



Fakultät für Medizin

Der Einfluss von Biofilm-konditioniertem Medium von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* auf die Inflammation und Apoptose primärer humaner Osteoblasten

Magdalena Catherine Jegen

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation

Vorsitzender: **Prof. Dr. Wolfgang Weber**

Prüfer*Innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Rainer Burgkart
2. Priv.-Doz. Dr. Moritz Crönlein

Die Dissertation wurde am 03.03.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.07.2021 angenommen.

Abstract

Background: Biofilm-mediated infections are some of the most common complications of artificial joint replacement. Due to the specific morphology of biofilm-related infections, bacteria are encapsulated off by an extracellular matrix (ECM). This mechanism accounts for the highly aggressive therapy necessary to eradicate such an infection usually entailing multiple surgeries, as well as extended antibiotic treatment. The two most common germs causing these infections are *S. aureus* and *S. epidermidis*. Despite their similar ability to form biofilms they differ substantially in their virulence factors. Virulence is greatly mediated by the secretion of molecules by the bacteria such as polysaccharides, lipids, extracellular DNA and toxins. Understanding of the full pathogenic process is still subject of current research. The aim of this study was to examine the effect of the metabolic products of the germs on the human *Osteoblasts (hOB)* of different patients on inflammation and apoptosis. Variable factors in this study were incubation time as well as concentration of biofilm-conditioned medium (BCM).

Methods: BCM was produced by incubating it with either *S. aureus* or *S. epidermidis* for 48 hours and then sterily adding it in different concentrations for different incubation times to *hOB*. Metabolic activity was measured using WST-1-Assays, the cell count was calculated by using CyQuant measurements. Differences in genetic expression of key factors in inflammation and apoptosis were assessed with real time PCR.

Results: Both germs caused a significant reduction of the metabolic activity of the *hOB* as well as reducing the cell count. Measurements of the inflammatory reaction, however, showed that the cells showed considerable differences between *S. aureus* and *S. epidermidis*. Incubation with BCM from *S. aureus* caused significantly higher inflammatory reaction compared to *S. epidermidis*. Additionally, substantial differences between the various patients were measured. The investigation regarding apoptotic factors scarcely showed any differences.

Discussion: The already established difference in virulence between the two germs was confirmed by the different intensity of the inflammatory reaction of the *hOB*. The differences between inflammatory reaction of the various patients allows the speculation that patients might profit from therapy adapted to their individual susceptibility for periprosthetic infections. Further investigations regarding predisposing factors for fulminant courses of infection in different patient groups need to be conducted.

Zusammenfassung

Hintergrund: Biofilm-vermittelte Infektionen sind eine der größten Komplikationen des künstlichen Gelenkersatzes. Durch die spezielle Morphologie des Biofilms mit Abkapselung der Bakterien durch eine dichte extrazelluläre polymere Substanz (EPS) gestaltet sich die Therapie einer solchen Infektion aktuell sehr aggressiv und geht häufig mit multiplen operativen Eingriffen und ausgedehnter Antibiotikatherapie einher. Die zwei häufigsten Keime einer solchen Infektion sind *S. aureus* und *S. epidermidis*, trotz ihrer Gemeinsamkeit der Biofilm-Produktion unterscheiden sich die Keime erheblich in den produzierten Virulenzfaktoren. Die Virulenz und deren Einfluss auf die Umwelt wird vor allem auch durch die von den Bakterien sezernierte Substanzen vermittelt. Hierzu gehören unter anderem extrapolymere Substanzen wie Polysaccharide, Lipide, extrazelluläre DNA und Toxine. Die genaue Wirkung der Virulenz von Biofilmen auf Knochenzellen ist nicht vollständig verstanden. Das Ziel dieser Arbeit lag darin, den alleinigen Effekt der Stoffwechselprodukte der Bakterien auf humane *Osteoblasten* (*hOB*) von unterschiedlichen Patienten anhand der Konzentration und der Inkubationsdauer auf die Apoptose und inflammatorischen Reaktion zu untersuchen.

Methoden: Biofilm-konditioniertes Medium (BCM) wurde durch 48-stündige Inkubation mit jeweils *S. aureus* oder *S. epidermidis* produziert und steril anschließend in unterschiedlichen Konzentrationen für verschiedene Inkubationszeiten mit humanen *Osteoblasten* (*hOB*) inkubiert. Mittels WST-1-Assay wurden Aussagen über die metabolische Aktivität und mittels CyQuant über die Zellzahl getroffen. Die Veränderung der genetischen Expression von Schlüsselfaktoren der Inflammation und Apoptose wurde mittels real-time-PCR bestimmt.

Ergebnisse: Für beide Keime konnte eine signifikante Minderung der metabolischen Aktivität der *hOB* sowie der Zellzahl bestimmt werden. Bei der Untersuchung der inflammatorischen Reaktion wurden hingegen deutliche Unterschiede der beiden Keime festgestellt. Die Inkubation mit BCM von *S. aureus* führte in den *hOB* zu deutlich höheren inflammatorischen Markern als *S. epidermidis*. Dabei fanden sich zusätzlich erhebliche interindividuelle Unterschiede zwischen den Zellen der verschiedenen Patienten. Bei der Untersuchung der Apoptose konnten hingegen kaum Veränderungen festgestellt werden.

Diskussion: Die bereits etablierten Unterschiede der Virulenz der Keime zeigt auch in unserer Arbeit eine unterschiedlich ausgeprägte Intensität der inflammatorischen Reaktion. Die Patienten-individuell ausgeprägten Unterschiede der inflammatorischen Reaktion hingegen eröffnet zudem die Perspektive die Behandlung mehr an die individuelle Suszeptibilität für periprothetische Infektionen anzupassen. Weitere Untersuchungen zu prädisponierenden Faktoren für fulminante Verläufe in verschiedenen Patientengruppen sollten weiterführend durchgeführt werden.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Zusammenfassung	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	11
1.1 Motivation der Arbeit	11
1.2 Ziel der Arbeit	13
1.3 Knochen	14
1.4 Osteitis und periprothetische Infektionen	15
1.5 Biofilm	18
1.6 Staphylokokken	20
1.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)	20
1.6.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> (<i>S. epidermidis</i>)	21
1.7 Inflammation	22
1.7.1 Caspase-1	23
1.7.2 Toll-like-Rezeptoren	24
1.7.3 Interleukin 6 (IL6)	24
1.8 Apoptose	26
1.8.1 p53	28
1.8.2 BCL2 associated X (BAX)	28
1.8.3 Apoptotic Peptidase Activating Factor (Apaf-1)	29
1.8.4 Caspase-3	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.1.1 Labormaterialien	30
2.1.2 Zellmaterial	31
2.1.2.1 Osteoblasten	31
2.1.2.2 <i>S. aureus</i>	31
2.1.2.3 <i>S. epidermidis</i>	31
2.1.3 Medien	31

2.1.3.1 Osteogenes Proliferationsmedium	31
2.1.3.2 Biofilm-konditioniertes Medium	32
2.1.4 Reagenzien	33
2.1.5 Primer	34
2.1.6 Kits	35
2.1.7 Software	35
2.1.8 Geräte	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 Herstellung des Biofilm-konditionierten Mediums (BCM)	37
2.2.1.1 Inokulation von <i>S. epidermidis</i> und <i>S. aureus</i>	37
2.2.1.2 Ansetzen der Vorkultur	37
2.2.1.3 Herstellung der Arbeitssuspension	37
2.2.1.4 Anzucht des Biofilms	37
2.2.1.5 Wechsel des Mediums	37
2.2.1.6 Abnahme des Biofilm-konditioniertem Mediums	37
2.2.1.7 Vorbereitung des BCM	38
2.2.2 Kultivierung humaner Osteoblasten (hOB's)	39
2.2.3 Inkubation der hOB's mit BCM	39
2.2.4 Proliferationsmessung mittels WST-Assay	40
2.2.4.1 Aussaat der Platten	40
2.2.4.2 Mediumwechsel	40
2.2.4.3 Assay	41
2.2.4.4 Messung	41
2.2.4.5 Auswertung	41
2.2.5 Indirekte Zellzahlbestimmung mittels DNA-Quantifizierung	41
2.2.5.1 Assay	41
2.2.5.2 Messung	42
2.2.5.3 Auswertung	42
2.2.6 Genexpressionsanalyse	42
2.2.6.1 RNA-Isolierung	42
2.2.6.2 Reverse Transkription	42
2.2.6.3 Messung	43
2.2.6.4 Auswertung	44
2.2.7 Statistische Auswertung	45
3 Ergebnisse	46
3.1 pH-Analysen	46
3.2 Morphologie	46
3.3 WST	48
3.3.1 Vergleich BCM vs. Kontrollmedium	48
3.3.2 Vergleich der beiden Keime	49
3.3.3 Vergleich des zeitlichen Einflusses	50
3.3.4 Vergleich der Konzentration	51
3.4 Indirekte Zellzahlbestimmung mittels DNA-Quantifizierung	52
3.4.1 Vergleich BCM vs. Kontrollmedium	52
3.4.2 Vergleich der beiden Keime	53
3.4.3 Vergleich des zeitlichen Verlaufs	53
3.4.4 Vergleich der Konzentration	54
3.5 PCR	55
3.5.1 Inflammation	55

3.5.1.1 Caspase-1	55
3.5.1.2 TLR2	56
3.5.1.3 IL6	56
3.5.2 Apoptose	57
3.5.2.1 p53	57
3.5.2.2 BCL2 (BAX)	58
3.5.2.3 Apaf-1	59
3.4.2.4 Caspase-3	60
3.5.3 Patientenindividuelle Unterschiede	61
3.5.3.1 Vergleich von Patienten unterschiedlichen Alters	63
3.5.3.2 Vergleich Patienten unterschiedlichen Geschlechts	65
4 Diskussion	67
4.1 Der Einfluss des BCM auf die Inflammation	69
4.2 Einfluss des BCM auf die Apoptose	71
4.3 Limitationen dieser Arbeit	74
4.4 Ausblick	75
Danksagung	77
Literaturverzeichnis	78

Abkürzungsverzeichnis

Aap	Accumulation-associated protein
Apaf-1	Apoptotic Peptidase Activating Factor
ATP	Adenosin-Triphosphat
BAX	BCL2 associated X
BCM	Biofilm-konditioniertes Medium
CAD	caspase-activated-dnase
CRP	c-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECM	Extracellular matrix
EPS	Extrapolymere Substanz
FAS	Fatty acid synthetas
hOB	Humane Osteoblasten
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL6	Interleukin 6
IL37	Interleukin 37
LPS	Lipoteichonsäuren
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
MSCRMMs	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PAMP	pathogen-associated molecule patterns
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PIA	beta-1,6-linked N-acetylglucosamin
PRR	pattern-recognition-receptors
qtPCR	Quick time Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleinsäure
<i>S. aureus</i>	Staphylococcus aureus
<i>S. epidermidis</i>	Staphylococcus epidermidis
TLR	Toll-like Rezeptor
TLR2	Toll-like Rezeptor 2
TLR6	Toll-like Rezeptor 6
TNF- α	Tumor-nekrose Faktor alpha
WST-1	water soluble tetrazolium

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Labormaterialien	30
Tabelle 2: Patientenbezogene Daten der verwendeten hOB	31
Tabelle 3: Zusammensetzung des osteogenen Proliferationsmediums für die Kultivierung humaner Osteoblasten.....	32
Tabelle 4: Zusammensetzung des TSB Mediums	32
Tabelle 5: Zusammensetzung des osteogenen Basismediums	33
Tabelle 6: Reagenzien	33
Tabelle 7: Primer für die qtPCR.....	34
Tabelle 8: Kits	35
Tabelle 9: Software.....	35
Tabelle 10: Geräte	36
Tabelle 11: Bezeichnung der untersuchten Gruppen.....	39
Tabelle 12: Zusammensetzung der CyQuant-Arbeitslösung.....	42
Tabelle 13: Zusammensetzung einer Reaktion der Wipeout Puffer-Lösung	43
Tabelle 14: Zusammensetzung des RT Mastermix	43
Tabelle 15: Reaktionsabfolge der qPCR	44
Tabelle 16: Legende der Darstellung der Signifikanzen	45

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der Differenzierung einer mesenchymalen Stammzelle zu einem Osteozyten nach Manolagas et al. (Manolagas and Jilka 1995) 15
- Abbildung 2: Vorgang der Biofilmentstehung modifiziert nach Monds et al. (Monds and O'Toole 2009) 19
- Abbildung 3: Komprimierte Übersicht der untersuchten inflammatorischen Reaktion modifiziert nach Rea et al. (Rea, Gibson et al. 2018) Zellschäden oder Infekte lösen die Ausschüttung von DAMP („damage-associated-molecule-patterns“,) beziehungsweise PAMP („pathogen-associated-molecule-patterns“) aus. Diese aktivieren Rezeptoren, die PRR („pattern-recognition-receptors“), welche eine Immunreaktion auslösen. Zu diesen Rezeptoren gehören unter anderem die TLR („toll-like-receptor“) sie aktivieren über den NF- κ B-Stoffwechselweg („nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“) die Zytokinproduktion. Neben diesem Weg erfolgte eine Zytokinausschüttung jedoch auch maßgeblich durch die Aktivierung der Caspase 1 durch das sog. Inflammasom. Die ausgeschütteten Zytokine führen zu einer Ausschüttung und Aktivierung von IL6 („Interleukin 6“)..... 24
- Abbildung 4: Pleiotrope Funktionen von IL6, adaptiert nach Tanaka et al. (Tanaka, Narazaki et al. 2014) IL6 beeinflusst den Körper durch Aktivierung verschiedener Kreisläufe nach seiner Ausschüttung. Zunächst hat es die immunologische Funktion der B- und T-Zell-Aktivierung. Physiologisch wird so durch einen äußeren Einfluss eine Immunantwort induziert. Es kommt durch eine Aktivierung von B-Zellen zu einer Autokörperproduktion, sowie durch eine Aktivierung der T-Zellen zu einer Differenzierung der Th17-Zellen, sowie zu einer Minderung der Treg-Differenzierung. Eine Übermäßige Differenzierung führt jedoch zu chronischer Autoinflammation sowie Autoantikörperhypergammaglobulinämie. Weiterhin wird in der Leber die Ausschüttung von Hecpidin, Fibrinogen, CRP und Serum Amyloid induziert und die Produktion von Albumin vermindert. Die Entstehung einer Anämie, und Ödemen wird begünstigt, das Kardiovaskuläre Risiko und die Ablagerung von Amyloid A wird erhöht. Im Knochenmark sorgt es für eine vermehrte Freisetzung von Thrombozyten und somit für eine erhöhte Koagulabilität des Bluts. Durch die Aktivierung von synovialen Fibroblasten wird vermehrt VEGF produziert. Die Angiogenese und die vaskuläre Permeabilität werden erhöht und Gelenkschmerzen begünstigt. Zusätzlich induziert IL6 durch Dermale Fibroblasten und eine vermehrte Kollagen I Produktion Fibrosen im Körper..... 26
- Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Apoptoseinduktion, adaptiert an Youle et al. sowie Schuler et al. (Youle and Strasser 2008)..... 27
- Abbildung 6: Herstellung des Biofilm-konditionierten Mediums. Die Bakterienkolonien werden mittels Impföse von der Blutagarplatte gelöst und in TCB-Medium

suspendiert. Steriles TCB-Medium wird in eine 6-Well-Platte pipettiert, die Bakterien-Suspension wird in Thin-Certs in den 6-Well-Platten pipettiert und für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wird das TCB-Medium in den Thin Certs abpipettiert und diese in eine neue 6-Well-Platte, gefüllt mit osteogenem Basismedium (OBM), umgesetzt. Die Thin-Certs werden mit OBM befüllt und das Medium für 24 Stunden inkubiert. Nach 24-Stunden ist das Biofilm-konditionierte Medium (BCM) fertig. Die Thin-Certs werden in eine neue 6-Well-Platte mit OBM umgesetzt und erneut für 24 Stunden inkubiert, das fertige BCM wird anschließend gepoolt.....	38
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Abläufe der Zellkultur	40
Abbildung 8: Lichtmikroskopische Darstellung humaner Osteoblasten, Inkubation mit OPM, 320-fache Vergrößerung.....	46
Abbildung 9: Lichtmikroskopisches Bild der hOB inkubiert mit Kontrollmedium.....	47
Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahme hOB nach 72h Inkubation mit BCM von S. aureus	47
Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme von hOB nach 72h Inkubation mit BCM von S. epidermidis.....	48
Abbildung 12: Vergleich der metabolischen Aktivität nach Inkubation mit BCM zu der Kontrolle (Kontrollwerte als KO in rot markiert)	49
Abbildung 13: Untersuchung des Einflusses der Keimart, sowie Dauer und Konzentration zur Kontrolle (Kontrollwerte als KO in rot markiert)	50
Abbildung 14: Vergleich des Einflusses der Zeit der Inkubation mit BCM, links bei s. aureus, rechts bei S. epidermidis (Kontrollwerte als KO in rot markiert)	50
Abbildung 15: Vergleich des zeitlichen Verlaufs bei S. epidermidis nach 6 Tagen (Kontrollwerte als KO in rot markiert)	51
Abbildung 16: Vergleich des Einflusses der Konzentration des BCM, bei s. aureus (links) und bei S. epidermidis (rechts)	51
Abbildung 17: Vergleich BCM und KO (Kontrollwerte als KO in rot markiert)	52
Abbildung 18: Vergleich der Veränderung der DNA-Quantität nach Inkubation mit BCM zwischen S. aureus und S. epidermidis (Kontrollwerte als KO in rot markiert).....	53
Abbildung 19: Vergleich des Einflusses der Dauer der Inkubation mit BCM von S. aureus (links) und S. epidermidis (rechts), Kontrollwerte als KO in rot markiert	54
Abbildung 20: Vergleich des Einflusses der Konzentration des BCM von S. aureus (links) und S. epidermidis (rechts), Kontrollwerte als KO in rot markiert	54
Abbildung 21: Untersuchung der relativen Quantifikation von Caspase-1 der BCM-behandelten hOB	55
Abbildung 22: Untersuchung der Relativen Quantifikation von TLR-2 der BCM-behandelten hOB	56
Abbildung 23: Untersuchung der relativen Quantifikation von IL6 der BCM-behandelten hOB --> Grenzwerte für S. aureus immer höher, patientenabhängig wurden zum Teil Maximalwerte von bis 1000 gemessen, die große Standardabweichung ergibt sich aus den patientenindividuellen Unterschieden.	57

Abbildung 24: Untersuchung der relativen Quantifikation von P53 der BCM-behandelten hOB	58
Abbildung 25: Untersuchung der relativen Quantifikation von BAX der BCM-behandelten hOB	58
Abbildung 26: Untersuchung der relativen Quantifikation von Apaf-1 der BCM-behandelten hOB	59
Abbildung 27: Vergleich der Relativen Quantifikation von Caspase-3 der BCM-behandelten Zellen	60
Abbildung 28: Relative Quantifikation der Primer Caspase 1 und TLR2 von hOB nach Inkubation mit BCM (100% Konzentration) von SA, Legende s. Abbildung 29.	61
Abbildung 29: Relative Quantifikation des Primers für Interleukin 6 von hOB nach Inkubation mit BCM (100% Konzentration) von SA	62
Abbildung 30: Relative Quantifikation der Primer Caspase 3 und p53 von hOB nach Inkubation mit BCM (100% Konzentration) von SA, Legende s. Abbildung 29.	62
Abbildung 31: Relative Quantifikation der Primer Apaf und BAX von hOB nach Inkubation mit BCM (100% Konzentration) von SA, Legende s. Abbildung 29.	63
Abbildung 32: Vergleich der inflammatorischen Reaktion von Patient A und D.....	64
Abbildung 33: Vergleich der apoptotischen Reaktion von Patient A und D.....	64
Abbildung 34: Vergleich der inflammatorischen Reaktion von Patient B und G	65
Abbildung 35: Vergleich der apoptotischen Reaktion von Patient B und G.....	66

1 Einleitung

1.1 Motivation der Arbeit

Durch eine stetig alternde Gesellschaft und einen zunehmenden Anspruch an die Funktionalität des Körpers hat die Anzahl der durchgeführten Operationen an dem Bewegungsapparat in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen (Wengler, Nimptsch et al. 2014, Otto-Lambertz, Yagdiran et al. 2017). Zu diesen Operationen gehören auch solche, bei denen Fremdmaterial in den Körper eingebracht wird. Einer dieser Eingriffe ist der künstliche Gelenkersatz. In einer Hochrechnung von Kurtz et al. wurde eine Steigerung der Anzahl der Hüftendoprothesen um 174% bis 2030 in den Vereinigten Staaten vorhergesagt (Kurtz, Ong et al. 2007). Durch die wachsende Zahl solcher Eingriffe steigen auch die vielfältigen Komplikationen. Neben der Luxation und aseptischen Lockerung stellt die periprothetische Infektion mit bis zu 17% die dritthäufigste Komplikation eines solchen Eingriffs dar (Dale, Fenstad et al. 2012, Wetters, Murray et al. 2013, Gundtoft, Overgaard et al. 2015, Otto-Lambertz, Yagdiran et al. 2017). Je nach Lokalisation der Prothese sind auf diese Weise 1-3% der Patienten von einer Infektion betroffen (Winkler 2014). In vielen Studien konnten prädisponierende Faktoren hierfür identifiziert werden; hierzu gehören die Komorbidität von Diabetes mellitus, eine Raucheranamnese, Adipositas und Malnutrition (Poss, Thornhill et al. 1984, Tande, Gomez-Urena et al. 2017). Die Erfolgsraten der Behandlung solcher Infektionen sind schlecht, bis zu 8,8% (Kunutsor, Whitehouse et al. 2016) der Knie- und 7,9% der Hüfterkrankten (Kunutsor, Whitehouse et al. 2015) erleiden auch nach einer Revisionsplastik ein Infektionsrezidiv. Die Einjahresmortalität für Patienten, die eine Revision aufgrund einer periprothetischen Infektion nach einer Totalendoprothetik am Hüftgelenk bekommen haben, liegt bei 8% (Gundtoft, Pedersen et al. 2017).

Die Behandlung von periprothetischen Infektionen ist aufwendig. Entsprechend der Dauer und Ausprägung der jeweiligen Infektion erfolgt eine antibiotischer Behandlung sowie, bei komplexen oder chronischen Infektionen eine teils mehrstufige chirurgische Interventionen (Renz 2015).

Periprothetische Infektionen gehen mit verlängerten Hospitalisierungsraten, sowie zusätzlichen Krankenhausaufenthalten (Schairer, Sing et al. 2014) und einer erhöhten Mortalität einher (Gundtoft, Pedersen et al. 2017). Dies bedingt die aktuelle und prospektive finanzielle Belastung des Gesundheitssystems (Kurtz, Ong et al. 2014).

Die häufigsten Erreger dieser Infektionen sind mit 75,5% Staphylokokken, die dabei weitaus häufigsten Vertreter sind *S. aureus* und *S. epidermidis* (Arciola, Campoccia et al. 2015). Die Herausforderung einer Infektion mit diesen Keimen liegt unter anderem in ihrer Fähigkeit, Bio-

filme zu bilden. Durch die Biofilm-bedingte Abschirmung vor Antibiotika und der wirtsspezifischen Immunabwehr sind sie ein schwieriges Ziel für die medikamentöse Therapie; dies wird durch die Zunahme der Resistenzen gegen viele herkömmliche Antibiotika weiter potenziert (del Pozo and Patel 2007, Kayser, Böttger et al. 2014, Lutro, Langvatn et al. 2014).

Eine vollständige Aufschlüsselung der Bestandteile der Extrazellulären Matrix von Biofilmen ist aufgrund der Komplexität des Aufbaus, sowie die enge Bindung an die Bakterien und die Oberfläche der Fremdkörper auf denen sie wachsen, Bestandteil der aktuellen Forschung (Flemming and Wingender 2010). Die zur Verfügung stehenden Methoden für eine quantitative Analyse der extrazellulären Bestandteile gehen oftmals mit einer Schädigung der Bakterien einher, da viele Bestandteile der Matrix sehr eng an Bakterienzellen gebunden sind. Isolationsmechanismen schädigen dabei häufig die Zellen, sodass eine Differenzierung zwischen extrazellulären Substanzen und dem Mikroorganismus nicht mehr eindeutig möglich ist (Flemming and Wingender 2010). Um also in den Untersuchungen eine möglichst realistische Zusammensetzung der vom Biofilm produzierten Substanzen imitieren zu können, wurde ein „Black-Box-Prinzip“ durchgeführt. Dabei wurde das Medium der Osteoblasten durch ein Thin-Cert getrennt und den Bakterien und dem von ihnen produziertem Biofilm inkubiert. Auf diese Weise können wir davon ausgehen, dass die Bestandteile der ECM in unserem Medium vollständig enthalten sind. Der Effekt alleine dieser löslichen Faktoren des Biofilms auf die Osteoblasten war der Fokus unserer Untersuchungen, eine Interaktion zwischen hOB und Bakterien ist bewusst vermieden worden. Auf diese Weise ist es uns möglich gewesen, spezifische Rückschlüsse auf die Interaktion in vivo zu ziehen.

1.2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Reaktion humaner Osteoblasten verschiedener Patienten bezüglich ihrer inflammatorischen sowie apoptotischen Reaktion auf die Stoffwechselprodukte, die in einem Biofilm von *S. aureus* und *S. epidermidis* produziert wurden, zu untersuchen und zu analysieren. Für diesen Ansatz war uns wichtig, dass wir keine Kohabitation der Bakterienzellen mit den Osteoblasten als Versuchsmodell verwenden, sondern nur die Stoffwechselprodukte betrachten, die von den Bakterien innerhalb einer Inkubation von 48 Stunden gebildet werden. Die beiden Spezies kommen hierbei zu keinem Zeitpunkt in direkten Kontakt, eine gegenseitige Interaktion wird dadurch ausgeschlossen. Durch diesen Versuchsaufbau wird nur die Reaktion auf Stoffwechselprodukte untersucht, die physiologisch von den Bakterienzellen produziert werden und diejenigen ausgeschlossen, deren Produktion durch die Anwesenheit von humanem Gewebe induziert werden könnte.

Die grundlegende Frage ist, ob die Bakterien obligat pathogene Substanzen für Osteoblasten produzieren, um eine mögliche zukünftige Therapieoption der Kohabitation in Erwägung ziehen zu können.

Bei den Untersuchungen standen vor allem der Vergleich der beiden Keime, der zeitliche Verlauf, sowie die Patienten-individuellen Unterschiede im Vordergrund.

Fragestellungen:

1. Hat das BCM einen Effekt auf die metabolische Aktivität der hOB?
2. Unterscheiden sich die Effekte zwischen den beiden Keimen?
3. Macht die Konzentration des BCM einen Unterschied?
4. Wie ist die Entwicklung im zeitlichen Verlauf?
5. Welche Rolle spielt das BCM bei der Apoptose?
6. Welche Rolle spielt das BCM bei der Inflammation?

1.3 Knochen

Das Knochengewebe ist der Hauptbestandteil des Stützgewebes des menschlichen Körpers (Aumüller, Aust et al. 2014). Es lässt sich makroskopisch in eine äußere (die Kortikalis) und eine innere Schicht (die Spongiosa) unterteilen. Die Funktionen des Knochengewebes sind vielfältig: es dient als Gerüst des Körpers und hat somit einen wesentlichen Anteil an der Mobilität. Hierfür ist die Zug-, Druck und Biegefestigkeit des Knochens elementar. Die biomechanische Stabilität wird durch die lokale Interaktion zwischen Mineralsubstanzen der extrazellulären Matrix und der kollagenen Matrix des Knochengewebes (dem Osteoid, die unkalzifizierte Knochensubstanz) ermöglicht (Wirth, Kohn et al. 2013). Das Osteoid wird von Knochenzellen produziert und besteht aus Proteoglykanen, Glukosaminoglykanen und Kollagen Typ I Fasern. Nach der Mineralisierung ist es reich an Kalzium und Phosphat; dies macht den Knochen zu dem wichtigsten Speicher von Mineralien im Körper (Wirth 2014).

Knochengewebe erneuert sich strukturell und biologisch während des gesamten Lebens, hierbei spielen äußere Einflüsse wie Belastung, der Hormonhaushalt und die Ernährung eine große Rolle (Cowan and Kahai 2018). Der Anteil der Knochenmasse an der Gesamtkörpermasse entspricht in etwa 10%, wobei die größte Dichte im 3. Lebensjahrzehnt erreicht wird. Nach Erreichen dieses Maximums verringert sich die Knochenmasse, wobei die Abnahme bei Frauen mit Erreichen der Menopause steiler erfolgt. Darüber hinaus können körperliche Inaktivität, Komorbiditäten, Malnutrition und Durchblutungsstörungen die Knochenmasse negativ beeinflussen (Wirth, Kohn et al. 2013).

