpern (Cedergren et al. 1993) und vermittelt dadurch einen antiphagozytären Effekt, der durch die Zerstörung von Phagozyten durch Leukozidine (PVLs) verstärkt wird. Kollagenasen, Lipasen, Hyaluronidasen und Fibrinolysine führen durch Aufspaltung extrazellulärer Matrix zur Gewebszerstörung und weiterer Invasion. Verschiedenste Toxine sind ursächlich für Durchfälle, das Toxic-Shock-Syndrom oder das Staphylococcal-Scalded-Skin-Syndrom.

Genauere Analysen des *Staph. aureus* Biofilms zeigen einen mehrschichtigen Aufbau umhüllt von einer Glykokalyx oder einer Schleimschicht (Archer et al. 2011). Die Hauptkomponenten sind zu 80% Teichonsäuren, Staphylokokken- und Wirtsproteine. Die komplexe Regulierung erfolgt über den *ica*-Genlocus und dessen Genprodukt polysaccharide intercellular adhesin (PIA), eDNA und die *sigB*, *agr*, *sarA* und *sae* Gen-loci (Archer et al. 2011) (Montanaro, Speziale et al. 2011).

2.3.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis, ein Koagulase-negativer, Biofilm bildender Keim, ist Teil der physiologischen Hautflora. Diese Kolonisation schützt vor virulenteren Erregern, moduliert das menschliche Immunsystem und reduziert beispielsweise das Risiko einer Atopischen Dermatitis (Brown, Clarke 2017). Ein großer Unterschied zu SA besteht in der Abwesenheit aggressiver Virulenzfaktoren wie Invasinen (Zimmerli et al. 2004), mit Ausnahme von phenol-soluble modulins (PSMs), moderat zytolytische Toxine. Massey et al. (Massey et al. 2006) postulieren einen evolutionären Vorteil durch die mit der niedrigen Virulenz einhergehende verbreitete Kolonisierung. Als einer der Haupterreger fremdkörperassoziierter Infektionen ruft *Staph. epidermidis* sub-akute Infektionen vor allem in immungeschwächten Patienten hervor (Sabaté Brescó et al. 2017). Prädisponierende Faktoren sind z.B. Diabetes mellitus, Alkoholismus, hohes Alter, eine Glukokortikoidtherapie oder eine Immunstörung wie AIDS (Walter et al. 2012). Trotz geringer Virulenz sind *Staph. epidermidis*-low-grade Infekte oft therapierefraktär, was Otto (Otto 2009) auf Exopolymere, die vor Erkennung durch Antikörper schützen, und einer schwächeren Immunantwort durch die vorangegangene Kolonisierung zurückführt. Zusätzlich attenuiert *Staph. epidermidis* in Biofilmstadien das angeborene Immunsystem, insbesondere die Phagozyten und Leukozyten, und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (Nguyen et al. 2017). Resistenzen gegenüber Antibiotika, insbesondere Methicillin sind bei *Staph. epidermidis* mit einer Rate 75-90%, sogar noch höher als bei *Staph. aureus* (Diekema et al. 2001). Durch Übertritt ins Blut können diese Erreger lebensgefährliche Sepsen auslösen. Dies könnte durch PSM bewirkt werden, pro-inflammatorische Toxine, die eine Ablösung einzelner Erreger des Biofilms begünstigen (Otto 2013) und zytolytisch gegen Neutrophile wirken (Cheung et al. 2010).

Obwohl Aufbau und Regulation der Biofilme von *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis* in weiten Teilen sehr ähnlich sind, gibt es funktionale Unterschiede, sodass nicht alle Beobachtungen übertragen werden können (Büttner et al. 2015). Auch der Biofilm von *Staph. epidermidis* exprimiert spezifische Adhesine für Oberflächen wie PIA, welches auch die Biofilmmreifung fördert, das accumulation-associated protein (Aap) (Le et al. 2018), die häufigen Autolysine AtlE- und Aae-, das biofilm-associated protein (Bap) und Teichonsäuren. Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs), wie die Sdr-Familie oder extracellular matrix binding protein (Embp), wiederum binden spezifisch an Matrixproteine wie Kollagen, Fibrinogen, Fibronectin oder Elastin und fördern die Adhäsion der Erreger (Le et al. 2018). (Otto 2009) (Fey, Olson 2010)

Die Analyse der Biofilmbestandteile und vor allem ihrer Funktion bedarf noch weiterer Forschung.

2.4 bakterieller Einfluss auf Osteoblasten

Trotz der eindeutigen klinischen Relevanz von *Staph. epidermidis* in der Orthopädie konzentrieren sich die meisten Studien über den Einfluss von Bakterien auf Osteoblasten auf *Staph. aureus*. Der nächste Abschnitt gibt einen genaueren Einblick über die ablaufenden osteoblastären molekulare Mechanismen und Reaktionen bei Infektionen.

Relevant für die Pathogenität des *Staph. aureus*-Biofilms insbesondere im Knochen sind Oberflächenstrukturen des *Staph. aureus*, die als pathogen associated molecular pattern (PAMP) zusammengefasst werden. Durch Induktion von Chemokinen und Zytokinen wird das Immunsystem angeregt, was wiederum Osteoklasten aktiviert. Dies und direkte Apoptoseinduktion von Osteoblasten durch *Staph. aureus* führt zu inflammatorischem Knochenschwund (Josse et al. 2015). Ein weiterer Virulenzfaktor von *Staph. aureus* ist seine Fähigkeit über multiple Adhesine (MSCRAMM) an Knochenmatrixproteine zu binden (Heilmann 2011). Eine direkte Bindung findet an Kollagen I, bone sialoprotein, Osteopontin und Fibronectin statt. Das Kollagen-Adhesin (Cna) wird stark während des exponentiellen Wachstums exprimiert (Gillaspay et al. 1997) und Cna-positive Stämme sind oft mit Biofilmbildung assoziiert (Montanaro, Arciola et al. 1999). Manche *Staph. aureus*-Stämme exprimieren auch spezifische Bindungsproteine für Osteopontin (sog. MAP, ein Protein analog zu MHC II Molekülen) oder bone sialoprotein (sog. bone sialoprotein binding protein bbp) (RYDÉN et al. 1989). Fibronectin verbindet Osteoblasten über das $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin. *Staph. aureus* kann durch zwei Proteine, den fibronectin binding protein A und B (FnBP A/B), an Fibronectin binden und über diese ‚Brücke‘ von Osteoblasten internalisiert werden (Kintarak et al. 2004). Insbesondere in multiresistenten Stämmen lassen sich vermehrt diese Gene finden. Ein Risikofaktor für eine intrazelluläre Persistenz der Erreger ist ihr Phänotyp als SCV. Dieser langsam wachsende Phänotyp mit atypischer Kolonie Morphologie ist resistenter gegenüber Antibiotika und kann länger intrazellulär persistieren (Proctor et al. 2006). Die Umwandlung in SCVs geht mit einer Hochregulation von Adhesinen und einer Herunterregulation von Toxinen einher (Tuchscher, Löffler 2016).

Des Weiteren kann spA über TNFR-1 an Osteoblasten binden, die Proliferationsrate senken und Apoptose auslösen. spA beeinflusst auch die Mineralisierung, durch Hemmung von Phosphat und Calcium Ablagerung (Chen et al. 2014), und induziert eine höhere Expression

von RANKL, der Osteoklasten aktiviert (Claro et al. 2011). Analoge Reaktionen und eine Verminderung der AP-Aktivität wurden von *Jin et al.* auch für das Exotoxin PVL und das Enzym Staphylocoagulase (Coa) festgestellt (Jin et al. 2013). Eine Infektion mit *Staph. aureus* führt zu einer geringeren Produktion der Matrixproteine wie Kollagen I, Osteocalcin, Osteopontin und Osteonectin. Laut *Widaa et al.* könnte spA durch molekulares Mimikry von TNF α an TNFR-1 binden und so Apoptose und eine Hemmung der osteogenen Proliferation und Differenzierung auslösen (Widaa et al. 2012).

Eine zunächst konträr klingende Beobachtung konnten *Somayaji et al.* machen: Titaniumlegierungen, die mit toten Bakterien beschichtet waren, induzierten eine stärkere osteoblastäre Adhäsion, Differenzierung und Mineralisierung im Vergleich mit Fibronectin beschichteten Titaniumplatten (Somayaji et al. 2010).

Interessant ist, dass Effekte für Biofilmmatrix ohne Bakterien ähnlich ausfallen. Obwohl dadurch Virulenzfaktoren wie Internalisierung oder direkte Adhäsion wegfallen, reduzierten lösliche Biofilmfaktoren die Zellviabilität (teilweise durch Apoptoseinduktion) und verminderten das Differenzierungspotenzial von MSCs und Osteoblasten. Zudem zeigte sich eine vermehrte Expression von RANK-L, was auf eine vermehrte Knochenresorption schließen lässt. (Ward et al. 2015) (Sanchez et al. 2013)

3 Material und Methoden

In dieser *in vitro* Arbeit wurde der Einfluss von Stoffwechselprodukten im Biofilm relevanter Erreger auf menschliche Knochenzellen getestet. Staphylokokken sind mit 78% die häufigsten Erreger von Osteomyelitiden und Implantat-assoziierten Infektionen (Campoccia et al. 2006). Die Biofilmbildner *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* sind mit 34% und 32% die beiden häufigsten Arten. Im folgenden Kapitel werden Material und Methoden beschrieben und erläutert. Es wurde stets konform der laborinternen Protokolle gearbeitet.

3.1 Kits, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

TAB. 3.1 verwendete Kits

Kit	Hersteller	Bestellnr.
CyQUANT™ Cell Proliferation Assay Kit	Invitrogen	C7026
BCA™ Protein Assay Kit	Fisher Scientific	23225
QuantiTect Reverse Transcription	Qiagen	205313
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74134
TaqMan Universal PCR Master Mix	qApplied Biosystem	4352042
Ancillary Reagent Kit 2	R&D-Systems	DY008
Duo Set Human Osteopontin	R&D-Systems	DY1433

TAB. 3.2 verwendete Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Bestellnr.
Acryl Aqua Clean	WAK	09-WAK-AQA-250-50L
Alizarin Red S	Sigma	A5533
Aqua dest. (steril)	B. Braun	387875
Columbia Blutagar mit 5% Schafsblut	BD	PA-254005.06
Dexamethason	Sigma-Aldrich	D8893
DMEM- Ca ²⁺ frei	Pan Biotech	P04-01501
DMEM- mit Ca ²⁺	Sigma-Aldrich	D5546
Dulbecco's PBS	Sigma-Aldrich	D8537
Eisessig		
Ethanol für Molekularbiologie	Merck Millipore	10693081
Fetales Rinderserum (FCS)	Biochrom	S0115
HCL 1M	Merck	1.09057.
HEPES Puffer Lösung	Sigma-Aldrich	83264
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich	A92902
L-Glutamin 200mM	Sigma-Aldrich	59292C
MEM Vitamin Solution	Sigma-Aldrich	M6895
Methanol	Apotheke MRI	
NaOH 0,1M		
p-Nitrophenol	Sigma-Aldrich	1067980025
Paraformaldehyd		
Tris-HCl 1M pH 7.0	Sigma-Aldrich	T2413
Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100
Trypanblau Lösung	Sigma-Aldrich	T8154
Trypsin-EDTA Lösung	Sigma-Aldrich	T3924
Tryptic Soy Broth (TSB)	BD	BA-257107.03
Wasser Bioscience Grade	Roth	T143
WST-1 Reagenz	Roche	5015944001
Zellysepuffer 2	R&D-Systems	
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M6250

TAB. 3.3 verwendete Materialien

Materialien	Hersteller	Bestellnr.
15ml, 50ml-conical tubes (Cellstar [®])	Greiner Bio-One	188261, 2272611
12x15mm Zellkulturschale	Greiner Bio-One	628160
16x15mm Zellkulturschale	Greiner Bio-One	628 160
6-Well Platte (Cellstar [®])	Greiner Bio-One	657160
48-, 96-Well Platte (Cellstar [®])	Greiner Bio-One	677-, 655 180
EASY Strainer 40 μ m	Greiner Bio-One	542040
MicroAmp [®] Fast 96-Well Reaction Plate 0,1ml	Applied Biosystems	4346907
MicroAmp [®] Optical Adhesive Film	Applied Biosystems	4311971
Parafilm [®] M	Bemis	PM-999
PCR Reaktionsgefäß 0.2ml	Biozym Scientific	711080
QIAshredder	Qiagen	79654
Reaktionsgefäß 0.6ml, 1.6ml, 2.0ml	Biozym Scientific	710308. -204, -280
2,5 μ l, 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Greiner Bio-One	690005, 771261
RNase freie Spitzen		772288, 692069, 750261
5ml, 10ml, 25ml, 50ml Serologische Pipetten	Biozym Scientific	606-, 607-, 760-, 768180
T75-, T175-Zellkulturflasche (Falcon [™])	Fisher Scientific	353078
Thin-Certs [™] Einsätze	Greiner Bio-One	657 641
0,4 μ M 6 Well translucent		

3.2 Zellen und Bakterienstämme

3.2.1 primäre humane Osteoblasten

Primäre humane Osteoblasten (phOB) wurden mit der Explant Methode aus der Spongiosa von, bei Gelenkersatzoperationen gewonnenen Hüftköpfen und teilweise Beckenkämmen, isoliert (Aldinucci et al. 1996). Die Abgabe der Probe erfolgte stets mit vorangegangener Einwilligung des Patienten. Hierüber wurde im Ethikrat votiert und der Antrag angenommen (Nr. 1307/05).

3.2.2 Bakterienstämme

TAB. 3.4 Bakterienstämme

Spezies	Referenzstamm	Hersteller
<i>Staph. aureus</i>	25923	ATCC
<i>Staph. epidermidis</i>	35984	ATCC

3.3 Kulturmedien

3.3.1 Proliferationsmedium

Osteogenes Proliferationsmedium (OPM) ohne osteogenen Zusätze (L-Ascorbinsäure und Dexamethason) wird als Proliferationsmedium (PM) geführt.

TAB. 3.5 Osteogenes Proliferationsmedium

Komponente	Konzentration im Medium
Dexamethason	10nM
DMEM- Ca ²⁺ frei	80%
Fetales Rinderserum	16%
HEPES Pufferlösung	1,6%
L-Ascorbinsäure	1,8µM
L-Glutamin	0,8%
MEM Vitamin solution	0,8%

3.3.2 Assaymedium

Osteogenes Assaymedium (OAM) ohne osteogene Zusätze wird analog zum OPM im Folgenden als Assaymedium (AM) bezeichnet.

TAB. 3.6 Osteogenes Assaymedium

Komponente	Konzentration im Medium
Dexamethason	10nM
DMEM mit Ca ²⁺	80%
Fetales Rinderserum	16%
Hepes Pufferlösung	1,6%
L-Ascorbinsäure	1,8µM
L-Glutamin	0,8%
MEM Vitamin solution	0,8%

3.4 Primer

TAB. 3.7 Primer des TaqMan Gene Expression Assays

Gen	target	Bestellnr.
<i>ALPL</i>	Alkaline Phosphatase	Hs01029144_m1
<i>BGLAP</i>	Osteocalcin bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein	Hs01587814_g1
<i>COL1A1</i>	Collagen Type 1 α 1	Hs00164004_m1
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Hs02758991_g1
<i>RUNX2</i>	Runt-related transcription factor 2	Hs01047973_m1
<i>SPP1</i>	secreted phosphoprotein 1/ Osteopontin/ bone sialoprotein 1	Hs00959010_m1

3.5 Software

Folgende Software in Tabelle 3.8 wurde zur Auswertung, sowie zur Bearbeitung verwendet.

TAB. 3.8 verwendete Software

Software	Hersteller/Entwickler
Axiovision	Carl Zeiss
GraphPad Prism Version 6	GraphPadSoftware, Inc.
ViiA7™Real-time PCR software	Applied biosystems
NanoDrop 2000 software	Thermo Fisher scientific
Microsoft Office 2003	Microsoft
Overleaf V2	WriteLatex Limited

3.6 Geräte

Alle verwendeten Geräte werden in der folgenden Tabelle 3.9 aufgeführt.

3.7 Produktion des Biofilm-konditionierten Mediums

Es wurde AM mit einer Bakterienkultur so co-kultiviert, dass Stoffwechselprodukte bis zu $0,4\mu\text{m}$ hindurch diffundieren konnten. Die Basis für das Biofilm-konditionierten Medium (BCM) stellt das AM dar. Zusätzlich benötigte Materialien waren Columbia Blutagar mit 5% Schafsblut zur Inokulation der Bakterien, sowie TSB Medium zum Anzüchten der Vorkultur. Die Herstellung des TSB Mediums erfolgte durch Mischen der folgenden Komponenten:

TAB. 3.10 TSB Medium

Komponenten	Volumen/Gewicht
Aqua dest.	1000ml
TSB	30g

Für die Produktion des BCMs wurde für *Staph. aureus* und für *Staph. epidermidis* das identische Protokoll mit jeweils einer anderen optischen Dichte (OD) befolgt.

