

Aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker

**Molekularbiologische und immunologische Untersuchungen
zu klinisch relevanten immunodominanten Antigenen von
Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Bakterien
(MRSA) für eine Antikörpertherapie**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Tanja Geis

aus Bessenbach

Würzburg, Juli 2005

Referent: Professor Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker

Koreferent: Professor Dr. med. Dr. h. c. A. Thiede

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Mai 2006

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
2.	Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in der Therapie von Staphylokokkeninfektionen	8
3.	Neue Therapien	13
II.	Material und Methoden	15
1.	Material	15
1.1	Bakterienstämme	15
1.2	Seren	19
1.3	Sekundärantikörper	20
1.4	Chemikalien- und Verbrauchsmaterial	20
1.5	Medien und Agarplatten	22
1.6	Antibiotikazusätze	23
1.7	DNA-Größenmarker	24
1.8	Geräte	25
1.9.	Verwendete Plasmide	26

2. Methoden	26
2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. aureus</i>	26
2.2 Phenol-Chloroform-/Isoamylalkohol-Extraktion	27
2.3 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	28
2.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel (GeneClean-III-Kitt von Bio101)	28
2.5 „Sticky-End“-Ligation	29
2.6 Horizontale Gelelektrophorese	30
2.7 Transformation in kompetente <i>E. coli</i>	31
2.8 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> DH5alpha-Zellen (CaCl ₂ -Methode)	32
2.9 Herstellung elektrokompeter <i>S. aureus</i> -Zellen	32
2.10 Elektroporation in <i>S. aureus</i>	33
2.11 Phagengewinnung mit aufgenommenem Plasmid	33
2.12 Phagentransduktion in <i>S. aureus</i>	34
2.13 Southern Blot	35
2.14 Kapillarblot	37
2.15 Markierung der DNA-Sonde und Hybridisierung	38
2.16 Entfernen einer Sonde	39
2.17 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
2.18 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	41
2.19 Probengewinnung für Westernblot	43
2.20 Western-Blot	44
2.21 Antikörperreaktion	45
2.22 Wachstumskurven	46
2.23 Glucose-/NaCl-Wachstumskurven	47
2.24 Api-Staph-Testung zur Charakterisierung von Staphylokokkenstämmen	48
2.25 Magermilch-/Blutplatten zur Testung des Lyseverhaltens	49
2.26 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration	50
2.27 Lymphknotenverarbeitung	51

2.28	Isolierung monoklonaler Blutzellen/Ficoll-Gradient	51
2.29	Zellfusion zur Herstellung monoklonaler Antikörper	54
2.30	ELISA (Enzyme-linked immunosorbend assay oder enzymgekoppelter Test der immunologischen Wechselwirkungen)	56
II.	Ergebnisse	59
1.	Entwicklung und Optimierung eines ELISA-Verfahrens für den Nachweis von IsaA und anti-IsaA-spezifischen Antikörpern	59
1.1	Auswahl geeigneter Antigenbeschichtungs- Konzentrationen	59
1.2	Optimale Konzentration des Primärantikörpers	63
1.3	Optimiertes Protokoll zur Bestimmung einer Anti-IsaA-Aktivität in verschiedenen menschlichen Seren und in Tierseren	69
2.	Fusion	70
3.	Ermittlung der Spezifität von IsaA anhand der Auftrennung von Proteinfractionen verschiedener Bakterienstämme und Detektion mittels Immunoblottings	72
4.	Herstellung einer IsaB-Mutante	80
4.1	Konstruktion des temperatursensitiven Integrationsvektors mit Antibiotikamarker und IsaB-flankierenden Bereichen	80
4.2	Integration des Vektors in das Chromosom von <i>S. aureus</i> 8325	85

4.3	Southern Blot-Analyse der IsaB-Mutante	87
5.	Charakterisierung der Mutante	92
5.1	Wachstumskurve von Wildtyp 8325 und <i>ΔisaB</i> - Mutante 8325 in LB- und TSB-Medium bei 30 °C, 37 °C und 42 °C	91
5.2	Wachstumsvergleich von Wildtyp und Mutante bei Glucose- und NaCl-Zusatz	97
5.3	Api-Staph	99
5.4	Blutplatten – Hämolyseverhalten von Mutante und Wildtyp	101
5.5	Magermilchplatten – Proteolyseverhalten von Wildtyp und Mutante	102
5.6	Biofilmbildung	103
5.7	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Wildtyp 8325 und <i>ΔisaB</i> -Mutante 8325	104
III.	Diskussion	107
1.	Einsatz von monoklonalen Antikörpern im Rahmen der Immuntherapie	109
2.	ELISA	118
3.	IsaA	123
4.	Phänotypische Untersuchungen putativer Targetproteine durch Mutationsexperimente	126

IV. Zusammenfassung	132
V. Literatur	135
VI. Anhang	144

I. Einleitung

1. *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken gehören phylogenetisch zu dem Reich der Eubakterien. Dieses Reich wird wiederum in 11 Divisionen unterteilt, wobei die Staphylokokken der pathogenen Abteilung der *Firmicutes* (grampositive Bakterien) zuzuordnen sind. Staphylokokken-Bakterien gehören zu der Familie der *Micrococcaceae*. Sie sind in der Regel unbewegliche, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende, meist in Haufen angeordnete Kokken. Aufgrund ihrer starren, dicken Zellwand, bestehend aus Murein, Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren werden sie durch ihr Färbeverhalten im Färbeverfahren nach Gram der Gruppe der grampositiven Bakterien (blaue Färbung) zugeteilt. Die dicke Zellwand verhindert die Elution des Farbstoff-Jod-Komplexes durch Alkohol.