Knochenzellen entstehen, wie alle Zellen des Binde- und Stützgewebes, aus mesenchymalen Stammzellen, die sich im Rahmen der osteogenen Differenzierung in spezialisierte Zellen weiterentwickeln (siehe *Abbildung 1*). Die wichtigsten Zellen, die Teil der Knochensubstanz sind, sind Stammzellen, Fibroblasten, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (Aumüller, Aust et al. 2014).

Osteoklasten bauen den Knochen ab, Osteoblasten produzieren neue Knochensubstanz um sich herum, gemeinsam sind sie für die Restrukturierung des Knochens verantwortlich. Wenn Osteoblasten vollständig von Osteoid umgeben sind, werden sie zu Osteozyten. Diese Zellen sind durch lange Fortsätze miteinander verbunden und können so miteinander kommunizieren. Sie sind konzentrisch um sogenannte Haver'sche Kanäle angeordnet, in denen Blutgefäße und Nerven verlaufen (Aumüller, Aust et al. 2014). Die Einheit eines Haver'schen Kanals und die konzentrisch darum angeordneten Osteozyten in der Knochensubstanz wird auch als Haver'sches System bezeichnet.

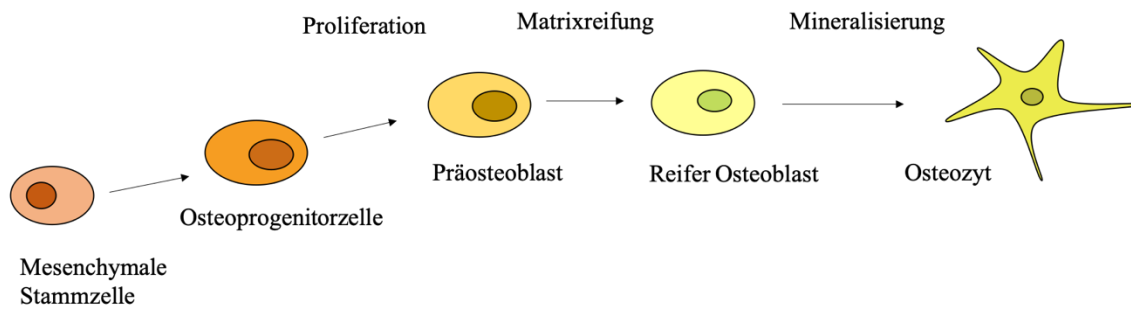


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Differenzierung einer mesenchymalen Stammzelle zu einem Osteozyten nach Manolagas et al. (Manolagas and Jilka 1995)

1.4 Osteitis und periprothetische Infektionen

Der Begriff Osteitis beschreibt eine Entzündung des Knochengewebes. Dabei stellen Staphylokokken die mit Abstand häufigsten Erreger dar (Wirth 2014). Eine Osteitis entsteht durch endogene oder exogene Keimübertragung. Die endogene Keimübertragung wird durch eine hämatologische Streuung von Keimen vermittelt (Wirth 2014). Ort der Infektion ist bei Kindern zu meist die Tibia oder der Femur, bei Erwachsenen vor allem in den Wirbelkörpern (Zimmerli 2010). Die exogene Infektion entsteht durch direkten Keimkontakt mit dem Knochengewebe, beispielsweise durch Trauma oder operative Exposition. Eine akute Infektion ist dadurch definiert, dass sie entweder eine Dauer von bis zu vier Wochen nicht überschreitet, oder innerhalb von vier Wochen nach einer invasiven Diagnostik oder Therapie ausbricht (Renz 2015).

Eine besondere Form der Osteitis stellen periprothetische Infektionen dar. Eine periprothetische Infektion ist eine Infektion des, ein künstliches Gelenk umgebenden, Gewebes (Otto-Lambertz, Yagdiran et al. 2017). Nach Invasion des Gewebes durch die Bakterien kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion und Verlust des vitalen Knochengewebes und schließlich einer Lockerung der Prothese (Arciola, Campoccia et al. 2015). Der größte Risikofaktor für die Entstehung einer solchen Infektion ist die direkte Keimübertragung während der Operation oder durch eine infizierte Operationswunde (Berbari, Hanssen et al. 1998). Aufgrund der möglichen hämatogenen Übertragung von Keimen ist jedoch nach Implantateinsatz die Entstehung einer periprothetischen Infektion lebenslang möglich (Murdoch, Roberts et al. 2001). Für die Entstehung einer fremdkörperassoziierten Infektion genügt bereits eine Keimzahl von 100-1000 Keimen (Renz 2015).

Für die Diagnose einer periprothetischen Infektion wird eine Gelenkspunktion durchgeführt, da laborchemische Serumwerte des Bluts oftmals bei low-grade-Infektionen nicht aussagekräftig sind (Corvec, Portillo et al. 2012). Die Behandlung erfolgt je nach Auftreten und Ausmaß der

Infektion mittels antibiotischer Behandlung und teils mehrzeitigen chirurgischer Interventionen bis hin zur vollständigen Revision des Eingriffs (al. , Renz 2015, Zimmerli and Sendi 2017). Weitere Schritte, die bei der Bekämpfung einer solchen Infektion unterstützend wirken, sind unter anderem der Gebrauch von antibiotikahaltigem Zement zur Fixierung des künstlichen Gelenks, sowie die multidisziplinäre Versorgung in Zentren für betroffene Patienten (Tande, Gomez-Urena et al. 2017). Die Antibiotikatherapie einer periprothetischen Infektion sollte, unabhängig von dem zusätzlichen chirurgischen Interventionen, 12 Wochen lang durchgeführt werden (Renz 2015). Als Antibiotikum wird häufig Rifampicin in Kombination mit einem weiteren Antibiotikum wie einem Aminoglykosid oder Vancomycin verwendet, da es eine gute Biofilm-Aktivität besitzt und durch die Kombination die Wahrscheinlichkeit einer Resistenz der Keime minimiert wird (Renz 2015, Gundtoft, Pedersen et al. 2017, Zimmerli and Sendi 2017). Die Inzidenz für Infektionen nach Implantation von künstlichen Gelenkprothesen liegt bei 1% beim Schulter- und Hüftgelenk bis hin zu 2-3% bei Knie- und Sprunggelenkprothesen, bei Ellenbogengelenkprothesen sogar bis zu 3,3% (Winkler 2014, Watts, Duckworth et al. 2019). Wenn Patienten eine Infektion entwickeln, tritt diese zu 83% innerhalb des ersten postoperativen Jahres auf (Gundtoft, Overgaard et al. 2015). Von allen Komplikationen der Prothesenimplantation stellt die Infektion 10-15% der Fälle dar (Lachiewicz, Rogers et al. 1996, Dale, Fenstad et al. 2012, Gundtoft, Overgaard et al. 2015, Otto-Lambertz, Yagdiran et al. 2017). Nach operativer Revision einer solchen periprothetischen Infektion liegt die Mortalität im Vergleich zu einer Revision aus anderem Grund innerhalb eines Jahres je nach Studie und Prothese zwischen 8% und 25,9% (Zmistowski, Karam et al. 2013, Otto-Lambertz, Yagdiran et al. 2017). Die Komorbiditäten des Patienten sind dabei ein wichtiger prädiktiver Faktor für die Entstehung einer periprothetischen Infektion. Um eine Risikostratifizierung präoperativ zu ermöglichen, wurde ein entsprechender Score entwickelt (Berbari, Osmon et al. 2012). Enthaltene Kriterien sind unter anderem der Body-Mass-Index, vorhergehende Operation des gleichen Gelenks, Immunsuppression, der ASA-Score (Klassifikation des körperlichen Gesamtzustands des Patienten) und die Dauer des Eingriffs. Weitere wichtige Risikofaktoren für die Entwicklung einer periprothetischen Infektion sind nah zurückliegende Bakteriämie, multiple chirurgische Eingriffe an dem betroffenen Gelenk, eine Vorgeschichte einer Gelenksentzündung, sowie die Komorbidität einer immunsuppressiven Erkrankung (Diabetes mellitus, Mangelernährung, HIV-Infektion) (Zmistowski, Della Valle et al. 2014).

Eine Therapie der periprothetischen Infektion erweist sich meist als langwierig und kompliziert. Grund hierfür sind unterschiedliche Mechanismen, die von den Keimen verwendet werden, um einer Eradikation zu entgehen. Zu diesen Mechanismen gehört eine genetisch determinierte Resistenz gegen viele Antibiotikaklassen (McCarthy, Rudkin et al. 2015), die Produktion von Biofilm, der die Bakterien vor der Penetration der Antibiotika abschirmt (Kayser, Böttger et al.

2014), sowie die Internalisierungsfähigkeit in humane Osteoblasten (Ellington, Reilly et al. 1999).

1.5 Biofilm

Ein Biofilm ist definiert als eine Kolonisation prokaryotischer Zellen, die irreversibel an eine Oberfläche gebunden und von einer klebrigen Matrix umgeben sind, die die Bakterien selber produzieren (Madigan 2013). Diese Matrix besteht aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und Wasser, in die die Mikroorganismen eingebettet und dadurch immobilisiert sind (Sutherland 2001, Flemming and Wingender 2010). Die Bestandteile der Biofilm-Matrix unterscheiden sich nach individueller Spezies und Wachstumsvoraussetzung der Bakterien. Wichtige Bestandteile sind unter anderem Polysaccharide, Proteine, Glykoproteine und Nukleinsäuren (im speziellen eDNA), eine genaue Aufschlüsselung der Bestandteile ist jedoch noch Gegenstand der aktuellen Forschung (Flemming, Neu et al. 2007). Diese Bestandteile nehmen bis zu 90% der Biomasse des Biofilms in Anspruch (Flemming and Wingender 2010). Durch die EPS wird die dreidimensionale Struktur und mechanische Stabilität des Biofilms bestimmt und so ein funktioneller Gemeinschaftsraum der Bakterien gebildet (Fuchs 2017). Die Adhäsion an vitale oder nicht-vitale Oberflächen, sowie die Kohäsion zwischen den Zellen werden dadurch ermöglicht (Flemming and Wingender 2010).

Die Entstehung eines Biofilms erfolgt über einen schrittweisen Prozess (Arciola, Campoccia et al. 2015): Die initiale Adhäsion der Mikroorganismen findet passiv durch unspezifische Kräfte wie Hydrophobie, elektrische Ladung oder Van der Waals Kräfte (Arciola, Campoccia et al. 2015), sowie aktiv durch Autolysine statt, die an Wirtsproteine binden (Heilmann, Hussain et al. 1997). Bei manchen Spezies sind auch Mikropillie und Flagellen an der aktiven Bindung beteiligt (Jamal, Ahmad et al. 2018). Die Struktur der Oberfläche, an die die Zellen binden spielt eine elementare Rolle, da Mikroorganismen besser an hydrophobe oder unpolare Flächen wie zum Beispiel Plastik oder Teflon binden können, weniger gut an Materialien wie Glas oder Metall (Jamal, Ahmad et al. 2018). Nach Adhäsion wird die Zellteilungsrate der Bakterien erhöht und Mikrokolonien ausgebildet. Die einzelnen Zellen verbinden sich dabei in mehreren Schichten miteinander und sind so auch in der Lage als funktionelle Einheit zu agieren. Dies ist unter anderem für die Verteilung lebenswichtiger Nährstoffe und Stoffwechselprodukte notwendig. Das Habitat Biofilm bietet zudem die Möglichkeit für verschiedene Mikroorganismen gemeinsam in einer syntrophischen Gemeinschaft zu leben (Jamal, Ahmad et al. 2018).

In derartigen Gemeinschaften ist die Zell-Zell-Kommunikation essentiell notwendig. Diese Form der Kommunikation wird als *Quorum sensing* beschrieben; hierdurch ist es Bakterien möglich, die Dichte der Population zu ermitteln und einen reifen Biofilm auszubilden (Monds and O'Toole 2009). Für die Reifung des Biofilms ist die Produktion der EPS, welches bei Staphylokokken beispielsweise zum großen Anteil aus beta-1,6-linked N-acetylglucosamin (PIA) besteht, dessen Synthese durch ica-Operon reguliert wird (Heilmann, Hussain et al. 1997, Costerton, Montanaro et al. 2005), essentiell. Durch die Zusammensetzung des EPS werden die

Lebensbedingungen innerhalb des Biofilms festgelegt, es erfolgt eine Auftrennung in Mikrodomänen mit unterschiedlichen Umgebungsbedingungen (Lawrence, Swerhone et al. 2016). Dabei bestehen Unterschiede bezüglich der Porosität, Dichte, des Wassergehalts, der Ladung, der Hydrophobität und mechanische Stabilität, sowie der Aufnahmefähigkeit für Nährstoffe innerhalb des Biofilms (Flemming, Neu et al. 2007).

Nach der vollständigen Reifung beginnen einzelne Bakterien sich aus der Matrix zu lösen, sie gehen erneut in den planktonischen Zustand über. Dieser Prozess erlaubt die Streuung der Mikroorganismen, durch die die Entstehung neuer Mikrokolonien ermöglicht wird und die Ausbreitung der Bakterien voranschreitet (Campoccia, Montanaro et al. 2006). Bis zur vollständigen Reifung des Biofilms wird ein Zeitraum von bis zu vier Wochen angenommen (Walter, Kemmerer et al. 2012).

Die Lebensform innerhalb eines Biofilms bietet für Mikroorganismen viele Vorteile. Bereits 1957 konnten Elek & Conen nachweisen, dass durch die Präsenz eines Fremdkörpers die Virulenz von *S. aureus* um das 10.000-fache gesteigert wird (Elek and Conen 1957). In einem Biofilm gibt es einen signifikant erhöhten Gentransfer zwischen den Bakterien im Vergleich zu der planktonischen Lebensform (Hausner and Wuertz 1999). Gene für die Resistenz gegen Antibiotika können effektiver konjugiert werden, es entsteht ein evolutionärer Vorteil für die Bakterien. Das Habitat an der Oberfläche von Fremdkörpern bietet Bakterien außerdem den Vorteil der besseren Nährstoffverfügbarkeit im Vergleich zu dem planktonischen Zustand in einer gleichen Umgebung (Madigan 2013). Dies wird durch die effektive Nährstoffdistribution innerhalb des EPS-Gerüsts weiter unterstützt (Jamal, Ahmad et al. 2018).

Schließlich sind Bakterien durch den Schutz der Biofilm-Matrix größtenteils vor Angriffen durch Zellen des Immunsystems des Wirts und vor der Wirkung der meisten Antibiotika abgeschirmt (Flemming and Wingender 2010).

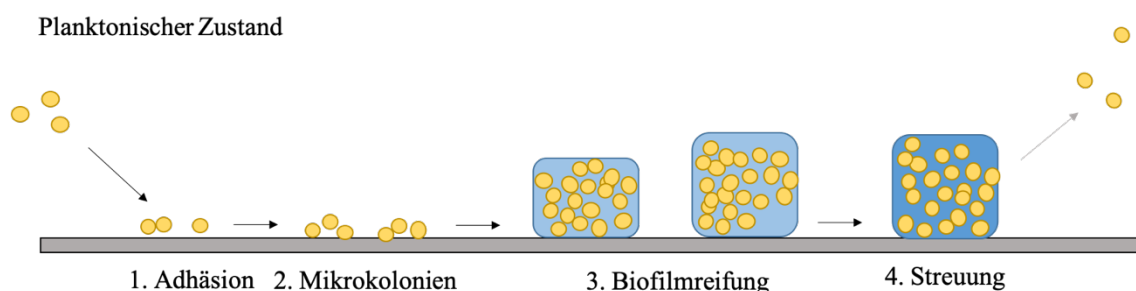


Abbildung 2: Vorgang der Biofilmentstehung modifiziert nach Monds et al. (Monds and O'Toole 2009)

1.6 Staphylokokken

Staphylokokken sind grampositive, in Trauben oder Haufen angeordnete Bakterien, die eine charakteristische runde Erscheinungsform haben (Kayser, Böttger et al. 2014). Sie sind unbeweglich, Katalase positiv, fakultativ anaerob und enthalten in ihrer Zellwand charakteristischerweise Teichonsäuren, die an der Adhärenz an Oberflächen beteiligt sind (Hahn 2005). Staphylokokken haben eine ausgeprägte Halophylie (Salztoleranz), Hitzeresistenz, sowie Austrocknungsresistenz und die Fähigkeit Kohlenhydrate zu fermentieren (Fuchs 2017). Diese Fähigkeiten ermöglichen ihnen das Überleben auf der menschlichen Haut. Durch einen Koagulase-Test können Staphylokokken in zwei große Gruppen unterteilt werden: *S. aureus* als Koagulase-positiver Keim, sowie die Gruppe der Koagulase-negativen Keime, zu denen *S. epidermidis* gehört. Die Unterscheidung ist wichtig, da die Virulenzfaktoren, der Infektionsweg, die Klinik und die Therapie von der Klassifikation abhängig sind und für die Keime jeweils unterschiedlich ist. Staphylokokken lösen fremdkörper-assoziiierter Infektionen aus. *S. aureus* und *S. epidermidis* gehören durch ihre Biofilm-produzierenden Eigenschaften zu den wichtigsten Erregern von periprothetischen Infekten (Kapadia, Berg et al. 2016, Otto-Lambertz, Yagdiran et al. 2017, Raafat, Otto et al. 2019).

In einer Studie von Montanari et al. in der zwischen 2007 und 2011 alle Keime von orthopädischen Infektionen isoliert wurden, konnte *S. aureus* als der häufigste Keim für Infektionen ohne Fremdkörper und *S. epidermidis* als häufigster Keim mit Fremdkörper-Einsatz nachgewiesen werden (Campoccia, Testoni et al. 2016).

1.6.1 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

S. aureus (lat. *aureus*: golden) wächst auf Blutagar in goldgelben Kolonien und ist meist von einem schmalen Hämolyse-Saum umgeben. Er besiedelt bei 20-50% der gesunden Bevölkerung die Nasenvorhöfe, seltener das Kolon, Rektum oder Vagina. Die Kolonisation ist meist asymptomatisch (Hahn 2005), jedoch wurde bei kolonialiserten Patienten bei einer *S. aureus*-Infektion in 65% der gleiche Stamm nachgewiesen (Wertheim, Vos et al. 2004).

S. aureus wird durch Schmierinfektion übertragen, löst meist zunächst eitrige Lokalinfektionen aus und davonausgehend chronische Infektionen wie die Endokarditis oder fremdkörper-assoziierte Osteitis (hier ist er der häufigste Erreger) (Campoccia, Montanaro et al. 2006, Lister and Horswill 2014, Wirth 2014). Der Verlauf einer solchen Infektion ist meist schnell und schwerwiegend (Renz 2015).

Die für *S. aureus* charakteristische Invasivität und Aggressivität wird durch zahlreiche Virulenzfaktoren ausgelöst. Als diagnostische Kriterien gelten die Koagulase und Lecithinase, da sie bei

allen Stämmen vorkommen. Weitere Virulenzfaktoren sind DNasen, Phospholipasen, Kollagenasen, Lipasen, Hyaluronidasen, Leukocidine (lysieren Leukozyten) (Fuchs 2017) und Invasine, die eine Internalisierung in Wirtszellen ermöglichen und so eine Abschirmung vor Immunzellen des Wirts ermöglichen (Ellington, Reilly et al. 1999, Campoccia, Montanaro et al. 2006). Diese Internalisierungsfähigkeit ist speziell auch bei Osteoblasten nachgewiesen, eine Rekrutierung von Osteozyten, die Induktion von Apoptose und die langfristige Entwicklung einer Osteitis sind damit assoziiert (Campoccia, Montanaro et al. 2006). Aufgrund dieser ausgeprägten Virulenz ist bei Verdacht einer Infektion bereits der positive Nachweis einer einzelnen Probe, statt der gewöhnlichen zwei, als diagnostisches Kriterium ausreichend (Otto-Lambertz, Yagdiran et al. 2017).

Eine zunehmende Herausforderung für das Gesundheitssystem stellen Methicillin-resistenten Stämme dar. Infektionen mit ihnen können in manchen Fällen nicht therapiert werden und führen, vor allem bei multimorbiden Patienten, häufig zu letalen Verläufen (McCarthy, Rudkin et al. 2015).

Eine weitere Subpopulation von *S. aureus* sind die Small Colony Variants. Sie sind charakterisiert durch ein langsames Wachstum mit niedrigerer Teilungsrate in typisch kleineren Populationen. Sie besitzen eine signifikant höhere Bindungsfähigkeit für Fibrinogen und Fibronectin, sowie eine erhöhte Toleranz gegen Antibiotika, was eine Infektion zu einer schwer behandelbaren, langwierigen Erkrankung macht (Sendi, Rohrbach et al. 2006, 2010). Diese Subpopulation sollte daher getrennt betrachtet werden.

1.6.2 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)

S. epidermidis ist mit 70-80% der häufigste Vertreter der Koagulase-negativen Staphylokokken, er wächst auf Blutagar in weislichen Kolonien. Er ist der am häufigsten nachgewiesene Keim bei fremdkörper-assoziierten Infektionen wie der Infektion von Urin-Kathetern oder peripheren Venenkathetern (Kayser, Böttger et al. 2014). *S. epidermidis* ist ein universeller Hautkeim, der bei jedem Menschen zur normalen Hautflora gehört und wird vor allem an den Axillae, Kopf und der Nase nachgewiesen (Kloos and Musselwhite 1975). *S. epidermidis* ist somit ein opportunistischer Keim. Jedoch ist, wie bei *S. aureus*, eine Kolonialisierung mit ihm nicht mit einer Infektion gleichzusetzen.

Infektionen mit ihm werden vor allem durch Kontaminierung, zum Beispiel während einer Operation ausgelöst (Otto 2009). Typische, durch ihn ausgelöste medizinische Herausforderungen sind Katheter-assoziierte Harnwegsinfekte, Thrombophlebitiden durch intravasale Katheter sowie die Infektion von Endoprothesen, hier ist er sogar der zweithäufigste Erreger (Hahn 2005, Campoccia, Montanaro et al. 2006, Kayser, Böttger et al. 2014).

Zusätzlich zu seinem abundanten Vorkommen besitzt *S. epidermidis* Virulenzfaktoren, die ein langfristiges Überleben im Wirt ermöglichen. Zu diesen Faktoren gehören die Fähigkeit Biofilm zu bilden (Campoccia, Montanaro et al. 2006), eine effektive Umgehung der Immunabwehr seiner Wirte (Otto 2009), sowie die Resistenzbildung gegen Antibiotika vor allem gegen Aminopenicilline, Clindamycin, Cotrimoxazol, Fluorchinolone und Makrolide (Lutro, Langvatn et al. 2014).

Elementar für die Biofilmproduktion von *S. epidermidis* ist die große Anzahl an unterschiedlichen microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRMMs) (Bowden, Chen et al. 2005), die eine Bindung an Oberflächenmoleküle ermöglichen, sowie Accumulation-associated protein (Aap), da es die Bildung von polymeren Fibrillen induziert und so ein Aneinanderheften der Zellen möglich ist (Raafat, Otto et al. 2019). Für die Umgehung der Immunabwehr des Wirts hilft die Produktion von Exopolymeren, die eine Erkennung als pathologische Struktur durch Bindung eines Antikörpers für das Immunsystem erschweren (Otto 2009). Infektionen mit *S. epidermidis* verlaufen typischerweise subakut (Renz 2015). Aufgrund der fehlenden aggressiven Virulenzfaktoren wie Invasinen, sind Krankheitsverläufe oft subklinisch und selten letal. Die hierdurch entstehenden Vorteile für den Keim wurden durch Massey et al durch ein mathematisches Modell erklärt. Hiernach haben Keime, die ubiquitär vorkommen und eine niedrige Pathogenität haben, hierdurch eine hohe Transmissionsrate, was einen evolutionären Vorteil bedeutet. Die Transmission ist definiert durch zwei wichtige Faktoren: die Einfachheit der Übertragung und die Dauer einer Übertragungsmöglichkeit. In diesem Zusammenhang bedeutet die geringere Virulenz für *S. epidermidis* einen Überlebensvorteil (Massey, Horsburgh et al. 2006). In dieser Eigenschaft unterscheidet er sich stark von *S. aureus* bei dem eine Übertragung häufiger mit einer Infektion und somit Symptomatik einhergeht.

1.7 Inflammation

Der Begriff der Infektion beschreibt das Eindringen und Vermehren von Mikroorganismen in einen Wirt, die Inflammation hingegen beschreibt die komplexe biologische Immunantwort des Wirtes auf einen Reiz (Kayser, Böttger et al. 2014). Eine Inflammation wird typischerweise durch einen Zellschaden oder die Detektion einer Infektion ausgelöst (Rea, Gibson et al. 2018). Sie ist durch 5 klassische klinische Zeichen charakterisiert: Rötung, Schwellung, Schmerz, Funktionsverlust und Überwärmung (Silbernagel 2018).

Die Immunabwehr des Menschen lässt sich in die spezifische und die unspezifische Immunantwort unterteilen (Silbernagel 2018). Bei der spezifischen oder erworbenen Immunantwort werden Antigene auf der Zelloberfläche von Mikroorganismen bzw. Makromolekülen durch spezifische B- und T-Zellen erkannt, hierdurch werden spezielle Antikörper zur Bekämpfung produ-

ziert (Kumar, Kawai et al. 2011). Die unspezifische angeborene Immunantwort hingegen reagiert unabhängig von dem jeweiligen Erreger, die Zellen der Immunabwehr erkennen dabei Muster von Erregerbausteinen. Die unspezifische Immunantwort dominiert durch die Universalität der Antwort vor allem in der frühen Phase einer Infektion (Hahn 2005).

Das Immunsystem altert mit dem Menschen mit, die Immunantwort wird daher im Alter in der Regel weniger rasch aktiviert, der Impfschutz ist weniger gut, die Anfälligkeit für Infektionskrankheiten, für Tumore und Autoimmunkrankheiten ist erhöht (Silbernagel 2018).

1.7.1 Caspase-1

Die Caspase-1 ist eine Cystein-Protease. Sie gilt als integraler Regulator des angeborenen unspezifischen Immunsystems und verknüpft proinflammatorische Mechanismen mit protektiven und regenerativen Prozessen (Kumar, Kawai et al. 2011, Winkler, Hedrich et al. 2016).

Die Aktivierung erfolgt über eine Autoproteolyse des Inflammasoms. Das Inflammasom ist ein multimerer Proteinkomplex, der aus drei typischen Komponenten besteht: einem intrazellulären Sensor für Pathogene wie beispielsweise Toll-like-Rezeptoren (TLR), einem Adapterprotein, sowie der Pro-Caspase-1 (Winkler and Rosen-Wolff 2015).

Eine Aktivierung kann sowohl durch infektiöse, als auch durch sterile, also nicht durch Mikroorganismen verursachte Signale erfolgen, wie z.B. eine Schädigung von Gewebe (Latz, Xiao et al. 2013). Dabei kommt es einmal zu einer Aktivierung der „pattern-recognition-receptors“ (PRR) wie den TLR durch Bindung von beispielsweise sogenannte pathogen-associated molecule patterns (PAMP) und der folgenden Aktivierung von NF- κ B („nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“), einem proinflammatorischen Transkriptionsfaktors, der eine Zytokinproduktion auslöst (Kumar, Kawai et al. 2011). Zum anderen aber auch durch intrazelluläre Signale wie zum Beispiel Bakterientoxine, prokaryotischer mRNA, Proteinaggregate oder ATP (Strowig, Henao-Mejia et al. 2012).

Die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine ist an der Induktion der Pyroptose beteiligt, die eine spezielle Form des kontrollierten Zelltods darstellt (Winkler and Rosen-Wolff 2015).

Die Caspase 1 besitzt jedoch auch anti-inflammatorische Komponenten, da sie Interleukin 37 (IL37) aktiviert. IL37 ist seinerseits ein potenter Inhibitor des angeborenen Immunsystems, da es Interleukin 6 (IL6) inhibiert (Winkler and Rosen-Wolff 2015).

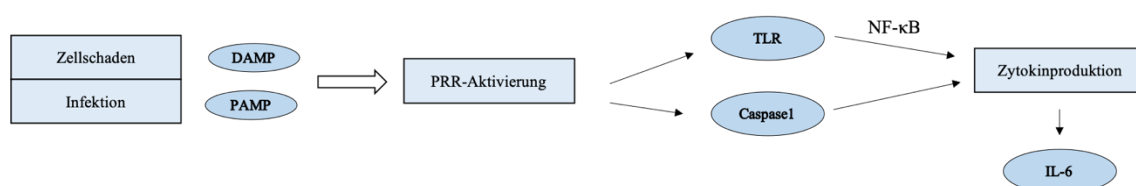


Abbildung 3: Komprimierte Übersicht der untersuchten inflammatorischen Reaktion modifiziert nach Rea et al. (Rea, Gibson et al. 2018) Zellschäden oder Infekte lösen die Ausschüttung von DAMP („damage-associated-molecule-patterns“) beziehungsweise PAMP („pathogen-associated-molecule-patterns“) aus. Diese aktivieren Rezeptoren, die PRR („pattern-recognition-receptors“), welche eine Immunreaktion auslösen. Zu diesen Rezeptoren gehören unter anderem die TLR („toll-like-receptor“) sie aktivieren über den NF- κ B-Stoffwechselweg („nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“) die Zytokinproduktion. Neben diesem Weg erfolgte eine Zytokinausschüttung jedoch auch maßgeblich durch die Aktivierung der Caspase 1 durch das sog. Inflammasom. Die ausgeschütteten Zytokine führen zu einer Ausschüttung und Aktivierung von IL6 („Interleukin 6“).