Inokulation Columbia Blutagar wurde mit dem entsprechenden Keim beimpft und für 24h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Mit einer Impföse wurden 4 Einzelkolonien von der Agarplatte gelöst, in

TAB. 3.9 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
ARPEGE 75	Air Liquid Deutschland GmbH
Axiovert 25 Mikroskop	Carl Zeiss
Biophotometer 6131	Eppendorf AG
Captair® Biocap PC Workstation	Erlab
Fluoroscan Ascent FL	Thermo Fischer Scientific
FormaTM 900 series	Thermo Fischer Scientific
HERAFreeze BASIC	Thermo Fischer Scientific
Heracell 150 Incubator	Thermo Fischer Scientific
Hera Safe HS 12 sterile work bench	Kendro Laboratory Products
Herasafe KS 12 sterile work bench	Thermo Fischer Scientific,
Lab Dancer Test Tube Shaker	IKA Labortechnik
Microplate Centrifuge, PCR Plate Spinner	Peqlab Biotechnologie GmbH – jetzt VWR international
Minispin Plus	Eppendorf
Multiscan Ascent	Thermo Fischer Scientific
Nanodrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Fischer Scientific
Neubauer Hämocytometer	Marienfeld Laborglaswaren
Observer Z1 Mikroskop	Carl Zeiss
PCR Express Thermal Cycler	Thermo Fischer Scientific
inoLab pH Level 1	Wissenschaftliche technische Werkstätten
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Thermocycler	Eppendorf AG
Thermomixer	Eppendorf AG
TR 60	Air Liquid Deutschland GmbH
Wasserbad Grant-Sub Type 14	Grant Instruments
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf AG
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG
Zytostatika-Werkbank	Bermer International GmbH

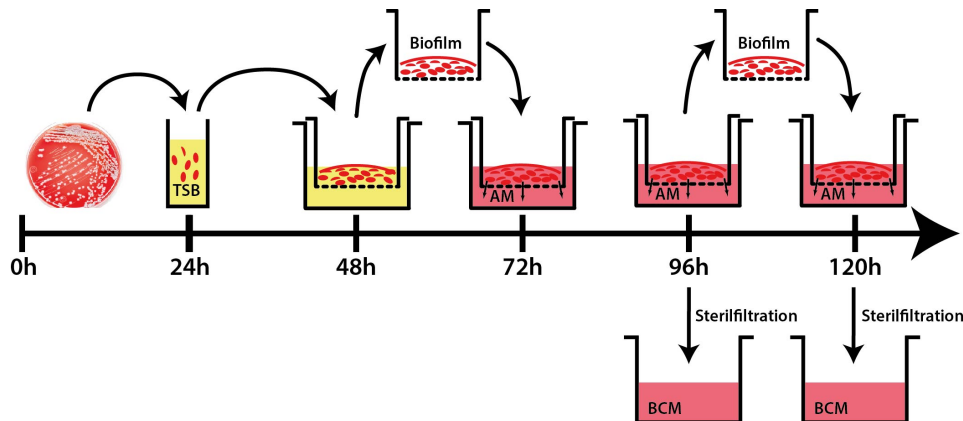


ABB. 3.1 Biofilmherstellung

2ml TSB Medium eingerührt, vermischt und für 1h bei 37 °C mit 350rpm inkubiert.

Vorkultur 200µl dieser Vorkultur wurden in 5ml TSB suspendiert und dynamisch mit 350rpm, bei 37 °C für 3,5-4h inkubiert. Nach der Ermittlung der exponentiellen Wachstumsphase von 2-3 mittels OD₆₀₀ Messung am Biophotometer wurde die Bakteriensuspension auf die entsprechende OD für die Arbeitssuspension (*Staph. aureus*: 0,4; *Staph. epidermidis*: 0,2) verdünnt.

Anzucht Die Anzucht des Biofilms erfolgte in 6-Well Platten (A). Hierfür wurden pro Well 3ml TSB vorgelegt, Thin Cert Well Einsätze eingehängt, mit 2ml der jeweiligen Arbeitssuspension befüllt und 24h bei 37 °C inkubiert.

Medienwechsel Nach der Inkubationszeit bildete sich ein sichtbarer Biofilm auf der Suspension. Ohne den Biofilm zu beschädigen, wurde die Arbeitssuspension abgesaugt und das Thin Cert in eine neue Platte (B), in der pro Well 3 ml AM vorgelegt war, überführt. Nach Zugabe von 2 ml AM in das Thin Cert wurde 24h bei 37 °C inkubiert.

Abnahme des Biofilm-konditionierten Mediums In eine 6-Well Platte (C) wurden 3ml AM vorgelegt, die Thin Certs mit einer sterilen Pinzette überführt und 24h bei 37 °C inkubiert. Die erste Abnahme des BCM erfolgte aus den Platten B. Das BCM wurde abgenommen, steril filtriert und bis zur nächsten BCM-Abnahme bei 4 °C gelagert. Nach 24h wurden die Thin Certs aus den Platten C entfernt, das BCM abgenommen, steril filtriert und mit dem BCM des

Vortages gepoolt. Der pH wurde geprüft und das restliche BCM bei -20°C aliquotiert gelagert.

Herstellung der Kontrolle Als Kontrolle wurde im Schritt 3.7 gleichzeitig 6-Well Platten (B und C) mit AM ohne Thin Certs angelegt, die analog behandelt wurden. Steril-filtriertes, pH-kontrolliertes und gepooltes AM (Kontrollmedium (KO)) wurde bei -20°C eingefroren.

Vorbereitung BCM Eingefrorenes, gepooltes BCM und die entsprechende Menge KO wurden im Wasserbad aufgetaut, in ventilierte Zellkulturflaschen gefüllt und für 24h bei 37°C , 5% CO_2 , 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert um den pH-Wert auszugleichen. Anschließend wurde der pH der Lösungen gemessen. BCM50 wurde zu gleichen Teilen aus der KO und BCM100 hergestellt. Zur KO, zu BCM50 und zu BCM100 wurden die entsprechenden Mengen an osteogen Zusätzen (Dexamethason, Ascorbinsäure) hinzugefügt.

3.8 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C , 5% CO_2 , 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Eine Zentrifugation wurde stets, sofern nicht anders beschrieben, für 10min bei 250rpm, 25°C durchgeführt. Alle Arbeiten fanden unter einer sterilen Werkbank statt.

Mittels Explantmethode (Aldinucci et al. 1996) wurden frisch isolierte humane Osteoblasten nach jeweils 2 und 4 Passagen abtrypsiniert und in DMSO-haltigen cell freezing Medium als Stock bei -80°C eingefroren. Pro Versuch wurden phOB neu aufgetaut und kultiviert. Jeweils ein Röhrchen mit ca. 5mio eingefrorenen Zellen wurde auf 0°C aufgetaut und sofort mit 10ml 37°C warmen OPM resuspendiert, sodass das DMSO inaktiviert wurde. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt, bei 250rpm 10min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. In OPM resuspendierte Zellen wurden mit einer Dichte von 8500 Zellen/ cm^2 in T175-Flaschen ausgesät. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen jeweils mindestens 2 Passagen, jedoch mind. 10 Tage kultiviert.

Primäre humane Osteoblasten wurden nach mikroskopischer Beurteilung der Konfluenz und der Zellmorphologie bei ca 80% Konfluenz passagiert, was im Mittel 7 Tage dauerte. Verbrauchtes Medium wurde abgenommen, der Zellrasen mit 5ml PBS gewaschen und anschließend 5min mit 5 ml Trypsin inkubiert. Das Ablösen der adhärenen Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert, das Trypsin inaktiviert und zentrifugiert. Zum Erhalt einer Einzelzellsuspension wurden

die Zellen filtriert ($40\mu\text{m}$) und mit einer Konzentration von $4\text{-}5 \times 10^3$ Zellen/ cm^2 ausgesät.

3.9 Proben und Assays

Das so entstandene BCM wurden in Biofilm-konditioniertes Medium in 50%-iger Konzentration, verdünnt mit KO (BCM50) und Biofilm-konditioniertes Medium in 100%-iger Konzentration (BCM100) aufgeteilt und darin primäre humane Osteoblasten verschiedener Spender für 24h, 72h und teilweise für 6 Tage inkubiert. Analysiert wurde die Stoffwechselaktivität, die Ribonukleinsäure (RNA)-Produktion, die Proteinproduktion und die Mineralisierung im Vergleich zur Referenz. 6 von 8 Patientenzellreihen wurden zwei mal, die restlichen 2 wurden 3 mal in jeweils einer unterschiedlicher Passage untersucht. Zur Versuchsvorbereitung wurden 3 T175 Flaschen à 2mio Zellen und 4 T175 Flaschen à 1,5mio Zellen für 2 Tage in OPM kultiviert. Zellpellets wurden als Proben für Reverse Transkriptase quantitative Real-time PCR (RT-qPCR) und Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) hergestellt.

3.9.1 Genexpressionsanalyse

RNA Gewinnung Das OAM von 24h lang inkubierten phOB wurde gegen jeweils 15ml Kontrollmedium, BCM50 und BCM100 getauscht und die Zellen für 24h respektive 72h inkubiert. Die abtrypsinisierten Zellen wurden als Zellpellets mit einer Zellmenge von $5\text{-}10 \times 10^6$ bei -80°C eingefroren.

RNA Extraktion Aufgetaute Zellpellets wurden in $600\mu\text{l}$ RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol lysiert. Die RNA-Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des RNeasy Kits von QIAGEN (QIAGEN GmbH, 2012). Zur Eluation der RNA wurde $50\mu\text{l}$ RNase freies Wasser hinzugefügt und bei $8000g$ 1 Minute zentrifugiert. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde mittels Nanodrop (ThermoFisher) bestimmt. Als Reinheitsparameter wurden die Quotienten die Ratio der RNA-Konzentration zur Proteinkonzentration ($\text{Ratio } A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,8$) und die Ratio der RNA-Konzentration zu organischen Verbindungen ($\text{Ratio } A_{260}/A_{230} > 1,8$) verwendet.

Reverse Transkription Extrahierte RNA wurde entweder sofort in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert oder bei -80°C gelagert. Die Reverse Transkription erfolgte nach dem Protokoll des QuantiTect Reverse Transcription Kits (QIAGEN GmbH). Jeweils $1\mu\text{g}$ RNA wurde mit Wipeout-Puffer-Lösung von genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) gereinigt.

Nach 2min Inkubation bei 42 °C wurde der Reverse Transkription Mastermix dazugegeben, vermischt und 15min bei 42 °C inkubiert. Um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren wurde 3min bei 95 °C inkubiert. Die cDNA wurde bei –20 °C gelagert oder sofort weiter verarbeitet.

TAB. 3.11 Wipeout Puffer-Lösung

Komponenten	Volumen
gDNA Wipeout Puffer	2 μ l
Template RNA	1 μ g
Aqua dest. (RNase frei)	variabel
Volumen insgesamt	14μl

TAB. 3.12 RT Mastermix

Komponenten	Volumen
Reverse Transcriptase	1 μ l
RT Puffer (5x)	4 μ g
RT Primer Mix	1 μ l

Quantitative Real-time PCR Die quantitative Real-time PCR (qPCR) wurde nach Protokoll des Herstellers für das Applied Biosystems StepOnePlus RealTime PCR System durchgeführt. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als Housekeeping Gen. Zusätzlich zur 3-fachen Ausführung jeder Probe, wurde pro Primer ein Blank (ohne hinzugefügte cDNA) angelegt.

Zu 19 μ l Mastermix pro Well einer 96-Well Platte, wurde je 1 μ l cDNA hinzugefügt. Die Platte wurde versiegelt, im PCR Plate Spinner zentrifugiert und das PCR- Programm gestartet. Die relative Genexpression wurde nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ermittelt.

TAB. 3.13 qPCR Mastermix

Komponenten	Volumen
TaqMan Primer	1 μ l
TaqMan Fast Universal Mastermix	4,4 μ g
RT Primer Mix	1,1 μ l

Bei der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode wird die Expression des Target Gens gegen die Expression des Housekeeping Gens normiert. Ein Housekeeping Gen sollte unter normalen Bedingungen unabhängig vom Gewebetyp, Differenzierungsstadium, Zellzyklus oder externen Signalen

ähnlich hoch in allen Zellen eines Organismus exprimiert werden (Eisenberg, Levanon 2013). Besonders geeignet sind dafür Gene, die für das Überleben einer Zelle notwendig sind. GAPDH katalysiert den sechsten Schritt der Glykolyse und ist so essentiell für den aeroben Stoffwechsel. Desweiteren ist es wichtig für DNA Reparatur und Transkriptionsregulierung. Normalisierung anhand der Housekeeping Gene wird durchgeführt um die Messfehler durch die Variabilität der Proben, der Extraktion, der RNA-Qualität und der Effektivität der cDNA Synthese zu minimieren (Rebouças et al. 2013). Der Wert des *quantification cycle* (Cq) entspricht dem PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmals einen bestimmten Grenzwert überschreitet und die Fluoreszenzkurve exponentiell ansteigt. Zur Normalisierung wurde der Wert des *quantification cycle* der endogenen Kontrolle vom Cq-Wert des Target Gens subtrahiert.

$$\Delta Cq = Cq_{TargetGen} - Cq_{HousekeepingGen}$$

Die Variabilität zwischen den Proben wurden durch Normalisierung gegen die jeweilige Kontrolle (KO) minimiert. Es wurde der Cq-Wert der BCM-Proben vom Cq-Wert der Kontrolle subtrahiert.

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{BCM50/BCM100} - \Delta Cq_{KO}$$

Der relative Expressionsunterschied wurde durch die Formel

$$2^{-\Delta\Delta Cq}$$

berechnet.

3.9.2 WST-1 Assay

Der WST-1 Assay wurde verwendet um die Zellproliferation und Zellviabilität zu messen. Das wasserlösliche stabile Tetrazoliumsalz (WST-1) wird durch komplexe zelluläre Mechanismen, die hauptsächlich von der glykolytischen Produktion von NAD(P)H in lebenden Zellen abhängt, zu löslichem Formazan reduziert. Daher korreliert die Menge an Formazan direkt mit der Zahl der metabolisch aktiven Zellen.

Jeweils 0,5ml von in OAM suspendierten phOB wurden mit einer Dichte von 12×10^3 Zellen/cm² (24h), 10×10^3 Zellen/cm² (72h) und 8×10^3 Zellen/cm² (6d) in 3 Reihen à 7 Wells auf je eine 48-Well Platte ausgesät. Nach 24h wurden die Konfluenz, die Adhärenz, die Vernetzung und die Morphologie der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Das OAM mit je 0,4ml

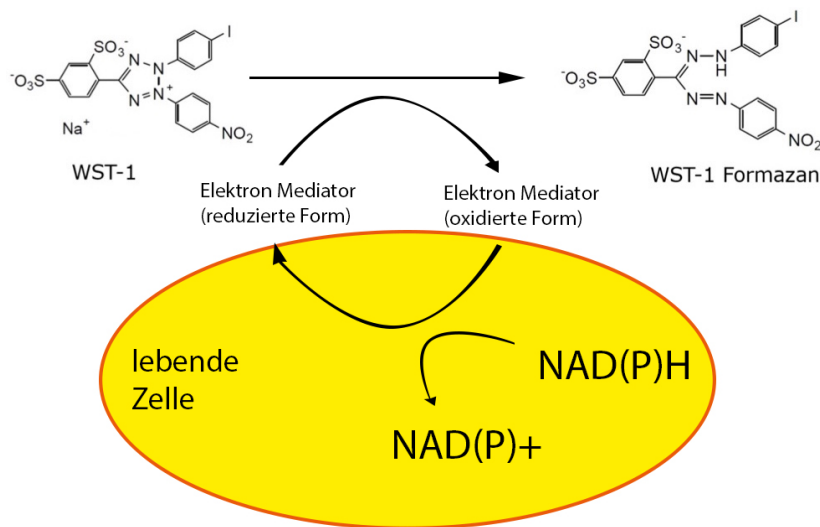


ABB. 3.2 WST-1-Assay nach Immunservice (Immunservice 2019)

KO, BCM50 und BCM100 ersetzt, pro Reihe ein Blank hinzugefügt und für 24h, 72h oder 6d inkubiert.