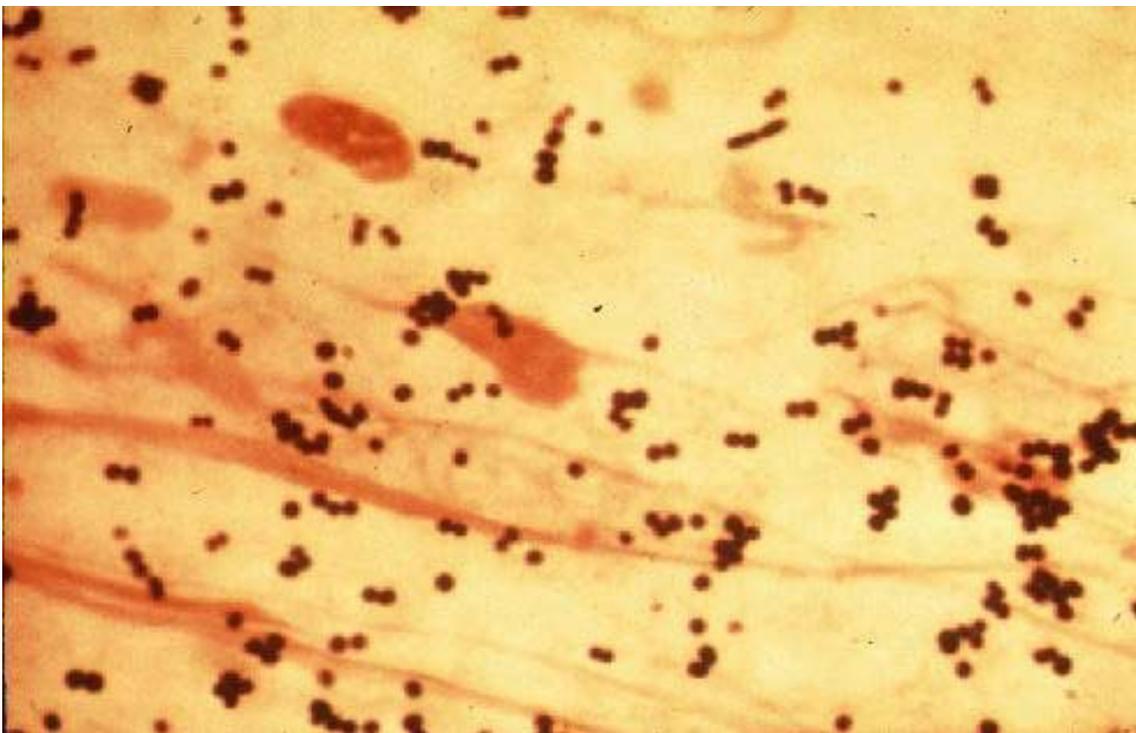


Abb. 1.1: Gram-Präparat von Staphylokokken

Durch den schottischen Chirurgen Ogsten erhielten die Staphylokokken im Jahre 1881 wegen ihrer traubenförmigen Anordnung in Eiterisolaten ihren Namen (griechisches Wort: „staphyle“ – Traube) (Ogsten, 1881). Im Jahre 1884 wurden die Staphylokokken aufgrund ihres Pigmentierungsverhaltens auf Agarmedien (Karotinoide als Schutz gegen Licht und UV-Strahlen) durch den Göttinger Chirurgen Rosenbach in gelb- (*S. aureus*) und weißpigmentierte (*S. albus*) Arten näher klassifiziert. Die für den klinischen Alltag wichtige Unterscheidung zwischen pathogenen und harmlosen Staphylokokken gelang mit der Entdeckung der Fähigkeit einiger Bakterien Plasma zu verklumpen (Loeb, 1903; Much, 1908; Darányi, 1956). Dies führte zur Einteilung der Staphylokokken in koagulasepositive, zu denen vor allem *S. aureus* gehört, und in koagulasenegative Bakterien mit dem Hauptvertreter *S. epidermidis*. Dass dies nicht der einzige Pathogenitätsfaktor der Staphylokokken ist, zeigte sich im Laufe der Zeit, da der lange als apathogen geltende koagulasenegative *S. epidermidis* heute in vielen Krankenhäusern ein häufiger opportunistischer Erreger von Katheter- und Implantatinfektionen ist (Kloos and Bannemann, 1994). Das Genom der Staphylokokken besteht aus einem ringförmigen Chromosom von ca. 2800 kbp und enthält verschiedene Prophagen, Transposons und integrierte Plasmide. Zusätzlich besitzen Staphylokokken meist noch ein oder mehrere freie Plasmide. Die Genomsequenzierungen der vergangenen Jahre zeigten deutlich, dass das Genom in ein sogenanntes „Core-Genome“, das hauptsächlich Stoffwechsel-relevante Gene enthält und in einen variablen Teil, der mobile genetische Elemente beinhaltet, unterschieden werden kann. Der mobile Genomteil ist für die außerordentlich hohe genetische Flexibilität der Staphylokokken verantwortlich, die bis zu 22 % des Genoms betragen kann (Fitzgerald et al., 2001, Lindsay and Holden, 2004). Auf dem variablen Genomteil sind oftmals Virulenzgene und Resistenzdeterminanten kodiert, die maßgeblich die Pathogenität eines Stammes bestimmen.

Staphylokokken gehören meist der natürlichen Flora von Haut und Schleimhäuten von Menschen, Säugetieren und Vögeln an (Kloos and Lambe, 1991). Sie besiedeln bevorzugt den Oropharynx, das Vestibulum nasii, die Ausführungsgänge der Brustdrüsen, die Axillen und die Perinealregion. Die klinisch relevanten Erscheinungsformen von *S. aureus*-Infektionen reichen von banalen Hautinfektionen bis

hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen und lassen sich demnach in drei Gruppen unterteilen (Ohlsen, 1997):

1. Lokal-oberflächliche Infektionen (Furunkel, Karbunkel, oberflächliche Wundinfektionen);
2. Invasive Infektionen (Endokarditis, Osteomyelitis, Mastitis, Organabszesse, Pneumonien, Sepsis) und fremdkörperassoziierte Infektionen (Besiedlung von Kathetern, Dialyseschläuchen, Herzschrittmachern, künstlichen Herzklappen, Gelenkprothesen);
3. Toxinvermittelte Erkrankungen (SSSS - Staphylococcus-Scalded-Skin-Syndrome, Pemphigus neonatorum, Dermatitis exfoliativa - M. Ritter von Rittershain , Impetigo bullosa, TSS – Toxic-Shock-Syndrome, Enterotoxikosen).

Die klinischen Erscheinungsbilder spiegeln die einzelnen Schritte der Pathogenese wider, beginnend bei der harmlosen Kolonisation des Erregers von Haut, Schleimhäuten und leblosem Fremdmaterial. Die anschließende Infektion erfolgt entweder endogen (autogen), d. h. durch „Selbstinfektion“ mit Mikroorganismen der körpereigenen Flora oder exogen. Durch diagnostische und therapeutische Interventionen werden die natürlichen Barrieren zerstört und die körpereigene, transiente oder permanente Haut- und Schleimhautflora dringt in den Körper ein und führt zu einer lokalen Infektion. Seltener ist der exogene Übertragungsweg durch andere Patienten, Personal oder medizinische Gegenstände, welche von *Staphylococcus aureus* besiedelt sind (Lowy, 1998). Findet die Lokalinfection Anschluss an das Gefäßsystem folgt die systemische Streuung im Sinne einer Bakteriämie. Sind die Patienten durch Diabetes, Dialyse, Multimorbidität im Alter, vorbestehende Infektionen, abgeschwächtem Immunsystem oder Drogenmissbrauch prädisponiert, kann schließlich eine Sepsis mit evtl. letalem Ausgang aus der primär harmlosen Besiedlung resultieren (RKI, Nosokomiale Infektionen, Heft 8, 2002). Darüber hinaus ist eine metastatische Absiedlung in verschiedene Organsysteme jederzeit möglich.