1.7.2 Toll-like-Rezeptoren

Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems, sie sind sogenannte „pattern-recognition-receptors“ (PRR), die in der Lage sind durch Bindung spezieller Pathogenbestandteile, zum Beispiel „pathogen-associated molecule patterns“ (PAMP's), Erreger zu erkennen und eine reaktive Ausschüttung inflammatorischer Zytokine auszulösen (Kawai and Akira 2010). Ebenso sind sie in der Lage durch Bindung von DAMP („damage-associated-molecule-patterns“) Signale von verletzten oder sterbenden Zellen unabhängig von einer Infektion zu empfangen und auf die gleiche Weise eine Immunreaktion auszulösen (Rea, Gibson et al. 2018).

Aktuell sind 10 TLR-Domänen des menschlichen Genoms bekannt, jede codiert für eine spezielle PAMP-Bindungsaffinität (Lim and Staudt 2013). TLR lassen sich anhand ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle grob in zwei Subgruppen unterteilen: die an der Zelloberfläche und die in endosomalen Kompartimenten der Zelle.

Der TLR2 ist einer der Rezeptoren an der Zelloberfläche, nach Bindung von extrazellulären PAMP erfolgt eine Aktivierung des NF- κ B-Stoffwechselwegs und somit Transkription von proinflammatorischen Zytokinen. Er ist somit ein Bestandteil des angeborenen unspezifischen Immunsystems (Kumar, Kawai et al. 2011). Unter anderem formt der TLR2 mit TLR6 Heterodimere und erkennt so Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren und Lipopeptide, welche Bestandteile der Zellwand von gram-positiven Bakterien sind (Kawai and Akira 2010).

1.7.3 Interleukin 6 (IL6)

Interleukin 6 ist ein proinflammatorisches Zytokin (Tanaka, Narazaki et al. 2014), die Produktion wird nach Aktivierung des proinflammatorischen Stoffwechselwegs initiiert (siehe oben). Es hat dabei pleiotrope Effekte, die Abbildung 4 entnommen werden können.

Durch die vielfältigen Funktionen, die IL6 innerhalb des Körpers einnimmt, kann eine Änderung der Konzentration ganz unterschiedliche Symptome auslösen (siehe *Abbildung 4*). Dazu

gehören Fieber, Fatigue, Appetitverlust, Lymphknotenschwellung, Anämie und Osteoporose (Yoshizaki, Murayama et al. 2018).

Die Ausschüttung erfolgt nach Erkennung von pathogenetischen Molekülstrukturen durch Immunzellen (Monozyten/Makrophagen) über ihre PRR, z.B. über Toll-like-Rezeptoren. Es kommt zu einer Aktivierung des NF- κ B-Stoffwechselwegs und der vermehrten Produktion der mRNA von inflammatorischen Zytokinen wie IL6, sowie auch TNF- α und IL-1 β . Diese stimulieren durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus zusätzlich die Produktion von IL6; es kommt zu einer potenzierten Reaktion (Tanaka, Narazaki et al. 2014). Zu den häufigsten pathogenetischen Molekülstrukturen gehören mikrobielle Komponenten wie LPS (Kishimoto 1989). Eine Sekretion wird jedoch auch durch sogenannte DAMP (damage-associated-molecule-patterns) ausgelöst. DAMP werden, unabhängig von einer Infektion, von verletzten oder sterbenden Zellen freigesetzt und lösen so eine Inflammation aus (Tanaka, Narazaki et al. 2014). IL6 ist ein typisch erhöhter Laborparameter bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen (Nishimoto, Yoshizaki et al. 1989). Dabei ist IL6 der am schnellsten ansteigende Vertreter der Akuten Phase Proteine (Nishimoto, Yoshizaki et al. 1989) nach seiner Ausschüttung induziert er seinerseits die Produktion weiterer Akute-Phase-Proteine wie CRP, Serumamyloidase, Fibrinogen und Hepcidin in der Leber (Tanaka, Narazaki et al. 2014).

Die Produktion von IL6 wird durch Sexualhormone wie Östrogen oder Testosteron gehemmt, so konnten bei Frauen nach der Menopause signifikant höhere Werte gemessen werden (Jilka, Hangoc et al. 1992). IL6 ist in der Entstehung, Differenzierung und Resorptionsfähigkeit von Osteoklasten ein wichtiger Einflussfaktor (Ohsaki, Takahashi et al. 1992, Manolagas and Jilka 1995).

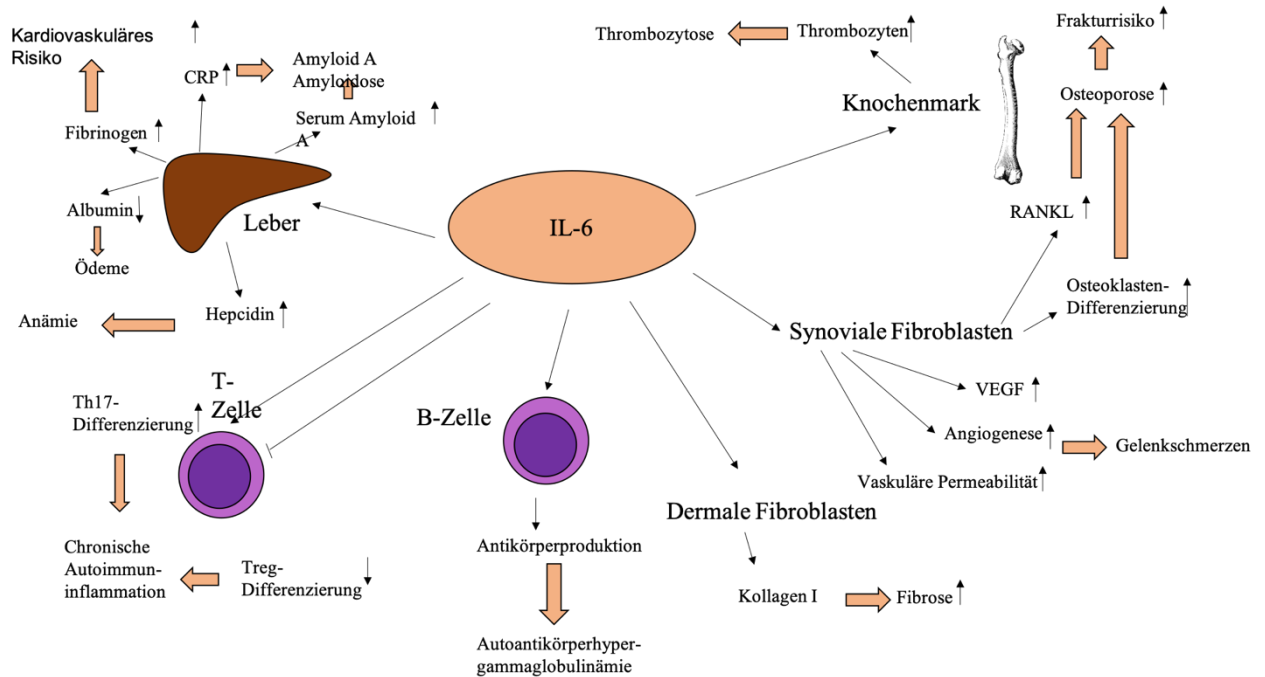


Abbildung 4: Pleiotrope Funktionen von IL6, adaptiert nach Tanaka et al. (Tanaka, Narazaki et al. 2014) IL6 beeinflusst den Körper durch Aktivierung verschiedener Kreisläufe nach seiner Ausschüttung. Zunächst hat es die immunologische Funktion der B- und T-Zell-Aktivierung. Physiologisch wird so durch einen äußeren Einfluss eine Immunantwort induziert. Es kommt durch eine Aktivierung von B-Zellen zu einer Autokörperproduktion, sowie durch eine Aktivierung der T-Zellen zu einer Differenzierung der Th17-Zellen, sowie zu einer Minderung der Treg-Differenzierung. Eine Übermäßige Differenzierung führt jedoch zu chronischer Autoinflammation sowie Autoantikörperhypergammaglobulinämie. Weiterhin wird in der Leber die Ausschüttung von Hepcidin, Fibrinogen, CRP und Serum Amyloid induziert und die Produktion von Albumin vermindert. Die Entstehung einer Anämie, und Ödemen wird begünstigt, das Kardiovaskuläre Risiko und die Ablagerung von Amyloid A wird erhöht. Im Knochenmark sorgt es für eine vermehrte Freisetzung von Thrombozyten und somit für eine erhöhte Koagulabilität des Bluts. Durch die Aktivierung von synovialen Fibroblasten wird vermehrt VEGF produziert. Die Angiogenese und die vaskuläre Permeabilität werden erhöht und Gelenkschmerzen begünstigt. Zusätzlich induziert IL6 durch Dermale Fibroblasten und eine vermehrte Kollagen I Produktion Fibrosen im Körper.

1.8 Apoptose

Die Apoptose beschreibt den Prozess des kontrollierten Zelltodes ohne die Auslösung einer inflammatorischen Reaktion (Silbernagel 2018). In ihrer physiologischen Funktion ist sie an Wachstums-, Entwicklungs- und Alterungsprozessen beteiligt, der embryonalen Entwicklung, der Entstehung des Immunsystems oder hormoneller Atrophie. Sie kann jedoch auch Teil des zellulären Verteidigungssystems werden, als Reaktion auf Infektionen oder Zellschäden (Elmore 2007). Eine Deregelation der Apoptose kann zu Pathologien wie Autoimmunerkrankungen, neurodegenerativen Defekten und Krebs führen (Jin and El-Deiry 2005).

Der Ablauf der Apoptose verläuft dabei immer charakteristisch: die Zelle schrumpft, die DNA des Zellkerns kondensiert, wird fragmentiert, es kommt zur Formation apoptotischer Körper, die schließlich von Makrophagen phagozytiert werden (Savill and Fadok 2000, Wall and McCormick 2014). Die Initiierung dieses Ablaufs kann durch zwei unterschiedliche Stoffwechselwege erfolgen. Zum einen durch intrinsische Signale, wie der Aneignung von tumorigenem Potentials der Zelle, der Fehlfaltung von Proteinen oder schlichtweg dem Ende des Zellzyklus. Zum anderen aber auch durch extrinsische Signale wie der Aktivierung von Zelltodrezeptoren durch mikrobielle Infekte oder oxidativen Stress (Schuler and Green 2001, Jin and El-Deiry 2005).

Eine wichtige Unterscheidung zu der feinregulierten Apoptose stellt die Nekrose da. Sie ist der Prozess des ungeordneten Zelltods, hierbei kommt es initial zu einer starken Schädigung der Zelle, dabei werden die zellulären Bestandteile unkontrolliert freigelassen, was zu einer Schädigung benachbarter Zellen sowie einer inflammatorischen Reaktion des Organismus führt (Leist and Jaattela 2001). Eine Zwischenform dieser zwei konträren Zelltodmechanismen stellt die Pyroptose dar. Hierbei finden sich Aspekte der Apoptose, wie die Fragmentierung zellulärer Bestandteile, kombiniert mit Komponenten der Nekrose, wie der inflammatorischen Reaktion. Die Pyroptose ist eine Form des Zelltods, die bei einer mikrobiellen Infektion beobachtet wird (Strowig, Henao-Mejia et al. 2012).

Die biologische Funktion der Apoptose im Vergleich zur Nekrose und Pyroptose liegt also darin, dass durch diesen Mechanismus der Organismus als Ganzes vor der Vermehrung fehlerhafter oder geschädigter Zellen geschützt wird, ohne eine große Entzündungsreaktion auszulösen und somit unnötige weitere Zellverluste zu verursachen.

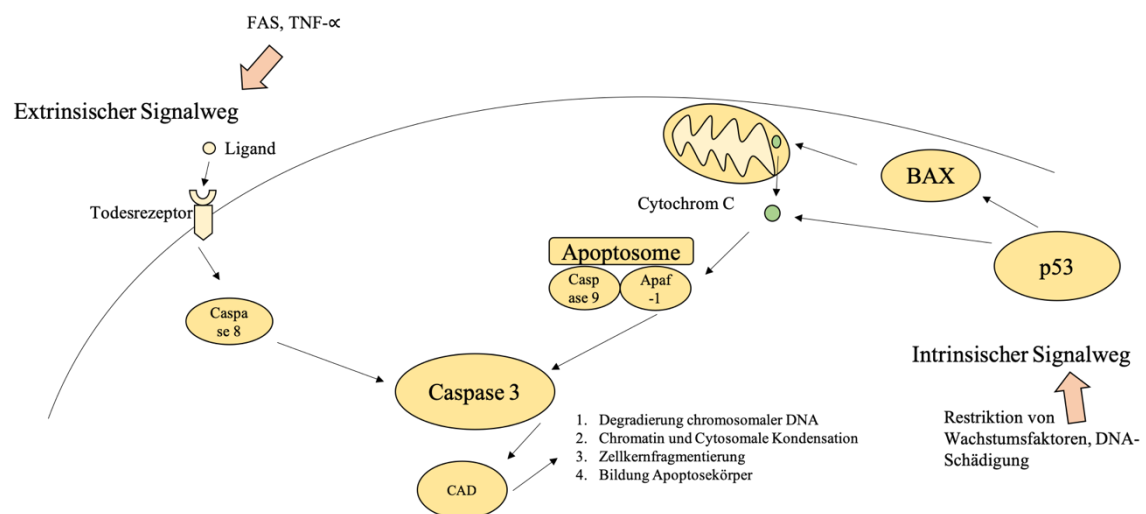


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Apoptoseinduktion, adaptiert an Youle et al. sowie Schuler et al. (Youle and Strasser 2008)

Die Aktivierung des Extrinsischen Signalwegs erfolgt durch Bindung z.B. der akute Phase Proteine der Inflammation FAS („*fatty acid synthetas*“) oder TNF- α („*tumor-necrosis-factor- α* “) an Todesrezeptoren, wodurch die Pro-Caspase Caspase 8 aktiviert wird. Eine Aktivierung des Intrinsischen Signalwegs erfolgt durch eine p53-Aktivierung, beispielsweise durch die Restriktion von Wachstumsfaktoren oder DNA-Schäden. Bei der Aktivierung des intrinsischen Signalwegs wird einerseits durch p53 der BAX-Signalweg aktiviert, hierdurch wird eine Porenbildung in der Mitochondrienmembran ausgelöst und somit vermehrten Cytochrom C freigesetzt. Zum anderen verstärkt p53 jedoch zusätzlich die Freisetzung von Cytochrom C direkt. Cytochrom ist ein Initiator der Bildung des Apoptosoms, welches aus Apaf-1 und der Caspase 9 besteht und die Caspase 3 aktiviert. Die Caspase 3 ist eine Effektorcaspase, mit ihr beginnt die gemeinsame Endstrecke des Extrinsischen und Intrinsischen Signalwegs der Apoptose. Sie aktiviert die CAD („*caspase-activated-dnase*“) welche die DNA spaltet. Es kommt zu einer Degradierung der DNA; der Kondensation des Chromatins und des Cytosoms, zu einer Zellkernfragmentierung und der Bildung von Apoptosekörpern, welche von Makrophagen phagozytiert werden.

1.8.1 p53

Durch zellulären Stress wie die Restriktion von Wachstumsfaktoren, DNA-Schäden oder onkogene Zellexpression kommt es zu einer Aktivierung von *p53* (Schuler and Green 2001).

P53 ist die wichtigste Kontrollinstanz des menschlichen Genoms, als Tumorsuppressorgen überprüft es die Integrität der DNA. Bei detektierten Schäden wird der Zellzyklus angehalten und gegebenenfalls die Apoptose durch Aktivierung des intrinsischen Signalwegs eingeleitet (Horn 2019).

1.8.2 BCL2 associated X (BAX)

BAX ist ein pro-apoptotisches Protein, das an der Auslösung der Apoptose durch den intrinsischen Signalweg beteiligt ist (Youle and Strasser 2008). Es stellt eine Subgruppe der Bel-2-Familie dar (Elmore 2007). Nach Aktivierung führt es durch Oligomerisierung der mitochondrialen Membran zu einer Porenbildung und somit zu einer erhöhten Permeabilität. Hierdurch werden die apoptogene Faktoren DIABLO und Cytochrom C in das Cytosol der Zelle entlassen und die Bildung des Apoptosoms ermöglicht (Lee and Fairlie 2012).

Die Aktivierung der Apoptose kann nach der durch BAX induzierten Porenbildung der Mitochondrien nicht mehr gestoppt werden („Point of no return“) (Jin and El-Deiry 2005).

1.8.3 Apoptotic Peptidase Activating Factor (Apaf-1)

Apaf-1 ist ein Adaptermolekül, es wird durch die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien aktiviert und bildet gemeinsam mit der Caspase-9 das sogenannte Apoptosom, welches den Effektor der Apoptose, die Caspase-3 aktiviert (Lee and Fairlie 2012).

1.8.4 Caspase-3

Die Caspase-3 ist eine Cystein-Aspartat-Protease und gehört, gemeinsam mit Caspase 6 und 7 zu den sogenannten Effektor-Caspasen der Apoptose (Nunez, Benedict et al. 1998). Sie kommt als inaktive Procaspase-3 in der Zelle vor, wird gespalten und zwei Monomere zur Aktivierung aneinandergelagert (Nunez, Benedict et al. 1998). Dieser Schritt stellt die gemeinsame Endstrecke des extrinsischen und intrinsischen Signalwegs der Apoptose dar (Youle and Strasser 2008). Nach Aktivierung wird sie auch durch ihre Substratpromiskuität zu einem sehr potenten Effektor des Prozesses der Apoptose (Wall and McCormick 2014); dabei fungiert sie als Endonuklease und spaltet Zellproteine (Youle and Strasser 2008). Durch die ausgeprägte Kompetenz die Apoptose auszulösen ist eine strenge Regulierung der Caspase-3 notwendig. Dies geschieht durch einen stetigen Umsatz des Enzyms, sodass der Schwellwert für eine Apoptoseinduktion nicht ohne ein vorheriges Signal erreicht werden kann (Jiang, Fletcher et al. 2009). Eine Grundaktivität der Caspase wird auch in nicht apoptotischen Zellen beobachtet; dies liegt an ihren zusätzlichen Funktionen in der Zellproliferation und -differenzierung sowie in der Immunmodulation, Zellmigration und Signaltransduktion (Wall and McCormick 2014). Zusätzlich sind manche Bakterienspezies in der Lage die Aktivität der Caspase 3 zu modulieren und somit die Apoptose ihrer Wirtszelle zu induzieren oder zu verhindern (Santic, Pavokovic et al. 2010, Zhu, Hammad et al. 2013).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Labormaterialien

Die für die Arbeit verwendeten Materialien sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Verwendete Labormaterialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Bestellnummer</i>
15ml blue screw cap tubes (Cellstar©)	Greiner Bio-One	188261
50ml blue screw cap tubes (Cellstar©)	Greiner Bio-One	227261
12x15mm Zellkulturschale	Greiner Bio-One	628160
96-Well Platte (Cellstar©)	Greiner Bio-One	655180
48-Well Platte (Cellstar©)	Greiner Bio-One	677180
6-Well Platte (Cellstar©)	Greiner Bio-One	657160
EASY Strainer 40µm	Greiner Bio-One	542040
Parafilm® M	Bemis	PM-999
PCR Reaktionsgefäß 0,2ml	Biozym Scientific	711080
QIAshredder	Qiagen	79654
Reaktionsgefäß 1,6ml	Biozym Scientific	710204
Reaktionsgefäß 2,0ml	Biozym Scientific	710280
2,5µl RNase freie Spitzen	Greiner Bio-one	690005
10µl RNase freie Spitzen	Greiner Bio-one	771261
100µl RNase freie Spitzen	Greiner Bio-one	772288
200µl RNase freie Spitzen	Greiner Bio-one	692069
1000µl RNase freie Spitzen	Greiner Bio-one	750261
5ml Serologische Pipetten	Biozym Scientific	606180
10ml Serologische Pipetten	Biozym Scientific	607180
25ml Serologische Pipetten	Biozym Scientific	760180
50ml Serologische Pipetten	Biozym Scientific	768180
Thin-Certs™ Einsätze translucant	Biozym Scientific	657641
0,4µM 6-Well		
MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1ml)	Applied Biosystems	4346907
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems	4311971

2.1.2 Zellmaterial

2.1.2.1 Osteoblasten

Primäre humane Osteoblasten (hOB) wurden während Gelenkersatzoperationen aus der Spongiosa von Hüftköpfen und Beckenkämmen gewonnen. Dies geschah ausschließlich nach Einwilligung der Patienten. Ein zustimmendes Votum der Ethikkommission der Technischen Universität München erfolgte bereits am 28.04.2005 (Ethiknummer: 1307/05) für alle Versuche mit den entnommenen Zellen.

Anschließend wurden die Zellen mittels Explant-Methode gewonnen und amplifiziert (Aldinucci, Quinn et al. 1996). Die Zellen wurden maximal bis Passage 8 verwendet.

Das Alter und Geschlecht der Patienten ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Patientenbezogene Daten der verwendeten hOB

Bezeichnung	Patientengeschlecht	Patientenalter (Jahre)
A	weiblich	36
B	männlich	66
C	weiblich	45
D	weiblich	59
E	männlich	65
F	weiblich	67
G	weiblich	36

2.1.2.2 *S. aureus*

Für die Herstellung des Biofilm-konditionierten Mediums wurde der *S. aureus* Referenzstamm 25923 von ATCC verwendet.

2.1.2.3 *S. epidermidis*

Für die Herstellung des Biofilm-konditionierten Mediums wurde der *S. epidermidis* Referenzstamm 35984 von ATCC verwendet.

2.1.3 Medien

2.1.3.1 Osteogenes Proliferationsmedium

Für die Herstellung des osteogenen Proliferationsmediums (OPM) wurden die Tabelle 3 aufgelisteten Bestandteile in den entsprechenden Konzentrationen verwendet.

Tabelle 3: Zusammensetzung des osteogenen Proliferationsmediums für die Kultivierung humaner Osteoblasten

Komponente	Konzentration
Dexamethason	10 μ M
DMEM - calciumfrei	50%
Fetales Kalbserum	16%
HEPES Pufferlösung	1,6%
L-Ascorbinsäure	2,5 μ M
L-Glutamine	0,8%
Vitamine	0,8%

2.1.3.2 Biofilm-konditioniertes Medium

Für die Herstellung von Biofilm-konditioniertem Medium (BCM) wurden verschiedene Nährmedien verwendet.

2.1.3.3 *Columbia Blutagar*

Für die Inokulation wurden die Bakterien auf Columbia Blutagar ausgestrichen, dieser enthält 5% Schafsblut.

2.1.3.4 *TSB Medium*

Die Vorkultur des BCM wurde in TSB-Medium angesetzt. Nach Vermischung aller Komponenten wurde das Medium bis zur Verwendung bei 4° gelagert.

Tabelle 4: Zusammensetzung des TSB Mediums

Komponente	Volumen
Aqua dest.	1000ml
TSB	30g

2.1.3.2.3 *Osteogenes Basismedium*

Für die Herstellung des Osteogenen Basismediums (OBM) wurden folgende Reagenzien in entsprechenden Konzentrationen verwendet.

Tabelle 5: Zusammensetzung des osteogenen Basismediums

Komponente	Konzentration
DMEM – 1g/L Glukose	80%
Fetales Kalbserum	16%
Hepes Pufferlösung	1,6%
L-Glutamin	0,8%
Vitamine	0,8%

2.1.4 Reagenzien

Die in der Arbeit verwendeten Reagenzien sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Bestellnummer
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
Dulbecco's Modified Eagles Medium-Ca ²⁺ frei	Pan Biotech	P04-01501
Dulbecco's Modified Eagles Medium- mit Ca ²⁺	Sigma-Aldrich	D5546
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich	D8537
Ethanol für Molekularbiologie	Merck Millipore	10693081
HCL 1M	Merck	1.09057
Fetales Rinderserum (FCS)	Biochrom	S0115
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	
p-Nitrophenol	Sigma-Aldrich	1067980025
Paraformaldehyd	Merck	104005

Tris-HCl 1M pH 7.0	Sigma-Aldrich	T2Y13
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
Zelllysepuffer 2	R&D-Systems	
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M6250

2.1.5 Primer

Alle für die qtPCR verwendeten Primer sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Primer für die qtPCR

Gen	Target	Code	TaqMan® Assay
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase		Hs02758991_g1
Col1A1	Kollagen Typ 1 α 1		Hs00164004_m1
ALPL	Alkalische Phosphatase		Hs01029144_m1
BGLaP	Osteocalcin, bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein		Hs01587814_g1
RunX2	Runt-related transcription factor 2		Hs01047973_m1
SPP1	Secreted phosphoprotein 1/ Osteopontin/ bone sialoprotein		Hs00959010_m1
IL 6	Interleukin 6		Hs00174131_m1
Casp1	Caspase 1		Hs00354836_m1
Casp3	Caspase 3		Hs00234387_m1
TLR2	Toll-like-Rezeptor 2		Hs00610101_m1
TP53BP1	Tumor protein p53 binding protein 1		Hs00996818_m1
APAF1	Apoptic Peptidase Activating Factor 1		Hs00559441_m1
BAX	BCL2 associated X, apoptosis regulator		Hs00180269_m1

2.1.6 Kits

Für die Durchführung der Versuche dieser Arbeit wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Kits verwendet.

Tabelle 8: Kits

Kit	Hersteller	Bestellnummer
CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit	Invitrogen	C7026
QuantiTect Reverse Transcription	Qiagen	205313
RNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden, DE	74134
TaqMan Universal PCR Master Mix	qApplied Biosystem; Forster City, USA	4352042
Human IL6-ELISA-Set	Diaclone, Besançon, Frankreich	851.520.005
Accessory ELISA-Set	Diaclone, Besançon, Frankreich	858.000.005
Ancillary Reagent Kit 2	R&D-Systems; Minneapolis, USA	DY008
Duo Set Human TLR2	R&D-Systems; Minneapolis, USA	DY2616
Duo Set Human Osteopontin	R&D-Systems; Minneapolis, USA	DY1433

2.1.7 Software

Für die graphische und quantitative Aufbereitung, der in dieser Arbeit generierten Daten, ist die in Tabelle 9 aufgeführte Software verwendet worden.

Tabelle 9: Software

Software	Hersteller/Entwickler
Axiovision	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
GraphPad Prism Version 7.04	GraphPadSoftware, Inc.; la Jolla, USA
Microsoft Office 2003	Microsoft, Redmond, USA
NanodropSoftware	Thermo Fischer Scientific
ViiA™ 7 Real Time PCR System	Applied Biosystems

2.1.8 Geräte

Für die Versuche wurden die in der Tabelle aufgelisteten Geräte verwendet.

Tabelle 10: Geräte

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

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung des Biofilm-konditionierten Mediums (BCM)

2.2.1.1 Inokulation von *S. epidermidis* und *S. aureus*

Mit Hilfe einer Impföse werden Zellen von *S. epidermidis* auf eine Columbia Blutagarplatte ausgestrichen. Die Platte wird für 24h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.2 Ansetzen der Vorkultur

Es werden 4 Einzelkolonien von der Columbia Blutagarplatte mit der Impföse entnommen und in 2ml TSB-Medium gegeben. Die Suspension wird mittels Vortex vermischt und für eine Stunde dynamisch bei 350rpm und 37°C inkubiert.

2.2.1.3 Herstellung der Arbeitssuspension

200µl der Vorkultur werden in 5ml TSB gelöst. Die Suspension wird dynamisch bei 350rpm und 37°C für 4 Stunden inkubiert. Nach fünf Stunden wird die OD₆₀₀ am Biophosphometer gemessen. Ist eine OD₆₀₀ von 2-3 erreicht wird die Suspension auf 0,4 für *S. aureus* bzw. 0,2 für *S. epidermidis* verdünnt (=Arbeitssuspension).

2.2.1.4 Anzucht des Biofilms

Die Anzucht des Biofilms erfolgt in 6-Well-Platten (pro Well 9cm²). In jedes Well einer Platte (A) werden 3ml TSB-Medium pipettiert, anschließend wird mit einer sterilen Pinzette ein Thin-Cert mit einer Porengröße der Membran von 0,4µm in jedes Well eingelegt. In jedes Thin-Cert werden 2ml Arbeitssuspension pipettiert. Die Platten werden für 24 Stunden statisch bei 37°C inkubiert.