Pro Well wurde WST-1 Reagenz in 1:10-facher Verdünnung hinzugegeben, für 3h inkubiert und jeweils 100µl in eine 96-Well Platte überführt. Mit einem Photometer wurde die Absorption bei 450nm, sowie bei der Referenzwellenlänge von 620nm, gemessen.

Mittelwerte wurden aus den 7 technischen Replikaten erstellt. Der Mittelwert der Kontrolle (MW_{KO}) wurde auf 100% gesetzt. Die Prozentsätze der Versuchsgruppen (BCM_{rel}) wurden mit der Formel

$$BCM_{rel} = \frac{MW_{BCM50/BCM100}}{MW_{KO}}$$

berechnet.

3.9.3 CyQuant-Assay

Mit dem CyQuant-Zellproliferations-Assay kann durch die direkte Bindung des CyQuant Farbstoffes an Nukleinsäuren und die dadurch deutlich verstärkte Fluoreszenz, der DNA-Gehalt der Probe gemessen werden. In Kombination mit dem WST-1 Assay kann die reine Zellproliferation von metabolischer Aktivität differenziert werden.

Analog zum WST-1-Assay wurden 0,2ml in OAM suspendierte Zellen mit einer Dichte von 6×10^3 Zellen/cm² (24h), 5×10^3 Zellen/cm² (72h) und 4×10^3 Zellen/cm² (6d) in 3 Reihen à

7 Wells auf je eine 96-Well Platte ausgesät.

Nach 24h Adhärenzzeit wurde das OAM mit 0,2ml pro Well KO, BCM50 und BCM100 ersetzt und pro Reihe ein Blank hinzugefügt und für 24h, 72h oder 6d inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Platten auf ein Papiertuch gestürzt. Etwaige Flüssigkeitsrückstände wurden abpipettiert. Die Platten wurden in Parafilm und in Alufolie eingewickelt, um Gefrierbrand zu vermeiden, und bei -80°C für bis zu 4 Wochen eingefroren. Zur Messung wurden die Platten bei RT aufgetaut, je Well 0,2ml CyQuant-Lösung hinzugegeben, für 5min/RT im Dunklen inkubiert und anschließend die Fluoreszenz bei 480nm Exzitation und 520nm Emission im Fluorometer gemessen.

TAB. 3.14 CyQUANT Arbeitslösung

Komponenten	Volumen
Aqua dest. (Nuklease frei)	19ml
Zellyse Puffer (20x)	1ml
CyQUANT [®] GR dye	50 μ l

3.9.4 Mineralisierungsassay

Unterschiedliches Verhalten der Mineralisierung wurden mit der Alizarin red s Färbung untersucht. Alizarin red s (AzHNa) ist ein schwer lösliches Salz, das an Calciumionen bindet und so Hydroxylapatitstrukturen anfärbt. Die chemische Reaktion (Misra 1992) lautet:



Pro Patient werden auf zwei 48-Well Platten vier mal phOB mit einer Konzentration von 30000 Zellen/Well ausgesät. Bei Konfluenz wird das PM durch 0,4ml/Well KO, BCM50, BCM100 mit osteogenen Zusätzen und β -Glycerophosphat ersetzt. Für 4-6 Wochen erfolgt jede Woche ein Medienwechsel.

1g Alizarin red s Pulver (Sigma) wurde in 50ml Aqua dest. gelöst. Nach 24h wird die Lösung filtriert und mit HCL 0,01M oder NaOH 0,1M auf einen pH von 4,1-4,3 eingestellt. Zum Herauslösen der Zellen wurden 20ml Methanol mit 10ml Eisessig und 70ml Aqua dest.

vermischt.

TAB. 3.15 Alizarin red s Färbung

2x Waschen der Wells mit PBS	
Fixierung mit PFA 4%	10min
Spülung mit Aqua dest.	
Lufttrocknung	
Färbung mit 0,5% Alizarinlösung	15min
Spülung mit Aqua dest.	
Lufttrocknung	
Herauslösen der Zellen	15min
Messung der Extinktion bei 450nm	

3.10 Statistische Analyse

Die Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc.). Graphiken von WST, CyQuant und Genexpressionsanalyse zeigen Box-Whisker-Plots mit Antennen von der 5. bis zur 95.- Perzentile. Mit einem Einstichproben t-test mit einem Konfidenzintervall von 95% wurde gegen die jeweilige Nullhypothese getestet:

- a) WST $H_0 = 100\%$
- b) CyQuant $H_0 = 100\%$
- c) Genexpression $H_0 = 1$
- d) ELISA $H_0 = 100\%$

Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden durch einen gepaarten t-Test und einer zweifachen Varianzanalyse (Faktor 1: Zeit, Faktor 2: Konzentration) untersucht. Ein p-Wert von $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen. Signifikanzen wurden in den Graphen als Sterne dargestellt.

Symbol	Bedeutung
ns.	$p > 0.05$
*	$p \leq 0.05$
**	$p \leq 0.01$
***	$p \leq 0.001$

4 Ergebnisse

Das Alter der Zellspender reichte von 36 bis 67 Jahren. Der Median betrug 58 Jahre. 62,5% waren weiblich und 37,5% männlich. Risikofaktoren für Osteomyelitis, wie Alkohol- und Nikotinabusus, Diabetes Mellitus oder Body-Mass-Index lagen teilweise vor.

TAB. 4.1 Patientendaten der Zellspender

Name	Code	Geschlecht	Alter	Raucher	Ethanol
A	5	w	38	nein	k.A.
B	6	w	36	k.A.	k.A.
C	16	m	66	nein	0g
D	22	w	45	k.A.	k.A.
E	58	m	59	nein	15g
F	66	m	65	nein	k.A.
G	71	w	67	ja	30g
H	73	w	58	ja	0g

4.1 pH

Ein optimaler pH in der Zellkultur liegt zwischen 7,2 und 7,4 (Neumann 1995). In unseren Experimenten lag bei *Staph. aureus* der pH der KO bei $7,74 \pm 0,09$ und der des BCMs bei $7,6 \pm 0,13$. Bei *Staph. epidermidis* lag der pH der KO bei $7,8 \pm 0,13$ und der des BCMs bei $7,6 \pm 0,07$. Damit lag der pH des BCM um 0,2 näher am Optimum, als der der KO. Dies zeigte sich auch in einer Signifikanz im Einstichproben t-Test, wobei der *p*-Wert bei *Staph. aureus* bei $p = 0.0376$ und bei *Staph. epidermidis* bei $p < 0.0001$ lag.

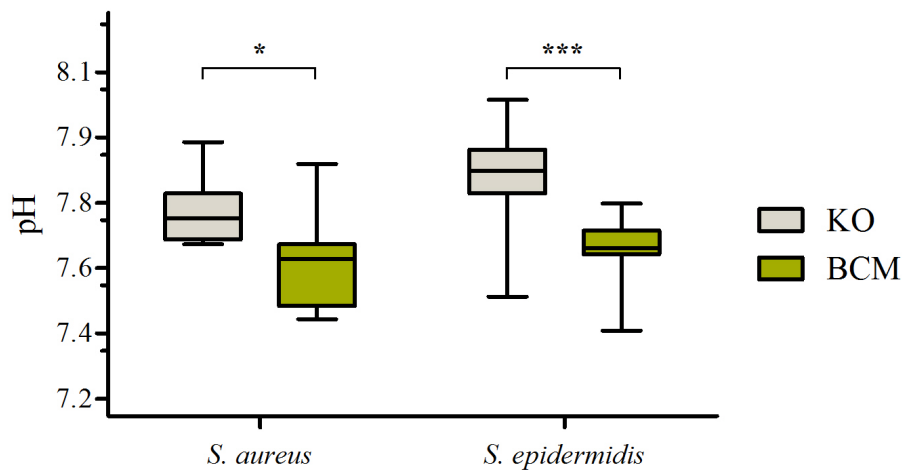


ABB. 4.1 Vergleich der pH Werte der KO und des BCM

4.2 Metabolische Aktivität

Metabolische Aktivität wurde mit Hilfe des WST-1 Assays gemessen. Wie in Abschnitt 3.9.2 dargestellt, wurde für *Staph. aureus* jeder Patient einmal (à 6 technische Replikate) und für *Staph. epidermidis* jeder Patient 2-3 mal (à 7 technische Replikate) untersucht und die Werte gemittelt. Jeder Ansatz enthielt eine Kontroll-, eine BCM50- und eine BCM100- Reihe. Werte der KO wurden auf 100% festgesetzt und die Versuchsgruppen dazu in Relation gesetzt.

4.2.1 *S. aureus*

Nach Inkubation mit BCM50 für 24h zeigte sich ein Rückgang der metabolischen Aktivität auf $75 \pm 23\%$ ($p = 0.0174$), der sich nach 72h auf $57 \pm 30\%$ ($p = 0.0053$) erniedrigte. Nach Inkubation mit BCM100 zeigten sich ähnliche, nur stärker ausgeprägte Reaktionen. Die metabolische Aktivität fiel auf $49 \pm 32\%$ (24h, $p = 0.0026$) und $26 \pm 21\%$ (72h, $p \leq 0.0001$) ab. Vergleicht man wie in Abbildung 4.2b den Einfluss der Inkubationszeiten zeigt sich nur bei BCM100 ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeiten ($p = 0.0434$). Dagegen zeigt sich bei beiden Zeitpunkten ein signifikanter Einfluss der Konzentration (24h: $p = 0.0161$, 72h: $p = 0.0152$).

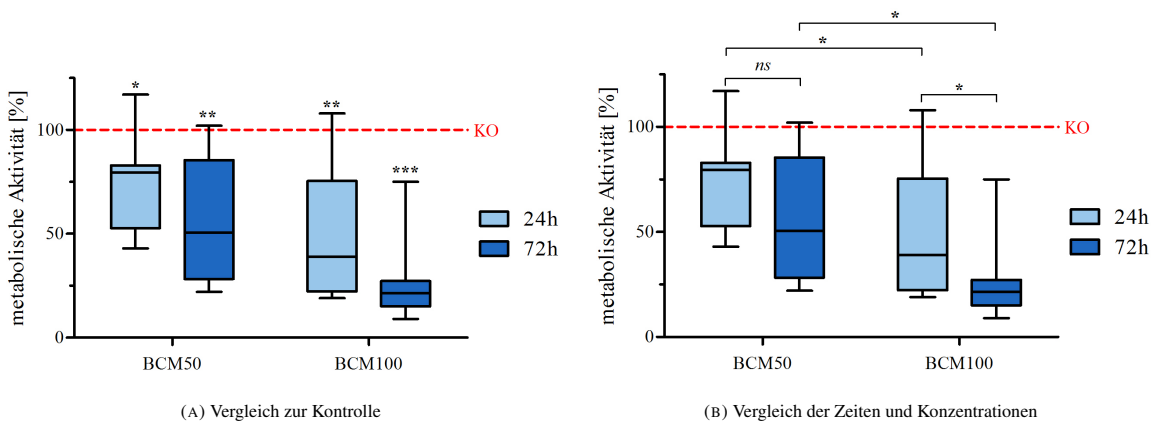


ABB. 4.2 Vergleich des WST-1-Assays von *S. aureus* mit (a) der Kontrolle und (b) der Zeiten und Konzentrationen, N = 8, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

4.2.2 *Staphylococcus epidermidis*

Bei BCM von *Staph. epidermidis* zeigte sich analog zum *Staph. aureus*, jedoch später, ein signifikanter Rückgang der metabolischen Aktivität. Nach 24h zeigte sich die metabolische Aktivität bei $98 \pm 14\%$ (BCM50, $p = 0.5342$) und $85 \pm 30\%$ (BCM100, $p = 0.0508$) und fiel nach 72h auf $60 \pm 19\%$ (BCM50, $p \leq 0.0001$) und $38 \pm 18\%$ (BCM100, $p \leq 0.0001$) ab. Als Zusatzparameter wurde hier die metabolische Aktivität nach 6 Tagen bestimmt. Hier war ein Abfall auf $49 \pm 7\%$ (BCM50, $p \leq 0.0001$) und auf $21 \pm 14\%$ ($p \leq 0.0001$) zu erkennen. Wird der Einfluss der Inkubationszeit wie in Abbildung 4.3b betrachtet findet man bei beiden Konzentrationen einen signifikanten Unterschied zwischen 24h und 72h (BCM50: $p = 0.0005$, BCM100 $p = 0.0001$). Auch die Konzentrationen zeigten sich nach 72h als signifikante Einflussgröße (72h: $p = 0.0036$).

4.2.3 Vergleich von *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis*

Wie in Abbildung 4.4 ersichtlich sinkt bei beiden Keimen die metabolische Aktivität mit zunehmender Konzentration und Inkubationsdauer. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis* gibt es nach 24h ($p < 0.05$) bei BCM50 und BCM100. Nach 72h sind die Unterschiede in der Reduktion der metabolischen Aktivität nicht mehr signifikant.

4 Ergebnisse

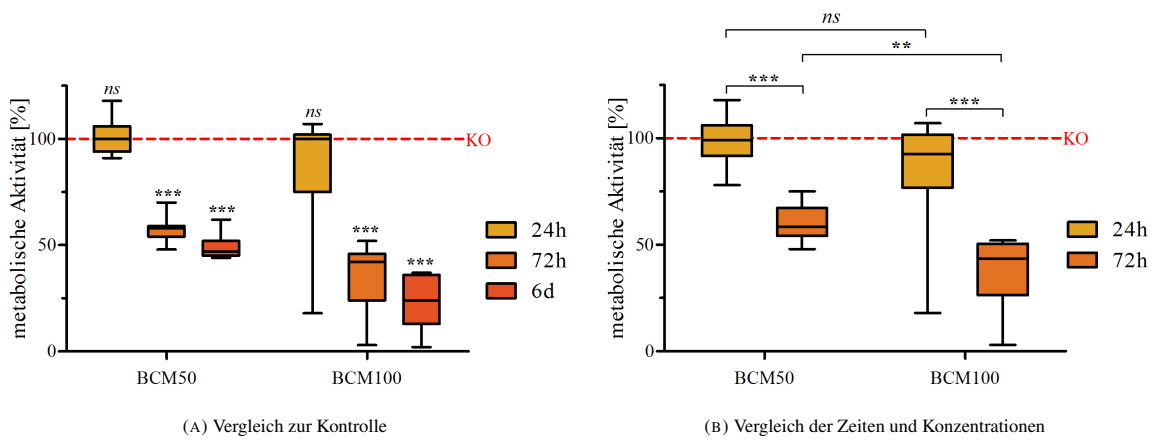


ABB. 4.3 Vergleich des WST-1-Assays von *S. epidermidis* mit (a) der Kontrolle (N = 7) und (b) der Zeiten und Konzentrationen (N = 8), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

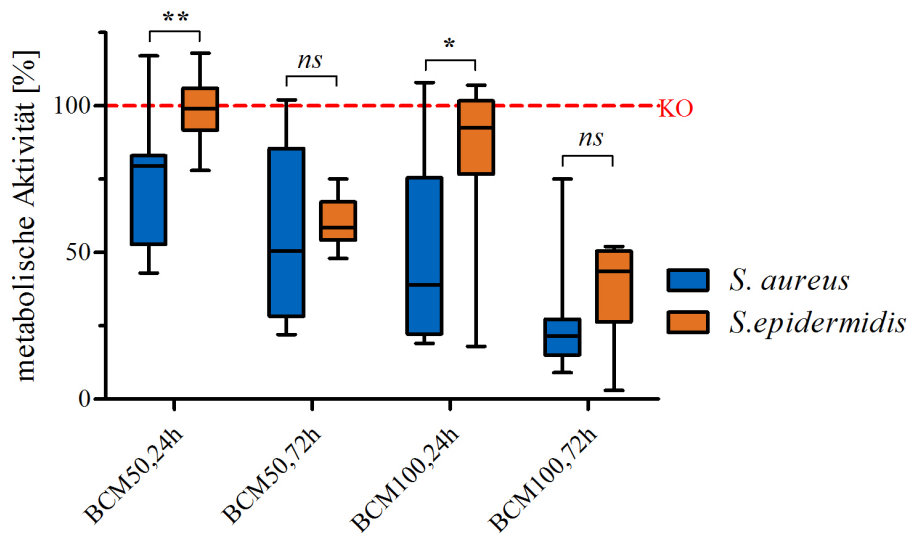


ABB. 4.4 WST-1-Assays von *Staph. aureus* und von *Staph. epidermidis* im Vergleich, N = 8, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

4.3 CyQuant

Die Proliferation der Zellen wurde indirekt anhand der DNA-Menge mit dem CyQuant bestimmt. Analog zum WST wurden pro Patient und Keim 1-3 Versuche durchgeführt, deren

Werte gemittelt wurden. Die Werte von BCM100 und BCM50 wurden zu ihrer jeweiligen Kontrolle ($\hat{=}$ 100%) in Relation gesetzt.