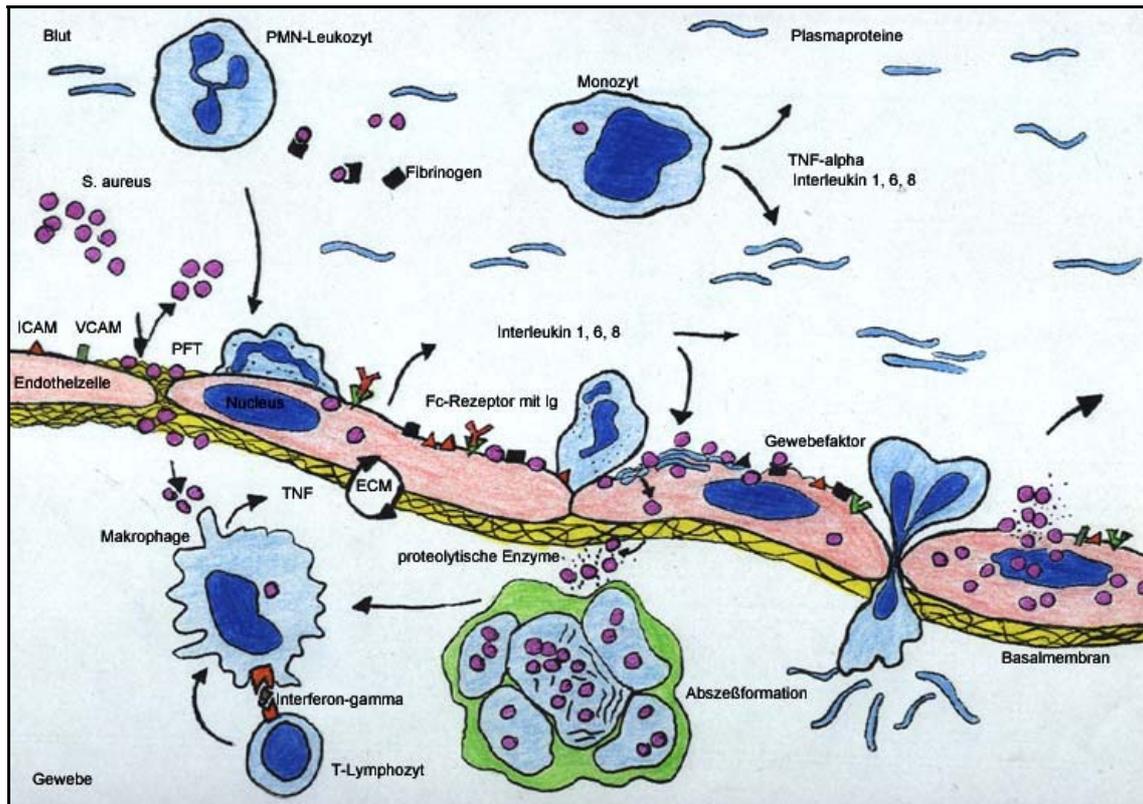


Abb. 1.2: Verschiedene Stadien der Pathogenese von *S. aureus* (modifiziert nach Lowy, 1998):

Die Reihenfolge der Pathogenese wird im Bild von links nach rechts beschrieben. Zirkulierende Staphylokokken binden an Gefäßwandverletzungen, wo sich bereits PFT (Platelet-fibrin-thrombie) gebildet hat. Die Anheftung der Staphylokokken erfolgt entweder über sogenannte MSCRAMM-Proteine oder direkt über Adhäsionsrezeptoren an der Zellwand. Anschließend erfolgt die Phagozytose der Bakterien durch die Endothelzellen. Die Bakterien geben proteolytische Enzyme ab, wodurch die Bakterien wieder in die Blutbahn gelangen. Die Bakterien lösen eine inflammatorische Reaktion aus und es kommt zur Abszeßbildung. Die Endothelzellen exprimieren Fc-Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle, sogenannte ICAM und VCAM (intercellular adhesion molecules und vascular-cell adhesion molecules). Es kommt zu einer Ausschüttung von Interleukin-1, -6 und -8. Dadurch werden Leukozyten angelockt, welche sich am Ort der Infektion niederlassen. Aufgrund einer Änderung in der Anordnung der Endothelzellen kommt es zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität mit Transudation von Plasmaproteinen. Makrophagen und zirkulierende Monozyten schütten ebenfalls Interleukin-1, -6, und -8, sowie Tumornekrosefaktor α (TNF α) aus. Die Makrophagenaktivierung führt zu einer Interferon- γ -Ausschüttung aus T-Lymphozyten. Diese Zytokine und Mediatorsubstanzen aggravierern die inflammatorische Reaktion. Es resultiert dadurch Sepsis und Vaskulitis (Lowy, 1998).

Eine besondere Form der Pathogenese zeichnen die Toxinosen aus. Durch Expression von pyrogenen Superantigenen kommt es zu einer Aktivierung von T-Zellen und zu

dem rapid verlaufenden Krankheitsbild mit Fieber, Schock, „capillary-leak“-Syndrom und ohne rasche Intervention zum Multiorganversagen. Neben dem TSST-1 (toxic shock syndrome toxin 1) sind daran verschiedene Enterotoxine beteiligt. Bislang sind 17 verschiedene superantigene Enterotoxine beschrieben (A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, Q (Le Loir et al., 2003). Interessanterweise sind alle superantigenen Toxine von *S. aureus* auf mobilen genetischen Elementen kodiert.

Das breite Krankheitsspektrum ist Ausdruck der Expression einer Vielzahl unterschiedlichster Pathogenitätsfaktoren der *S. aureus*-Stämme. Zu ihnen gehören:

Protein A. Ein Oberflächenprotein von *S. aureus* mit einem Molekulargewicht von 42 kD. Es besitzt antiphagozytäre Eigenschaften und kann durch die Fähigkeit Immunglobuline über das F_c-Stück zu binden, den Opsonisierungseffekt der Antikörper aufheben. Dies kann auch in der serologischen Diagnostik von Bedeutung sein, da durch die Beschichtung mit spezifischen Antikörpern über die F_c-Fragmente an *S. aureus*-Stämmen ein Antigennachweis möglich ist (Gemmel et al., 1990).

Clumpingfaktor. Ein Fibrinogenrezeptor an der Zelloberfläche von *S. aureus* führt über Aktivierung von Fibrinmonomeren zu einer Verklumpung von Plasma (Plasmaagglutination nach Birch-Hirschfeld auf dem Objektträger) und ist, neben **Fibronectin-** und **Kollagen-Bindeprotein**, verantwortlich für die Adhäsionsfähigkeit am Wirtsgewebe oder an Fremdkörpern (Foster und McDevitt, 1994; Liang et al., 1995).