2.2.1.5 Wechsel des Mediums

Die Arbeitssuspension wird vorsichtig, ohne den Biofilm zu schädigen, aus den Thin-Certs abgenommen. In neue 6-Well-Platten (B) wird pro Well 3ml Osteogenes Basismedium (OBM) pipettiert. Anschließend werden die Thin-Certs mit einer sterilen Pinzette in die neuen Wells überführt. In jedes Thin-Cert wird nun auch OBM pipettiert. Die Platten werden für 24h statisch bei 37°C inkubiert.

2.2.1.6 Abnahme des Biofilm-konditioniertem Mediums

Es werden neue 6-Well-Platten (C) mit je 3ml OBM pro Well angelegt. Die Thin-Certs werden erneut mit einer sterilen Pinzette in die einzelnen Wells überführt. Die Platten (C) werden für weitere 24 Stunden statisch bei 37°C inkubiert.

Das Medium aus den Platten (B) wird mit einer 50ml Spritze abgenommen und durch 0,2µm Sterilfilter gedrückt und vorübergehend bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wird das Medium der Platten (C) ebenfalls mit einer 50ml Spritze abgenommen und durch einen 0,2µm Sterilfilter filtriert. Das Medium wird mit dem des Vortages gepoolt. 3ml wurden zur pH-Wert-Überprüfung entnommen. Das so produzierte Biofilm-konditionierte Medium (BCM) wurde bis zur Verwendung für Versuche bei -20°C gelagert.

Als Kontrolle wird bei Schritt 2.2.2.5 und 2.2.2.6 OBM ohne Biofilm angesetzt. Das gewonnene Kontrollmedium (KO) der Kontrollplatten wurde ebenfalls filtriert, der pH-Wert wurde ebenfalls überprüft. Die Kontrollproben wurden in jedem Schritt äquivalent zu den BCM-Proben behandelt.

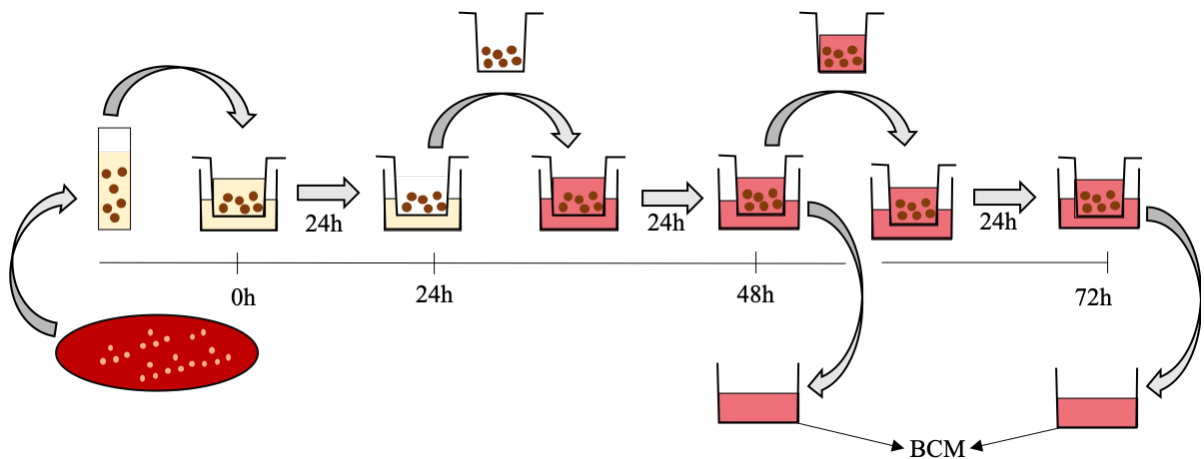


Abbildung 6: Herstellung des Biofilm-konditionierten Mediums. Die Bakterienkolonien werden mittels Impföse von der Blutagarplatte gelöst und in TCB-Medium suspendiert. Steriles TCB-Medium wird in eine 6-Well-Platte pipettiert, die Bakterien-Suspension wird in Thin-Certs in den 6-Well-Platten pipettiert und für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wird das TCB-Medium in den Thin Certs abpipettiert und diese in eine neue 6-Well-Platte, gefüllt mit osteogenem Basismedium (OBM), umgesetzt. Die Thin-Certs werden mit OBM befüllt und das Medium für 24 Stunden inkubiert. Nach 24-Stunden ist das Biofilm-konditionierte Medium (BCM) fertig. Die Thin-Certs werden in eine neue 6-Well-Platte mit OBM umgesetzt und erneut für 24 Stunden inkubiert, das fertige BCM wird anschließend gepoolt.

2.2.1.7 Vorbereitung des BCM

Eingefrorenes, gepooltes BCM, sowie die entsprechende Menge KO wurden im Wasserbad bei maximal 37°C aufgetaut, in ventilierte Zellkulturflaschen gefüllt und für 24 Stunden bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert, um den pH-Wert auszugleichen. Nach 24 Stunden wurde der pH-Wert gemessen, BCM 50% wurde zu gleichen Teilen aus KO und BCM 100% hergestellt. Zu allen Medien wurden die osteogenen Zusätze (Dexamethason und Ascorbinsäure) hinzugefügt.

2.2.2 Kultivierung humaner Osteoblasten (hOB's)

Alle primären humanen Osteoblasten wurden bei 37°C und 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Eine Zentrifugation fand stets, sofern nicht anders beschrieben, für 10 Minuten bei 250rpm, 25°C statt.

Die Zellen wurden mittels Explantmethode (Parencite Lit) jeweils nach 2 und 4 Passagen frisch abtrypsiniert und isoliert. Unter Zunahme von DMSO-haltigen cell-freezing Medium wurden die Zellen bei -80°C gelagert. Für die entsprechenden Versuchsreihen wurden die primären Osteoblasten wieder aufgetaut und kultiviert. Dabei wurden jeweils circa 5 Millionen Zellen auf eine Temperatur von 0°C gebracht und sofort in Osteogenem Proliferationsmedium (OPM) resuspendiert, dies diente auch der Neutralisierung des DMSO. Die Zellen wurden anschließend mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstands in einer Konzentration von 8500 Zellen/cm² in 20ml OPM in T175-Flaschen ausgesät. Vor Beginn der Versuche wurden die Zellen mindestens 2 Passagen und mindestens 10 Tage kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen passagiert. Dies dauerte in der Regel circa 7 Tage.

Für das Passagieren der Zellen wurde das Zellmedium abgenommen, die Zellen mit 10ml PBS gewaschen und mit 5ml Trypsin für 5 Minuten bei 37° inkubiert. Nach der Inkubation wurde die trypsinogene Wirkung mittels Zugabe von 5ml Medium neutralisiert. Die Zellen wurden nach Neubauer gezählt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, anschließend wird das Medium abgenommen und neues OPM hinzugegeben. Die Zellen werden in einer Dichte von 4-5x10³ Zellen/cm² neu ausgesät.

2.2.3 Inkubation der hOB's mit BCM

Für die Auswertung der Inkubation der hOB's wurden für alle Experimente mehrere Messzeitpunkte festgelegt. Ein Messpunkt war nach 24 Stunden Inkubation, der andere nach 72 Stunden, für einige Untersuchungen wurde ein weiterer Zeitpunkt nach 6 Tagen festgelegt.

Tabelle 11: Bezeichnung der untersuchten Gruppen

Bezeichnung	Medium
BCM100	100% BCM
BCM50	50% BCM, 50% Kontrollmedium
KO	100% Kontrollmedium

Für jeden qPCR-Versuchsansatz wurden so 8 T175-Zellkulturflaschen mit hOB's angelegt. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80% wurde OPM entweder mit BCM100, BCM50 oder KO ausgetauscht. Nach 24, bzw. 72 Stunden Inkubation wurden die Zellen trypsiniert und das Pellet für die RNA-Isolierung bei -80°C eingefroren.

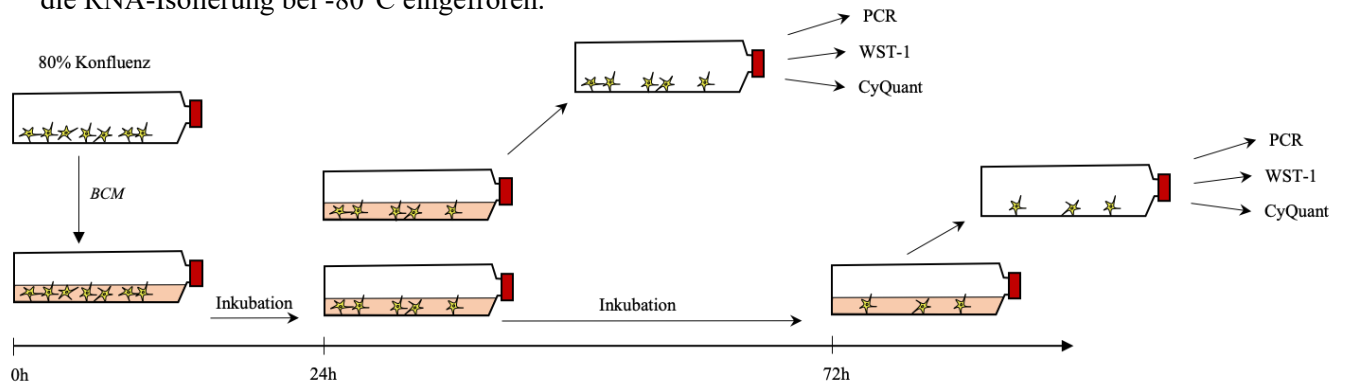


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Abläufe der Zellkultur

2.2.4 Proliferationsmessung mittels WST-Assay

Für die Messung der Zellproliferation und -viabilität wurde ein WST-1 Assay durchgeführt. Hierbei wird das WST-1 Reagenz (Tetrazoliumsalz) durch komplexe zelluläre Mechanismen, in die lösliche Form des Formazan reduziert. Voraussetzung für diese biochemische Reaktion ist die Intaktheit der Atmungskette der Zellen, die untersucht werden, da der Prozess hauptsächlich auf der glykolytischen Produktion von NAD(P)H beruht. Die Menge an Formazan und die metabolische Aktivität der Zellen steht daher in einem direkten proportionalen Verhältnis und ermöglicht so Rückschlüsse auf die Menge der aktiven Zellpopulation.

2.2.4.1 Aussaat der Platten

Die Zellen wurden nach 2.2.1. trypsiniert, die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt und schließlich in entsprechender Konzentration auf 48-Well-Platten ausgesät. Pro Inkubationszeit wurden jeweils 3 Reihen mit jeweils 7 Wells pipettiert. Die Dichte der Zellen wurde an die geplante anschließende Inkubationszeit in BCM angepasst, sodass festgelegt wurde:

24h Inkubation in BCM: 12.000 Zellen pro $0,95\text{cm}^2$ -Well

72h Inkubation in BCM: 10.000 Zellen pro $0,95\text{cm}^2$ -Well

Die Wells wurden mit OBM auf ein Volumen von 0,5ml pro Well aufgefüllt. Die Platten wurden für 24 Stunden bei 37° inkubiert.

2.2.4.2 Mediumwechsel

Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen mikroskopisch begutachtet. Hierbei wurde die Morphologie, die Vernetzung, die Adhärenz und Konfluenz der Zellen kontrolliert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abpipettiert.

Pro Probe wurden die Wells anschließend mit 0,5ml Medium aufgefüllt. Es wurden Proben mit je einer Reihe BCM100, eine mit BCM50 sowie eine Kontrolle mit KO bereitet. Für jede Probe wurde zusätzlich ein Well ohne Zellen als BLANK ebenfalls mit 0,5ml OBM befüllt. Die Platten wurden anschließend für 24 beziehungsweise 72 Stunden oder 6 Tage bei 37°C inkubiert.

2.2.4.3 Assay

Die Wellplatten wurden nach der entsprechenden Inkubationszeit erneut unter dem Mikroskop begutachtet. Anschließend werden aus jedem Well 300µl Medium entnommen und verworfen. In jedes Well wurde nun 20µl WST-Reagenz hinzupipettiert. Danach wurden die Platten für weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.4.4 Messung

Die Absorption der Proben wurden im Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug 620nm.

2.2.4.5 Auswertung

Für die Auswertung wurden Mittelwerte der Replikate erstellt. Der Mittelwert der Kontrollen (MW_{KO}) wurde als Referenz als 100% gewertet. Die Prozentsätze der Versuchsgruppen (BCM_{rel}) der Kontrollen wurden mittels der untenstehenden Formel berechnet.

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

2.2.5 Indirekte Zellzahlbestimmung mittels DNA-Quantifizierung

Für die Messung des DNA-Gehalts wurde ein CyQuant-Zellproliferations-Assay durchgeführt. In Zusammenschau der Befunde der metabolischen Aktivität, die mittels WST-1-Assay quantifiziert wurden, kann so eine Differenzierung und ein Rückschluss auf die tatsächliche Proliferation der Zellen gewonnen werden.

Bei dem CyQuant-Zellproliferationsassay wird durch die direkte Bindung des Farbstoffs an Nukleinsäuren, und die dadurch deutliche Fluoreszenz, der DNA-Gehalt der Proben mittels Fluorometer gemessen.

Die Aussaat sowie der Mediumwechsel erfolgt analog der des WST-1-Assays und ist 2.2.4.1 bzw. 2.2.4.2 zu entnehmen.

2.2.5.1 Assay

Nach einer Inkubationszeit von 24h, 72h oder 6d wurden die Platten auf eine sterile Unterlage gestürzt. Sofern Flüssigkeitsrückstände vorhanden waren wurden sie abpipettiert, die Platten wurden in Parafilm und Alufolie eingewickelt und anschließend bei -80°C für bis zu 4 Wochen eingefroren.

2.2.5.2 Messung

Für die Messung wurden die Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend pro Well 200µl CyQuant-Lösung hinzupipettiert und für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Die Fluoreszenz der Proben wurden im Fluorometer mit einer Exzitation von 480nm und einer Emission von 520nm gemessen.

Tabelle 12: Zusammensetzung der CyQuant-Arbeitslösung

Komponenten	Volumen
Aqua dest. (Nuklease-frei)	19ml
Zelllyse-Puffer (20x)	1ml
CyQuant® GR dye	50µl

2.2.5.3 Auswertung

Für die Auswertung wurden Mittelwerte der Replikate erstellt. Der Mittelwert der Kontrollen (MW_{KO}) wurde als Referenz als 100% gewertet. Die Prozentsätze der Versuchsgruppen (BCM_{rel}) der Kontrollen wurden mittels der in 2.2.4.5 beschriebenen Formel berechnet.

2.2.6 Genexpressionsanalyse

Für die Analyse der Expression unterschiedlicher Gene der Inflammation und Apoptose wurde eine Genexpressionsanalyse mittels real time PCR durchgeführt.

2.2.6.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurden die Zellpellets verwendet, die entsprechend 2.2.3 mit Osteogenem Assaymedium, sowie dem Biofilm-konditionierten Medium von *S. aureus* und *S. epidermidis* für 24 beziehungsweise 72 Stunden inkubiert wurden. Die eingefrorenen Zellpellets wurden bei RT aufgetaut und mit 600µl Lösung aus RLT-Puffer und 10µl β-Mercaptoethanol lysiert. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte nach Protokoll des Herstellers des RNeasy-Kits (Qiagen GmbH, 2012, pp. 23-28).

Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser eluiert, die RNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop bestimmt.

2.2.6.2 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurde nach dem Protokoll des Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen GmbH, 2009, pp. 11-13) gearbeitet.

Um die RNA zunächst von gDNA zu entfernen wurde die Wipeout-Puffer-Lösung für zwei Minuten bei 42°C inkubiert.

Tabelle 13: Zusammensetzung einer Reaktion der Wipeout Puffer-Lösung

Komponenten	Volumen
gDNA Wipeout Puffer	2µl
Template RNA	1µg
Aqua dest. (RNase-frei)	variabel
Gesamtvolumen	14µl

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße sofort für sieben Minuten auf Eis gestellt. Zu jeder Reaktion wurde 6 µl Mastermix (s. Tabelle 14) hinzugefügt.

Tabelle 14: Zusammensetzung des RT Mastermix

Komponenten	Volumen
Reverse Transcriptase	1µl
RT Puffer (5x)	4µl
RT Primer Mix	1µl

Danach wurden die Reaktionsgefäße im PCR Express Thermal Cycler platziert und für 15 Minuten bei 42°C und anschließend 3 Minuten bei 95°C inkubiert. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert oder sofort weiterverwendet.

2.2.6.3 Messung

Für die Genexpressionsanalyse wurde pro Quantitativer PCR Reaktion 1µl TaqMan[®] Gene Expression Assay (20x) mit 10µl TaqMan[®] Fast Universal Mastermix, 8 µl Nuklease-freiem Wasser und 1µl cDNA in ein Well der MicroAMP 96-Well-Reaction Plate pipettiert.

Als endogene Kontrolle wurde das Housekeeping-Gen GAPDH verwendet. Also „No Template Control“ wurde für jeden Primer eine Reaktion ohne cDNA, dafür dem entsprechendem Volumen Nuklease-freiem Wasser pipettiert.

Alle Proben wurden für jeden Primer in dreifacher Ausführung bereit. Als Kontrolle wurde die Genexpression der Zellen untersucht, die mit Kontrollmedium für die jeweils entsprechende Zeit inkubiert wurden. Die verwendeten Primer sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Die quantitative PCR wurde mittels StepOnePlus Real-Time PCR System durchgeführt. Nach einer einmaligen Aktivierungsphase wurden 40 Zyklen durchgeführt. Die einzelnen Reaktions-schritte sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Reaktionsabfolge der qPCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit (Sek.)
Einmalige Aktivierung der Fast Taq DNA Polymerase	95°C	20
Pro Zyklus:		
Denaturierung der DNA	95°C	3
Primerhybridisierung und Elongation	60°C	30

2.2.6.4 Auswertung

Die Auswertung der relativen Genexpression erfolgte durch die Software des Real Time PCR System mittels $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak and Schmittgen 2001). Hierbei wird die Expression des Target Gens gegen die Expression des Housekeeping-Gens (GAPDH) normiert. Damit dieser Wert zuverlässig ist, muss ein Housekeeping Gen unter normalen Bedingungen unabhängig vom Gewebetyp, Differenzierungszustand, Zellzyklus oder externen Signalen sein (Dheda, Huggett et al. 2004, Walker, Meier et al. 2009). GAPDH eignet sich als Housekeeping-Gen, da es für die Glykolyse notwendig ist und somit essentiell für den aeroben Stoffwechsel.

Die Normierung der Werte erfolgt bei der Analyse der qPCR um etwaige Messfehler durch die Variabilität der Proben, der Extraktion, der RNA-Qualität und der Effektivität der cDNA Synthese zu minimieren (Walker, Meier et al. 2009). Es wird das Verhältnis der Genexpression untersucht und keine absoluten Werte.

Der von dem Gerät gemessene Wert der *Threshold Cycle (CT)* beschreibt den PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmals den Grenzwert überschreitet und den entsprechenden Startpunkt der exponentiellen Entwicklung der Kurve. Für die Berechnung wurden die entsprechenden Mittelwerte der Proben für die einzelnen Primer errechnet. Für die Normierung wurden die CQ -Werte der endogenen Kontrollen, von denen der Zielprimer subtrahiert.

$$\Delta CT = CT_{TargetGen} - CT_{Housekeeping-Gen}$$

Für die Normierung der Werte gegen die Werte der Zellen, die mit Kontrollmedium inkubiert wurden, wurden ΔCQ der Kontrollen subtrahiert.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{BCM} - \Delta CT_{KO}$$

Für die Berechnung des relativen Expressionsunterschieds wurde der logarithmisch angegebene $\Delta\Delta CT$ -Wert mittels unten aufgeführter Formel in die Linearität überführt.

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

2.2.7 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mittels der Software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte der unterschiedlichen Messungen mit der entsprechenden Standardabweichung. Die Graphiken von WST, CyQuant, sowie der Genexpressionsanalyse zeigen Box-Whisker-Plots mit Antennen von der 5.- 95. Perzentile. Mittels ungepaarten t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95% wurde gegen die jeweilige Nullhypothese getestet:

- i) WST $H_0 = 100\%$
- ii) CyQuant $H_0 = 100\%$
- iii) Genexpression $H_0 = 1$
- iv) ELISA $H_0 = 100\%$

Um die einzelnen Gruppen miteinander vergleichen zu können wurde ein Oneway t-Test verwendet. Dabei wurde eine zweifache Varianzanalyse durchgeführt, die Faktoren waren hierbei die Zeit und die Konzentration.

Für den Vergleich der unterschiedlichen Werte eines einzelnen Patienten wurde jeweils ein gepaarter t-Tests durchgeführt.

Ein p-Wert von $p < 0.05$ wurde als signifikant gewertet. Die Signifikanzen sind in den Graphen als Sterne dargestellt.

Für WST und CyQuant wurden bei mehrfacher Durchführung der Experimente die Mittelwerte errechnet und die Mittelwerte verwendet. Die Werte wurden zu einem Kontrollwert mittels one-sample T-Test verglichen.

Tabelle 16: Legende der Darstellung der Signifikanzen

Symbol	Bedeutung
ns	$p > 0.05$
*	$p < 0.05$
**	$p < 0.01$
***	$p < 0.001$

3 Ergebnisse

3.1 pH-Analysen

Der in den Medien gemessene pH wurde stets als physiologisch getestet. Die Werte und Darstellung sind dem Anhang zu entnehmen.

3.2 Morphologie

Um den Einfluss des Biofilm-konditioniertem Mediums von *S. aureus* und *S. epidermidis* auf die Morphologie der hOB untersuchen zu können wurden die Zellen jeweils mit 50% oder 100% BCM für 24 beziehungsweise 72 Stunden inkubiert. Als Referenz wurden hOB mit Kontrollmedium für die entsprechende Zeit inkubiert.

In Abbildung 8 sind hOB von Patient 5 in 100-facher Vergrößerung zu erkennen, die für 72 Stunden mit KO inkubiert wurden, Abbildung 10 zeigt hOB des gleichen Patienten nach einer Inkubation von 100% BCM von *S. aureus*.

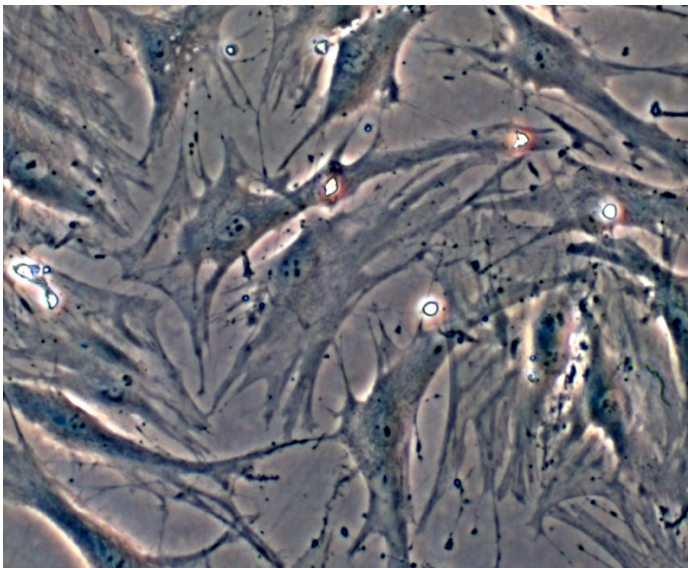


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Darstellung humaner Osteoblasten, Inkubation mit OPM, 320-fache Vergrößerung

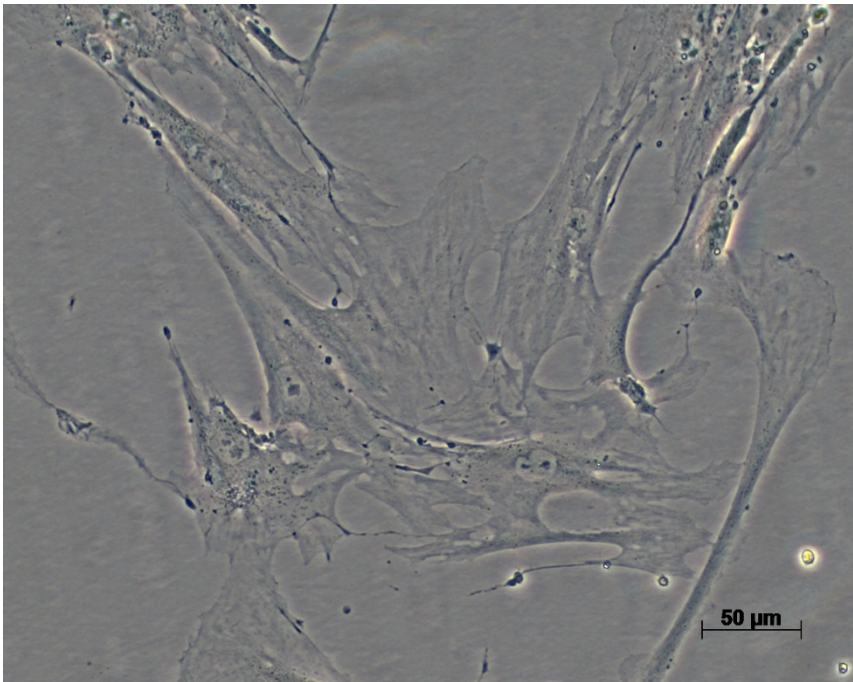


Abbildung 9: Lichtmikroskopisches Bild der hOB inkubiert mit Kontrollmedium

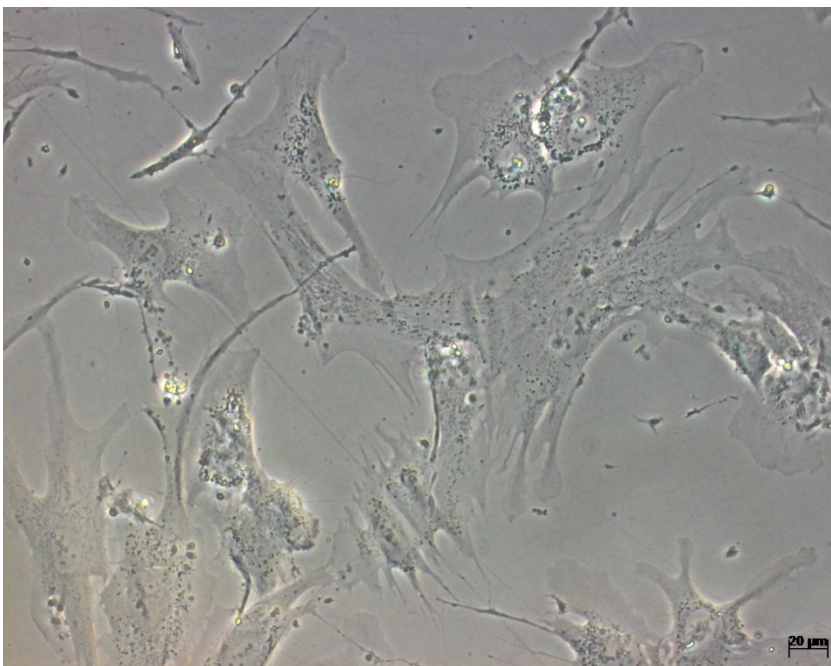


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahme hOB nach 72h Inkubation mit BCM von *S. aureus*

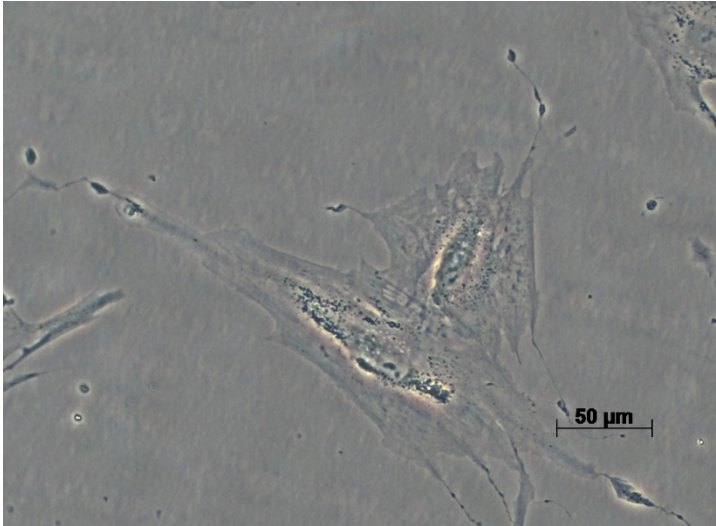


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme von hOB nach 72h Inkubation mit BCM von *S. epidermidis*

Die hOB der Kontrolle zeigen in der Mikroskopie ein vitales, der Norm entsprechendes Wachstum. Die BCM-behandelten Zellen zeigen deutliche Veränderungen der Morphologie: Es ist zu einer Blasenbildung gekommen und eine Zellfragmentierung ist erkennbar.