4.3.1 *Staph. aureus*

Im CyQuant zeigte sich für *Staph. aureus* nach Inkubation mit BCM50 nach 24h ein signifikanter Abfall der DNA-Menge auf $80 \pm 13\%$ ($p = 0.0038$) und nach 72h auf $74 \pm 11\%$ ($p = 0.0003$). Bei Inkubation mit BCM100 fiel die DNA-Menge nach 24h auf $60 \pm 18\%$ ($p = 0.0005$) und nach 72h auf $46 \pm 22\%$ ($p = 0.0002$). Vergleicht man die Inkubationszeiten miteinander zeigt sich nur bei BCM100 ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden ($p = 0.0355$). Im Vergleich der Konzentrationen (24h vs. 72h) fällt dort ein signifikanter Einfluss auf (BCM50: $p = 0.0188$ und BCM100: $p = 0.0060$).

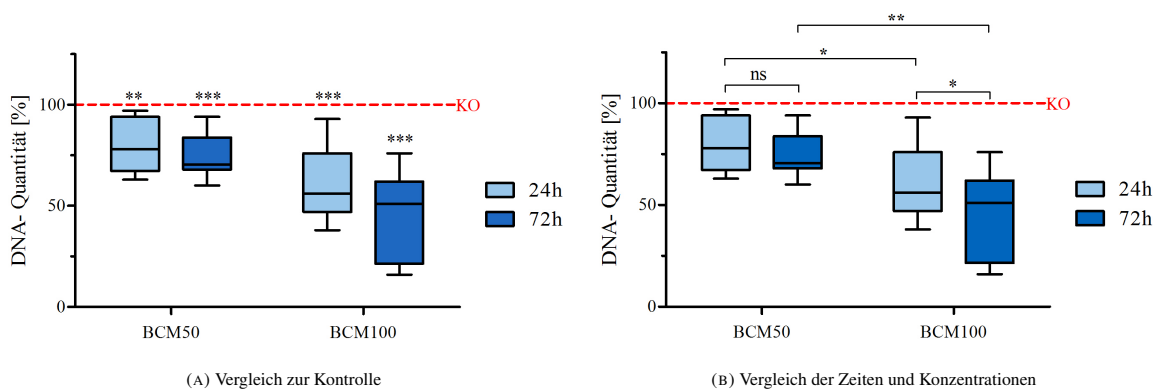


ABB. 4.5 Vergleich des CyQuant-Assays von *S. aureus* mit (a) der Kontrolle und (b) der Zeiten und Konzentrationen, N = 8, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

4.3.2 *Staph. epidermidis*

Analog wie bei *Staph. aureus* fiel auch die DNA-Menge nach Inkubation mit *Staph. epidermidis* signifikant ab. Bei Inkubation mit BCM50 wurde ein Abfall auf die Werte $94 \pm 6\%$ (24h, $p = 0.0438$), $73 \pm 7\%$ (72h, $p < 0.0001$) und $67 \pm 16\%$ (6d, $p = 0.0018$) gemessen. Bei BCM100 zeigten sich Werte von $66 \pm 19\%$ (24h, $p = 0.0013$), $40 \pm 17\%$ (72h, $p < 0.0001$) und $33 \pm 18\%$ (6d, $p < 0.0001$). Im Vergleich der Inkubationszeiten wie in Abbildung 4.6b fallen hier signifikante Unterschiede zwischen 24h und 72h auf (BCM50: $p = 0.0002$, BCM100: $p <$

0.0001). Betrachtet man die Konzentrationen zeigen sich auch hier signifikante Unterschiede zwischen BCM50 und BCM100 (24h: $p = 0.0015$, 72h: $p = 0.0003$).

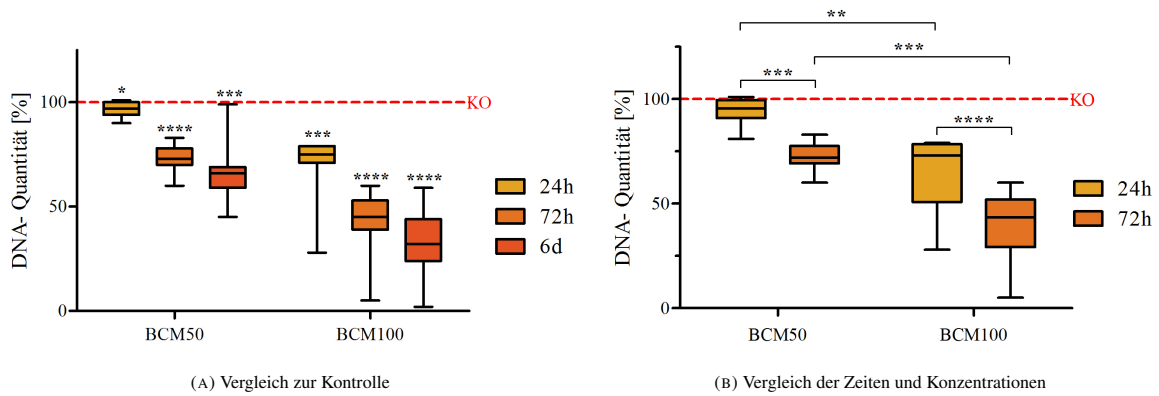


ABB. 4.6 Vergleich des CyQuant-Assays von *S. epidermidis* mit (a) der Kontrolle (N = 7) und (b) der Zeiten und Konzentrationen (N = 8), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

4.3.3 Vergleich von *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis*

Die Abbildung 4.7 zeigt den Vergleich zwischen *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis*. Hier zeigten sich nur bei BCM50,24h ein signifikanter Unterschied ($p = 0.0163$) in der DNA-Menge unter dem Einfluss der beiden Keime.

4.4 Genexpression: osteogene Differenzierung

PhOB von acht Patienten wurden jeweils für 24h und 72h mit BCM von *Staph. epidermidis* und von *Staph. aureus* in 100%-iger und 50%-iger Konzentration inkubiert. Expressionslevel in Genen der osteogenen Differenzierung wurden mittels qPCR gemessen, gegen *GAPDH* normalisiert und mittels $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode zur Kontrolle relativiert. Die verschiedenen Patienten zeigten zum Teil eine sehr unterschiedliche Ergebnisse mit teilweise gegenläufiger Expression. Alle im Folgenden gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte aller Patienten. Die Tabellen 4.2 und 4.3 zeigen die einzelnen Werte der nachfolgenden Abbildungen mit Standardabweichung. Signifikante Ergebnisse im Einstichproben-t-Test wurden dort fett markiert und in den Abbildungen mit entsprechenden Sternchen markiert.

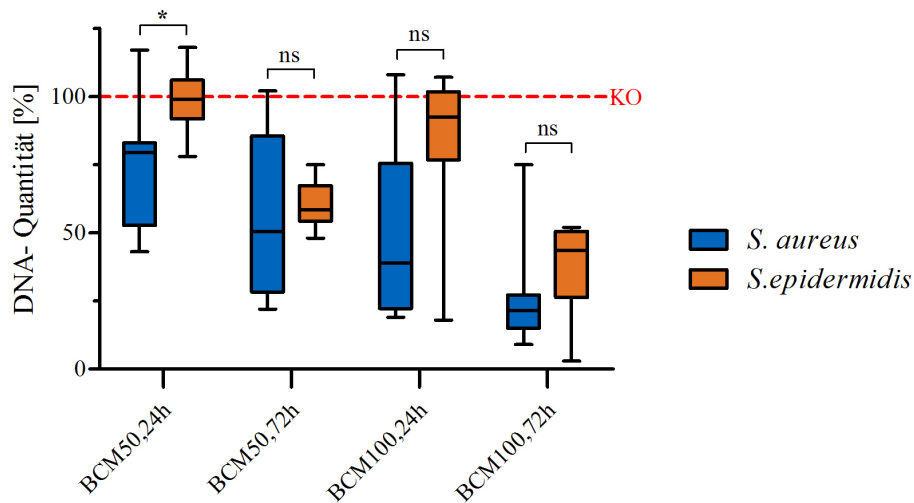


ABB. 4.7 CyQuant von *Staph. epidermidis* und von *Staph. aureus* im Vergleich, N = 8, * $p \leq 0.05$

4.4.1 *Staph. aureus*

Wie in Tabelle 4.2 ersichtlich, zeigte sich bei Inkubation mit BCM von *Staph. aureus* ein signifikanter Anstieg der Expressionslevel des Transkriptionsfaktors *RUNX2* (2-fach, BCM50,24h, $p = 0.0196$ und 1,9-fach, BCM100,24h, $p = 0.0056$) und des *SPP1*-Gens (6-fach, BCM100,72h, $p = 0.0292$). Ein signifikanter Abfall wurde bei *BGLAP* (0,3-fach, BCM50,72h, $p = 0.0002$) und *COL1A1* (0,6-fach, BCM50,72h, $p = 0.008$ und 0,5-fach, BCM100,72h, $p = 0.0004$) beobachtet.

Die Expression von *ALP* änderte sich nicht signifikant. Nicht signifikant über das 1,5-fache hochreguliert wurden *RUNX2* (1,5-fach, BCM100,72h) und *SPP1* (2-fach, BCM50,24h; 2,7-fach BCM50,72h und 1,9-fach BCM100,24h). Nicht signifikant auf unter das 0,75-fache herunterreguliert wurde *BGLAP* mit auf das 0,7-fache nach 24h und das 0,6-fache nach 72h bei BCM100.

4.4.2 *Staph. epidermidis*

Bei der Inkubation mit BCM von *Staph. epidermidis* dagegen zeigte sich nur die *ALP* nach 72h auf das 0,7-fache (BCM50, $p = 0.0282$) und auf das 0,5-fache (BCM100, $p = 0.0004$) signifikant herunterreguliert, wie in Tabelle 4.3 dargestellt.

Ein nicht signifikanter Anstieg auf das über 1,5-fache zeigte sich bei *BGLAP* in allen

4 Ergebnisse

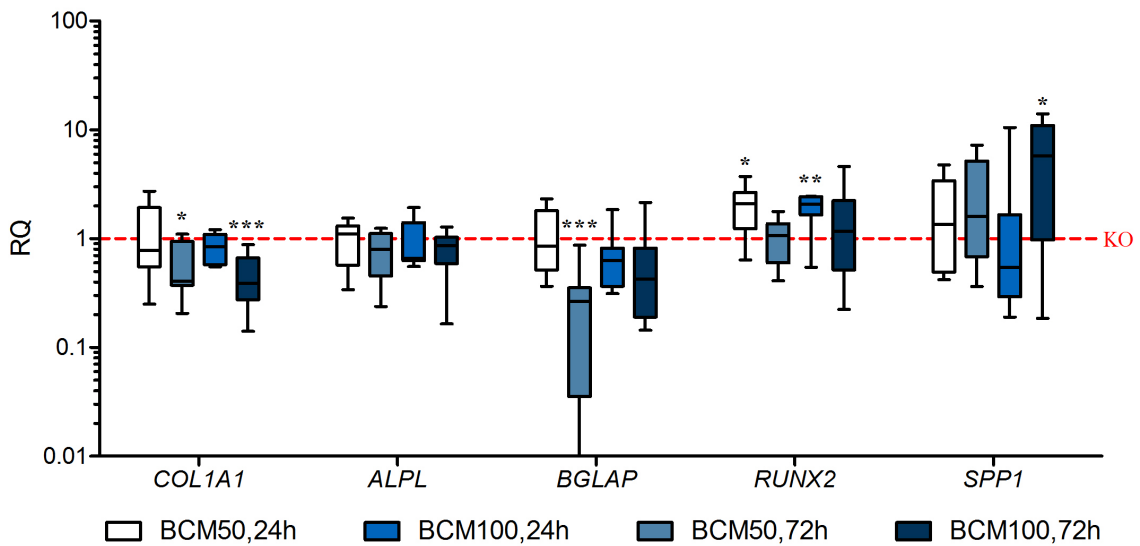


ABB. 4.8 Genexpression von *Staph. aureus* im Überblick, N = 8, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

TAB. 4.2 PCR-Ergebnisse von *Staph. aureus*: Mittelwerte \pm SD, fett $\hat{=}$ signifikant

Gen	BCM50,24h	SD	BCM50,72h	SD
<i>RUNX2</i>	2.028 \pm 0.9656		1.014 \pm 0.4621	
<i>ALP</i>	0.985 \pm 0.4282		0.7695 \pm 0.3605	
<i>BGLAP</i>	1.074 \pm 0.7266		0.2729 \pm 0.2807	
<i>SPP1</i>	1.951 \pm 1.650		2.739 \pm 2.578	
<i>COL1A1</i>	1.104 \pm 0.8921		0.5723 \pm 0.3304	
	BCM100,24h	SD	BCM100,72h	SD
<i>RUNX2</i>	1.92 \pm 0.6614		1.582 \pm 1.429	
<i>ALP</i>	0.9535 \pm 0.5123		0.799 \pm 0.3393	
<i>BGLAP</i>	0.7307 \pm 0.4986		0.6477 \pm 0.6528	
<i>SPP1</i>	1.949 \pm 3.502		6.085 \pm 5.264	
<i>COL1A1</i>	0.8451 \pm 0.2622		0.4502 \pm 0.2444	

Ansätzen (1,8-fach, BCM50,24h; 1,7-fach, BCM50,72h; 2,2-fach, BCM100,24h und 2,4-fach, BCM100,72h). Auch *COL1A1* zeigte einen Expressionsanstieg auf das 1,5-fache (BCM50,72h) und 1,6-fache (BCM100,24h).

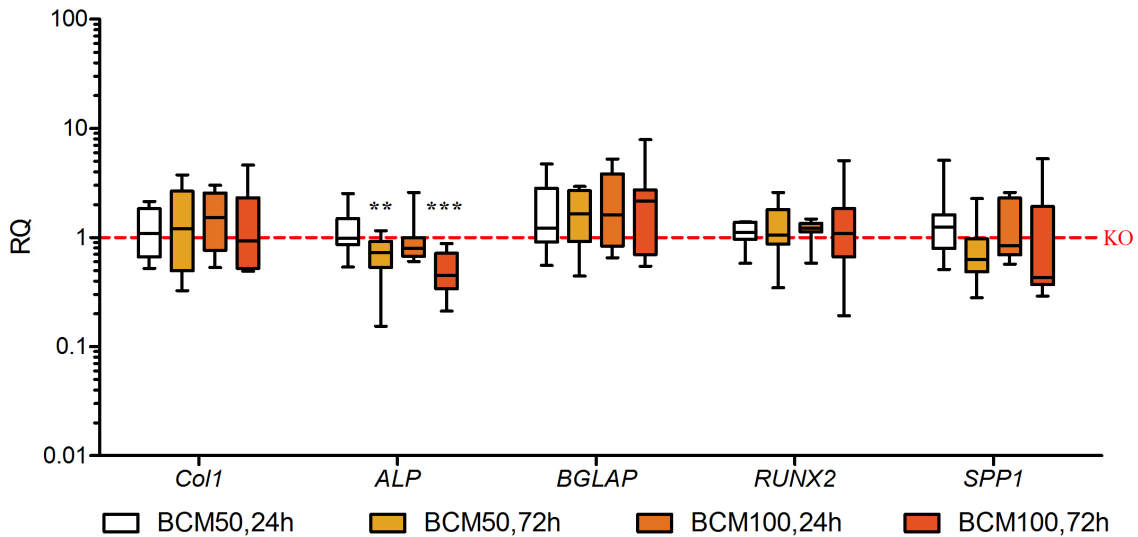


ABB. 4.9 Genexpression von *Staph. epidermidis* im Überblick, N = 8, * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$

4.4.3 Vergleich von *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis*

Vergleicht man die Änderung der Genexpression der beiden Keime in den Abbildungen 4.8 und 4.9, fällt auf, dass bei keinem Genprodukt, Zeitpunkt und Konzentration eine signifikante Änderung beider Keime zu finden ist. Daher erschließen sich die Unterschiede der beiden Keime aus den obengenannten Abschnitten 4.4.1 und 4.4.2. Die beiden Staphylokokken greifen deutlich an verschiedenen Punkten der osteogenen Differenzierung ein. Während *Staph. aureus* die Expression von *RUNX2* und *SPP1* hochreguliert und die Expression von *COL1A1* und *BGLAP* herunterreguliert, vermindert *Staph. epidermidis* vor allem die Expression der *ALPL*.