Kapsel. Die Kapsel besteht aus Polysacchariden und ist ein weiterer antiphagozytärer Faktor der *S. aureus*-Bakterien. Sie schützt das Bakterium vor Angriffen des Monozyten-Makrophagensystem des Wirtes. Gegenwärtig sind 11 verschiedene Typen von Schleimkapseln bekannt, wobei Typ 5 und 8 in 75 % der humanen Infektionen anzutreffen sind (O`Riordan and Lee, 2004).

Weiterhin tragen extrazelluläre Produkte zur Virulenz bei. Sie spielen eine Rolle in der Festsetzung im Gewebe, beim Überleben, bei der Vermehrung und Ausbreitung im

Wirtsgewebe. Sie schützen das Bakterium gegen die Abwehrmechanismen des Wirtes. Zu diesen extrazellulären Substanzen zählt die schon erwähnte **Plasmakoagulase**, welche ähnlich der physiologischen Blutgerinnung, sich mit dem Staphthrombin verbindet und die Aktivierung des Fibrinogens zu Fibrin auslöst. Dadurch entsteht ein Fibrinschutzwall um die Staphylokokken, was sich klinisch in der Ausbildung von Abszesshöhlen äußert. Durch ein bakterieneigenes Fibrinolytin, **Staphylolysin**, kann dieser Schutzwall wieder aufgelöst werden und sich das Bakterium weiter im Organismus ausbreiten, ansonsten sind die Bakterien durch diesen Fibrinschutzwall vor dem Abwehrsystem des Körpers und auch Antibiotika geschützt.

Weitere extrazelluläre Virulenzfaktoren sind **Leukozydine**, welche für die selektive Granulozyten- und Makrophagenschädigung verantwortlich sind.

Hämolytine führen zur Zerstörung von Erythrozyten, Thrombozyten und anderen Zellen (Dermatonekrosen). Es sind vier verschiedene Hämolytine bekannt: α -, β -, γ - und δ -Hämolytin.

Hyaluronidasen und **Hydrolasen** spalten enzymatisch interzelluläre Kitsubstanzen des Wirts und erleichtern die Invasion ins Wirtsgewebe (Kornblum et al., 1990).

Für das SSSS sind spezielle **Exfoliativtoxine** (A und B) nötig. Es handelt sich hierbei um epidermolytische Toxine, welche zu einer intraepidermalen Spaltbildung zwischen Stratum spinosum und Stratum granulosum führen.

Enterotoxikosen werden durch verschiedene **Enterotoxine** (A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, Q) hervorgerufen. Sie verursachen Nahrungsmittelvergiftungen, welche klinisch als rasch auftretende (Inkubationszeit: 1 - 6 Stunden), jedoch meist selbstlimitierende (24 - 48 Stunden), Gastroenteritiden imponieren.

Das TSS wird durch das **Toxic-Shock-Syndrom-Toxin 1 (TSST 1)** ausgelöst. Die Hauptwirkung liegt vermutlich in der Funktion als „Superantigen“ T-Lymphozyten zu stimulieren, in der Folge werden als proinflammatorische Mediatoren Interleukin-1 und

Tumornekrosefaktor- α aus Makrophagen freigesetzt, die für die klinischen Symptome eines toxischen Schocks verantwortlich gemacht werden (Baker and Acharya, 2004).

Es werden noch weitere Toxine und Enzyme, wie Lipasen, Proteasen und Nukleasen, von Staphylokokken gebildet. **Bacteriocine** sind inhibitorische Substanzen, welche den Staphylokokken ermöglichen in ihrer Umgebung eine grampositive Mischflora zu hemmen und somit einen Wachstumsvorteil zu verschaffen.

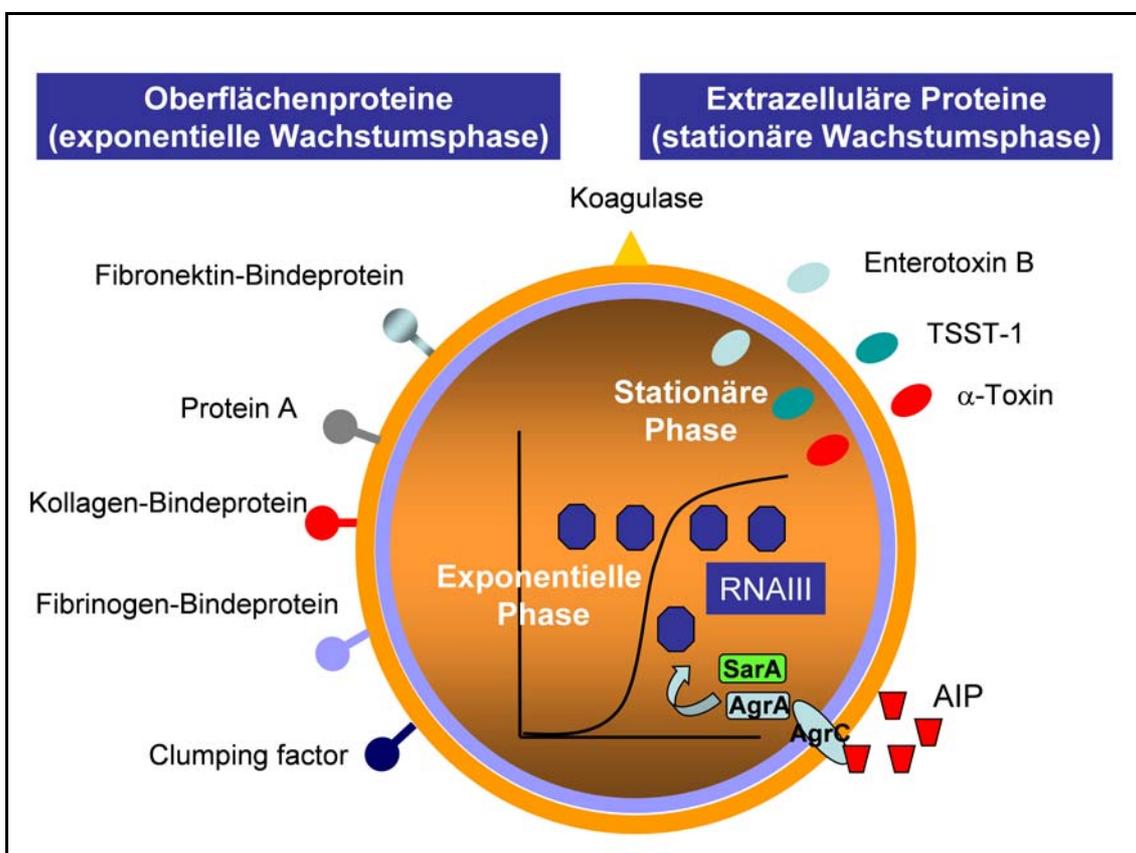


Abb. 1.3: Schematische Darstellung ausgewählter Virulenzfaktoren von *S. aureus*. Die Produktion dieser Faktoren erfolgt Wachstumsphasen-abhängig und wird durch globale Regulatoren (*agr*, *sar*) reguliert. In Abhängigkeit von der Zelldichte wird ein Quorum-sensing-Signalmolekül ausgeschieden (AIP-„autoinducing peptide“). Oberflächenproteine werden vorwiegend in der exponentiellen Wachstumsphase und extrazelluläre Proteine meist in der stationären Phase gebildet.