3.3 WST

Die Proliferation der hOB wurde mit WST-Assays quantifiziert. Dabei wurden die Zellen mit 50- bzw. 100% BCM von *S. aureus* und *S. epidermidis* für 24, 72, bzw. 144 Stunden (6 Tage) inkubiert. Als Referenz dienten hOB, die mit KO für die entsprechenden Zeiten inkubiert wurden. Für alle Versuche mit BCM von *S. epidermidis* wurde für jede Probe ein $n=7$ gewählt, die Versuche wurden 2-3 Mal wiederholt, um eine repräsentative Probenzahl zu gewährleisten, Mittelwerte wurden berechnet. Für die Versuche mit BCM von *S. aureus* wurde $n=6$ durchgeführt, die Versuche wurden 1-2 Mal wiederholt. Es wurden Mittelwerte berechnet. Aufgrund der zeitlichen Abfolge und der Verfügbarkeit von BCM konnten die Versuche für *S. epidermidis* in Summe häufiger durchgeführt werden.

Für die Darstellung der Proliferation der hOB wurden die Werte der jeweiligen Kontrollen als Standard gesetzt, die der BCM-behandelten im Verhältnis dazu errechnet. In der Abbildung 12 wurden die Kontrollen daher mit 100% metabolischer Aktivität eingezeichnet.

3.3.1 Vergleich BCM vs. Kontrollmedium

Die metabolische Aktivität der Zellen wird durch die Inkubation mit Biofilm-konditioniertem Medium beeinflusst. In Abbildung 12 ist die metabolische Aktivität der hOB dargestellt. Der

Kontrollwert (KO=100%) entspricht dem Mittelwert der Zellen, die mit osteogenem Proliferationsmedium inkubiert wurden. Diese Werte wurden als Basiswerte festgelegt, die Veränderung der metabolischen Aktivität wurde relativ dazu errechnet. In fast allen Vergleichsgruppen ist eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zum Kontrollmedium feststellbar.

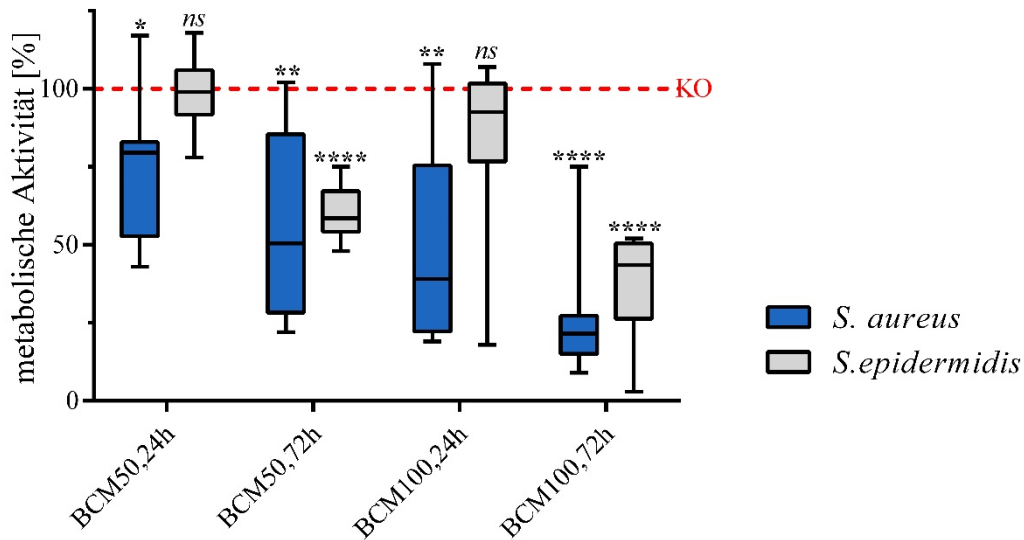


Abbildung 12: Vergleich der metabolischen Aktivität nach Inkubation mit BCM zu der Kontrolle (Kontrollwerte als KO in rot markiert)

3.3.2 Vergleich der beiden Keime

In Abbildung 12 ist die metabolische Aktivität der hOB dargestellt. Die eingetragenen Signifikanzen stellen den Vergleich der Veränderung der metabolischen Aktivität nach Inkubation mit *S. aureus* beziehungsweise *S. epidermidis* dar. *S. aureus* mindert nach 24 Stunden bei BCM50 und BCM100 signifikant die metabolische Aktivität der Zellen im Vergleich zu *S. epidermidis*. Für die anderen Werte wurden keine Signifikanzen errechnet. Bei der Betrachtung der Graphik ist jedoch erkennbar, dass die Mittelwerte für *S. aureus* jeweils niedriger waren als die für *S. epidermidis*.

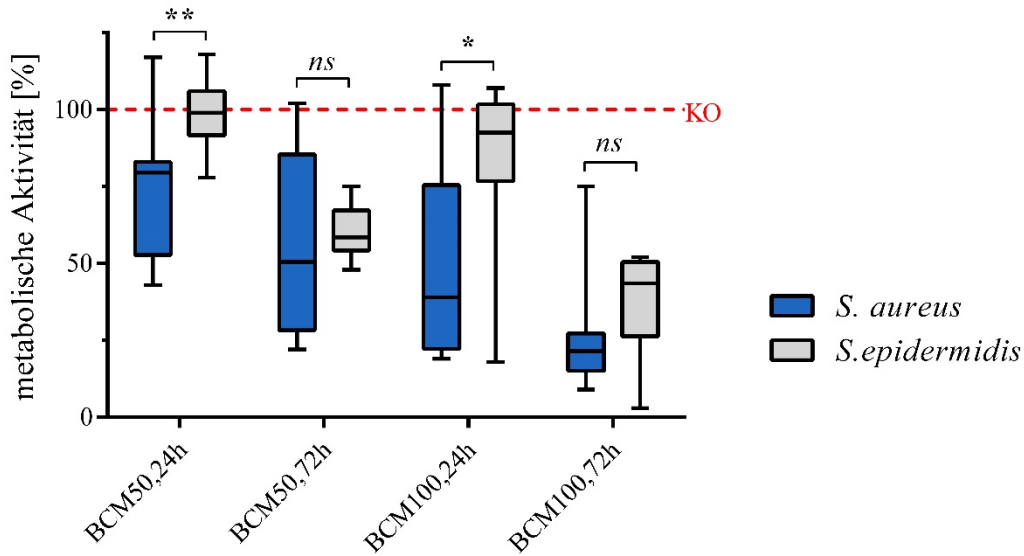


Abbildung 13: Untersuchung des Einflusses der Keimart, sowie Dauer und Konzentration zur Kontrolle (Kontrollwerte als KO in rot markiert)

3.3.3 Vergleich des zeitlichen Einflusses

Für die Untersuchung des Einflusses des Faktors Zeit wurden für *S. aureus* Messungen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten, für *S. epidermidis* zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

Bei einer Konzentration von 100% BCM und einer Inkubation von 72 Stunden ist ein signifikanter Abfall der metabolischen Aktivität der hOB im Vergleich zu der nach 24 Stunden erkennbar.

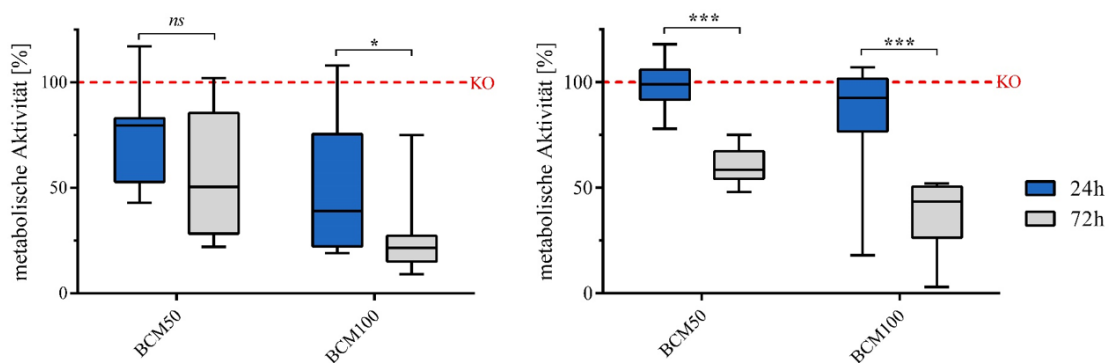


Abbildung 14: Vergleich des Einflusses der Zeit der Inkubation mit BCM, links bei *S. aureus*, rechts bei *S. epidermidis* (Kontrollwerte als KO in rot markiert)

Bei der Inkubation nach 72 BCM Stunden und 6 Tagen mit von *S. epidermidis* ist bei beiden Konzentrationen eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität der hOB messbar.

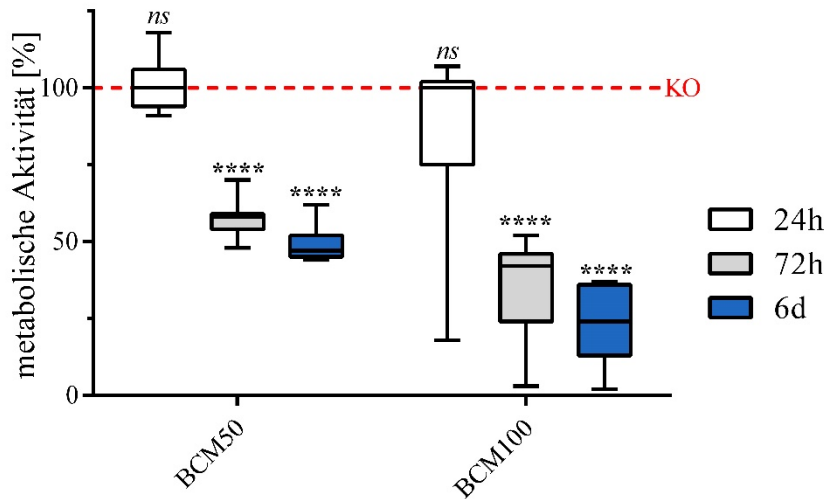


Abbildung 15: Vergleich des zeitlichen Verlaufs bei *S. epidermidis* nach 6 Tagen (Kontrollwerte als KO in rot markiert)

3.3.4 Vergleich der Konzentration

Um den Einfluss der Konzentration des BCM zu untersuchen wurden gepaarte t-Tests durchgeführt. Die beiden Konzentrationen, die untersucht wurden, waren BCM100 und BCM50.

Bei dem Vergleich der Konzentration des BCM für *S. aureus* ist zu beiden Zeitpunkten eine signifikante Minderung der metabolischen Aktivität bei einer Konzentration von 100% erkennbar.

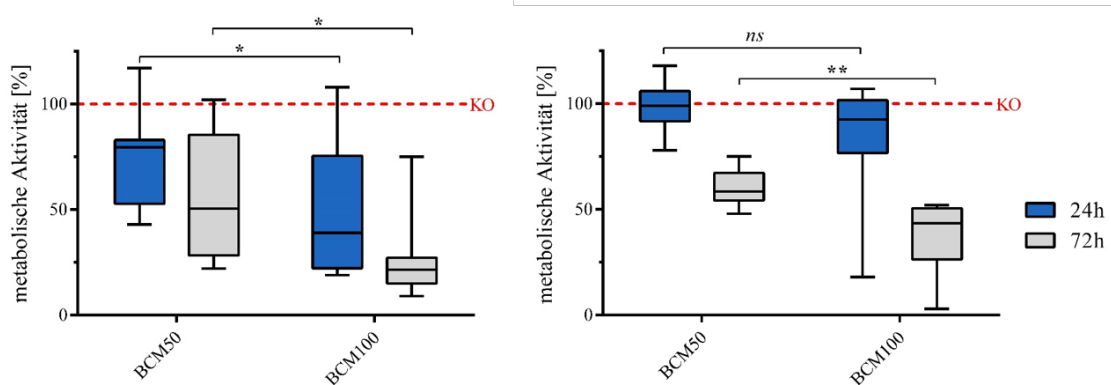


Abbildung 16: Vergleich des Einflusses der Konzentration des BCM, bei *S. aureus* (links) und bei *S. epidermidis* (rechts)

Bei dem Vergleich der Konzentration des BCM für *S. epidermidis* findet sich nach einer Inkubation von 72 Stunden eine signifikant deutliche Abnahme der metabolischen Aktivität bei einer Konzentration von 100%.

3.4 Indirekte Zellzahlbestimmung mittels DNA-Quantifizierung

Die Entwicklung der Zellzahlbestimmung wurde indirekt durch eine DNA-Quantifizierung mittels CyQuant-Assay getestet.

3.4.1 Vergleich BCM vs. Kontrollmedium

Die Menge der enthaltenen DNA in den Proben wird negativ durch die Inkubation mit Biofilm-konditioniertem Medium beeinflusst.

In Abbildung 16 ist die DNA-Quantität der Proben der hOB dargestellt. Der Kontrollwert (KO=100%) entspricht dem Mittelwert der Zellen, die mit osteogenem Proliferationsmedium inkubiert wurden. Diese Werte wurden als Basiswerte festgelegt, die Veränderung des DNA-Gehalts wurde relativ dazu errechnet. In allen gemessenen Proben ist eine signifikante Abnahme des DNA-Gehalts der Proben im Vergleich zu den Kontrollen messbar. Dabei korrelieren die Konzentration und die zeitliche Dauer hier mit der Intensität der Ausprägung.

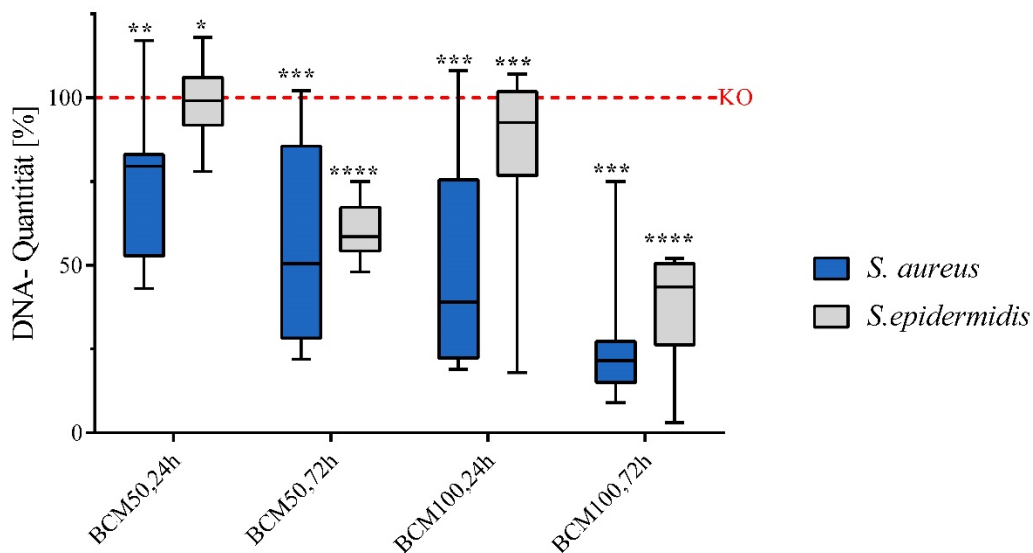


Abbildung 17: Vergleich BCM und KO (Kontrollwerte als KO in rot markiert)

3.4.2 Vergleich der beiden Keime

In Abbildung 18 ist die DNA-Quantität der Proben der hOB dargestellt. Die eingetragenen Signifikanzen stellen den Vergleich der Veränderung des DNA-Gehalts nach Inkubation mit *S. aureus* beziehungsweise *S. epidermidis* dar. *S. aureus* mindert nach 24 Stunden bei BCM50 signifikant die DNA-Quantität der Proben im Vergleich zu *S. epidermidis*. Für die anderen Zeitpunkte und Konzentrationen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei der Betrachtung der Graphik ist jedoch erkennbar, dass die Mittelwerte für *S. aureus* jeweils niedriger waren als die für *S. epidermidis*.

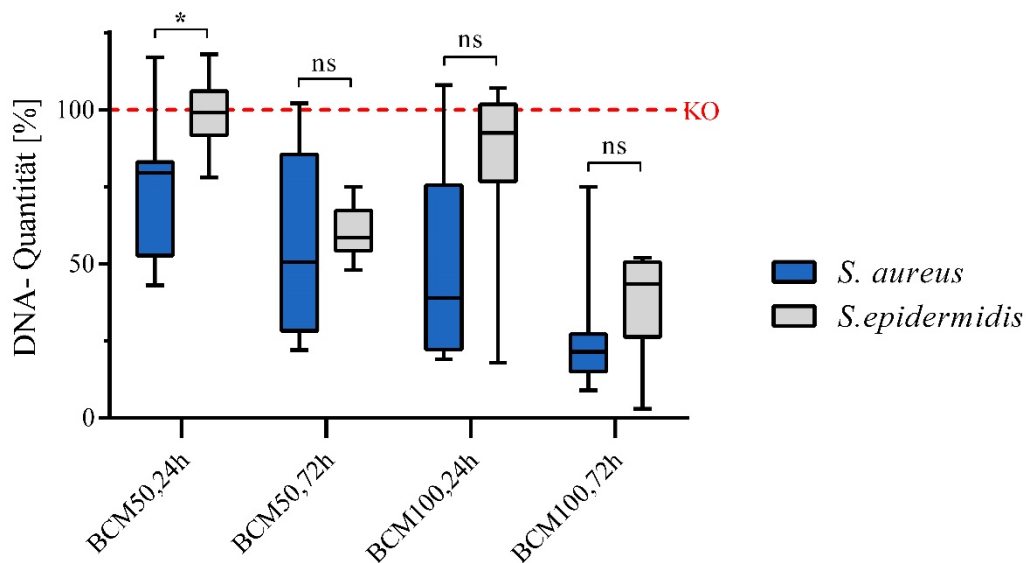


Abbildung 18: Vergleich der Veränderung der DNA-Quantität nach Inkubation mit BCM zwischen *S. aureus* und *S. epidermidis* (Kontrollwerte als KO in rot markiert)

3.4.3 Vergleich des zeitlichen Verlaufs

Für die Untersuchung des Einflusses des Faktors Zeit wurden für *S. aureus* Messungen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten, für *S. epidermidis* zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

Abbildung 18 stellt die gemessenen Werte für jeweils *S. aureus* und *S. epidermidis* dar. Die Inkubation mit BCM von *S. aureus* sorgt im zeitlichen Verlauf zu einer sichtbaren Abnahme der DNA-Quantität. Signifikant wird diese jedoch erst bei einer Konzentration von 100%. Im Ver-

gleich dazu ist die zeitliche Dauer der Inkubation mit BCM von *S. epidermidis* wesentlich signifikanter. Auch bei einer Konzentration von 50% sind hochsignifikante Abnahmen der DNA-Quantitäten nach 72 Stunden im Vergleich zu nach 24 Stunden messbar.

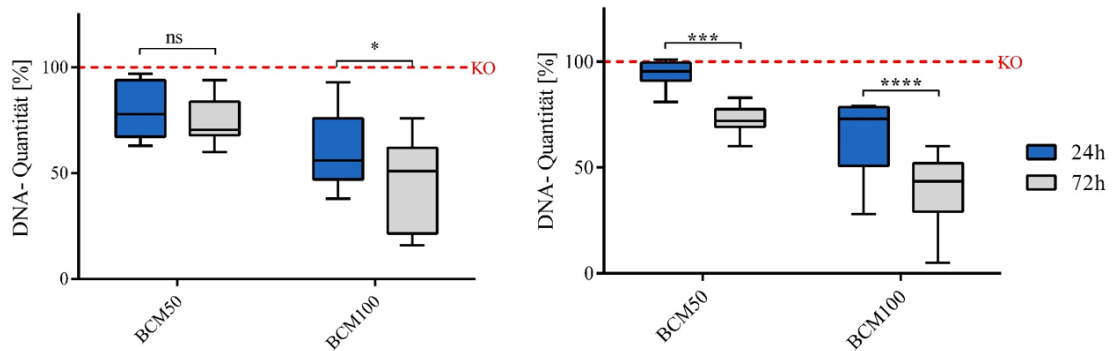


Abbildung 19: Vergleich des Einflusses der Dauer der Inkubation mit BCM von *S. aureus* (links) und *S. epidermidis* (rechts), Kontrollwerte als KO in rot markiert

3.4.4 Vergleich der Konzentration

Um den Einfluss der Konzentration des BCM zu untersuchen wurden gepaarte t-Tests durchgeführt. Die beiden Konzentrationen, die untersucht wurden, waren BCM100 und BCM50. Sowohl bei *S. aureus* als auch bei *S. epidermidis* ist eine signifikante Abnahme der DNA-Quantität der Proben bei einer höheren Konzentration des BCM feststellbar.

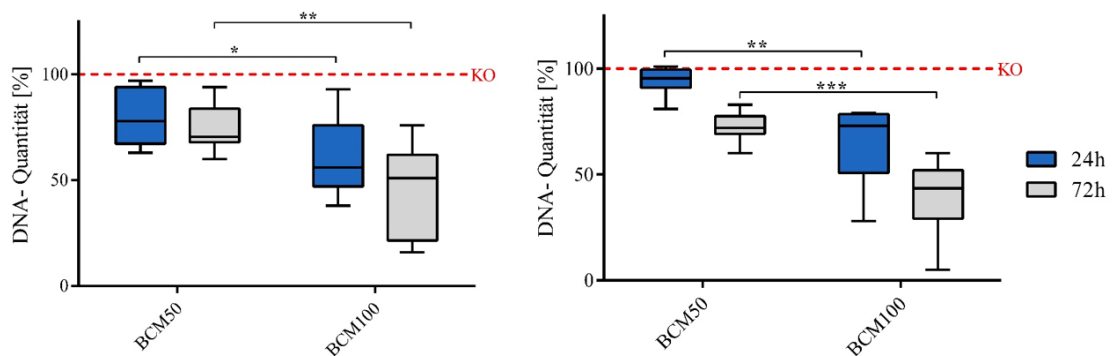


Abbildung 20: Vergleich des Einflusses der Konzentration des BCM von *S. aureus* (links) und *S. epidermidis* (rechts), Kontrollwerte als KO in rot markiert

3.5 PCR

Die Expression der ausgewählten Gene der Inflammation und Apoptose wurden mittels qPCR gemessen und relativ zu dem Housekeeping-Gen GAPDH quantifiziert. Die Berechnung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Hierfür wurden die Proben in drei Gruppen für 24 bzw. 72 Stunden entweder mit BCM 100%, BCM 50% oder dem KO inkubiert. Die Expressionslevel der Zellen, die mit KO inkubiert wurden, wurde als Referenzwert genommen und die RQ=1 gesetzt und die Werte der Zellen, die mit BCM inkubiert wurden, damit ins Verhältnis gesetzt. In den Abbildungen ist der Referenzwert stets als rote Markierung eingetragen. Die Ergebnisse der einzelnen Gene sind in den Abbildungen 21-27 graphisch dargestellt.

3.5.1 Inflammation

3.5.1.1 Caspase-1

Die Relative Quantifikation der Caspase-1 zeigte keine signifikante Steigerung oder Abnahme nach der Inkubation mit BCM. Bei der Betrachtung des Diagramms ist jedoch eine Verschiebung der Mittelwerte des zeitlichen Verlaufs für *S. aureus* erkennbar. Die RQ nimmt hier bei beiden Konzentrationen bei 72h im Vergleich zu 24h Stunden zu. Bei der Betrachtung der Mittelwerte von *S. epidermidis* ist eine Verschiebung der Mittelwerte zu einer niedrigeren RQ feststellbar, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

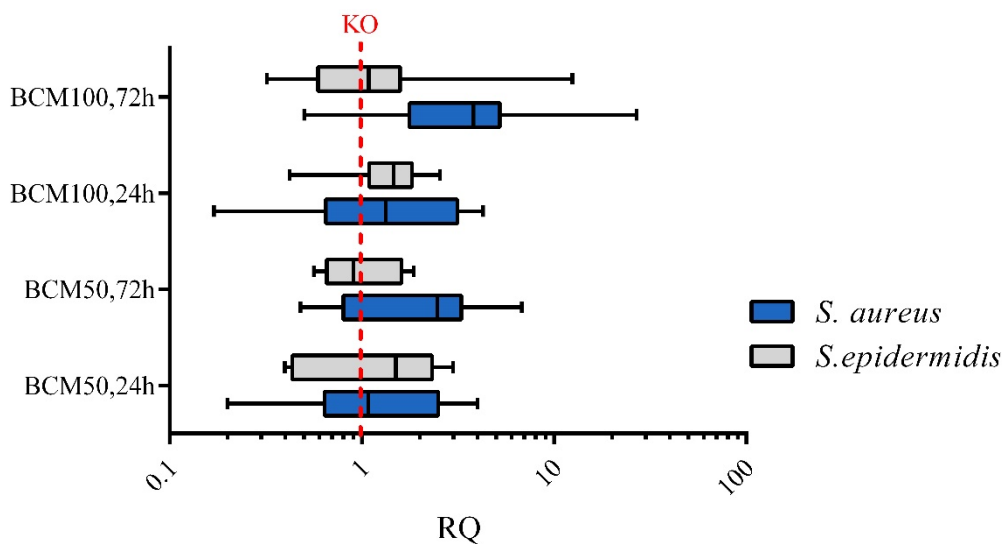


Abbildung 21: Untersuchung der relativen Quantifikation von Caspase-1 der BCM-behandelten hOB

3.5.1.2 TLR2

Die Relative Quantifikation des Toll-like-Rezeptors-2 ist nach Inkubation mit BCM beider Keime erhöht. Für *S. aureus* konnten nach 24 Stunden Signifikanzen für beide Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen gemessen werden. Auch bei der Betrachtung von *S. epidermidis* konnte eine signifikante Zunahme der RQ bei einer Konzentration von 50% nach 72 Stunden nachgewiesen werden. Allgemein sind die Mittelwerte aller Konzentrationen zu jedem Zeitpunkt im Vergleich zu denen der Kontrollen erhöht.

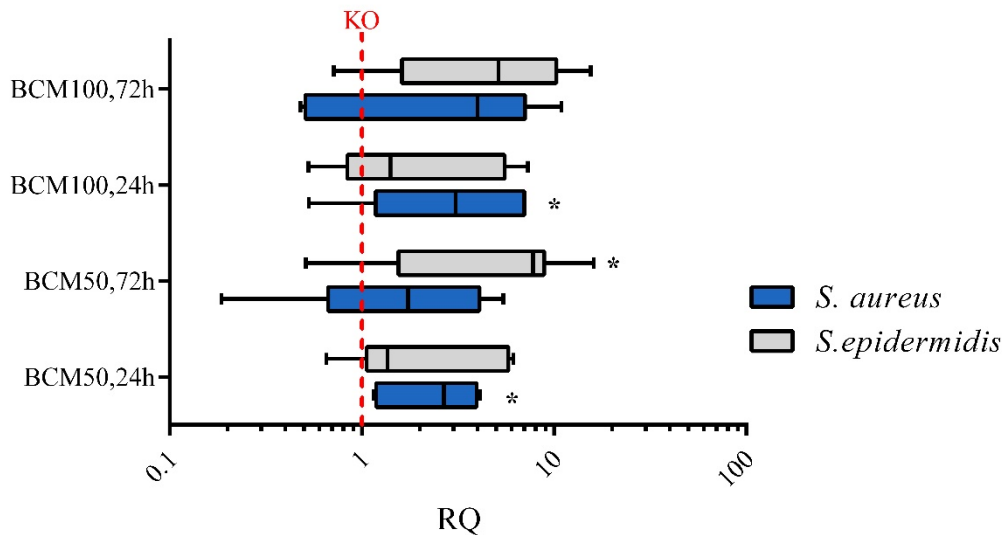


Abbildung 22: Untersuchung der Relativen Quantifikation von TLR-2 der BCM-behandelten hOB

3.5.1.3 IL6

Die relative Quantifikation von Interleukin 6 ist nach Inkubation mit BCM beider Keime erhöht. Je nach Patient wurden Werte bis zu einer 1000-fachen Steigerung der RQ im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. Grundsätzlich ist kein Wert der hOB nach einer Inkubation von BCM mit *S. aureus* niedriger als 3. Aufgrund der hohen individuellen Unterschiede der Patientenreaktion konnten jedoch leider keine signifikanten Veränderungen berechnet werden.

Im Vergleich zu *S. aureus* sind die Werte von *S. epidermidis* deutlich niedriger. Die Mittelwerte liegen immer unter einer RQ von 10, auch die Höchstwerte reichen bei Weitem nicht an die exponentiellen Steigerungen von *S. aureus* heran.