4.5 ELISA: Osteopontin

Im ELISA konnte weder mit Proben aus den Überständen aus dem WST noch mit Zelllysaten aus Zellpellets Osteopontin detektiert werden. In weiteren Experimenten (Daten werden nicht

TAB. 4.3 PCR-Ergebnisse von *Staph. epidermidis*: Mittelwerte \pm SD, fett $\hat{=}$ signifikant

Gen	BCM50,24h	SD	BCM50,72h	SD
<i>RUNX2</i>	1.107 \pm 0.2874		1.284 \pm 0.694	
<i>ALP</i>	1.182 \pm 0.6192		0.7064 \pm 0.3011	
<i>BGLAP</i>	1.811 \pm 1.423		1.709 \pm 0.9306	
<i>SPPI</i>	1.616 \pm 1.453		0.8332 \pm 0.6204	
<i>COL1A1</i>	1.186 \pm 0.6072		1.549 \pm 1.257	
	BCM100,24h	SD	BCM100,72h	SD
<i>RUNX2</i>	1.178 \pm 0.2681		1.496 \pm 1.536	
<i>ALP</i>	1.023 \pm 0.6456		0.495 \pm 0.2296	
<i>BGLAP</i>	2.189 \pm 1.723		2.432 \pm 2.376	
<i>SPPI</i>	1.304 \pm 0.8331		1.298 \pm 1.730	
<i>COL1A1</i>	1.599 \pm 0.918		1.494 \pm 1.445	

gezeigt) gelang der Nachweis von Osteopontin in Überständen von Osteoblasten, welche 28 Tage lang inkubiert wurden. Daher lagen die Osteopontinlevel im ursprünglichen Versuchsansatz wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze.

4.6 Mineralisierung

PhOB wurden nach Konfluenz mit β -Glycerophosphat stimuliert und für 4-6 Wochen mit KO und BCM100 inkubiert. Extrazelluläre Calciumionen als Parameter der erfolgreichen Mineralisierung wurden mit Alizarin red s angefärbt, anschließend herausgelöst, die Extinktion gemessen und in der Abbildung 4.10 dargestellt. Separate Wells wurden analog vorbereitet und nach dem Färben in 50-facher Vergrößerung fotografiert (exemplarisch dargestellt in Abbildung 4.11) und semiquantitativ ausgewertet.

Staph. aureus Bei der Inkubation mit BCM von *Staph. aureus* wurde bei BCM50 eine Calciummenge von $67 \pm 13\%$ ($p = 0.0004$) und bei BCM100 $74 \pm 20\%$ ($p = 0.0145$) der Kontrolle erreicht. Im Vergleich der Konzentrationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

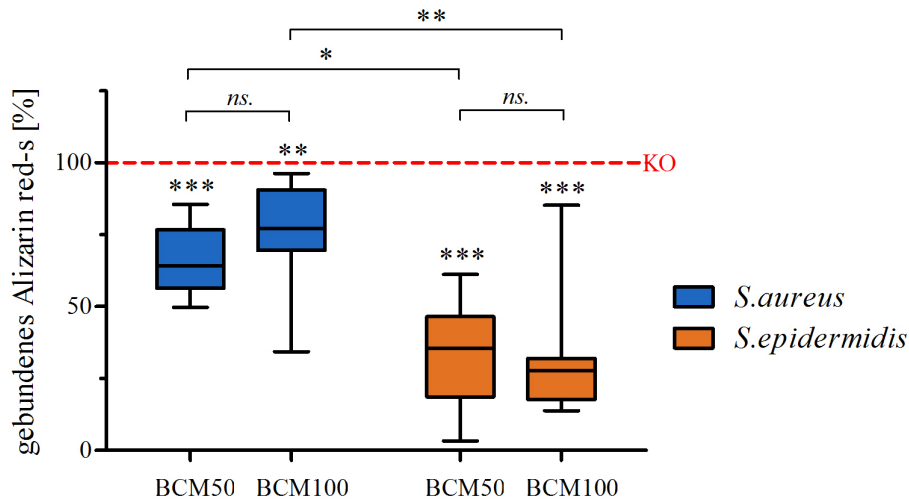


ABB. 4.10 Mineralisierung von *Staph. epidermidis* und von *Staph. aureus* im Vergleich zur Kontrolle, zur Konzentration und miteinander, N = 7, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

Staph. epidermidis Eine Inkubation mit BCM von *Staph. epidermidis* führte zu einer Reduktion der extrazellulären Calciummenge auf $33 \pm 20\%$ (BCM50, $p < 0.0001$) und $33 \pm 24\%$ (BCM100, $p = 0.0003$) in Bezug auf die Kontrolle. Auch hier zeigte sich im Vergleich der Konzentrationen kein signifikanter Unterschied.

Vergleich von *Staph. aureus* mit *Staph. epidermidis* Im Vergleich der beiden Keime zeigten sich bei beiden Konzentrationen signifikante Unterschiede (BCM50: $p = 0.0126$ und BCM100: $p = 0.0035$). Die Übersicht der semiquantitativen Werte in Tabelle 4.4 veranschaulicht die große Variabilität der Reaktion zwischen den Patienten. Auch hier lässt sich jedoch der gleiche Trend wie in der Eluation erkennen: *Staph. aureus* hemmt die Mineralisierung weniger, beziehungsweise fördert sie sogar teilweise, während *Staph. epidermidis* bei fast allen Patienten eine Reduktion des extrazellulären Calciums zur Folge hat.

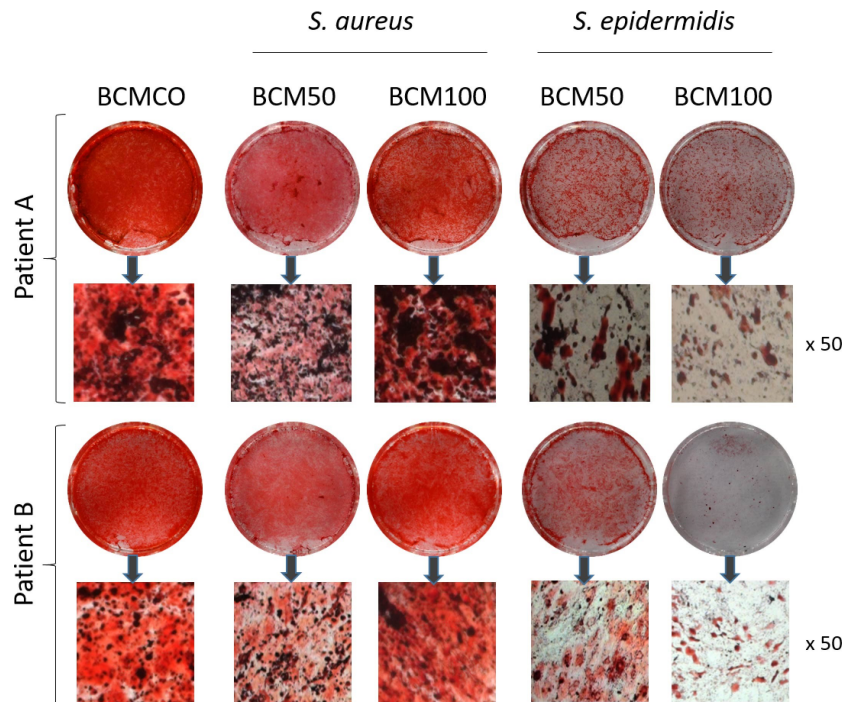


ABB. 4.11 Exemplarische Darstellung der Mineralisierung von *Staph. epidermidis* und von *Staph. aureus* im Vergleich zur Kontrolle und der Konzentrationen

TAB. 4.4 semiquantitative Analyse der Mineralisierung in Bezug zur Kontrolle

Patient	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	BCM50	BCM100	BCM50	BCM100
A	--	++	+	-
B	++	++	-	--
C	++++	++	++	=
D	---	=	=	---
E	=	=	---	--
F	=	++	=	+

5 Diskussion

Staph. aureus und *Staph. epidermidis* sind für ca. 70% der Implantat-assoziierten Infektionen und Osteomyelitiden verantwortlich, welche komplexe und langwierige Therapien erfordern. Im Laufe der Evolution haben Bakterien zahlreiche Strategien entwickelt um sich einen Überlebensvorteil zu sichern. Hier kann man zwischen Angriff (Toxine, Superantigene, pH-Veränderungen, Internalisierung) und Verteidigung (Proteinasen, Biofilmformation, Internalisierung) unterscheiden, wobei zumeist eine Kombination der beiden entscheidend ist. Der Großteil unseres Wissens über die Interaktion von Prokaryonten und phOB entstammt Studien, die deren direkten Kontakt betrachten. Des Weiteren wurden Versuche oft mit planktonisch wachsenden Bakterien durchgeführt, obwohl Biofilme die häufigste Lebensform von Bakterien darstellen (Flemming, Wingender 2010). Dort ist durch die EPS der direkte Zell-Zell-Kontakt jedoch minimiert, sodass andere pathogene Reaktionswege eine Rolle spielen müssen.

Hier setzt unsere Studie an und zeigt eine deutliche und relevante Veränderung der osteogenen Differenzierung und der Mineralisierung von phOB bereits durch lösliche Faktoren aus *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis* Biofilmen. Dies ist unseres Wissens das erste Mal, dass diese Art des Einflusses durch *Staph. epidermidis* Biofilme gezeigt wurde. Während *Staph. aureus* aufgrund seiner zahlreichen pathogenen Faktoren als deutlich virulenter gilt, zeigen Klinik, Literatur und unsere Ergebnisse die Problematik der evasiven Faktoren des *Staph. epidermidis* auf. Die nähere Betrachtung von Agenzien und deren Wirkungsweisen bei chronischen Infektionen offenbart neue Zusammenhänge und kann neue Therapien ermöglichen. Lösliche Biofilmfaktoren sind im menschlichen Körper örtlich weniger eingeschränkt, können in die nähere Umgebung diffundieren und ebenso nach einem Transport über die Blut- oder Lymphbahnen in weiter entfernten Regionen wirken.

Patientenabhängigkeit Die meisten vorangegangenen Studien untersuchten isolierte phOB eines Spenders oder immortalisierte Zelllinien, deren verändertes Teilungsverhalten sich auch auf die Ausdifferenzierung in Richtung Osteozyt und damit auf die Mineralisierung auswirkt. *In*

in vitro Untersuchungen mit Zelllinien können daher nicht auf die Pathogenese *in vivo* übertragen werden. Die Stärke unserer Arbeit besteht in der Verwendung von primären Zellen verschiedener Spender unterschiedlichen Alters, Geschlechts und Vorerkrankungen. In unseren Versuchen zeigten sich starke individuelle Unterschiede, zum Beispiel hinsichtlich des Teilungsverhaltens und der Resilienz gegenüber des Biofilms, die sich konstant durch alle Experimente zogen. Trotz der interindividuellen Inhomogenität mit teils gegenläufigen Beobachtungen bei verschiedenen Patienten, wurden bei einer Untersuchungszahl von 8 insgesamt hochsignifikante Veränderungen gemessen. Auch eine Untersuchung von phOB nur eines Spenders wie bei Ward et al. (Ward et al. 2015) lässt diese unterschiedlichen Reaktionen außer Acht. Unseres Wissens sind wir die Ersten, die Auswirkungen der löslichen Faktoren an mehreren Patienten untersuchen. Dies unterstreicht die Bedeutung der beobachteten Effekte und es kann von einer höheren Übertragbarkeit der vorliegenden *in vitro* Ergebnisse für die klinische *in vivo* Situation ausgegangen werden. Bei einer weiteren Erhöhung der Spenderanzahl könnten klinische Parameter mit morphologischen und laborchemischen Veränderungen und Reaktionsmustern korreliert werden. Risikofaktoren wie Vorerkrankungen, Alter, Geschlecht können präzisiert und auf ihre biochemische Wirkung untersucht werden. Auf dem Weg zur personalisierten Medizin wäre es möglich individuelle Prognosen aufzustellen und die Wirksamkeit einer Therapie zuvor *in vitro* zu testen.

Stoffwechselaktivität und Proliferation Primäre humane Osteoblasten reagieren mit einem signifikanten, deutlichen Rückgang des Zellmetabolismus auf lösliche Biofilmprodukte von *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis*. Dies ist direkt abhängig von der Konzentration des BCM und der Inkubationszeit. Je höher die Konzentration des BCM ist und je länger die Inkubationszeit, desto stärker ist der Rückgang. Bereits nach 24h zeigen sich deutliche Beeinträchtigungen des normalen Zellverhaltens. *In vivo* dauern Knocheninfektionen mehrere Wochen bis Monate an (Otto-Lambertz et al. 2017), wobei sich in der Biofilmumgebung bereits nach 24h deutliche Zellveränderungen zeigen könnten, die mikroskopisch nicht sichtbar sind. Im Verlauf der Infektion kann trotz mangelndem direkten Bakterienkontakt die Proliferation sowie die Stoffwechselaktivität der Osteoblasten in der Umgebung weiter abnehmen. Eine verminderte Anzahl an Osteoblasten und Osteozyten, sowie eine erhöhte Apoptose führt zu einem Verlust von trabekulären und corticalen Knochen und somit zu einem deutlich instabilen Knochen und einer erhöhten Frakturgefahr (Parfitt 1984) (Almeida 2012). Insbesondere bei älteren Menschen mit altersbedingtem Knochenschwund potentielliert sich die Gefahr von

Frakturen, Hospitalisation und einer damit einhergehenden erhöhten Mortalität.

Im Vergleich der beiden Keime zeigt der virulentere *Staph. aureus* einen früheren und stärkeren Effekt, der jedoch nicht immer signifikant ist. Da die Versuche mit *Staph. aureus* über 2 Jahre mit mehreren BCM-Ansätzen durchgeführt wurden, während das SE-BCM stets aus dem gleichen Pool stammte, können Unterschiede im Wachstumsverhalten und im Metabolismus der Bakterien bei der Anzucht des Biofilms zu unterschiedlichen Konzentrationen von Pathogenitätsfaktoren im BCM geführt haben. Die DNA-Menge, ein Surrogatparameter der Proliferationsrate, sank ebenfalls signifikant zeit- und konzentrationsabhängig stark ab, jedoch etwas weniger ausgeprägt als der Zellmetabolismus. Im Vergleich der Keime zeigte auch hier *Staph. aureus* einen stärkeren und früheren Rückgang. Die Unterschiede der Keime zeigen sich auch klinisch. Während *Staph. aureus* bei IaI eher akute high-grade Infekte auslöst, gilt *Staph. epidermidis* als häufigster Erreger von chronischen low-grade Infekten (Steinhausen 2017). Diese beiden Effekte lassen sich nicht durch einen pH-Unterschied im Medium erklären, da der durchschnittliche pH-Wert des BCMs sogar um 0,2 näher am pH-Optimum als der der Kontrolle lag.

Bekannt ist, dass planktonische Bakterien an Matrixproteine wie Kollagen I, Osteocalcin und Osteopontin binden und dadurch Apoptose, eine Hemmung der Proliferation und der osteogenen Differenzierung auslösen oder die Bindung nutzen um in die Osteoblasten einzudringen (Widaa et al. 2012) (RYDÉN et al. 1989) (Kintarak et al. 2004). Die in der Literatur beschriebene Hemmung der Proliferation und Differenzierung auch allein durch lösliche Biofilmprodukte (sBf) unterstreicht unsere Ergebnisse (Ward et al. 2015) (Sanchez et al. 2013). Bei der Analyse des extrazellulären Proteoms des BCM von *Staph. aureus*-SAMMC-700 fanden Sanchez et al. eine heterogene Mischung. Prädominant waren zytosolische Proteine, die wahrscheinlich durch Autolyse als Teil der natürlichen Biofilmmreifung in das BCM gelangt waren (Bayles 2007) (Sadykov, Bayles 2012). Neben den zytosolischen Proteinen, die am häufigsten aus dem prokaryontischen Stoffwechsel stammten, fanden sich Hämolytine und Proteinasen, z.B. Staphopain B. Diese Proteine könnten für die Apoptose (Dinges et al. 2000) (Craven et al. 2009) und die Apoptose-abhängige Verminderung des Metabolismus verantwortlich sein. Auch spA, das über TNFR-1 an Osteoblasten bindet und deren Proliferationsrate hemmt, und PVL, das zu einer Zellzerstörung insbesondere von Phagozyten führt, könnten ursächlich für den Rückgang sein (Chen et al. 2014).

Genexpression In der Genexpression zeigte sich ein gemischtes Bild: Während *Staph. aureus* zu unterschiedlichen Zeitpunkten alle untersuchten Gene bis auf *ALPL* beeinflusste, veränderte *Staph. epidermidis* nur die *ALPL* signifikant. Eine Reduktion der Synthese von Kollagen I, wie nach 72h mit SA zu bemerken ist, kann zur Reduktion der osteogenen Differenzierung beitragen, da der Kontakt mit extrazellulärer Matrix und im speziellen mit Kollagenen diese induziert (Salasznyk et al. 2004).