Die meisten Pathogenitätsfaktoren sind Bestandteil von komplexen Regulons und werden als Antwort auf intra- und extrazelläre Signale gebildet (Novick, 2003, Cheung, 2004, Balaban et al. 2001; Lindsay et al., 1999). Zusätzlich sind verschiedene Regulationssysteme für die Expression von Bedeutung, wie der „accessory gene regulator“ (*agr*), der „staphylococcal accessory regulator“ (*sar*), *sae*, *arl* und verschiedene *sar*-homologe Regulatoren (Cheung, 2004, Novick, 2003, Fournier et al., 2001; McNamara et al., 2000).

2. Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in der Therapie von Staphylokokkeninfektionen

In der Therapie von *S. aureus*-Infektionen kommen neben Antibiotika vor allem chirurgische Maßnahmen wie Eröffnung, Drainage und Ausräumung von Abszessen sowie Entfernung von Sequester und Fremdkörpern in Betracht. Antibiotika der Wahl sind bei nicht Penicillinase-bildenden Bakterien Benzylpenicilline, bei β -Lactamase-bildenden Bakterien Isoxazolympenicilline, bei schweren Infektionen auch kombiniert mit Aminoglykosiden. Aufgrund immer häufigerer Resistenzen gegenüber Antibiotika ist es sinnvoll, mit einer kalkulierten Chemotherapie auf Grundlage eines Antibiogramms gezielter gegen die einzelnen Bakterienstämme vorzugehen. Ein großes Problem ist jedoch die Zunahme von multiresistenten Keimen, vor allem von Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämmen (MRSA). Die ersten MRSA-Stämme traten 1961 in England auf (Jevsons et al., 1961) und nehmen seither zu. Nach Witte ist die Prävalenz von 1,7 % im Jahre 1991 auf 20,7 % im Jahre 2002 gestiegen.

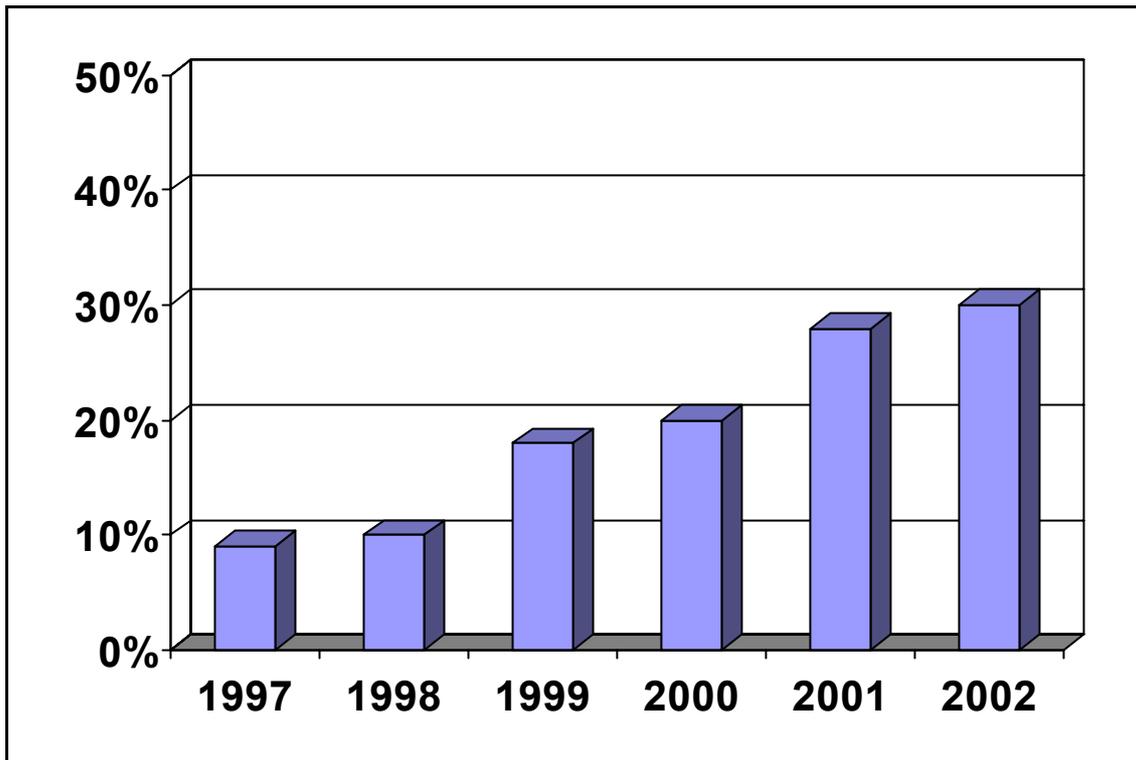


Abb.1.4: Anteil der MRSA bezogen auf alle *S. aureus*-Isolate bei nosokomialen Infektionen in Intensivstationen von Januar 1997 bis Juni 2002 (Epidemiologisches Bulletin des RKI, Ausgabe 9/2003).

Diese Bakterienstämme sind meist nur noch gegen Glykopeptidantibiotika, wie Vancomycin oder Teicoplanin, häufig in Kombination mit Rifampicin, Clindamycin oder Gentamicin angewandt, und gegen Linezolid aus der Substanzgruppe der Oxazolidinone sensibel. Diese steigende Zahl multiresistenter Stämme führt man auf den enormen Selektionsdruck der Bakterien in den Kliniken zurück. Nach Antibiotikagabe überleben nur gegen das Medikament resistent gewordene Bakterienstämme, welche sich weitervermehren und über horizontalen Gentransfer Resistenzdeterminanten weitergeben. Diese Resistenzfaktoren liegen oft auf mobilen genetischen Elementen wie Transposons und R-Plasmiden und können nicht nur zwischen Bakterien einer Art, sondern auch verschiedener Arten übertragen werden (Lindsay and Holden, 2004). Somit kommt es unter Selektionsdruck oft zu einer schnellen Ausbreitung der Antibiotikaresistenzen. Weiterhin können sich auch durch spontane Neumutationen Resistenzen entwickeln (z. B.: Rifampicinresistenz - daher Rifampicin niemals als Monotherapie verwenden ebenso nicht Fluorochinolone). Problematisch ist auch die Selektion antibiotikaresistenter Keime in der Tierzucht durch

die nutritive Gabe von Antibiotika oder prophylaktischen Antibiotikagebrauch. Solche Keime können über die Nahrungskette oder den direkten Kontakt mit landwirtschaftlichem Personal in Krankenhäuser gelangen (Witte, 1998). Auch der zunehmende Tourismus ist eine Quelle für die Ausbreitung antibiotikaresistenter Bakterien (Schmunis and Corber, 1999).