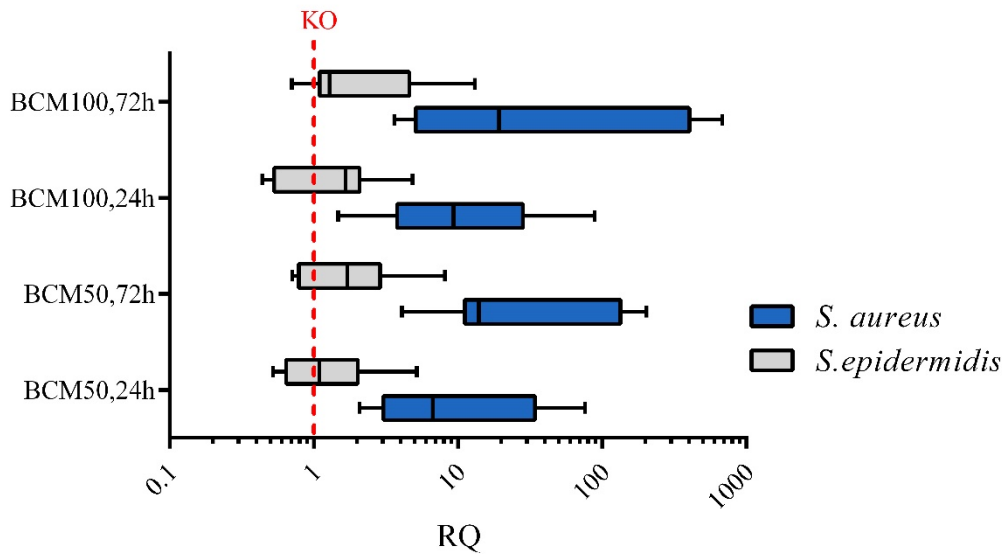


Abbildung 23: Untersuchung der relativen Quantifikation von IL6 der BCM-behandelten hOB --> Grenzwerte für *S. aureus* immer höher, patientenabhängig wurden zum Teil Maximalwerte von bis 1000 gemessen, die große Standardabweichung ergibt sich aus den patientenindividuellen Unterschieden.

3.5.2 Apoptose

3.5.2.1 p53

Die Untersuchung der relativen Quantifikation der hOB nach Inkubation mit BCM zeigt für die beiden Keime unterschiedliche Ergebnisse. Für die Inkubation mit *S. aureus* konnte, im Vergleich zu der Kontrolle, eine signifikante Steigerung der RQ bei einer Konzentration von 100% nach 24 Stunden nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Standardabweichung konnte jedoch keine Signifikanz nach 72 Stunden nachgewiesen werden, jedoch ist der Mittelwert im Vergleich zu dem Wert nach 24 Stunden dreifach erhöht. Die Zellen, die mit BCM von *S. epidermidis* inkubiert wurden, zeigen im Vergleich zu den Kontrollen keine Steigerung der RQ, die Mittelwerte für alle Proben liegen knapp unterhalb der Kontrollen.

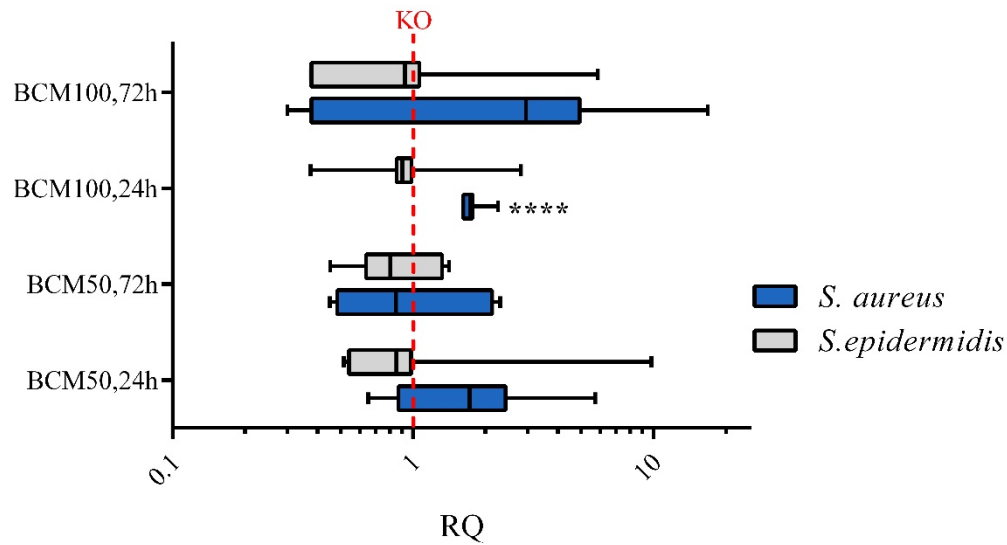


Abbildung 24: Untersuchung der relativen Quantifikation von P53 der BCM-behandelten hOB

3.5.2.2 BCL2 (BAX)

Bei der Untersuchung der Relativen Quantifikation für BAX konnte für beide Keime zu keinem Zeitpunkt und bei beiden Konzentrationen keine signifikante Zu- oder Abnahme festgestellt werden.

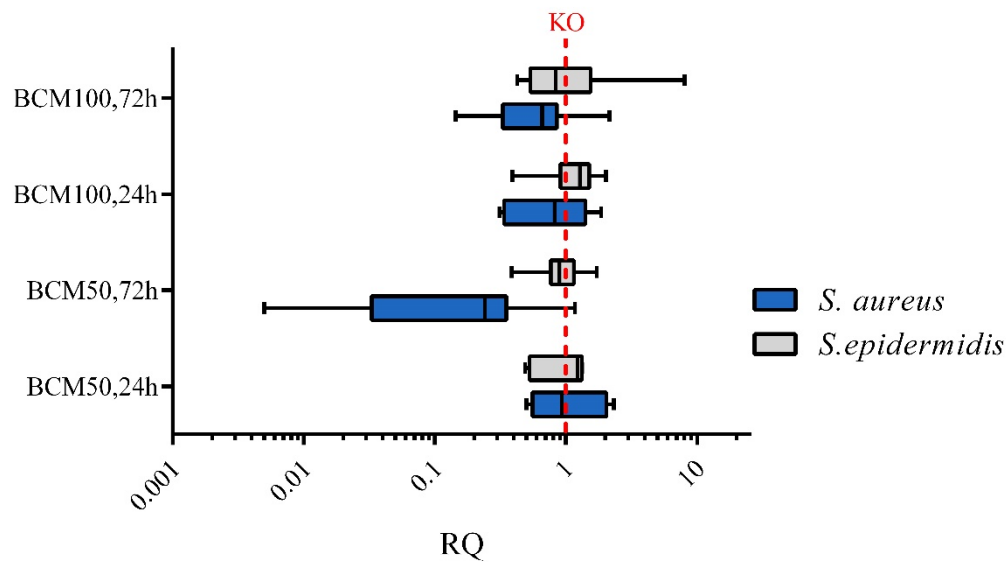


Abbildung 25: Untersuchung der relativen Quantifikation von BAX der BCM-behandelten hOB

3.5.2.3 Apaf-1

Bei der Untersuchung der Relativen Quantifikation von Apaf-1 zeigte sich eine signifikante Abnahme der Werte der hOB die für 24 Stunden mit BCM50 von *S. aureus* inkubiert wurden. Für alle anderen Konzentrationen und Zeitpunkte konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

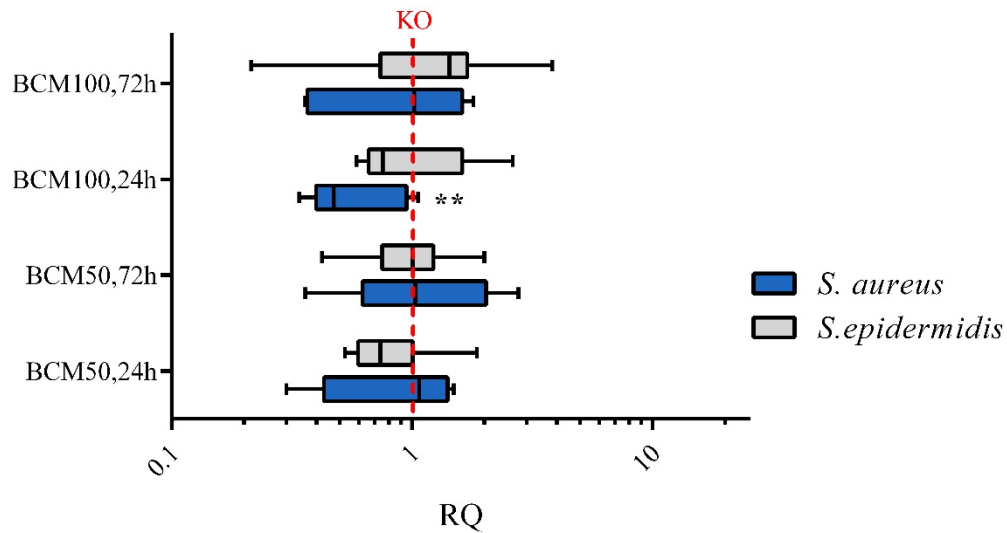


Abbildung 26: Untersuchung der relativen Quantifikation von Apaf-1 der BCM-behandelten hOB

3.4.2.4 Caspase-3

Die Relative Quantifikation der Caspase-3 zeigte keine signifikante Steigerung oder Abnahme nach der Inkubation mit BCM. Unterschiede in der Auswahl des Keims, die Dauer und die Konzentration des BCM sorgten bei dieser Untersuchung für keine Veränderungen.

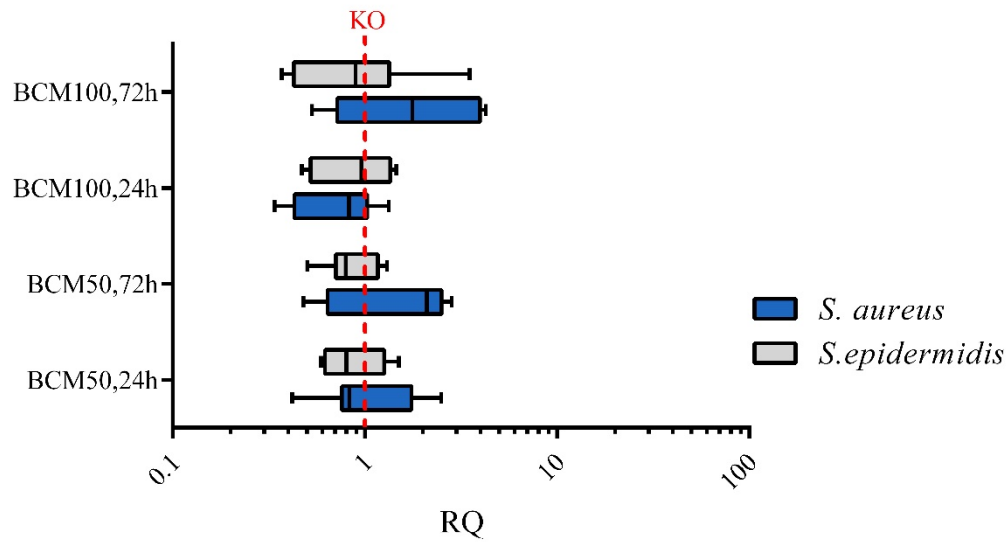


Abbildung 27: Vergleich der Relativen Quantifikation von Caspase-3 der BCM-behandelten Zellen

3.5.3 Patientenindividuelle Unterschiede

Bei der Interpretation der gewonnenen Daten ist die Betrachtung der einzelnen Primer für eine Schlussfolgerung interessant. Durch unseren Ansatz ist jedoch auch die Betrachtung der Reaktionen der einzelnen Patienten möglich. Zum Teil wurden sehr vergleichbare Reaktionen der Patienten festgestellt, es sind jedoch auch patientenindividuelle Unterschiede deutlich geworden. Eine Übersicht der Daten aller Patienten ist nachfolgenden dargestellt. Im Weiteren haben wir anhand von zwei Kriterien beispielhaft Patienten gesondert dargestellt.

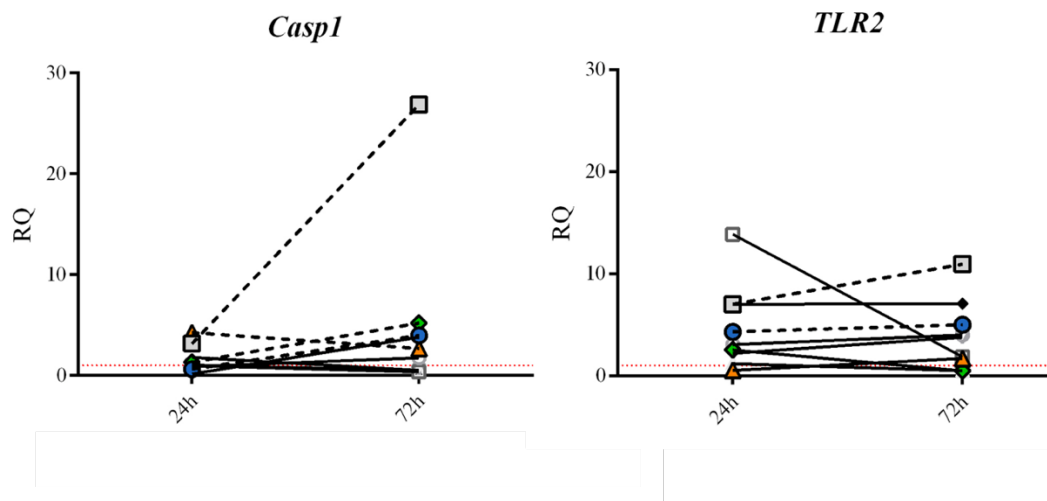


Abbildung 28: Relative Quantifikation der Primer Caspase 1 und TLR2 von hOB nach Inkubation mit BCM (100% Konzentration) von SA, Legende s. Abbildung 29

Bei beiden inflammatorischen Primern ist bei fast allen Patienten die Zunahme der inflammatorischen Werte im Zeitvergleich zwischen 24 und 72 Stunden darstellbar. Lediglich Patient 10 (männlich, 68 Jahre) und Patient 71 (weiblich, 67 Jahre) zeigen für TLR2 einen Abfall des Werts im zeitlichen Verlauf.

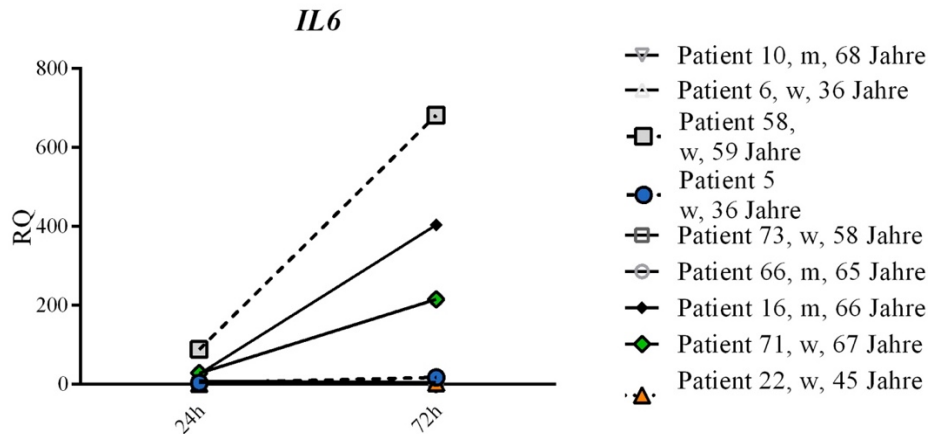


Abbildung 29: Relative Quantifikation des Primers für Interleukin 6 von hOB nach Inkubation mit BCM (100% Konzentration) von SA

Für Interleukin 6 ist die Zunahme im zeitlichen Verlauf bei allen Patienten anschaulich darstellbar. Besonders deutlich in dieser Darstellung wird jedoch die unterschiedliche Stärke, mit der die Patienten reagieren, so beträgt die RQ für Patient 58 (weiblich, 59 Jahre) ein hundertfaches wie für Patient 5 (weiblich 36 Jahre). Hierzu siehe nachfolgend 3.4.3.1.

Auch für die apoptotischen Faktoren ist ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Patienten darstellbar.

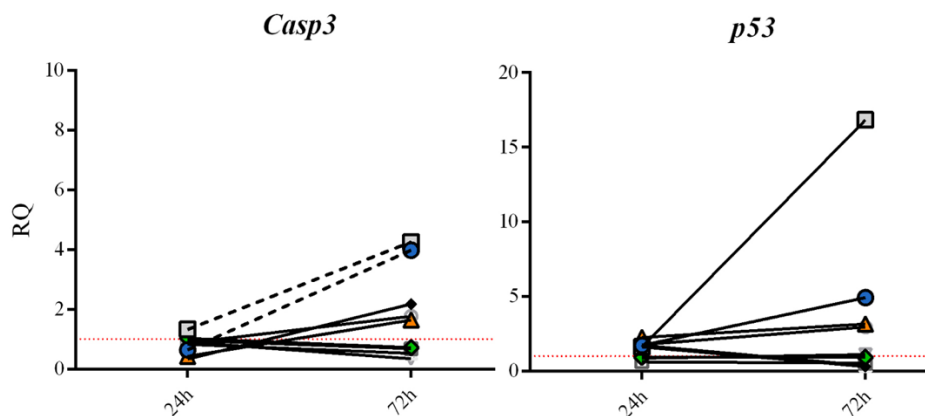


Abbildung 30: Relative Quantifikation der Primer Caspase 3 und p53 von hOB nach Inkubation mit BCM (100% Konzentration) von SA, Legende s. Abbildung 29

Der allgemeine Trend der Entwicklung der Konzentration von Caspase 3 und p53 als Vertreter der Apoptose ist weniger eindeutig. Die Patienten zeigten im Laufe der Inkubation überwiegend eine leichte Zunahme der Konzentration von Caspase 3, bei drei Patienten kam es zu einer geringen Abnahme der Konzentration. Für p53 sticht vor allem Patient 58 (weiblich, 59 Jahre)

hervor. Hier haben wir eine mehr als 3-fache Zunahme der relativen Quantifikation. Alle anderen Patienten stagnierten, oder verzeichneten nur eine geringfügige Zunahme. Für Apaf sind zwei Trends erkennbar: die eine Gruppe an Patienten zeigt im Verlauf eine Abnahme der Konzentration, die andere eine deutliche Zunahme. Diese ist für den Faktor BAX weniger eindeutig, hier ist entweder eine Zunahme oder eine Stagnation erkenntlich.

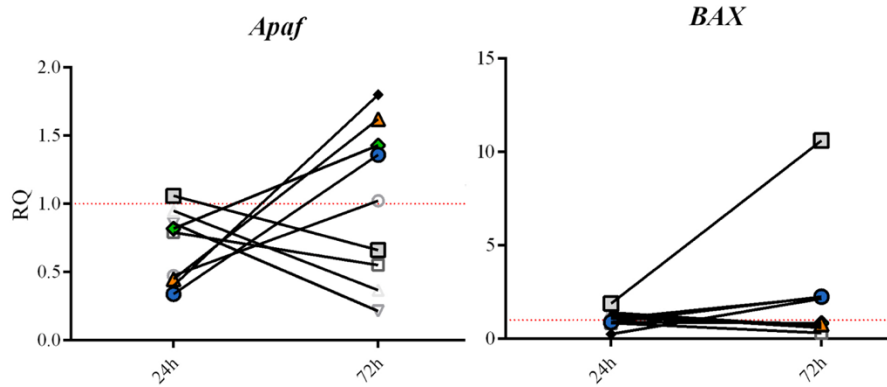


Abbildung 31: Relative Quantifikation der Primer Apaf und BAX von hOB nach Inkubation mit BCM (100% Konzentration) von SA, Legende s. Abbildung 29

3.5.3.1 Vergleich von Patienten unterschiedlichen Alters

Die in Abbildung 27 dargestellten relativen Quantifikationen stellen den Vergleich zwischen Patient A und Patient D dar. Ausschlaggebend für die Auswahl der Patientinnen war zum einen das weibliche Geschlecht und das Alter. Patientin A war zum Zeitpunkt der Entnahme der humanen Osteoblasten 36 Jahre alt und damit prämenopausal. Patientin D hingegen mit 59 Jahren postmenopausal. Der Einfluss des Hormonhaushalts auf die Knochen

Die Darstellung bezieht sich auf die Untersuchung der Expression nach der Inkubation mit BCM von *S. aureus*. Für alle drei Primer ist eine ähnliche Tendenz erkennbar: eine Steigerung der Expression konnte bei allen nach einer Inkubation von 72 Stunden im Vergleich zu 24 Stunden festgestellt werden. Der weitaus größte interindividuelle Unterschied lässt sich jedoch für *Interleukin 6* darstellen, hier wurde bei Patient D ein über 600-fach höherer Wert nachgewiesen im Vergleich u Patient A.

Zusätzlich ist zu erkennen, dass die Werte bei Patient D im Vergleich zu Patient A grundsätzlich höher sind und auch die Steigerung im zeitlichen Verlauf steiler erfolgt. Die rote Markierung bei RQ=1 stellt hier die Werte der hOB dar, die mit Kontrollmedium inkubiert wurden.

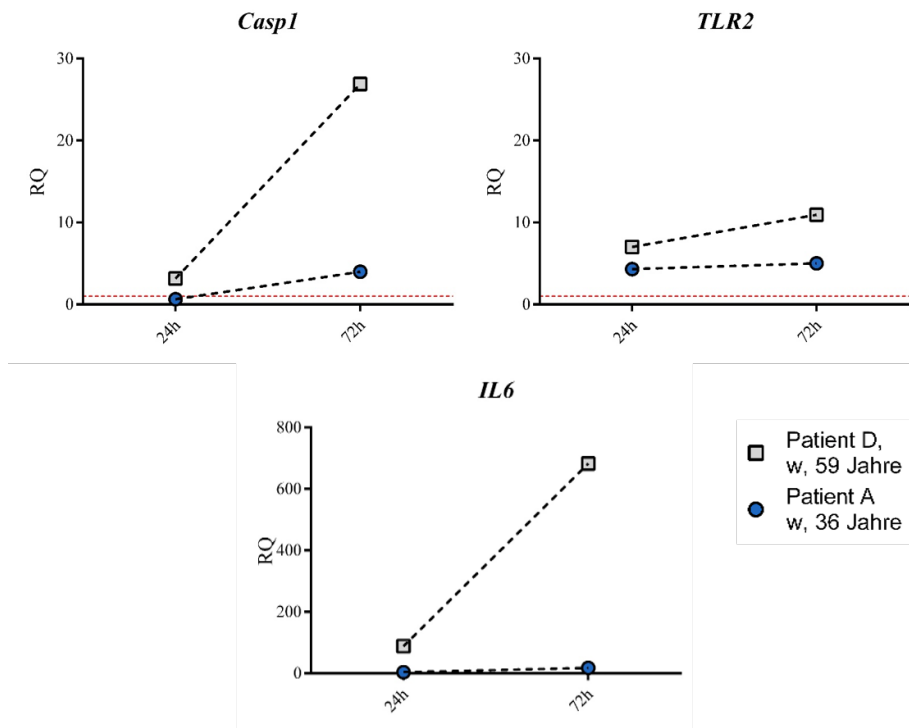


Abbildung 32: Vergleich der inflammatorischen Reaktion von Patient A und D

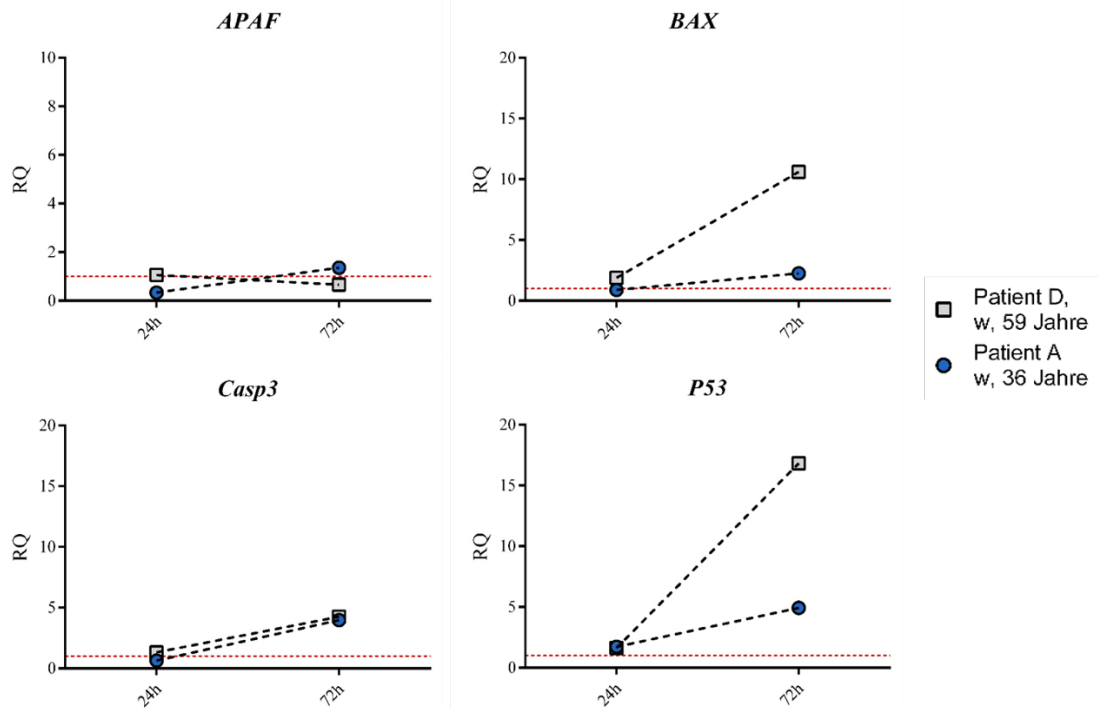


Abbildung 33: Vergleich der apoptotischen Reaktion von Patient A und D

3.5.3.2 Vergleich Patienten unterschiedlichen Geschlechts

Nicht nur das Alter kann einen signifikanten Unterschied in der Physiologie der Immunabwehr und des Knochenmetabolismus machen, auch das Geschlecht kann eine Rolle spielen.

Bei der Betrachtung von Patient B (männlich, 66 Jahre alt) und Patient G (weiblich, 67 Jahre alt) erkennt man, dass die beiden Patienten sich unterschiedlich bezüglich ihrer inflammatorischen Reaktion verhalten. Anders als bei Patient B nimmt die RQ für den TLR2 im zeitlichen Verlauf ab. Patient B zeigt zusätzlich eine deutlich gesteigerte RQ von IL6 nach 72 Stunden, bei Patient G ist hingegen keine wesentliche Steigerung zu erkennen.

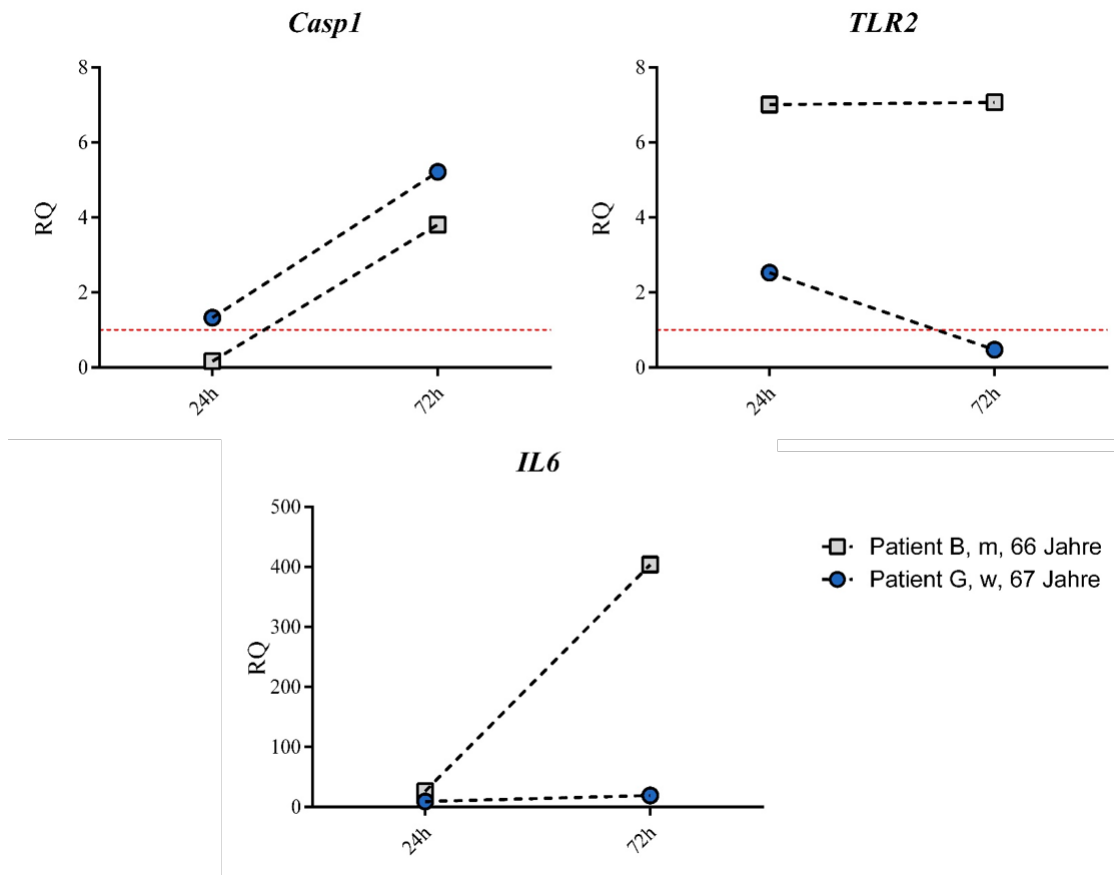


Abbildung 34: Vergleich der inflammatorischen Reaktion von Patient B und G

Bei der Betrachtung der ausgewählten Marker für die Apoptose wird deutlich, dass die beiden Patienten grundlegend unterschiedlich auf die Inkubation mit BCM reagieren. Patient B zeigt eine Steigerung der Apaf-1, des BAX und der Caspase-3, sowie eine Abnahme der P53-Konzentration. Patient G hingegen zeigt nur eine geringfügige Steigerung der Apaf-1, keine Stagnation der BAX, der Caspase-3 und des P53.