Die Expressionsreduktion von *BGLAP* kann mit konsekutiven niedrigen Osteocalcinleveln zu geringerer Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten führen (DeFranco et al. 1991) (Malone et al. 1982) (Ishida, Amano 2004), was zu einem geringeren Knochenumsatz und minderwertiger Knochenqualität bei IaI führen kann (Seeman, Delmas 2006). Auch in osteoporotischen und älteren Knochen lassen sich bei einem verminderten Remodeling vermehrt Mikrotraumata und dadurch eine erhöhte Knochen vulnerabilität nachweisen (Seeman, Delmas 2006). In Bezug auf die Mineralisierung gibt es zum Teil widersprüchliche Angaben in der Literatur. Der von uns gezeigte Rückgang in der Mineralisierung könnte durch einen Mangel an Osteocalcin und die dadurch geringere Größe der Hydroxylapatitkristalle (Kavukcuoglu et al. 2009) (A. Boskey et al. 1998) verursacht werden. Dennoch sollte die Rolle von *BGLAP*, insbesondere hinsichtlich des Einflusses auf Osteoklasten genauer untersucht werden, um eindeutigere Hypothesen aufstellen zu können.

Nach 72h zeigt sich auch eine vermehrte Transkription von *SPP1*, das Gen für Osteopontin. Da Osteopontin als früher Marker der osteogenen Differenzierung (Ayad et al. 1998a) die Knochenresorption beeinflusst, vor Apoptose schützt und die Proliferation fördert, scheinen diese Mechanismen in unseren Experimenten keine Effekte zu zeigen. Osteopontin bindet jedoch auch an Osteocalcin, Kollagen I und Hydroxylapatit und inhibiert so das Wachstum der Hydroxylapatitkristalle (Steitz et al. 2002) (Pampena et al. 2004). Diese Reaktion könnte einer der Gründe für eine verminderte Mineralisierung sein.

Der wichtigste Transkriptionsfaktor der osteogenen Differenzierung *RUNX2* zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation mit BCM-SA zunächst eleviert und schließlich wieder innerhalb der Norm. Die fehlende positive Rückkopplung durch die verminderte Bindung von *BGLAP* an eine Promotersequenz von *RUNX2* (Ducy et al. 1997) schlägt sich hier nicht nieder. Während der physiologischen Differenzierung steigt die Expression von *RUNX2* bis zum Stadium des reifen Osteoblasten stetig an und stagniert bei Osteozyten auf einem niedrigen Level (G. S. Stein, Lian et al. 2004) (Komori 2006). Im Einzelvergleich der Werte in der Abbildung 5.1 sieht man deutlich, wie unterschiedlich einzelne Patienten auf die Inkubation mit BCM reagieren. Diese

Varianz kann durch genetische, alters- oder hormonabhängige patientenindividuelle Merkmale bedingt sein. Auch wurden die verwendeten phOB zu unterschiedlichen Generationenzeiten untersucht, daher ist es möglich, dass einzelne Patienten sich bereits in einem späteren Differenzierungsstadium befanden, sodass die Kontrollen unterschiedlich hohe Transkriptionswerte zeigten. Der initiale Kontakt mit dem bakteriellen Proteom scheint zunächst zu einer Induktion der Differenzierung zu führen, was sich nach 72h jedoch nicht mehr nachweisen lässt.

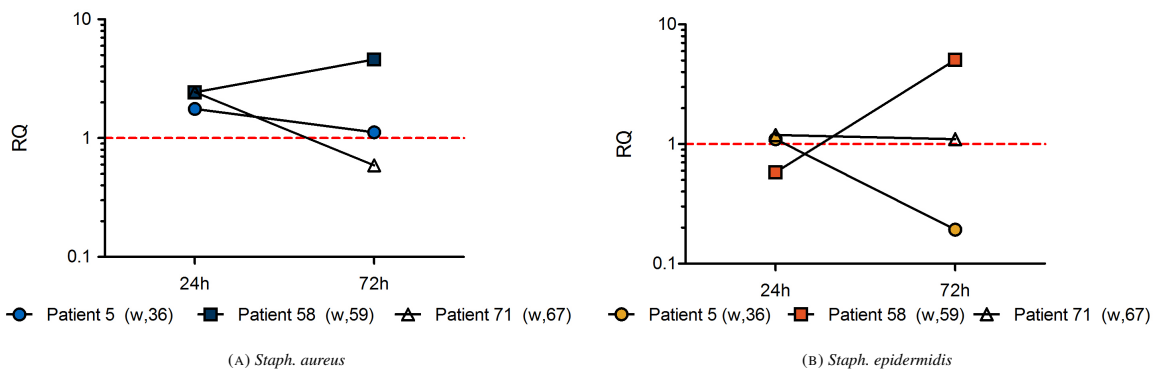


ABB. 5.1 Einzelvergleiche der *RUNX2*-Expression nach Inkubation mit BCM100 von (a) *Staph. aureus* (b) *Staph. epidermidis*

Eine Verminderung des frühen und hochspezifischen Markers *ALPL* der osteogenen Differenzierung (Dresner-Pollak et al. 1996) wie bei Inkubation mit BCM-SE führt zu großen Beeinträchtigungen der Mineralisierung (Wennberg et al. 2000). Hierauf wird in dem späteren Abschnitt ‚Mineralisierung‘ genauer eingegangen. Durch eine Inkubation mit BCM-SA wird die Expression von *ALPL* jedoch nicht beeinflusst. Maximale Konzentrationen der BAP werden bei der Matrixreifeung erreicht, sodass es bei einer längeren Inkubationszeit mit *Staph. aureus* indirekt durch eine gestörte Matrixreifeung auch zu einer Beeinflussung der *ALPL* kommen könnte.

Proteinnachweis Da zunächst im ELISA kein Osteopontin nachgewiesen werden konnte, gelang bis zum Abschluss der Experimente dieser Arbeit kein Proteinnachweis der veränderten Genexpression. In noch nicht veröffentlichten späteren Experimenten mit 28 Tage inkubierten Proben zeigte sich eine Reduktion der Osteopontinexpression unter Inkubation mit BCM. Da Osteopontin als früher Marker der osteogenen Differenzierung gilt und in länger inkubierten Überständen Osteopontin nachweisbar war, nehmen wir an, dass nach 72h noch keine

detektierbare Expression von Osteopontin stattfindet.

Mineralisierung Die Mineralisierung wird signifikant durch sBf gehemmt, jedoch ohne einen signifikanten Einfluss der Konzentrationen zu zeigen. Zusätzlich zu ihrer direkten Wirkung könnten sBf durch Diffusion auch für eine weiter entfernte Demineralisierung der Knochen verantwortlich sein. Die physiologische Mineralisierung des Knochen addiert Härte und Druckstabilität zur Elastizität des Kollagens (Lüllmann-Rauch 2008). Ein Mangel der Mineralien führt zu einer Verschlechterung der Knochenqualität und erhöht das Risiko von Frakturen (Seeman, Delmas 2006). Relevante Agenzien des Biofilms könnten unter anderem spA, PVL und Coa sein, lösliche Faktoren, die in Studien mit planktonischen Bakterien eine Reduktion der Mineralisierung und der Aktivität der Alkalischen Phosphatase bewirken (Chen et al. 2014) (Jin et al. 2013). Auch hier gibt es jedoch konträre Studienergebnisse. Kavanagh et al. berichten z.B. von einer Hypermineralisierung, die durch eine Kokultivierung mit spA induziert wurde (Kavanagh et al. 2018). Auch das staphylokkale Enterotoxin C2 scheint eine Osteogenese zu fördern (T. Wu et al. 2018).

Bemerkenswerterweise erreichte *Staph. epidermidis* eine signifikant stärkere Reduktion der Calciummenge als *Staph. aureus*, was in der Zusammenschau mit der Genexpression mit einer Reduktion der *ALPL* zusammenhängen könnte, da diese essentiell für die Bereitstellung von Mineralien ist (Wennberg et al. 2000) (G. S. Stein, Lian 1993) (Lüllmann-Rauch 2008). Eine Verminderung der Alkalischen Phosphatase könnte auch die radiologischen Veränderungen während einer langandauernden low-grade Infektion mit *Staph. epidermidis* erklären. Hier zeigen sich Osteolysen, Destruktionen und Sklerosezonen durch eine gestörte Mineralisierung (Walter et al. 2012). Klinisch scheint es jedoch keine signifikanten Unterschiede der beiden Keime hinsichtlich Prothesenlockerungen und des zeitlichen Ablaufs zu geben. Seltenerer Erreger wie *Enterococcus* spp. dagegen sind mit einem schnelleren Verlauf assoziiert (Dapunt, Radzuweit-Mihaljevic et al. 2016).

Eine große Rolle in der Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase und der Mineralisierung spielen zudem RANKL und die Osteoklastenaktivität, die auch durch planktonische Bakterienprodukte beeinflusst werden (Claro et al. 2011). In der semiquantitativen Auswertung der Mineralisierung, wo bei manchen Patienten bei Inkubation mit BCM eine stärkere Einlagerung von Calcium stattfand, könnten Faktoren wie von Somayaji et al. beschrieben, eine Rolle spielen. Hier führte eine Beschichtung mit abgetöteten Bakterien zu einer verstärkten osteogenen Differenzierung (Somayaji et al. 2010). Eine Erklärung könnte eine vermehrte Adhäsion und

daraufrhin schnellere Mineralisierung aufgrund löslicher Bindungsproteine sein, die z.B. durch Autolyse (Sanchez et al. 2013) in das Medium gelangen. Insgesamt zeigt sich eine deutliche Hemmung der osteogenen Differenzierung und Mineralisierung, wobei beide Keime dies wahrscheinlich auf unterschiedlichem Weg bewirken. Der als virulenter bekannte *Staph. aureus* scheint eine breitere Wirkung zu haben und viele Stoffwechselwege zu beeinflussen, während *Staph. epidermidis* in unseren Experimenten vor allem die Alkalische Phosphatase alteriert. Es bedarf weiterer Forschung um die genauen Wirkmechanismen herauszustellen.

Inhaltsstoffe des Biofilms Bei Analysen der Proteome von Biofilmen und planktonischen Bakterien in vorherigen Studien zeigte sich der Großteil der Inhaltsstoffe identisch. Wenige Proteine waren nur zu einem Reifungsstadium des Biofilms zuzuordnen (Ward et al. 2015) (Sánchez et al. 2013) (Secor et al. 2011). Die Schlussfolgerung, dass am ehesten der kumulative Effekt der Proteine (Exotoxine, Exoenzyme und durch Autolyse freigesetzte Endoproteine) die beobachteten Veränderungen hervorruft (Ward et al. 2015), gilt es für unsere Experimente zu überprüfen. Da die Reifung des Biofilms bis zu 4 Wochen in Anspruch nimmt (Walter et al. 2012) und obengenannte Analysen vor diesem Zeitpunkt durchgeführt wurden, könnte es dennoch deutliche Unterschiede in beiden Proteomen geben.

Osteoblasten als Immunzellen Die Biofilmformation schützt Bakterien durch eine geringe Stoffwechselaktivität und EPS vor Antibiotika und dem angreifendem Immunsystem und sichert so deren Persistenz im Körper. Gleichwohl erkennt und bekämpft das Immunsystem diese bakterielle Lebensform. Lokale Gewebszellen wie Osteoblasten locken durch eine erhöhte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine immunkompetente Zellen an. Diese dringen in den Biofilm ein und anstatt von Opsonierung (Dapunt, Hänsch et al. 2016), wofür das Erkennen und die Phagozytose frei schwimmender Bakterien notwendig wäre, findet die Aktivierung der Immunzellen schon durch lösliche Biofilmfaktoren wie Teichonsäuren und bakterielle Proteine statt (Dapunt, Giese et al. 2016). Im Zuge der lokoregionalen Inflammation wenden Osteoblasten mehr Energie zugunsten der Entzündungsreaktion auf und vermindern ihre eigentliche Aufgabe der Matrixproduktion und Mineralisierung. Trotz der Aktivierung des Immunsystems führt dies bei Implantat-assoziierten Infektionen häufig nicht zu einer kompletten Ausheilung sondern zu einer Persistenz des Biofilms und einer Chronifizierung der Entzündung, sodass deren negative Begleiterscheinungen in den Vordergrund treten (Dapunt, Hänsch et al. 2016).

In der Vergangenheit wurde stets versucht bakterielle Infektionen vorzubeugen (z.B. durch neue Implantatmaterialien mit Hilfe von Nanotechnologien (Legeay et al. 2006) (Somayaji et al. 2010)) oder zu bekämpfen (z.B. mit Antibiotika oder chirurgischem Débridement) um die klinischen Symptome zu beseitigen (Oliveira et al. 2018) (Dapunt, Hänsch et al. 2016). Ein neuer Ansatz in der Therapie der Implantat-assoziierten Infektionen wäre die Möglichkeit der reinen Symptomkontrolle. Ist die Entzündungsreaktion mit ihren Folgen wie Schmerz, Schwellung und Instabilität unterdrückt, ohne zu einer systemischen Verbreitung der Bakterien zu führen, wäre die radikale Bekämpfung obsolet. Ziel wäre eine stabile Koexistenz von Biofilm und umgebendem Weichteilgewebe mit Hilfe einer lokalen Teilimmunsuppression ohne systemische Folgen. Dabei darf keine Gefahr der weiteren Ausbreitung der Bakterien oder des Krankheitsprogresses bestehen. Denkbar wäre eine Hyposensibilisierung auf bestimmte Biofilmbestandteile, sodass sich eine Infektion in eine Kolonisation verwandelt. Auch eine Impfung gegen lösliche Biofilmfaktoren könnte dazu führen, dass diese abgefangen und abgebaut werden, bevor sie am umliegendem Gewebe Schäden auslösen.

5.1 Limitationen

Aufgrund der aufwendigen Herstellung des BCM und der Verwendung von primären humanen Osteoblasten konnte nur eine Versuchsgruppe von 8 Patienten untersucht werden. Bei der verwendeten Explantmethode werden alle adhärennten Zellen weiterkultiviert, daher ist zunächst von einer Mischkultur von Osteoblasten und Fibroblasten auszugehen, die sich durch Zugabe von Faktoren hauptsächlich osteogen weiter differenzieren. Dies könnte zu einem weniger eindeutigen Ergebnis führen, spiegelt jedoch auch die Situation *in vivo* besser wider. Eine weitere Einschränkung der Ergebnisse kommt durch die nur 5-tägige Reifungszeit des Biofilms, obwohl eine vollständige Reifung zum Teil bis zu 4 Wochen dauert. Zudem erlauben die durchgeführten Tests keine kontinuierliche Beobachtung der gleichen Ansätze, da diese jeweils verbraucht werden. Dies führt zu einer limitierten Anzahl an Beobachtungszeitpunkten, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese möglicherweise zu spät (Genexpression) oder zu früh (Proteinnachweis) gewählt wurden.

5.2 Ausblick

In den vorliegenden Experimenten zeigte sich klar der signifikante Einfluss von löslichen Biofilmprodukten von *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis* auf die osteogene Differenzierung. Modifikationen und Verbesserungen der Experimente für die Zukunft beinhalten eine Verlängerung der Maturation des Biofilms, andere Untersuchungszeitpunkte, die Analyse von weiteren Patienten und der erfolgreiche Nachweis der Veränderung von Proteinkonzentrationen. Eine Erweiterung des Patientenkollektivs ließe eine Analyse und gegebenenfalls eine individuelle Prognose hinsichtlich der Vulnerabilität, Wirksamkeit möglicher Therapien und die Evaluation einer möglichen Impfung gegen Antigene zu.

Geplante weiterführende Experimente unserer Arbeitsgruppe sind die Analyse des Biofilmproteoms im Vergleich zu planktonischem Proteom und gegebenenfalls selektive Versuchsansätze mit fraktionierten Gruppen zur Determinierung relevanter Faktoren, die Etablierung eines *in vitro*-Modells mit Osteoblasten und Osteoklasten und die Analyse neuer Parameter wie z.B. Inflammation und Apoptose.

In Zukunft sind auch die Analyse relevanter pathologischer Erreger aus klinischen Proben geplant, sowie eine *in vivo* Betrachtung im Tiermodell zur Evaluation der klinischen Relevanz möglich.