Weitere Ursachen für die zunehmende Verbreitung von MRSA sind laut dem Robert-Koch-Institut:

- fehlerhafte und inkonsequente Umsetzung von Hygienemaßnahmen,
- deutliche Zunahme von für MRSA-Infektionen prädisponierte Risikopatienten (Frühgeborene, Intensivpatienten, Diabetiker, polytraumatisierte, geriatrische Patienten und immunsupprimierte Patienten),
- Zunahme intensivmedizinischer medikotechnischer Maßnahmen und von Implantationen synthetischer Materialien,
- mangelnde Information der Folgeeinrichtungen nach Krankenhausaufenthalten im Umgang mit MRSA-infizierten Patienten, insbesondere Pflege- und Altenheime.

Tabelle 1.1: Nachweis einzelner Epidemiestämme bei invasiven Infektionen, Wundinfektionen und nasaler Besiedlung in Krankenhäusern für Deutschland im Jahre 2002

(Resistenzen: CIP=Ciprofloxacin, CLI=Clindamycin, ERY=Erythromycin, GEN=Gentamicin, OXA=Oxacillin, OTE=Oxytetracyclin, PEN=Penicillin, SXT=Trimethoprim/Sulfamethoxazol)

(Epidemiologisches Bulletin des RKI, Ausgabe 32/2003)

Art der Infektion, Besiedlung	„Barnim“- MRSA PEN, OXA, ERY, CLI, CIP	„Berliner“- MRSA PEN, OXA, CIP, GEN, ERY, CLI, SXT	„Süddeutscher“- MRSA PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, OTE	„Rhein-Hessen“- MRSA PEN, OXA, ERY, CLI, CMP, CIP	Andere nicht Epidemiestämme- MRSA
Sepsis	23,5 % (n=45)	18,2 % (n=35)	31,8 % (n=61)	15,6 % (n=30)	10,9 % (n=21)
Pneumonie	23,0 % (n=89)	17,6 % (n=68)	31,9 % (n=31,9)	11,7 % (n=45)	15,8 % (n=61)
Wundinfektion	22,3 % (n=206)	28,0 % (n=258)	21,9 % (n=202)	10,2 % (n=94)	17,6 % (n=162)
Nasale Besiedlung	24,0 % (n=118)	22,5 % (n=111)	24,7 % (n=122)	13,2 % (n=65)	15,6 % (n=77)
	23,0 % (n=458)	23,7 % (n=472)	25,5 % (n=508)	11,7 % (n=234)	16,1 % (n=321)

Tabelle 1.2: Resistenzen von MRSA gegen Antibiotika, Deutschland 2001 und 2002 (Epidemiologisches Bulletin des RKI, Ausgabe 35/2003)

	2001	2002
Insgesamt	100 % (n=3828)	100 % (n=3687)
Ciprofloxacin	97,23 %	97,18 %
Moxifloxacin	96,47 %	96,75 %
Erythromycin	69,67 %	72,28 %
Clindamycin	63,58 %	67,72 %
Chloramphenicol	50,99 %	55,95 %
Gentamicin	31,40 %	23,95 %
Sulfonamid/Trimethoprim	6,30 %	3,61 %
Oxytetracyclin	6,19 %	4,58 %
Fosfomycin	2,95 %	1,71 %
Fusidinsäure	2,48 %	2,44 %
Mupirocin	2,32 %	1,65 %
Rifampicin	2,30 %	1,87 %
Quinupristin/ Dalfopristin	0,03 %	0,05 %
Teicoplanin	0,00 %	0,03 %
Vancomycin	0,00 %	0,00 %
Linezolid	0,00 %	0,00 %

In der antiinfektiven Therapie ist man permanent auf der Suche nach neuen Chemotherapeutika. Eine neue Klasse von Antiinfektiva stellen die Oxazolidinone dar. Sie binden, ähnlich wie Chloramphenicol, an die 50S-Untereinheit bakterieller Ribosomen und verhindern so die Bildung eines funktionstüchtigen Initiationskomplexes in der Proteinsynthese. Das erste in der Humanmedizin verwendbare Oxazolidinon ist Linezolid. Es wirkt, wie die meisten neuen Antibiotika, vor allem im grampositiven Bereich und zeichnet sich dabei durch seine orale Verfügbarkeit, relativ gute Verträglichkeit und Wirkung bei resistenten Erregern aus. Bei langer Anwendung kann es zu Blutbildveränderungen und aufgrund der MAO-inhibitorischen Wirkung zu Interaktionen mit Sympathomimetika und anderen Arzneimitteln kommen. Neuere Antibiotika aus dieser Klasse, wie Ranebezolid, AZD2563 und PNU-288034, befinden sich noch in der Erprobung und zeichnen sich durch bessere pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften aus.

Im Jahre 2000 entwickelte man aus dem bekannten Stoffwechselprodukt Pristinamycin von *Streptomyces pristinae spiralis* die halbsynthetischen Derivate Quinupristin und Dalfopristin. In einer 30 : 70-Mischung dieser beiden synergistischen Antibiotika, welche man auch als Streptogramine bezeichnet, steht unter dem Handelsnamen *Synercid* ein neues Antibiotikum zur parenteralen Therapie vor allem für den grampositiven Bereich zur Verfügung. Quinupristin und Dalfopristin binden an bakterielle Ribosomen und hemmen somit die Proteinsynthese der Bakterien. Durch Hemmung der Peptidbindung kommt es zu unvollständigen Peptidketten. Aufgrund der synergistischen Wirkung der beiden Stoffe kommt es zu einer 10-fach höheren Wirkung als bei Verabreichung der Einzelkomponenten. Es wirkt vor allem im grampositiven Bereich, auch bei MRSA-Stämmen, sowie bei *Enterococcus faecium*, *S. pneumoniae* und GISA-Stämmen. Im gramnegativen Bereich werden auch einige Erreger, wie *M. catarrhalis*, *H. influenzae*, Neisserien, Mykoplasmen, Chlamydien und Legionellen erfasst, nicht jedoch Enterobakterien und Pseudomonaden. Problem des Einsatzes sind jedoch die multiplen Nebenwirkungen vor allem durch die rein parenterale Anwendung, wie periphere Venenreizung, Myalgien, Arthropathien und Hyperbilirubinämie.