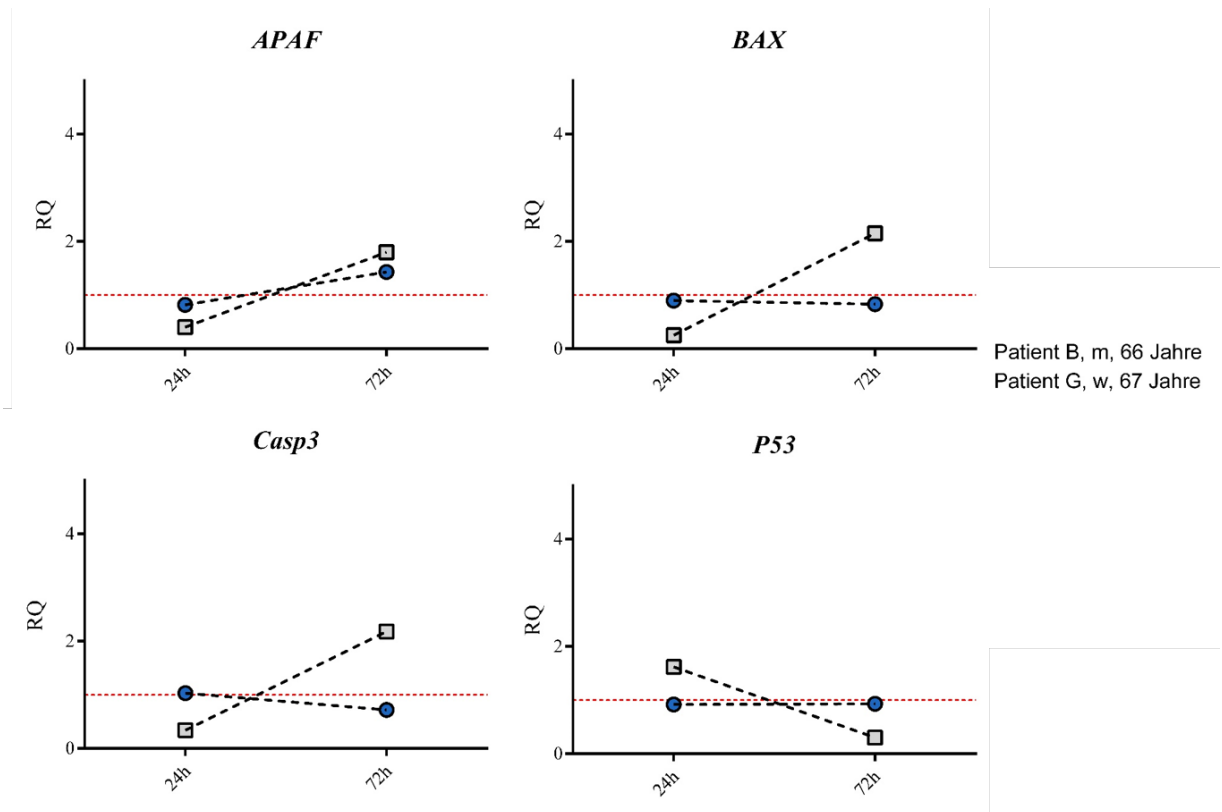


Abbildung 35: Vergleich der apoptotischen Reaktion von Patient B und G

4 Diskussion

Diese Arbeit stellt den Einfluss von BCM auf die Apoptose und Inflammation humaner Osteoblasten dar. Durch eine stetig alternde Gesellschaft und die Zunahme von Operationen zum Gelenkersatz geraten die Komplikationen dieser Eingriffe immer mehr in den Fokus. Als einer der prognostisch relevantesten Faktoren in der Morbidität und Mortalität eines solchen Gelenkersatzes gilt die periprothetische Infektion. Diese wird vor allem durch die Biofilm-Bildung auf dem Ersatzmaterial charakterisiert, die eine Therapie sehr schwierig und aufwändig machen.

Biofilm-assoziierte Infektionen sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Der Ablauf einer solchen Infektion ist sehr unterschiedlich in seiner inflammatorischen Reaktion des Wirts. Die Interaktion zwischen den Botenstoffen der Bakterien und den Wirtszellen, im Knochenfalle der Osteoblasten ist Fokus dieser Arbeit gewesen.

Die Untersuchungen wurden durchgeführt, ohne dass die beiden Spezies in direktem Kontakt zueinanderstanden. Jeder Einfluss auf Änderungen der Proliferation, DNA-Quantität und Genexpression kann somit nicht auf eine aktive Interaktion zwischen den Osteoblasten und den Bakterien zurückgeführt werden, sondern nur auf die von den Bakterien produzierten Stoffwechselprodukte. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf den Vergleich zwischen den beiden Keimen, sowie der Einfluss der Konzentration und der Dauer der Inkubation mit BCM auf die Proliferation gelegt.

Die metabolische Aktivität der hOB kann durch die WST-1-Untersuchungen quantifiziert werden. Unsere Ergebnisse zeigen eine deutliche Abnahme der metabolischen Aktivität der Zellen nach Inkubation mit BCM. Bei der genauen Betrachtung fällt auf, dass das BCM von *S. aureus* in jeder Konzentration und nach beiden gemessenen Zeitpunkten signifikante Minderungen der metabolischen Aktivität bewirkt.

Der Einfluss von Bakterien auf die metabolische Aktivität von hOB ist bereits vielfach untersucht worden. So konnten Widaa et al. (Widaa, Claro et al. 2012), die eine deutliche Abnahme der Proliferation von Osteoblasten durch eine 21 Tage andauernde Kohabitation mit *S. aureus* darstellen. Ihre These, dass dabei *S. aureus* Protein A eine tragende Rolle spielt konnten sie mit entsprechend defizienten Co-Kulturen nachweisen. Auch unsere Ergebnisse zeigen eine Reduktion der metabolischen Aktivität, durch unseren Versuchsaufbau ist jedoch eine Kausalität mit der Konzentration von Protein A nicht weiter beurteilbar.

Die Ergebnisse der metabolischen Aktivität von *S. aureus* unterscheiden sich an dieser Stelle deutlich von denen für *S. epidermidis*. Für diesen Keim wurde nach 24 Stunden bei keiner der beiden Konzentrationen eine signifikante Minderung der metabolischen Aktivität im Vergleich

zu der Kontrolle nachgewiesen. Die Funktionsfähigkeit der hOB wird also kurzfristig durch die Stoffwechselprodukte von *S. epidermidis* nicht eingeschränkt.

Dieser Effekt verringert sich jedoch bei einer längeren Inkubation, die Werte unterschieden sich nach 72 Stunden nicht mehr signifikant voneinander. Die Ergebnisse erlauben den Schluss, dass das BCM von beiden Keimen einen negativen Einfluss auf die metabolische Aktivität im Vergleich zum Kontrollmedium der hOB hat. Weiterhin kann geschlussfolgert werden, dass das BCM von *S. aureus* bereits bei einer geringeren Konzentration und nach einer Inkubation von 24 Stunden signifikante Minderungen hervorruft. Diese Beobachtung ist kongruent zu der von Sanchez et al., die bereits nach 24 Stunden bei Konzentrationen von >50% des BCM eine signifikante Reduktion der Zellviabilität und Proliferationsfähigkeit sahen (Sanchez, Ward et al. 2013).

Im Vergleich wurde für das BCM von *S. epidermidis* erst nach 72 Stunden eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität der hOB gemessen. Bei beiden Keimen ist eine Intensivierung der Ergebnisse bei hoher Konzentration und im zeitlichen Verlauf zu beobachten. Unsere Ergebnisse unterstreichen in diesem Punkt die in der Literatur vielfach beschriebenen Unterschiede in der Virulenz der beiden Keime (Otto 2009, Lei, Gupta et al. 2017). Des Weiteren ist bei der Betrachtung der Ergebnisse noch darauf hinzuweisen, dass in diesen Versuchen lediglich die Stoffwechselprodukte der Keime verwendet wurden, eine Interaktion der beiden Spezies wurde durch unseren Versuchsaufbau verhindert.

Eine quantitative Aussage über die Zelldichte der hOB kann durch die CyQuant-Untersuchungen getroffen werden. Bei unseren Messungen zeigten sich für beide Keime signifikante Abnahmen der DNA-Quantität nach der Inkubation mit BCM für alle Zeitpunkte und alle Konzentrationen. Auch bei der Betrachtung dieser Werte wird der Unterschied der beiden Keime deutlich: Die Mittelwerte von *S. aureus* sind nach einer Inkubation von 24 Stunden jeweils deutlich niedriger als die von *S. epidermidis*. Jedoch wird auch bei der CyQuant-Untersuchung dieser Unterschied deutlich vermindert, wenn die Zellen länger mit dem BCM inkubiert werden. Bei beiden Keimen kann darüber hinaus der Schluss gezogen werden, dass die Konzentration des BCM eine wesentliche Rolle in der Ausprägungsintensität der Beeinflussung hat. Sanchez et al. konnten mit einer vergleichbaren Methode über einen längeren Zeitraum ebenfalls eine deutliche Minderung der DNA-Quantität feststellen (Sanchez, Ward et al. 2013). Im Vergleich zu der Kontrolle konnten auch in unseren Versuchen signifikante Minderungen der Zellzahl nach Inkubation festgestellt werden.

In der Zusammenschau der Ergebnisse aus CyQuant und WST wird deutlich, dass *S. epidermidis* im Vergleich zu *S. aureus* bei den Osteoblasten eine verzögerte, jedoch auch deutlich messbare Reaktion auslöst.

4.1 Der Einfluss des BCM auf die Inflammation

Die Inflammation beschreibt die komplexe biologische Immunantwort des Wirts auf einen pathologischen Reiz (Kayser, Böttger et al. 2014). Zur Untersuchung der inflammatorischen Reaktion der Zellen auf das BCM wurden drei Primer im Speziellen untersucht, die bei der inflammatorischen Reaktion des Körpers eine wesentliche Rolle spielen.

Die Caspase-1 wurde untersucht, da sie ein integraler Regulator des angeborenen unspezifischen Immunsystems darstellt und proinflammatorische Mechanismen mit protektiven und regenerativen Prozessen verknüpft (Kumar, Kawai et al. 2011, Winkler, Hedrich et al. 2016).

Die durchgeführten Untersuchungen der Expression der Caspase-1 konnten im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikante Steigerung detektieren, bei der genauen Betrachtung der Ergebnisse wird jedoch ein Unterschied zwischen den beiden Keimen deutlich. Die Inkubation mit BCM von *S. aureus* sorgt, im Vergleich zu der Kontrollgruppe, immer zu einer Steigerung der Mittelwerte der RQ. Eine BCM-Konzentration von 100% zeigt jeweils höhere Werte. Es fand bei beiden Konzentrationen eine Steigerung der RQ zwischen den Werten nach 24 Stunden und 72 Stunden statt. Es ist von einer leichten, jedoch nicht signifikanten Steigerung der Caspase-1 im zeitlichen Verlauf auszugehen.

Die Werte, der mit BCM von *S. epidermidis* inkubierten Zellen, verhalten sich gegensätzlich. Hier kann eine leichte Abnahme der Mittelwerte beider Konzentrationen im zeitlichen Verlauf festgestellt werden. Auch zeigen die Mittelwerte der Konzentrationen keine wesentlichen Unterschiede.

Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Durch ihre Fähigkeit spezielle Pathogenbestandteile zu erkennen und die reaktive Ausschüttung inflammatorischer Zytokine auszulösen, sind sie ein wichtiger Bestandteil der inflammatorischen Reaktion des Körpers (Kawai and Akira 2010).

Die Untersuchungen der Expression von TLR-2 ergaben im Vergleich zu den Kontrollen zum Teil signifikante Steigerungen nach der Inkubation mit BCM beider Keime.

Bei der genauen Betrachtung wird deutlich, dass die Werte für *S. aureus* nach 24h für beide Konzentrationen signifikante Zunahmen der RQ zeigten. Die Werte nach 72h jedoch keine weitere Steigerung nachweisen konnten.

Gegenteilig hingegen zeigen sich die Werte für *S. epidermidis*. Bei der Betrachtung der Mittelwerte ist für beide Konzentrationen im zeitlichen Verlauf eine Steigerung der RQ nachzuweisen, bei der Betrachtung des BCM50 ist sogar eine Signifikanz gegenüber der Kontrolle nachweisbar. Grundsätzlich scheint die Inkubation mit *S. epidermidis* im Vergleich zu *S. aureus* zu einer Steigerung der Reaktion im zeitlichen Verlauf zu führen.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die im Verhältnis zur Expression von IL-6 nur gering erhöhte Expression von TLR2 könnte sein, dass weitere Signalwege Bestandteil der inflammatorischen Reaktion sein können. So wurde durch Takeuchi et al bereits 2000 in einer Studie mit Mäusen, defizient für einerseits TLR2 und in einer Kontrolle für MyD88, eine deutlich erhöhte Sterblichkeit nach Infektion mit *S. aureus* bei MyD88 defizienten Mäusen nachgewiesen (Takeuchi, Hoshino et al. 2000). Diese Studie zeigt, dass inflammatorische Signale zur Pathogen-Bekämpfung bei Infektion mit *S. aureus* nicht nur via des TLR2-Signalweg geleitet werden.

Interleukin 6 ist ein proinflammatorisches Zytokin (Tanaka, Narazaki et al. 2014), die Produktion wird nach Aktivierung des proinflammatorischen Stoffwechselwegs initiiert.

Die Untersuchungen der Expression von IL6 zeigen für beide Keime eine Erhöhung der Mittelwerte, diese fällt jedoch stark unterschiedlich aus.

Für *S. aureus* wurden zu jedem Zeitpunkt, bei jeder Konzentration eine starke Expression von IL6 beobachtet. Diese schwankt jedoch patientenindividuell sehr stark, eine Signifikanz konnte aufgrund dieser hohen Standardabweichung nicht beobachtet werden. Es finden sich jedoch bis zu 600-fache Steigerungen, sodass von einer deutlichen Induktion der Inflammation durch die Inkubation mit BCM auszugehen ist.

Im Vergleich hierzu ist der Einfluss von *S. epidermidis* deutlich schwächer. Zwar liegen die Mittelwerte der RQ für IL6 immer über denen der Kontrollen, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Auffällig jedoch auch bei dieser Untersuchung sind die patientenindividuellen Unterschiede der Messungen.

Die ausgeprägte Streubreite der interindividuellen inflammatorischen Reaktion zeigt sich auch in der Literatur. So wurde bei Dapunt et al. zwar eine Kohabitation von Bakterien und Osteoblasten durchgeführt, die Schwankungen sind jedoch vergleichbar (Dapunt, Giese et al. 2016). In ihrer Studie konnte auch eine Steigerung von IL-6 festgestellt werden, sowohl nach Kultur von humanen Osteoblasten mit planktonischen Bakterien als auch nach Kultur von *hOB* mit EPS. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Immunsysteme von manchen Patienten stärker auf die Anwesenheit von Bakterien und Stoffwechselprodukte von Bakterien reagieren als andere.

In einer kürzlich veröffentlichten klinischen Studie von Rasmussen et al wurden die inflammatorischen Reaktionen von Patienten mit Bakteriämie von *S. aureus* untersucht (Rasmussen, Idosa et al. 2019). Hierfür wurden an Tagen 1, 2, 3, 5 und 7 jeweils Blutentnahmen durchgeführt. In dieser Studie wurde ein Anstieg unter anderem der Caspase-1 festgestellt. Insbesondere die interindividuelle Varianz der inflammatorischen Reaktion wurde von den Autoren hervorgehoben. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Mortalität einer Bakteriämie mit *S. aureus* bei erhöhten Caspase-1-Werten deutlich geringer ausfiel.

Rea et al. haben darüber hinaus auch einen Einfluss des Alters der Patienten und der entsprechenden inflammatorischen Reaktion herleiten können (Rea, Gibson et al. 2018). So kann, durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, die durch altersbedingte Redox-Dysbalance entstehen, eine Aktivierung des NF- κ B durch Inflammasomautolyse ausgelöst werden.

Bezüglich der Reaktion auf die einzelnen Keime lässt sich in Zusammenschau der Befunde der Schluss ziehen, dass beide Keime eine inflammatorische Reaktion auslösen. Die Wirkung des BCM beider Keime, speziell jedoch von *S. aureus*, sorgten in unseren Versuchen für eine deutliche grundsätzliche Steigerung der Produktion inflammatorischer Marker.

Eine Erklärung für die im Vergleich geringer gesteigerten Werte für *S. epidermidis* könnten sich durch seine Infektionsart erklären. Es ist möglich, dass die Reaktion auf die Inkubation mit *S. epidermidis* verspätet eintritt, da Infektionen mit ihm grundsätzlich subakuter verlaufen (Renz 2015).

Zudem ist *S. epidermidis* ein universeller Hautkeim, der bei jedem Menschen zur normalen Hautflora gehört (Kloos and Musselwhite 1975). Als solcher besteht sein evolutionärer Vorteil darin, dass er sich fortpflanzt und verbreitet, ohne den Wirt signifikant zu schädigen (Massey, Horsburgh et al. 2006). Dies könnte ein Grund für die minder ausgeprägte inflammatorische Reaktion sein.

Zusätzlich ist jedoch auch die Lebensform der Bakterien innerhalb einer Biofilm-assoziierten Infektion ein Grund: während die Bakterien Teil des Biofilms sind haben sie einen reduzierten Stoffwechsel und produzieren vermindert Virulenzfaktoren (Resch, Rosenstein et al. 2005).

Wie in anderen Studien mit *S. aureus* bereits geschehen (Sanchez, Ward et al. 2013), müssen Untersuchungen mit entsprechend längerer Inkubation mit BCM durchgeführt werden, um eine Einordnung der langfristigen Wirkung vornehmen zu können.

4.2 Einfluss des BCM auf die Apoptose

Die Apoptose beschreibt den Prozess des kontrollierten Zelltods (Silbernagel 2018). Als Teil des zellulären Verteidigungssystems ist sie Bestandteil des Eradikationsprozesses von dysplastischen oder infizierten Zellen ohne die Auslösung einer inflammatorischen Reaktion (Elmore 2007).

Zur Untersuchung der Apoptose der mit BCM inkubierten hOB wurden in dieser Arbeit vier Primer im Speziellen untersucht, die bei der Apoptose eine wesentliche Rolle spielen.

P53 wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. Als Tumorsuppressorgen hat es eine tragende Rolle in der Überprüfung der Integrität der DNA (Horn 2019). Die Untersuchungen der

Expression von P53 nach der Inkubation mit *S. aureus* zeigte bei einer Inkubation mit BCM100 für 24h eine hochsignifikante Steigerung. Mit Ausnahme des BCM50 Wertes nach 72h sind außerdem alle Mittelwerte im Vergleich zu der Kontrolle leicht erhöht. Diese Änderungen sind jedoch nicht signifikant. Es findet sich eine hohe Standardabweichung. Im Vergleich hierzu sind alle Mittelwerte der hOB, die mit BCM von *S. epidermidis* inkubierten wurden, niedriger als die der Kontrollen. Die Inkubation mit BCM dieses Keims scheint keinen Einfluss auf die Expression von P53 zu haben.

BAX ist ein pro-apoptotischen Protein, es ist an der Auslösung der Apoptose durch den intrinsischen Signalweg beteiligt (Youle and Strasser 2008) und induziert die Porenbildung der mitochondrialen Membran. Eine Verhinderung der Apoptose ist nach seiner Aktivierung nicht mehr möglich (Jin and El-Deiry 2005). In unseren Untersuchungen konnten keine signifikanten Veränderungen der Expression von BAX festgestellt werden. Weder die Konzentration noch die Zeit scheinen eine Veränderung hervorzurufen. Bei der Betrachtung der Mittelwerte aller Untersuchungen der beiden Keime ist sogar eine Abnahme der RQ nach 72h feststellbar. Die Expression von BAX wird nicht durch die Inkubation mit BCM verändert.

Apaf-1 ist ein Adaptermolekül und Teil des Apoptosoms, welches die Caspase-3 aktiviert (Lee and Fairlie 2012). Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Genexpression für Apaf-1 findet sich keine signifikante Steigerung der Werte nach der Inkubation mit BCM beider Keime. Im Gegensatz erkennen wir eine signifikante Senkung der RQ nach Inkubation mit BCM100 von *S. aureus* nach 24h. Eine Inkubation mit BCM führt bei den hOB im Vergleich zu der Kontrolle zu keiner Erhöhung von Apaf-1.

Die Caspase-3 ist ein potenter Effektor der Apoptose (Wall and McCormick 2014), sie stellt die gemeinsame Endstrecke des Extrinsischen und Intrinsischen Signalwegs der Apoptose dar (Youle and Strasser 2008). *S. aureus* ist in der Literatur als Aktivator der Caspase-3 in Immunzellen und somit Auslöser der Apoptose beschrieben (Thammavongsa, Missiakas et al. 2013). Bei unserer Untersuchung der Expression der Caspase-3 konnten jedoch keine signifikanten Änderungen nach der Inkubation mit BCM festgestellt werden. Jedoch findet sich für die hOB, die mit BCM von *S. aureus* inkubiert wurden eine Verschiebung der Mittelwerte zwischen der Inkubation nach 24h und 72h. Diese Tendenz ließ sich bei beiden Konzentrationen nachweisen. Grundsätzlich ist jedoch keine signifikante Änderung nach der Inkubation mit BCM nachzuweisen.

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, dass nach 72 Stunden Inkubation mit BCM von weder *S. aureus* noch *S. epidermidis* eine signifikante Steigerung der Apoptose gezeigt werden kann.

Dass *S. aureus* die Apoptose in Osteoblasten auslöst, ist ein bereits häufig beschriebenes Phänomen (Tucker, Reilly et al. 2000, Alexander, Rivera et al. 2003, Claro, Widaa et al. 2011). Bereits 2000 wurde von Tucker et al. die These aufgestellt, dass *S. aureus* durch Wachstumsfaktoren

ren und Zytokine die Apoptose in *hOB* auslöst (Tucker, Reilly et al. 2000). Zwar wurden in diesen Versuchen keine humanen Zellen untersucht und ein Augenmerk auf die Internalisierung von *S. aureus* gelegt, ein deutlicher Effekt ist jedoch nicht zu leugnen.

Weiterhin sind Bakterien in planktonischem Zustand untersucht worden. In unserem Versuch ist die Entstehung eines Biofilms vorangegangen. In diesem Zustand ist eine allgemeine Minderung der metabolischen Aktivität der Bakterien bekannt (Resch, Rosenstein et al. 2005), die verminderte Produktion u.a. auch von Virulenzfaktoren könnte einen Einfluss auf die grundsätzlich mildere Reaktion haben.

Vergleichbarer zu unserer Arbeit ist die Studie von Sanchez et al. (Sanchez, Ward et al. 2013): bei diesen Versuchen wurde durch einen ähnlichen Versuchsaufbau BCM produziert und der Effekt auf Osteoblasten untersucht. Bei diesen Untersuchungen wurde jedoch eine signifikante Steigerung der Apoptose nachgewiesen. Im Vergleich zu unserem Versuchsaufbau wurden hier jedoch isolierte *hOB* von Promocell verwendet. Der Unterschied besteht darin, dass die Zellen von Promocell homogenisiert worden sind, dass also davon auszugehen ist, dass sie bei jedem Versuch immer gleich reagieren, da sie nicht mehr spezifisch von einem Patienten sind.

Unser Versuchsaufbau erlaubt hingegen den Rückschluss auf individuelle Unterschiede der Patienten.

Des Weiteren wurde bei Sanchez et al. die Steigerung der Apoptose wurde hier mittels Annexin V-FITC Apoptose Kit festgestellt. Annexin V wird als Teil des exekutiven Anteils der Apoptose eingeordnet (van Engeland, Nieland et al. 1998), weshalb von einer primären Aktivierung zumindest der Caspase 3 auszugehen wäre.

Schließlich wurde in dem Aufbau von Sanchez et al. eine Inkubationszeit von 7 Tagen gewählt, in unserem stattdessen nur von maximal 72 Stunden. Dieser Unterschied könnte zur Folge haben, dass die Zellen im Verlauf eine ausgeprägtere Tendenz zur Apoptose oder eine stärkere inflammatorische Reaktion gezeigt hätten. Es ist jedoch zu beachten, dass es bei unserem Versuchsaufbau zu einer starken Reduktion der Zellzahl gekommen ist, sodass wir nicht davon ausgehen, dass mit dem gleichen Versuchsaufbau und einer verlängerten Inkubationszeit genug Zellmaterial für eine Auswertung übrig sein wird.

Ein weiterer Faktor, der jedoch einen Einfluss auf die Ergebnisse der Untersuchung gehabt haben konnte, ist jedoch, dass in unseren Versuchen Knochenmaterial direkt von Patienten extrahiert und kultiviert wurde. Da Knochengewebe nicht allein aus Osteoblasten besteht, müssen wir davon ausgehen, dass bei unseren Untersuchungen eine Mischkultur aus Osteoblasten und anderen Bindegewebszellen (z.B. Fibroblasten) untersucht wurde.

Der Vorteil unseres Versuchsansatzes liegt hierbei darin, dass ein realistischeres Bild des Gewebes abgezeichnet wird. Der Nachteil ist allerdings, dass die Reaktion nicht spezifisch einer Zellreihe zugeordnet werden kann. Weitere Versuche zur klaren Differenzierung der verschiedenen

enthaltenen Zelltypen unserer Zellkulturen sind nötig, um eine gute Vergleichbarkeit zu erreichen.

Weiterhin wurden in unserem Versuchsaufbau Bakterienkulturen von ATCC verwendet. Zwar gibt es Hinweise darauf, dass der Effekt auf die Apoptose-Induktion durch unterschiedliche *S. aureus*-Stämme ausgelöst werden kann (Sanchez, Ward et al. 2013), jedoch ist es denkbar, dass unterschiedliche Stämme sich in der Virulenz unterscheiden.

Bei der Untersuchung des Ablaufs einer Infektion von *S. aureus* mit hOB wurde in der Vergangenheit zudem Aufmerksamkeit darauf gelenkt, dass Osteoblasten Eigenschaften von manchen Immunzellen aufweisen (Dapunt, Giese et al. 2016). So sind Osteoblasten in der Lage Bakterien zu opsonieren (Tucker, Reilly et al. 2000) und nach Bindung Zytokine und andere Immunfaktoren auszuschütten.

Im Gegensatz zu *S. aureus* bietet *S. epidermidis* eine signifikant niedrigere Internalisierungsrate in humane Osteoblasten (Campoccia, Montanaro et al. 2006, Khalil, Williams et al. 2007, Valour, Trouillet-Assant et al. 2013). Dies kann Hinweise darauf geben, dass dieser Mechanismus bei *S. epidermidis* nicht vorhanden, beziehungsweise, weniger stark ausgeprägt ist (Campoccia, Montanaro et al. 2006).

Im Rahmen der Untersuchungen der Inflammation und Apoptose in dieser Arbeit erscheint *S. aureus* als der pathogenere Keim. Im Rahmen der weiteren Untersuchungen konnte jedoch bei Betrachtung der osteogenen Differenzierung gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Reduktion der Kalzifizierung des Knochens kommt, wenn Zellen mit BCM von *S. epidermidis* inkubiert werden (Tubel, Maier et al. 2021).

Anhand unserer Untersuchungen lässt sich also rückschließen, dass beide Keime einen negativen Einfluss auf den Stoffwechsel und die Zellzahl humaner Osteoblasten haben. Anhand der Messungen der PCR wird darüber hinaus der Unterschied zwischen den zwei Bakterienspezies deutlich: *S. aureus* zeigte deutlich höhere inflammatorische Reaktionen bei den hOB als *S. epidermidis*. Schließlich ist in dieser Arbeit deutlich geworden, dass Patienten unterschiedlich auf die Stoffwechselprodukte der Bakterien im Biofilm reagieren. Weitere Untersuchungen zur Identifikation von prädisponierenden Faktoren sind notwendig.