6 Schlussfolgerung

Lösliche Stoffwechselprodukte von Biofilm-bildenden Bakterien (sBf) haben einen starken Einfluss auf den Metabolismus, die Proliferation und die osteogene Differenzierung inklusive Mineralisierung von primären humanen Osteoblasten. Vergleicht man die Wirkung der sBf von *Staphylococcus aureus* (SA) mit denen des *Staphylococcus epidermidis* zeigt sich für SA ein stärkerer Rückgang des Metabolismus und eine niedrigere Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix. Anders bei der Mineralisierung: hier hemmt *Staphylococcus epidermidis* stärker. Dies könnte durch eine verminderten Expression der alkalischen Phosphatase entstehen. Für diese Hemmung der osteogenen Differenzierung ist kein direkter Kontakt von Bakterien vonnöten. Ein Mangel an Osteoblasten und Osteozyten, einen Rückgang der Differenzierung und Stoffwechselaktivität und schlussendlich der Mineralisierung macht Knochen in der weiteren Umgebung von infiziertem Gewebe weicher, instabiler und weniger widerstandsfähig. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass SBf *in vivo* eine größere und wichtigere Rolle bei chronischer Osteomyelitis oder Implantat-assoziierten Infektionen spielen, als bisher angenommen.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Erreger der Implantat-assoziierten Infektionen nach (Campoccia et al. 2006) .	2
1.2	Modell der Interaktion löslicher Faktoren von Biofilmen mit vitalem Knochen- gewebe	4
2.1	Knochenzellen und ihre Anordnung <small>adaptiert nach OpenStax College (Anatomy, Jun 19 2013 2013)</small>	6
2.2	osteogene Differenzierung	7
2.3	Modell der Biofilmentstehung <small>adaptiert nach (Otto 2013)</small>	13
3.1	Biofilmherstellung	25
3.2	WST-1-Assay nach Immunservice (Immunservice 2019)	30
4.1	Analyse der pH-Werte	35
4.2	Vergleich des WST-1-Assays von <i>S. aureus</i> mit (a) der Kontrolle und (b) der Zeiten und Konzentrationen	36
4.3	Vergleich des WST-1-Assays von <i>S. epidermidis</i> mit (a) der Kontrolle und (b) der Zeiten und Konzentrationen	37
4.4	Analyse der WST-1-Assays im Vergleich	37
4.5	Vergleich des CyQuant-Assays von <i>S. aureus</i> mit (a) der Kontrolle und (b) der Zeiten und Konzentrationen	38
4.6	Vergleich des CyQuant-Assays von <i>S. epidermidis</i> mit (a) der Kontrolle und (b) der Zeiten und Konzentrationen	39
4.7	CyQuant von <i>Staph. epidermidis</i> und von <i>Staph. aureus</i> im Vergleich	40
4.8	Genexpression von <i>Staph. aureus</i>	41
4.9	Genexpression von <i>Staph. epidermidis</i>	42
4.10	Mineralisierung von <i>Staph. epidermidis</i> und von <i>Staph. aureus</i> im Vergleich zur Kontrolle, zur Konzentration und miteinander	44
4.11	Exemplarische Darstellung der Mineralisierung von <i>Staph. epidermidis</i> und von <i>Staph. aureus</i> im Vergleich zur Kontrolle und der Konzentrationen	45

5.1 Einzelvergleiche der *RUNX2*-Expression nach Inkubation mit BCM100 von
(a) *Staph. aureus* (b) *Staph. epidermidis* 50

Tabellenverzeichnis

3.1	verwendete Kits	18
3.2	verwendete Reagenzien	19
3.3	verwendete Materialien	20
3.4	Bakterienstämme	21
3.5	Osteogenes Proliferationsmedium	21
3.6	Osteogenes Assaymedium	22
3.7	Primer des TaqMan Gene Expression Assays	22
3.8	verwendete Software	23
3.10	TSB Medium	23
3.9	Verwendete Geräte	24
3.11	Wipeout Puffer-Lösung	28
3.12	RT Mastermix	28
3.13	qPCR Mastermix	28
3.14	CyQUANT Arbeitslösung	31
3.15	Alizarin red s Färbung	32
4.1	Patientendaten der Zellspender	34
4.2	PCR-Ergebnisse von <i>Staph. aureus</i>	41
4.3	PCR-Ergebnisse von <i>Staph. epidermidis</i>	43
4.4	semiquantitative Analyse der Mineralisierung in Bezug zur Kontrolle	45

Literatur

- Aldinucci, D., J. M. Quinn, M. Degan, S. Juzbasic, A. De Luliis, S. Improta, A. Pinto, V. Gattei (1996). „In vitro cellular systems for studying OC function and differentiation“. In: *Human Cell Culture Protocols*. Springer, S. 277–306.
- Almeida, M. (2012). „Aging mechanisms in bone“. In: *BoneKEy reports* 1.7.
- Anatomy, O. C., P. C. W. site <http://cnx.org/content/col11496/1.6/> Jun 19 2013 (3. Apr. 2013). *File:604 Bone cells.jpg*. URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:604_Bone_cells.jpg (besucht am 03.06.2019).
- Archer, N. K., M. J. Mazaitis, J. W. Costerton, J. G. Leid, M. E. Powers, M. E. Shirtliff (2011). „Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease“. In: *Virulence* 2.5, S. 445–459.
- Arciola, C. R., D. Campoccia, G. D. Ehrlich, L. Montanaro (2015). „Biofilm-based implant infections in orthopaedics“. In: *Biofilm-based healthcare-associated infections*. Springer, S. 29–46.
- Arrecubieta, C., T. Asai, M. Bayern, A. Loughman, J. R. Fitzgerald, C. E. Shelton, H. M. Baron, N. C. Dang, M. C. Deng, Y. Naka et al. (2006). „The Role of Staphylococcus aureus Adhesins in the Pathogenesis of Ventricular Assist Device–Related Infections“. In: *The Journal of infectious diseases* 193.8, S. 1109–1119.
- Aubin, J. E., J. T. Triffitt (2002). „Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation“. In: *Principles of bone biology*. Elsevier, S. 59–81.
- Aumüller, G., G. Aust, A. Conrad, J. Engele, J. Kirsch (2017). *Duale Reihe Anatomie*. 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. ISBN: 978-3-132-41754-0.
- Ayad, S., R. Boot-Handford, M. Humphries, K. Kadler, A. Shuttleworth (1998a). *The extracellular matrix factsbook*. Elsevier, S. 235–236.
- (1998b). *The extracellular matrix factsbook*. Elsevier, S. 231–232.
- Banerjee, C., A. Javed, J.-Y. Choi, J. Green, V. Rosen, A. J. Van Wijnen, J. L. Stein, J. B. Lian, G. S. Stein (2001). „Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype“. In: *Endocrinology* 142.9, S. 4026–4039.

- Banke, I., R. von Eisenhart-Rothe, H. Mühlhofer (2015). „Epidemiologie und Prophylaxe periprothetischer Infektionen“. In: *Der Orthopäde* 44.12, S. 928–933.
- Bayles, K. W. (2007). „The biological role of death and lysis in biofilm development“. In: *Nature Reviews Microbiology* 5.9, S. 721.
- Benninghoff, A., D. Drenckhahn, J. Waschke (2008). *Taschenbuch Anatomie*. Elsevier, Urban & Fischer München, S. 14–25.
- Boskey, A. L., F. Wians, P. V. Hauschka (1985). „The effect of osteocalcin on *In vitro* lipid-induced hydroxyapatite formation and seeded hydroxyapatite growth“. In: *Calcified tissue international* 37.1, S. 57–62.
- Boskey, A., S. Gadaleta, C. Gundberg, S. Doty, P. Ducy, G. Karsenty (1998). „Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin“. In: *Bone* 23.3, S. 187–196.
- Brandt, C. M., W. W. Sistrunk, M. C. Duffy, A. D. Hanssen, J. M. Steckelberg, D. M. Ilstrup, D. R. Osmon (1997). „Staphylococcus aureus prosthetic joint infection treated with debridement and prosthesis retention“. In: *Clinical Infectious Diseases* 24.5, S. 914–919.
- Brown, R. L., T. B. Clarke (2017). „The regulation of host defences to infection by the microbiota“. In: *Immunology* 150.1, S. 1–6.
- Bruderer, M., R. Richards, M. Alini, M. J. Stoddart (2014). „Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis“. In: *Eur Cell Mater* 28.269, e286.
- Busscher, H. J., H. C. Van Der Mei, G. Subbiahdoss, P. C. Jutte, J. J. Van Den Dungen, S. A. Zaat, M. J. Schultz, D. W. Grainger (2012). „Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface“. In: *Science translational medicine* 4.153, 153rv10–153rv10.
- Büttner, H., D. Mack, H. Rohde (2015). „Structural basis of Staphylococcus epidermidis biofilm formation: mechanisms and molecular interactions“. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 5, S. 14.
- Camposcia, D., L. Montanaro, C. R. Arciola (2006). „The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance“. In: *Biomaterials* 27.11, S. 2331–2339.
- Cedergren, L., R. Andersson, B. Jansson, M. Uhlén, B. Nilsson (1993). „Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG1“. In: *Protein Engineering, Design and Selection* 6.4, S. 441–448.
- Chellaiah, M., K. Hruska (2003). „The Integrin α v β 3 and CD44 Regulate the Actions of Osteopontin on Osteoclast Motility“. In: *Calcified tissue international* 72.3, S. 197–205.
- Chellaiah, M. A., N. Kizer, R. Biswas, U. Alvarez, J. Strauss-Schoenberger, L. Rifas, S. R. Rittling, D. T. Denhardt, K. A. Hruska (2003). „Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression“. In: *Molecular biology of the cell* 14.1, S. 173–189.

- Chen, Q., T. Hou, F. Luo, X. Wu, Z. Xie, J. Xu (2014). „Involvement of toll-like receptor 2 and proapoptotic signaling pathways in bone remodeling in osteomyelitis“. In: *Cellular Physiology and Biochemistry* 34.6, S. 1890–1900.
- Cheung, G. Y., K. Rigby, R. Wang, S. Y. Queck, K. R. Braughton, A. R. Whitney, M. Teintze, F. R. DeLeo, M. Otto (2010). „Staphylococcus epidermidis strategies to avoid killing by human neutrophils“. In: *PLoS pathogens* 6.10, e1001133.
- Claro, T., A. Widaa, M. O’Seaghdha, H. Miajlovic, T. J. Foster, F. J. O’Brien, S. W. Kerrigan (2011). „Staphylococcus aureus protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis“. In: *PloS one* 6.4, e18748.
- Cohen Jr, M. M. (2006). „The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates“. In: *American journal of medical genetics part A* 140.23, S. 2646–2706.
- Craven, R. R., X. Gao, I. C. Allen, D. Gris, J. B. Wardenburg, E. McElvania-TeKippe, J. P. Ting, J. A. Duncan (2009). „Staphylococcus aureus α -hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells“. In: *PloS one* 4.10, e7446.
- Dapunt, U., T. Giese, S. Stegmaier, A. Moghaddam, G. M. Hänsch (2016). „The osteoblast as an inflammatory cell: production of cytokines in response to bacteria and components of bacterial biofilms“. In: *BMC musculoskeletal disorders* 17.1, S. 243.
- Dapunt, U., G. Hänsch, C. Arciola (2016). „Innate immune response in implant-associated infections: neutrophils against biofilms“. In: *Materials* 9.5, S. 387.
- Dapunt, U., S. Radzuweit-Mihaljevic, B. Lehner, G. Haensch, V. Ewerbeck (2016). „Bacterial infection and implant loosening in hip and knee arthroplasty: evaluation of 209 cases“. In: *Materials* 9.11, S. 871.
- DeFranco, D. J., J. Glowacki, K. A. Cox, J. B. Lian (1991). „Normal bone particles are preferentially resorbed in the presence of osteocalcin-deficient bone particles *In vivo*“. In: *Calcified tissue international* 49.1, S. 43–50.
- Denhardt, D. T., C. M. Giachelli, S. R. Rittling (2001). „Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury“. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 41.1, S. 723–749.
- Diekema, D., M. Pfaller, F. Schmitz, J. Smayevsky, J. Bell, R. Jones, M. Beach, S. P. Group (2001). „Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999“. In: *Clinical Infectious Diseases* 32.Supplement_2, S114–S132.
- Dinges, M. M., P. M. Orwin, P. M. Schlievert (2000). „Exotoxins of Staphylococcus aureus“. In: *Clinical microbiology reviews* 13.1, S. 16–34.

- Dresner-Pollak, R., R. Parker, M. Poku, J. Thompson, M. Seibel, S. Greenspan (1996). „Biochemical markers of bone turnover reflect femoral bone loss in elderly women“. In: *Calcified tissue international* 59.5, S. 328–333.
- Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A. L. Ridall, G. Karsenty (1997). „Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation“. In: *cell* 89.5, S. 747–754.
- Eisenberg, E., E. Y. Levanon (2013). „Human housekeeping genes, revisited“. In: *TRENDS in Genetics* 29.10, S. 569–574.
- EISayed SA, V. M. (13. Nov. 2018). *Physiology, Bone*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441968/> (besucht am 24.02.2019).
- Faccio, R., M. Grano, S. Colucci, A. Z. Zallone, V. Quaranta, A. Pelletier (1998). „Activation of α v β 3 integrin on human osteoclast-like cells stimulates adhesion and migration in response to osteopontin“. In: *Biochemical and biophysical research communications* 249.2, S. 522–525.
- Fey, P. D., M. E. Olson (2010). „Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*“. In: *Future microbiology* 5.6, S. 917–933.
- Flemming, H.-C. et al. (1994). *Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen*. Kommissionsverlag, R. Oldenbourg.
- Flemming, H.-C., J. Wingender (2010). „The biofilm matrix“. In: *Nature reviews microbiology* 8.9, S. 623.
- Galindo, M., J. Pratap, D. W. Young, H. Hovhannisyanyan, H.-J. Im, J.-Y. Choi, J. B. Lian, J. L. Stein, G. S. Stein, A. J. Van Wijnen (2005). „The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts“. In: *Journal of Biological Chemistry* 280.21, S. 20274–20285.
- Gillaspy, A. F., J. M. Patti, M. S. Smeltzer (1997). „Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesion gene, *cna*“. In: *Infection and immunity* 65.4, S. 1536–1540.
- Gundtoft, P. H., A. B. Pedersen, C. Varnum, S. Overgaard (2017). „Increased mortality after prosthetic joint infection in primary THA“. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 475.11, S. 2623–2631.
- Gutowski, C. J., A. F. Chen, J. Parvizi (2016). „The incidence and socioeconomic Impact of periprosthetic joint infection: United States perspective“. In: *Periprosthetic joint infections*. Springer, S. 19–26.
- Harrasser, N., R. Eisenhart-Rothe, P. Biberthaler (2016). *Facharztwissen Orthopädie Unfallchirurgie*. Springer-Verlag.
- Heilmann, C. (2011). „Adhesion mechanisms of staphylococci“. In: *Bacterial adhesion*. Springer, S. 105–123.