4.3 Limitationen dieser Arbeit

Die Stärke dieser Arbeit bedeutet jedoch auch gleichzeitig eine Limitation. Es ist zu erwarten, dass eine Reaktion der hOB auf die Stoffwechselprodukte der Bakterien wiederum Einfluss auf die Proliferation der Keime hat. Eine Untersuchung einer Kohabitation und somit Vergleich mit den jetzigen Ergebnissen sollten in der Zukunft durchgeführt werden.

Die genaue Aufschlüsselung der Bestandteile der Biofilmmatrix und der darin enthaltenen Proteine ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Flemming and Wingender 2010). Durch unseren

Blackbox-Ansatz kann also eine genaue Kausalität einzelner Bestandteile nicht untersucht werden, jedoch auch weitgehend ausgeschlossen werden, dass wesentliche Bestandteile vernachlässigt wurden. Des Weiteren unterscheidet sich die Virulenz einzelner Bakterienstämme einer Art deutlich (Montanaro, Speziale et al. 2011), eine pauschale Aussage über das pathogene Potential kann ohne genaue Aufschlüsselung der Virulenzfaktoren des untersuchten Stamms nicht getroffen werden. Vielmehr ist die Betrachtung nicht einzelner Bakterienarten sinnvoll, sondern einzelner Virulenzfaktoren und deren Effekt auf *hOB*.

Eine weitere Limitation ist die Dauer der Inkubation des BCM. Bis zur vollständigen Reifung eines bakteriellen Biofilms wird ein Zeitraum von bis zu vier Wochen angenommen (Walter, Kemmerer et al. 2012), in unserem Protokoll wurde diese Zeitspanne nicht entsprechend repräsentiert, für die Bildung und Reifung des Biofilms wurden lediglich 48 Stunden verwendet. Es ist zu bedenken, dass ein vollständig ausgereifter Biofilm eine andere Stoffwechselaktivität besitzt als ein sich neu bildender. Die Reaktion der *hOB* können sich stark von der jetzigen unterscheiden. Darüber hinaus wurden die humanen Osteoblasten in unseren Versuchen maximal 6 Tage mit dem BCM inkubiert, obwohl bei der periprothetischen Infektion vor allem der chronische Verlauf im Vordergrund steht (Lei, Gupta et al. 2017). Über die Auswirkung einer chronischen Infektion kann mit unserem Versuchsaufbau keine Aussage getroffen werden. Für die adäquate Evaluation der chronischen Wirkung sind längerfristige Versuchsmodelle notwendig. Schließlich wurden die für unseren Versuchsaufbau verwendeten *hOB* von Patienten extrahiert und angezüchtet. Während dieses Prozesses wurde zwar bewiesen, dass Osteoblasten in den Zellkulturen vorhanden sind, jedoch wurden diese Nachweise nicht stetig wiederholt. Es ist davon auszugehen, dass ein Teil der Zellmasse nicht aus Osteoblasten besteht, sondern beispielsweise auch aus Fibroblasten. Obwohl dies dazu beiträgt, das realistische Knochenmilieu in unserem *in vitro* Verfahren darzustellen wäre eine genaue Differenzierung der Zusammensetzung der Zellkulturen für diesen Aspekt hilfreich.

Zudem ist unsere Fallzahl für eine zuverlässige Aussage zu niedrig, es sollten weitere Untersuchungen vorgenommen werden, um Tendenzen bei bestimmten Patientengruppen (Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen) erkennen und verlässlich auswerten zu können.

4.4 Ausblick

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von BCM von *S. aureus* und *S. epidermidis* einen Einfluss auf *hOB* hat. Dabei konnte ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Konzentration, sowie der Dauer der Inkubation des BCM und der Reaktionsintensität der *hOB* festgestellt werden.

Diese Arbeit beinhaltet Aussagen über die Reaktion der *hOB* auf die Stoffwechselprodukte, die von einem Biofilm produziert werden. Weitere Untersuchungen mit Co-Kulturen aus *hOB* und Bakterien sind für ein besseres Verständnis von Protheseninfektionen notwendig. Dazu gehört die sorgfältige Analyse der Bestandteile des BCM und, langfristig, Untersuchungen der Kohabitation von Bakterien und Knochenzellen.

Grundsätzlich bleibt zu diskutieren, inwiefern sich die Produktion von Stoffwechselprodukten durch eine Kohabitation verändert. Dabei wird auch die Betrachtung weiterer Erreger wichtig, die zwar seltener sind, aber teils mit einer erhöhten Mortalität einhergehen, wie beispielsweise *Enterococcus spp.* (Gundtoft, Pedersen et al. 2017).

Weitere Untersuchung mit genauer Analyse klinischer Details der Patienten sind notwendig, um langfristig Patienten besser identifizieren zu können, die ein gesteigertes Risiko haben an einer periprothetischen Infektion zu erkranken. Ein entsprechend gesteigertes prophylaktisches Regime oder die Entscheidung gegen einen Gelenkersatz könnte so patientenindividueller beraten werden.

Biofilme stellen eine große Herausforderung der modernen Medizin und der Wirtschaft dar (Kapadia, Berg et al. 2016). Ein vollständiges Verständnis der Pathogenität und des Ablaufs einer Infektion sind Grundlage für die Therapie und Prävention. Aufgrund der Evolution der Keime und die zunehmende Resistenz gegenüber Antibiotika (Massey, Horsburgh et al. 2006), ist das Verständnis der Infektionsmechanismen wichtig, um potentielle neue Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können. So kann bei vollständigem Verständnis der Pathologie auch die Option eines Disease control statt vollständiger Eradikation der Keime eine Option sein (Tande, Gomez-Urena et al. 2017).

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Labor für experimentelle Orthopädie der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie des Klinikums rechts der Isar. Am Zustandekommen und Gelingen dieser Arbeiten waren viele Menschen direkt und indirekt beteiligt. Ich möchte die Gelegenheit nutzen und an dieser Stelle ein herzliches Dankeschön aussprechen.

Zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Rainer Burgkart, dem Leiter der orthopädischen Forschung und Lehre, der mir trotz meines erschwerten Starts den Mut, das Vertrauen und die Inspiration für einen Neustart bereitet hat. Dessen Begeisterung für die Forschung und Neugier an allem mir immer Antrieb und Motivation waren. Es ist ein Privileg dich meinen Doktorvater nennen zu dürfen.

Frau Jutta Tübel danke ich für ihre Geduld, ihre motivierenden Worte und ihr unerschöpfliches Wissen, dass sie stets bereitwillig mit mir geteilt hat.

Frau Dr. med. Elisabeth Maier, die während dieses Projekts nicht nur programmieren gelernt hat, sondern nebenbei noch Milliarden an Osteoblasten gezüchtet hat. Gemeinsam waren wir stark.

Für die Durchsicht, die kritische Auseinandersetzung und Motivation möchte ich Frau Dr. med. Valerie Meister danken.

Und schließlich danke ich meiner Familie für die ständige Unterstützung, die Telefonate und unterbrochenen Urlaube. Zum Glück ist für dieses Projekt keine Maus ums Leben gekommen.

Literaturverzeichnis

- (2010). "Recommendations for bone and joint prosthetic device infections in clinical practice (prosthesis, implants, osteosynthesis). Societe de Pathologie Infectieuse de Langue Francaise." Med Mal Infect **40**(4): 185-211.
- al., T. e. "S2k-Leitlinie „Akute und chronische exogene Osteomyelitis langer Röhrenknochen des Erwachsenen“." 18.01.2019, from <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/012-033.html>.
- Aldinucci, D., J. M. Quinn, M. Degan, S. Juzbasic, A. D. Luliis, S. Improta, A. Pinto and V. Gattei (1996). "In Vitro Cellular Systems for Studying OC Function and Differentiation : Primary OC Cultures and the FLG 29.1 Model." Methods Mol Med **2**: 277-306.
- Alexander, E. H., F. A. Rivera, I. Marriott, J. Anguita, K. L. Bost and M. C. Hudson (2003). "Staphylococcus aureus - induced tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand expression mediates apoptosis and caspase-8 activation in infected osteoblasts." BMC Microbiol **3**: 5.
- Arciola, C. R., D. Campoccia, G. D. Ehrlich and L. Montanaro (2015). "Biofilm-based implant infections in orthopaedics." Adv Exp Med Biol **830**: 29-46.
- Aumüller, G., G. Aust, A. Conrad, J. Engele and J. Kirsch (2014). Duale Reihe Anatomie, Thieme.
- Barbari, E. F., A. D. Hanssen, M. C. Duffy, J. M. Steckelberg, D. M. Ilstrup, W. S. Harmsen and D. R. Osmon (1998). "Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study." Clin Infect Dis **27**(5): 1247-1254.
- Barbari, E. F., D. R. Osmon, B. Lahr, J. E. Eckel-Passow, G. Tsaras, A. D. Hanssen, T. Mabry, J. Steckelberg and R. Thompson (2012). "The Mayo prosthetic joint infection risk score: implication for surgical site infection reporting and risk stratification." Infect Control Hosp Epidemiol **33**(8): 774-781.
- Bowden, M. G., W. Chen, J. Singvall, Y. Xu, S. J. Peacock, V. Valtulina, P. Speziale and M. Hook (2005). "Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of Staphylococcus epidermidis." Microbiology **151**(Pt 5): 1453-1464.
- Campoccia, D., L. Montanaro and C. R. Arciola (2006). "The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance." Biomaterials **27**(11): 2331-2339.
- Campoccia, D., F. Testoni, S. Ravaioli, I. Cangini, A. Maso, P. Speziale, L. Montanaro, L. Visai and C. R. Arciola (2016). "Orthopedic implant infections: Incompetence of Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus lugdunensis, and Enterococcus faecalis to invade osteoblasts." J Biomed Mater Res A **104**(3): 788-801.
- Claro, T., A. Widaa, M. O'Seaghda, H. Miajlovic, T. J. Foster, F. J. O'Brien and S. W. Kerrigan (2011). "Staphylococcus aureus protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis." PLoS One **6**(4): e18748.
- Corvec, S., M. E. Portillo, B. M. Pasticci, O. Borens and A. Trampuz (2012). "Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection." Int J Artif Organs **35**(10): 923-934.
- Costerton, J. W., L. Montanaro and C. R. Arciola (2005). "Biofilm in implant infections: its production and regulation." Int J Artif Organs **28**(11): 1062-1068.
- Cowan, P. T. and P. Kahai (2018). Anatomy, Bones. StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing
StatPearls Publishing LLC.

- Dale, H., A. M. Fenstad, G. Hallan, L. I. Havelin, O. Furnes, S. Overgaard, A. B. Pedersen, J. Karrholm, G. Garellick, P. Pulkkinen, A. Eskelinen, K. Makela and L. B. Engesaeter (2012). "Increasing risk of prosthetic joint infection after total hip arthroplasty." Acta Orthop **83**(5): 449-458.
- Dapunt, U., T. Giese, S. Stegmaier, A. Moghaddam and G. M. Hansch (2016). "The osteoblast as an inflammatory cell: production of cytokines in response to bacteria and components of bacterial biofilms." BMC Musculoskelet Disord **17**: 243.
- del Pozo, J. L. and R. Patel (2007). "The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections." Clin Pharmacol Ther **82**(2): 204-209.
- Dheda, K., J. F. Huggett, S. A. Bustin, M. A. Johnson, G. Rook and A. Zumla (2004). "Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR." Biotechniques **37**(1): 112-114, 116, 118-119.
- Elek, S. D. and P. E. Conen (1957). "The virulence of *Staphylococcus pyogenes* for man; a study of the problems of wound infection." Br J Exp Pathol **38**(6): 573-586.
- Ellington, J. K., S. S. Reilly, W. K. Ramp, M. S. Smeltzer, J. F. Kellam and M. C. Hudson (1999). "Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts." Microb Pathog **26**(6): 317-323.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.
- Flemming, H. C., T. R. Neu and D. J. Wozniak (2007). "The EPS matrix: the "house of biofilm cells"." J Bacteriol **189**(22): 7945-7947.
- Flemming, H. C. and J. Wingender (2010). "The biofilm matrix." Nat Rev Microbiol **8**(9): 623-633.
- Fuchs, G. (2017). Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Gundtoft, P. H., S. Overgaard, H. C. Schonheyder, J. K. Moller, P. Kjaersgaard-Andersen and A. B. Pedersen (2015). "The "true" incidence of surgically treated deep prosthetic joint infection after 32,896 primary total hip arthroplasties: a prospective cohort study." Acta Orthop **86**(3): 326-334.
- Gundtoft, P. H., A. B. Pedersen, C. Varnum and S. Overgaard (2017). "Increased Mortality After Prosthetic Joint Infection in Primary THA." Clin Orthop Relat Res **475**(11): 2623-2631.
- Hahn, H. F., D.; Kaufmann, S.; Ullmann, U. (2005). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hausner, M. and S. Wuertz (1999). "High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis." Appl Environ Microbiol **65**(8): 3710-3713.
- Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters and F. Gotz (1997). "Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface." Mol Microbiol **24**(5): 1013-1024.
- Horn, F. (2019). Biochemie des Menschen. Stuttgart ; New York, Georg Thieme Verlag.
- Jamal, M., W. Ahmad, S. Andleeb, F. Jalil, M. Imran, M. A. Nawaz, T. Hussain, M. Ali, M. Rafiq and M. A. Kamil (2018). "Bacterial biofilm and associated infections." J Chin Med Assoc **81**(1): 7-11.
- Jiang, Z. L., N. M. Fletcher, M. P. Diamond, H. M. Abu-Soud and G. M. Saed (2009). "S-nitrosylation of caspase-3 is the mechanism by which adhesion fibroblasts manifest lower apoptosis." Wound Repair Regen **17**(2): 224-229.
- Jilka, R. L., G. Hangoc, G. Girasole, G. Passeri, D. C. Williams, J. S. Abrams, B. Boyce, H. Broxmeyer and S. C. Manolagas (1992). "Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6." Science **257**(5066): 88-91.
- Jin, Z. Y. and W. S. El-Deiry (2005). "Overview of cell death signaling pathways." Cancer Biology & Therapy **4**(2): 139-163.

- Kapadia, B. H., R. A. Berg, J. A. Daley, J. Fritz, A. Bhave and M. A. Mont (2016). "Periprosthetic joint infection." Lancet **387**(10016): 386-394.
- Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." Nat Immunol **11**(5): 373-384.
- Kayser, F. H., E. C. Böttger, O. Haller, P. Deplazes and A. Roers (2014). Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie, Thieme.
- Khalil, H., R. J. Williams, G. Stenbeck, B. Henderson, S. Meghji and S. P. Nair (2007). "Invasion of bone cells by Staphylococcus epidermidis." Microbes Infect **9**(4): 460-465.
- Kishimoto, T. (1989). "The biology of interleukin-6." Blood **74**(1): 1-10.
- Kloos, W. E. and M. S. Musselwhite (1975). "Distribution and persistence of Staphylococcus and Micrococcus species and other aerobic bacteria on human skin." Appl Microbiol **30**(3): 381-385.
- Kumar, H., T. Kawai and S. Akira (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." Int Rev Immunol **30**(1): 16-34.
- Kunutsor, S. K., M. R. Whitehouse, E. Lenguerrand, A. W. Blom and A. D. Beswick (2016). "Re-Infection Outcomes Following One- And Two-Stage Surgical Revision of Infected Knee Prosthesis: A Systematic Review and Meta-Analysis." PLoS One **11**(3): e0151537.
- Kunutsor, S. K., M. R. Whitehouse, J. Webb, A. Toms, I. Stockley, A. Taylor, S. Jones, M. Wilson, B. Burston, T. Board, J. P. Whittaker, A. W. Blom and A. D. Beswick (2015). "Re-infection outcomes following one- and two-stage surgical revision of infected hip prosthesis in unselected patients: protocol for a systematic review and an individual participant data meta-analysis." Syst Rev **4**: 58.
- Kurtz, S., K. Ong, E. Lau, F. Mowat and M. Halpern (2007). "Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030." J Bone Joint Surg Am **89**(4): 780-785.
- Kurtz, S. M., K. L. Ong, E. Lau and K. J. Bozic (2014). "Impact of the economic downturn on total joint replacement demand in the United States: updated projections to 2021." J Bone Joint Surg Am **96**(8): 624-630.
- Lachiewicz, P. F., G. D. Rogers and H. C. Thomason (1996). "Aspiration of the hip joint before revision total hip arthroplasty. Clinical and laboratory factors influencing attainment of a positive culture." J Bone Joint Surg Am **78**(5): 749-754.
- Latz, E., T. S. Xiao and A. Stutz (2013). "Activation and regulation of the inflammasomes." Nat Rev Immunol **13**(6): 397-411.
- Lawrence, J. R., G. D. Swerhone, U. Kuhlicke and T. R. Neu (2016). "In situ evidence for metabolic and chemical microdomains in the structured polymer matrix of bacterial microcolonies." FEMS Microbiol Ecol **92**(11).
- Lee, E. F. and W. D. Fairlie (2012). "Structural biology of the intrinsic cell death pathway: what do we know and what is missing?" Comput Struct Biotechnol J **1**: e201204007.
- Lei, M. G., R. K. Gupta and C. Y. Lee (2017). "Proteomics of Staphylococcus aureus biofilm matrix in a rat model of orthopedic implant-associated infection." PLoS One **12**(11): e0187981.
- Leist, M. and M. Jaattela (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(8): 589-598.
- Lim, K. H. and L. M. Staudt (2013). "Toll-like receptor signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(1): a011247.
- Lister, J. L. and A. R. Horswill (2014). "Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal." Front Cell Infect Microbiol **4**: 178.

- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lutro, O., H. Langvatn, H. Dale, J. C. Schrama, G. Hallan, B. Espehaug, H. Sjursen and L. B. Engesaeter (2014). "Increasing Resistance of Coagulase-Negative Staphylococci in Total Hip Arthroplasty Infections: 278 THA-Revisions due to Infection Reported to the Norwegian Arthroplasty Register from 1993 to 2007." Adv Orthop **2014**: 580359.
- Madigan, M. M., J.; Stahl, D.; Clark, D (2013). Brock Mikrobiologie, Pearson Deutschland GmbH.
- Manolagas, S. C. and R. L. Jilka (1995). "Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis." N Engl J Med **332**(5): 305-311.
- Massey, R. C., M. J. Horsburgh, G. Lina, M. Hook and M. Recker (2006). "The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission?" Nat Rev Microbiol **4**(12): 953-958.
- McCarthy, H., J. K. Rudkin, N. S. Black, L. Gallagher, E. O'Neill and J. P. O'Gara (2015). "Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*." Front Cell Infect Microbiol **5**: 1.
- Monds, R. D. and G. A. O'Toole (2009). "The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review." Trends Microbiol **17**(2): 73-87.
- Montanaro, L., P. Speziale, D. Campoccia, S. Ravaoli, I. Cangini, G. Pietrocola, S. Giannini and C. R. Arciola (2011). "Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics." Future Microbiol **6**(11): 1329-1349.
- Murdoch, D. R., S. A. Roberts, V. G. Fowler, Jr., M. A. Shah, S. L. Taylor, A. J. Morris and G. R. Corey (2001). "Infection of orthopedic prostheses after *Staphylococcus aureus* bacteremia." Clin Infect Dis **32**(4): 647-649.
- Nishimoto, N., K. Yoshizaki, H. Tagoh, M. Monden, S. Kishimoto, T. Hirano and T. Kishimoto (1989). "Elevation of serum interleukin 6 prior to acute phase proteins on the inflammation by surgical operation." Clin Immunol Immunopathol **50**(3): 399-401.
- Nunez, G., M. A. Benedict, Y. Hu and N. Inohara (1998). "Caspases: the proteases of the apoptotic pathway." Oncogene **17**(25): 3237-3245.
- Ohsaki, Y., S. Takahashi, T. Scarcez, A. Demulder, T. Nishihara, R. Williams and G. D. Roodman (1992). "Evidence for an autocrine/paracrine role for interleukin-6 in bone resorption by giant cells from giant cell tumors of bone." Endocrinology **131**(5): 2229-2234.
- Otto, M. (2009). "Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen." Nat Rev Microbiol **7**(8): 555-567.
- Otto-Lambertz, C., A. Yagdiran, F. Wallscheid, P. Eysel and N. Jung (2017). "Periprosthetic Infection in Joint Replacement." Dtsch Arztebl Int **114**(20): 347-353.
- Poss, R., T. S. Thornhill, F. C. Ewald, W. H. Thomas, N. J. Batte and C. B. Sledge (1984). "Factors influencing the incidence and outcome of infection following total joint arthroplasty." Clin Orthop Relat Res(182): 117-126.
- Raafat, D., M. Otto, K. Reppschlager, J. Iqbal and S. Holtfreter (2019). "Fighting *Staphylococcus aureus* Biofilms with Monoclonal Antibodies." Trends Microbiol.
- Rasmussen, G., B. A. Idosa, A. Backman, S. Monecke, K. Stralin, E. Sarndahl and B. Soderquist (2019). "Caspase-1 inflammasome activity in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia." Microbiol Immunol.
- Rea, I. M., D. S. Gibson, V. McGilligan, S. E. McNerlan, H. D. Alexander and O. A. Ross (2018). "Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines." Front Immunol **9**: 586.

- Renz, N. T., A. (2015). "Periprothetische Infektionen: aktueller Stand der Diagnostik und Therapie." Orthopädie und Rheuma **06/2018**.
- Resch, A., R. Rosenstein, C. Nerz and F. Gotz (2005). "Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions." Appl Environ Microbiol **71**(5): 2663-2676.
- Sanchez, C. J., Jr., C. L. Ward, D. R. Romano, B. J. Hurtgen, S. K. Hardy, R. L. Woodbury, A. V. Trevino, C. R. Rathbone and J. C. Wenke (2013). "Staphylococcus aureus biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption in vitro." BMC Musculoskelet Disord **14**: 187.
- Santic, M., G. Pavokovic, S. Jones, R. Asare and Y. A. Kwaik (2010). "Regulation of apoptosis and anti-apoptosis signalling by *Francisella tularensis*." Microbes Infect **12**(2): 126-134.
- Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**(6805): 784-788.
- Schairer, W. W., D. C. Sing, T. P. Vail and K. J. Bozic (2014). "Causes and frequency of unplanned hospital readmission after total hip arthroplasty." Clin Orthop Relat Res **472**(2): 464-470.
- Schuler, M. and D. R. Green (2001). "Mechanisms of p53-dependent apoptosis." Biochemical Society Transactions **29**: 684-688.
- Sendi, P., M. Rohrbach, P. Graber, R. Frei, P. E. Ochsner and W. Zimmerli (2006). "Staphylococcus aureus small colony variants in prosthetic joint infection." Clin Infect Dis **43**(8): 961-967.
- Silbernagel, S. (2018). Taschenatlas Physiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Strowig, T., J. Henao-Mejia, E. Elinav and R. Flavell (2012). "Inflammasomes in health and disease." Nature **481**(7381): 278-286.
- Sutherland, I. W. (2001). "The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment." Trends Microbiol **9**(5): 222-227.
- Takeuchi, O., K. Hoshino and S. Akira (2000). "Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection." J Immunol **165**(10): 5392-5396.
- Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto (2014). "IL-6 in inflammation, immunity, and disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(10): a016295.
- Tande, A. J., E. O. Gomez-Urena, E. F. Berbari and D. R. Osmon (2017). "Management of Prosthetic Joint Infection." Infect Dis Clin North Am **31**(2): 237-252.
- Thammavongsa, V., D. M. Missiakas and O. Schneewind (2013). "Staphylococcus aureus Degrades Neutrophil Extracellular Traps to Promote Immune Cell Death." Science **342**(6160): 863-866.
- Tubel, J., E. Maier, M. Jegen, C. Marthen, A. Obermeier, A. T. Haug, J. Schneider and R. Burgkart (2021). "Patient-specific effects of soluble factors from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on osteogenic differentiation of primary human osteoblasts." Sci Rep **11**(1): 17282.
- Tucker, K. A., S. S. Reilly, C. S. Leslie and M. C. Hudson (2000). "Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse osteoblasts." FEMS Microbiol Lett **186**(2): 151-156.
- Valour, F., S. Trouillet-Assant, J. P. Rasigade, S. Lustig, E. Chanard, H. Meugnier, S. Tigaud, F. Vandenesch, J. Etienne, T. Ferry, F. Laurent and B. J. I. S. G. Lyon (2013). "Staphylococcus epidermidis in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation." PLoS One **8**(6): e67240.
- van Engeland, M., L. J. W. Nieland, F. C. S. Ramaekers, B. Schutte and C. P. M. Reutelingsperger (1998). "Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure." Cytometry **31**(1): 1-9.

- Walker, C. G., S. Meier, M. D. Mitchell, J. R. Roche and M. Littlejohn (2009). "Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium." *BMC Mol Biol* **10**: 100.
- Wall, D. M. and B. A. McCormick (2014). "Bacterial secreted effectors and caspase-3 interactions." *Cell Microbiol* **16**(12): 1746-1756.
- Walter, G., M. Kemmerer, C. Kappler and R. Hoffmann (2012). "Treatment algorithms for chronic osteomyelitis." *Dtsch Arztebl Int* **109**(14): 257-264.
- Watts, A. C., A. D. Duckworth, I. A. Trail, J. Rees, M. Thomas and A. Rangan (2019). "Scoping review: Diagnosis and management of periprosthetic joint infection in elbow arthroplasty." *Shoulder Elbow* **11**(4): 282-291.
- Wengler, A., U. Nimptsch and T. Mansky (2014). "Hip and knee replacement in Germany and the USA: analysis of individual inpatient data from German and US hospitals for the years 2005 to 2011." *Dtsch Arztebl Int* **111**(23-24): 407-416.
- Wertheim, H. F., M. C. Vos, A. Ott, A. van Belkum, A. Voss, J. A. Kluytmans, P. H. van Keulen, C. M. Vandenbroucke-Grauls, M. H. Meester and H. A. Verbrugh (2004). "Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers." *Lancet* **364**(9435): 703-705.
- Wetters, N. G., T. G. Murray, M. Moric, S. M. Sporer, W. G. Paprosky and C. J. Della Valle (2013). "Risk factors for dislocation after revision total hip arthroplasty." *Clin Orthop Relat Res* **471**(2): 410-416.
- Widaa, A., T. Claro, T. J. Foster, F. J. O'Brien and S. W. Kerrigan (2012). "Staphylococcus aureus protein A plays a critical role in mediating bone destruction and bone loss in osteomyelitis." *PLoS One* **7**(7): e40586.
- Winkler, S., C. M. Hedrich and A. Rosen-Wolff (2016). "[Caspase-1 regulates autoinflammation in rheumatic diseases]." *Z Rheumatol* **75**(3): 265-275.
- Winkler, S. and A. Rosen-Wolff (2015). "Caspase-1: an integral regulator of innate immunity." *Semin Immunopathol* **37**(4): 419-427.
- Winkler, T. T., A., Hardt, S.; Janz, H., Kleber, C.; Perka, C. (2014). "Periprotetische Infektion nach Hüftendoprothetik." *Der Orthopäde*(01/2014).
- Wirth, C. J., D. Kohn, F. Abdolvahab, W. E. Mutschler and T. Pohlemann (2013). *Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie*, Thieme.
- Wirth, C. J. M., W.; Kohn, D.; Pohlemann, T. (2014). *Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG.
- Yoshizaki, K., S. Murayama, H. Ito and T. Koga (2018). "The Role of Interleukin-6 in Castleman Disease." *Hematol Oncol Clin North Am* **32**(1): 23-36.
- Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 47-59.
- Zhu, W., L. A. Hammad, F. Hsu, Y. Mao and Z. Q. Luo (2013). "Induction of caspase 3 activation by multiple *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates." *Cell Microbiol* **15**(11): 1783-1795.
- Zimmerli, W. (2010). "Clinical practice. Vertebral osteomyelitis." *N Engl J Med* **362**(11): 1022-1029.
- Zimmerli, W. and P. Sendi (2017). "Orthopaedic biofilm infections." *Apmis* **125**(4): 353-364.
- Zmistowski, B., C. Della Valle, T. W. Bauer, K. N. Malizos, A. Alavi, H. Bedair, R. E. Booth, P. Choong, C. Deirmengian, G. D. Ehrlich, A. Gambir, R. Huang, Y. Kissin, H. Kobayashi, N. Kobayashi, V. Krenn, L. Drago, S. B. Marston, G. Meermans, J. Perez, J. Ploegmakers, A. Rosenberg, C. Simpendorfer, P. Thomas, S. Tohtz, J. A. Villafuerte, P. Wahl, F. C. Wagenaar and E. Witzo (2014). "Diagnosis of periprosthetic joint infection." *J Arthroplasty* **29**(2 Suppl): 77-83.

Zmistowski, B., J. A. Karam, J. B. Durinka, D. S. Casper and J. Parvizi (2013).
"Periprosthetic joint infection increases the risk of one-year mortality." J Bone Joint Surg Am **95**(24): 2177-2184.