- Hunter, G. K., P. V. Hauschka, R. A. POOLE, L. C. Rosenberg, H. A. Goldberg (1996). „Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins“. In: *Biochemical Journal* 317.1, S. 59–64.
- Immunservice (2019). *Gebrauchsanweisung WST-1 Zellproliferations-Kit (ready-to-use)*. URL: https://immunservice.com/wp-content/uploads/WST-1_Gebrauchsanweisung.pdf (besucht am 16.09.2019).
- Ishida, M., S. Amano (2004). „Osteocalcin fragment in bone matrix enhances osteoclast maturation at a late stage of osteoclast differentiation“. In: *Journal of bone and mineral metabolism* 22.5, S. 415–429.
- Jamal, M., W. Ahmad, S. Andleeb, F. Jalil, M. Imran, M. A. Nawaz, T. Hussain, M. Ali, M. Rafiq, M. A. Kamil (2018). „Bacterial biofilm and associated infections“. In: *Journal of the Chinese Medical Association* 81.1, S. 7–11.
- Jin, T., Y. liang Zhu, J. Li, J. Shi, X. qing He, J. Ding, Y. qing Xu (2013). „Staphylococcal protein A, Panton-Valentine leukocidin and coagulase aggravate the bone loss and bone destruction in osteomyelitis“. In: *Cellular Physiology and Biochemistry* 32.2, S. 322–333.
- Josse, J., F. Velard, S. C. Gangloff (2015). „Staphylococcus aureus vs. osteoblast: relationship and consequences in osteomyelitis“. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 5, S. 85.
- Kavanagh, N., F. J. O’Brien, S. W. Kerrigan (2018). „Staphylococcus aureus protein A causes osteoblasts to hyper-mineralise in a 3D extra-cellular matrix environment“. In: *PloS one* 13.6, e0198837.
- Kavukcuoglu, N., P. Patterson-Buckendahl, A. Mann (2009). „Effect of osteocalcin deficiency on the nanomechanics and chemistry of mouse bones“. In: *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 2.4, S. 348–354.
- Kintarak, S., S. A. Whawell, P. M. Speight, S. Packer, S. P. Nair (2004). „Internalization of Staphylococcus aureus by human keratinocytes“. In: *Infection and immunity* 72.10, S. 5668–5675.
- Komori, T. (2010). „Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2“. In: *Cell and tissue research* 339.1, S. 189.
- (2006). „Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors“. In: *Journal of cellular biochemistry* 99.5, S. 1233–1239.
- Kurtz, S. M., E. Lau, H. Watson, J. K. Schmier, J. Parvizi (2012). „Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States“. In: *The Journal of arthroplasty* 27.8, S. 61–65.
- Lamagni, T. (2014). „Epidemiology and burden of prosthetic joint infections“. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69.suppl_1, S. i5–i10.
- Le, K. Y., M. D. Park, M. Otto (2018). „Immune evasion mechanisms of Staphylococcus epidermidis biofilm infection“. In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 359.
- Lee, M.-H., A. Javed, H.-J. Kim, H.-I. Shin, S. Gutierrez, J.-Y. Choi, V. Rosen, J. L. Stein, A. J. Van Wijnen, G. S. Stein et al. (1999). „Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic

- protein-2 and transforming growth factor β 1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation“. In: *Journal of cellular biochemistry* 73.1, S. 114–125.
- Lee, K.-S., H.-J. Kim, Q.-L. Li, X.-Z. Chi, C. Ueta, T. Komori, J. M. Wozney, E.-G. Kim, J.-Y. Choi, H.-M. Ryoo et al. (2000). „Runx2 is a common target of transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12“. In: *Molecular and cellular biology* 20.23, S. 8783–8792.
- Legeay, G., F. Poncin-Epaillard, C. R. Arciola (2006). „New surfaces with hydrophilic/hydrophobic characteristics in relation to (no) bioadhesion“. In: *The International journal of artificial organs* 29.4, S. 453–461.
- Lentino, J. R. (2003). „Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists“. In: *Clinical Infectious Diseases* 36.9, S. 1157–1161.
- Lewis, K. (2001). „Riddle of biofilm resistance“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45.4, S. 999–1007.
- Liggett Jr, W. H., J. B. Lian, J. S. Greenberger, J. Glowacki (1994). „Osteocalcin promotes differentiation of osteoclast progenitors from murine long-term bone marrow cultures“. In: *Journal of cellular biochemistry* 55.2, S. 190–199.
- Lowe D, J. S. (27. Okt. 2018). *Alkaline Phosphatase*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459201/> (besucht am 10. 12. 2018).
- Lucero, C. M., O. A. Vega, M. M. Osorio, J. C. Tapia, M. Antonelli, G. S. Stein, A. J. Van Wijnen, M. A. Galindo (2013). „The cancer-related transcription factor Runx2 modulates cell proliferation in human osteosarcoma cell lines“. In: *Journal of cellular physiology* 228.4, S. 714–723.
- Lüllmann-Rauch, R. (2008). *Histologie*. De Boeck Supérieur, S. 144–165.
- Malone, J., S. L. Teitelbaum, G. Griffin, R. Senior, A. Kahn (1982). „Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents.“ In: *The Journal of cell biology* 92.1, S. 227–230.
- Manolagas, S. C., R. L. Jilka (1995). „Bone marrow, cytokines, and bone remodeling—emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis“. In: *New England journal of medicine* 332.5, S. 305–311.
- Massey, R. C., M. J. Horsburgh, G. Lina, M. Höök, M. Recker (2006). „Opinion: The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission?“ In: *Nature Reviews Microbiology* 4.12, S. 953.
- Menanteau, J., W. F. Neuman, M. W. Neuman (1982). „A study of bone proteins which can prevent hydroxyapatite formation“. In: *Metabolic Bone Disease and Related Research* 4.2, S. 157–162.
- Misra, D. (1992). „Reaction of Alizarin Red S with hydroxyapatite: Stoichiometry and surface effect“. In: *Colloids and surfaces* 66.3, S. 181–187.

- Monds, R. D., G. A. O'Toole (2009). „The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review“. In: *Trends in microbiology* 17.2, S. 73–87.
- Montanaro, L., C. R. Arciola, L. Baldassarri, E. Borsetti (1999). „Presence and expression of collagen adhesin gene (cna) and slime production in Staphylococcus aureus strains from orthopaedic prosthesis infections“. In: *Biomaterials* 20.20, S. 1945–1949.
- Montanaro, L., P. Speciale, D. Campoccia, S. Ravaioli, I. Cangini, G. Pietrocola, S. Giannini, C. R. Arciola (2011). „Scenery of Staphylococcus implant infections in orthopedics“. In: *Future Microbiology* 6.11, S. 1329–1349.
- Morgenstern, M., C. Erichsen, C. von Räden, W. J. Metsemakers, S. L. Kates, T. F. Moriarty, S. Hungerer (2016). „Staphylococcal orthopaedic device-related infections in older patients“. In: *Injury* 47.7, S. 1427–1434.
- Mundy, G. R., J. W. Poser (1983). „Chemotactic activity of the γ -carboxyglutamic acid containing protein in bone“. In: *Calcified tissue international* 35.1, S. 164–168.
- Nakashima, K., B. de Crombrughe (2003). „Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation“. In: *TRENDS in Genetics* 19.8, S. 458–466.
- NCBI (13. Feb. 2019a). *ALPL alkaline phosphatase, biomineralization associated [Homo sapiens (human)]*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/249> (besucht am 17.03.2019).
- (13. Feb. 2019b). *BGLAP bone gamma-carboxyglutamate protein [Homo sapiens (human)]*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/632> (besucht am 17.03.2019).
- (17. März 2019c). *COL1A1 collagen type I alpha 1 chain [Homo sapiens (human)]*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1277> (besucht am 12.03.2019).
- (12. März 2019d). *RUNX2 runt related transcription factor 2 [Homo sapiens (human)]*. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=860 (besucht am 17.03.2019).
- (9. Dez. 2018). *SPP1 secreted phosphoprotein 1 [Homo sapiens (human)]*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6696> (besucht am 22.12.2018).
- Neumann, K. (1995). „Some studies on somatic embryogenesis. A tool in plant biotechnology. Pflanzliche Zell-Gewebekulturen“. In: *Ulmer Verlag, Stuttgart* 304, S. 1–27.
- Neve, A., A. Corrado, F. P. Cantatore (2013). „Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects“. In: *Journal of cellular physiology* 228.6, S. 1149–1153.
- Nguyen, T. H., M. D. Park, M. Otto (2017). „Host response to Staphylococcus epidermidis colonization and infections“. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7, S. 90.
- Oliveira, W., P. Silva, R. Silva, G. Silva, G. Machado, L. Coelho, M. Correia (2018). „Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections on implants“. In: *Journal of Hospital Infection* 98.2, S. 111–117.

- Otto-Lambertz, C., A. Yagdiran, F. Wallscheid, P. Eysel, N. Jung (2017). „Periprosthetic Infection in Joint Replacement: Diagnosis and Treatment“. In: *Deutsches Ärzteblatt International* 114.20, S. 347.
- Otto, M. (2013). „Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity“. In: *Annual review of medicine* 64, S. 175–188.
- (2009). „Staphylococcus epidermidis—the ‘accidental’ pathogen“. In: *Nature reviews microbiology* 7.8, S. 555.
- Oury, F., G. Sumara, O. Sumara, M. Ferron, H. Chang, C. E. Smith, L. Hermo, S. Suarez, B. L. Roth, P. Ducy et al. (2011). „Endocrine regulation of male fertility by the skeleton“. In: *Cell* 144.5, S. 796–809.
- Pampena, D. A., K. A. Robertson, O. Litvinova, G. Lajoie, H. A. Goldberg, G. K. Hunter (2004). „Inhibition of hydroxyapatite formation by osteopontin phosphopeptides“. In: *Biochemical Journal* 378.3, S. 1083–1087.
- Parfitt, A. (1984). „Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: cellular mechanisms and biomechanical consequences“. In: *Calcified tissue international* 36.1, S123–S128.
- Parvizi, J., B. Adeli, B. Zmistowski, C. Restrepo, A. S. Greenwald (2012). „Management of periprosthetic joint infection: the current knowledge: AAOS exhibit selection“. In: *JBJS* 94.14, e104.
- Proctor, R. A., C. Von Eiff, B. C. Kahl, K. Becker, P. McNamara, M. Herrmann, G. Peters (2006). „Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections“. In: *Nature Reviews Microbiology* 4.4, S. 295.
- Pulido, L., E. Ghanem, A. Joshi, J. J. Purtill, J. Parvizi (2008). „Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors“. In: *Clinical orthopaedics and related research* 466.7, S. 1710–1715.
- Rebouças, E. d. L., J. J. d. N. Costa, M. J. Passos, J. R. d. S. Passos, R. v. d. Hurk, J. R. V. Silva (2013). „Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues“. In: *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56.1, S. 143–154.
- Resch, A., S. Leicht, M. Saric, L. Pásztor, A. Jakob, F. Götz, A. Nordheim (2006). „Comparative proteome analysis of Staphylococcus aureus biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling“. In: *Proteomics* 6.6, S. 1867–1877.
- Romberg, R. W., P. G. Werness, B. L. Riggs, K. G. Mann (1986). „Inhibition of hydroxyapatite-crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins“. In: *Biochemistry* 25.5, S. 1176–1180.
- RYDÉN, C., A. I. YACOUB, I. MAXE, D. HEINEGÅRD, Å. OLDBERG, A. FRANZÉN, Å. LJUNGH, K. RUBIN (1989). „Specific binding of bone sialoprotein to Staphylococcus aureus isolated from patients with osteomyelitis“. In: *European journal of biochemistry* 184.2, S. 331–336.

- Sabaté Brescó, M., L. G. Harris, K. Thompson, B. Stanic, M. Morgenstern, L. O'Mahony, R. G. Richards, T. F. Moriarty (2017). „Pathogenic mechanisms and host interactions in *Staphylococcus epidermidis* device-related infection“. In: *Frontiers in microbiology* 8, S. 1401.
- Sadykov, M. R., K. W. Bayles (2012). „The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals“. In: *Current opinion in microbiology* 15.2, S. 211–215.
- Salasznyk, R. M., W. A. Williams, A. Boskey, A. Batorsky, G. E. Plopper (2004). „Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells“. In: *BioMed Research International* 2004.1, S. 24–34.
- Sánchez, C. J., K. Mende, M. L. Beckius, K. S. Akers, D. R. Romano, J. C. Wenke, C. K. Murray (2013). „Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections“. In: *BMC infectious diseases* 13.1, S. 47.
- Sanchez, C. J., C. L. Ward, D. R. Romano, B. J. Hurtgen, S. K. Hardy, R. L. Woodbury, A. V. Trevino, C. R. Rathbone, J. C. Wenke (2013). „*Staphylococcus aureus* biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption in vitro“. In: *BMC musculoskeletal disorders* 14.1, S. 187.
- Secor, P. R., G. A. James, P. Fleckman, J. E. Olerud, K. McInnerney, P. S. Stewart (2011). „*Staphylococcus aureus* Biofilm and Planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes“. In: *BMC microbiology* 11.1, S. 143.
- Seeman, E., P. D. Delmas (2006). „Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility“. In: *New England journal of medicine* 354.21, S. 2250–2261.
- Singh, R., P. Ray, A. Das, M. Sharma (2010). „Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms“. In: *Journal of antimicrobial chemotherapy* 65.9, S. 1955–1958.
- Somayaji, S. N., Y. M. Huet, H. E. Gruber, M. C. Hudson (2010). „UV-killed *Staphylococcus aureus* enhances adhesion and differentiation of osteoblasts on bone-associated biomaterials“. In: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 95.2, S. 574–579.
- Standal, T., M. Borset, A. Sundan et al. (2004). „Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling“. In: *Exp Oncol* 26.3, S. 179–84.
- Stein, G. S., J. B. Lian (1993). „Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype“. In: *Endocrine reviews* 14.4, S. 424–442.
- Stein, G. S., J. B. Lian, A. J. Van Wijnen, J. L. Stein, M. Montecino, A. Javed, S. K. Zaidi, D. W. Young, J.-Y. Choi, S. M. Pockwinse (2004). „Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression“. In: *Oncogene* 23.24, S. 4315.

- Steinhausen, E. (2017). „Low-Grade-InfektLow-grade infection“. In: *Trauma und Berufskrankheit* 19.3, S. 267–271.
- Steitz, S. A., M. Y. Speer, M. D. McKee, L. Liaw, M. Almeida, H. Yang, C. M. Giachelli (2002). „Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification“. In: *The American journal of pathology* 161.6, S. 2035–2046.
- Subbiahdoss, G., R. Kuijer, D. W. Grijpma, H. C. van der Mei, H. J. Busscher (2009). „Microbial biofilm growth vs. tissue integration:“the race for the surface” experimentally studied“. In: *Acta biomaterialia* 5.5, S. 1399–1404.
- Tani-Ishii, N., A. Tsunoda, T. Umemoto (1997). „Osteopontin antisense deoxyoligonucleotides inhibit bone resorption by mouse osteoclasts in vitro“. In: *Journal of periodontal research* 32.6, S. 480–486.
- Thirunavukkarasu, K., D. L. Halladay, R. R. Miles, X. Yang, R. J. Galvin, S. Chandrasekhar, T. J. Martin, J. E. Onyia (2000). „The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function“. In: *Journal of Biological Chemistry* 275.33, S. 25163–25172.
- Tuscherr, L., B. Löffler (2016). „Staphylococcus aureus dynamically adapts global regulators and virulence factor expression in the course from acute to chronic infection“. In: *Current genetics* 62.1, S. 15–17.
- Urquhart, D. M., F. S. Hanna, S. L. Brennan, A. E. Wluka, K. Leder, P. A. Cameron, S. E. Graves, F. M. Cicuttini (2010). „Incidence and risk factors for deep surgical site infection after primary total hip arthroplasty: a systematic review“. In: *The Journal of arthroplasty* 25.8, S. 1216–1222.
- Ventola, C. L. (2015). „The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats“. In: *Pharmacy and therapeutics* 40.4, S. 277.
- Walter, G., M. Kemmerer, C. Kappler, R. Hoffmann (2012). „Behandlungsalgorithmen der chronischen Osteomyelitis“. In: *Deutsches Ärzteblatt* 109.14, S. 257–264.
- Ward, C. L., C. J. Sanchez Jr, B. E. Pollot, D. R. Romano, S. K. Hardy, S. C. Becerra, C. R. Rathbone, J. C. Wenke (2015). „Soluble factors from biofilms of wound pathogens modulate human bone marrow-derived stromal cell differentiation, migration, angiogenesis, and cytokine secretion“. In: *BMC microbiology* 15.1, S. 75.
- Wei, J., G. Karsenty (2015). „An overview of the metabolic functions of osteocalcin“. In: *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 16.2, S. 93–98.
- Wengler, A., U. Nimptsch, T. Mansky (2014). „Hüft-und Kniegelenkersatz in Deutschland und den USA“. In: *Deutsches Ärzteblatt* 111, S. 407–16.
- Wennberg, C., L. Hesse, P. Lundberg, S. Mauro, S. Narisawa, U. H. Lerner, J. L. Millán (2000). „Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice“. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 15.10, S. 1879–1888.

- Widaa, A., T. Claro, T. J. Foster, F. J. O'Brien, S. W. Kerrigan (2012). „Staphylococcus aureus protein A plays a critical role in mediating bone destruction and bone loss in osteomyelitis“. In: *PloS one* 7.7, e40586.
- Wu, H., C. Moser, H.-Z. Wang, N. Høiby, Z.-J. Song (2015). „Strategies for combating bacterial biofilm infections“. In: *International journal of oral science* 7.1, S. 1.
- Wu, T., J. Zhang, B. Wang, Y. Sun, Y. Liu, G. Li (2018). „Staphylococcal enterotoxin C2 promotes osteogenesis of mesenchymal stem cells and accelerates fracture healing“. In: *Bone & joint research* 7.2, S. 179–186.
- Yamate, T., H. Mocharla, Y. Taguchi, J. U. Igietseme, S. C. Manolagas, E. Abe (1997). „Osteopontin expression by osteoclast and osteoblast progenitors in the murine bone marrow: demonstration of its requirement for osteoclastogenesis and its increase after ovariectomy“. In: *Endocrinology* 138.7, S. 3047–3055.
- Zimmerli, W., A. Trampuz, P. E. Ochsner (2004). „Prosthetic-joint infections“. In: *New England Journal of Medicine* 351.16, S. 1645–1654.