Im Bereich der Glykopeptidantibiotika sind in den letzten Jahren immer wieder neue Chemotherapeutika hergestellt worden. Zu ihnen gehören Daptomycin, Oritavancin, Dalbavanacin und TD6424. Ihre Wirkung liegt, wie die von Vancomycin und Teicoplanin, in der Hemmung der Proteinsynthese, jedoch durch verbesserte chemische Strukturen wirken sie rascher und effektiver als diese und sind daher auch für den Einsatz Vancomycin-resistenter und anderer multiresistenter grampositiver Erreger geeignet.

Auch in anderen Antibiotikaklassen werden immer wieder neue Stoffe entwickelt, welche sich durch bessere Eigenschaften als ihre „Vorgänger“ im Hinblick auf Wirkung und Nebenwirkungen auszeichnen (Heinzl, 2003).

3. Neue Therapien

Neben der Entwicklung neuer Antibiotika versucht man auch andere Ansätze in der Therapie von bakteriellen Infektionen zu entwerfen, wie zum Beispiel die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen neu entdeckte immunodominante Antigene (Lorenz et al., 2000) auf *S. aureus*, welche in der vorliegenden Arbeit näher erläutert werden.

Die Gabe von Antikörpern im Sinne einer passiven Immunisierung oder die aktive Immunisierung stellt einen vielversprechenden Ansatz in der Prävention und Therapie von Infektionen dar. Im Falle von Staphylokokkeninfektionen sollen Antikörper gegen Staphylokokkenantigenen den „Angriff“ des Erregers blockieren. Die Adhäsion an der Zelloberfläche soll behindert, die Opsonisierung und Phagozytose verhindert sowie Toxine neutralisiert werden. Tierexperimentelle Beispiele, wie die aktive Immunisierung von Rindern mit rekombinantem Fibronectin bindendem Protein, welche Schutz vor Mastitis bietet (Mamo et al., 1994) oder die Gabe von spezifischen Antikörpern gegen Kollagen-Adhäsinen bei Mäusen, die eine letal verlaufende Sepsis verhindern (Nilsson et al., 1998), zeigen den Erfolg von Immuntherapien.

Beispiel eines erfolgreichen Einsatzes eines in Deutschland zugelassenen monoklonalen Antikörpers ist der in der postoperativen adjuvanten Chemotherapie von Kolonkarzinomen im Stadium UICC III (DUKE C) eingesetzte Antikörper Edrecolomab (*Panorex*^R, Glaxo Wellcome) gegen das 17-1A-Zelloberflächenprotein. Der Antikörper markiert die Krebszelle, wodurch sie vom körpereigenen Immunsystem erkannt und phagozytiert werden kann. Hier gibt es jedoch Probleme durch die antigenen Eigenschaften des murinen Antikörpers.

Die Entdeckung von immunodominanten Targetstrukturen, welche während einer Sepsis mit MRSA exprimiert werden, ist Grundlage dieses neuen Therapieansatzes zur Bekämpfung von MRSA-Infektionen. Es handelt sich dabei um vier Staphylokokken-spezifische Antigene unterschiedlicher Strukturen. IsaA (immunodominant staphylococcal antigen) ist ein Protein mit einer Größe von 29 kDa, IsaB ein Protein mit

der Größe von 17 kDa, CspA ein Protein mit der Größe von 10 kDa, welches eine 100 %-ige Ähnlichkeit mit dem Hauptkälteschockprotein von *S. aureus* besitzt und ein 10 kDa großer Phosphatcarrier Hpr (Lorenz et al., 2000).

Primäres Ziel dieser Arbeit war die Gewinnung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers gegen IsaA, sowie die Etablierung eines ELISAs für den Nachweis dieses Antikörpers. Des Weiteren wurde die Spezifität von IsaA für *S. aureus* in Westernblots mit unterschiedlichen Bakterienstämmen getestet. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit das immundominante Antigen IsaB mutiert und phänotypisch charakterisiert.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Bakterienstämme

Tabelle 2.1: Verwendete und hergestellte Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>E. coli</i> DH 5 α	F-, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk-</i> , <i>mk</i>), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ -, Δ (<i>argF-lac</i>), U196, Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15	Bethesda Research
<i>S. aureus</i> RN4220	Derivat von <i>S. aureus</i> 8325, kein eigenes Wirtsrestriktionssystem, dadurch effizienter Akzeptor von <i>E. coli</i> -DNA, Em-resistant	Novick et al., 1983
<i>S. aureus</i> 8325	NCTC 8325 von Prophagen geheilt, <i>agr</i> -positiv	Novick, 1969
TG 1	<i>E. coli</i> DH 5 α mit hergestelltem Plasmid pTG1	Teil dieser Arbeit
TG 2	<i>S. aureus</i> 8325 mit hergestelltem Plasmid pTG1	Teil dieser Arbeit
TG 3	Hergestellte Mutante aus <i>S. aureus</i> 8325 und pTG1	Teil dieser Arbeit
Nr. 10	Methicillin-sensibler <i>S. aureus</i> , Rachen	Laborstammsammlung
Nr. 11	Methicillin-sensibler <i>S. aureus</i> , Wunde	Laborstammsammlung
Nr. 12	Methicillin-sensibler <i>S. aureus</i> , Nase	Laborstammsammlung

Nr. 13	Methicillin-sensibler <i>S. aureus</i> , Abszess	Laborstammsammlung
Nr. 14	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 15	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 16	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 17	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 18	<i>S. aureus</i> , Bindehaut	Laborstammsammlung
Nr. 19	<i>S. aureus</i> , Ulcus	Laborstammsammlung
Nr. 20	<i>S. aureus</i> , Wunde (MRSA)	Laborstammsammlung
Nr. 21	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 22	<i>S. aureus</i> , Parotis	Laborstammsammlung
Nr. 23	<i>S. aureus</i> , Wunde	Laborstammsammlung
Nr. 24	<i>S. aureus</i> , Abszess	Laborstammsammlung
Nr. 25	<i>S. aureus</i> , Wunde	Laborstammsammlung
Nr. 26	<i>S. aureus</i> , Wunde	Laborstammsammlung
Nr. 27	<i>S. aureus</i> , Ohr	Laborstammsammlung
Nr. 28	<i>S. aureus</i> , Rachen	Laborstammsammlung
Nr. 29	<i>S. aureus</i> , Abszess	Laborstammsammlung
Nr. 30	<i>S. aureus</i> , Wunde	Laborstammsammlung
Nr. 31	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 32	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 33	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 34	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 35	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 36	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 37	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 38	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung

Nr. 39	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 59	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 60	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 61	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 62	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 63	<i>S. aureus</i> , Blutkultur	Laborstammsammlung
Nr. 174	<i>S. haemolyticus</i> , Haut	Laborstammsammlung
Nr. 188	<i>S. haemolyticus</i> , Haut	Laborstammsammlung
Nr. 189	<i>S. saprophyticus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 190	<i>S. canosus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 191	<i>S. hominis</i>	Laborstammsammlung
Nr. 192	<i>S. lugdunensis</i>	Laborstammsammlung
Nr. 193	<i>S. warnerii</i>	Laborstammsammlung
Nr. 194	<i>S. cohnii</i>	Laborstammsammlung
Nr. 395	<i>Enterococcus faecalis</i>	Laborstammsammlung
Nr. 397	<i>E. coli</i>	Laborstammsammlung
Nr. 418	<i>Enterococcus faecium</i>	Laborstammsammlung
Nr. 456	<i>S. aureus</i> , ATCC29231/DSM2569	Intervet, Schwabenheim
Nr. 457	<i>S. aureus</i> , ATCC25923/DSM1104	Intervet, Schwabenheim
Nr. 458	<i>S. aureus</i> , SG511	Intervet, Schwabenheim
Nr. 459	<i>S. aureus</i> , 25178	Intervet, Schwabenheim
Nr. 460	<i>S. aureus</i> , 29740	Intervet, Schwabenheim
Nr. 463	TSST-positiver <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 464	TSST-positiver <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 465	TSST-positiver <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 466	TSST-positiver <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 467	TSST-positiver <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 468	TSST-positiver <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 477	ET-positiver <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung

Nr. 478	ET-positiver <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 479	ET-positiver <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 480	ET-positiver <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 481	ET-positiver <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 482	ET-positiver <i>S. aureus</i>	Laborstammsammlung
Nr. 512, 312/98	<i>S. aureus</i> aus Osteomyelitis, Epidemiestamm	Witte, Werningerode
Nr. 513, 2242/98	<i>S. aureus</i> aus Osteomyelitis, Epidemiestamm	Witte, Werningerode
Nr. 514, 2339/98	<i>S. aureus</i> aus Osteomyelitis, Epidemiestamm	Witte, Werningerode
Nr. 515, 70/99	<i>S. aureus</i> aus Osteomyelitis, Epidemiestamm	Witte, Werningerode
Nr. 516, 252/99	<i>S. aureus</i> aus Osteomyelitis, Epidemiestamm	Witte, Werningerode
Nr. 517, 5/98	<i>S. aureus</i> aus Endokarditis, Epidemiestamm	Witte, Werningerode
Nr. 518, 48/98	<i>S. aureus</i> aus Endokarditis, Epidemiestamm	Witte, Werningerode
Nr. 519, 84/98	<i>S. aureus</i> aus Endokarditis, Epidemiestamm	Witte, Werningerode
Nr. 520, 3137/99	<i>S. aureus</i> aus Endokarditis, Epidemiestamm	Witte, Werningerode
Nr. 521, 2950/00	<i>S. aureus</i> aus Endokarditis, Epidemiestamm	Witte, Werningerode
Nr. 761	<i>S. aureus</i> , Nasenschleimhaut gesunder Probanden	Laborstammsammlung
Nr. 782	<i>S. aureus</i> , Nasenschleimhaut gesunder Probanden	Laborstammsammlung
Nr. 785	<i>S. aureus</i> , Nasenschleimhaut gesunder Probanden	Laborstammsammlung

Nr. 794	<i>S. aureus</i> , Nasenschleimhaut gesunder Probanden	Laborstammsammlung
Nr. 809	<i>S. aureus</i> , Nasenschleimhaut gesunder Probanden	Laborstammsammlung

1.2 Seren

- Prä-Immuns Serum (Serum vor Immunisierung)
- „1. Test“-Serum (Serum nach erster Immunisierung mit IsaA 0,5mg)
- „2. Test“-Serum (Serum nach zweiter Immunisierung mit IsaA 0,5mg)
- „3. Test“-Serum (Serum nach dritter Immunisierung mit IsaA 0,5mg)
- „1. Regular“-Serum (größere Serumentnahme nach dreimaliger Antigengabe)
- „2. Regular“-Serum
(⇒ o. g. Seren wurden von der Firma „immunoGlobe® Antikörpertechnik“, Großostheim, hergestellt)
- Patientenseren mit Nachweis einer MRSA-Sepsis (von Dr. med. U. Lorenz, Facharzt für Chirurgie an der Uniklinik Würzburg, nach allgemeingültigen Vorschriften entnommen und genehmigt)
 - Patient 1: 12.06.2001 „Initiale“ F
 - Patient 2: 28.05.2001 „Myelodysplasie“
 - Patient 3: 17.05.2001 „Initialen“ ZF
- Kontroll-Testserum 19907
- Prä-Immun-Kaninchenseren von der Firma „immunoGlobe® Antikörpertechnik“, Großostheim:
S-0020 Standard-Immunisierungsprogramm:
 - 1 Serumprobe (ca. 500 µl); 19.05.01; Kaninchen AB19901;
(Alter: 2,5 Jahre)
 - 2 Serumprobe (ca. 500 µl); 19.05.01; Kaninchen AB19909;
(Alter: 21 Monate)

- 3 Serumprobe (ca. 500 μ l); 19.05.01; Kaninchen AB1-103;
(Alter: 21 Monate)
- 4 Serumprobe (ca. 500 μ l); 19.05.01; Kaninchen AB1-107;
(Alter: ca. 5 Monate)
- 5 Serumprobe (ca. 500 μ l); 19.05.01; Kaninchen AB1-0.Nr.;
(Alter: 2,5 Monate)
- 6 Serumprobe (100 μ l); 06.07.97; Kaninchen AB19702;
(Alter: ca. 1 Jahr)
- 7 Serumprobe (100 μ l); 06.07.97; Kaninchen AB19703;
(Alter: ca. 1 Jahr)
- 8 Serumprobe (100 μ l); 06.07.97; Kaninchen AB19704;
(Alter: ca. 5 Monate)
- 9 Serumprobe (100 μ l); 06.07.97; Kaninchen AB19705;
(Alter: ca. 6 Monate)
- 10 Serumprobe (100 μ l); 06.07.97; Kaninchen AB19706;
(Alter: ca. 1 Jahr)

1.3 Sekundär-Antikörper

- Kaninchen-Anti-Human-Antikörper (Dianova, Hamburg)
- Schwein-Anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg)

1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die Materialien, welche nicht zu den allgemeinen Standardchemikalien des Labors für molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg gehören, stammen von folgenden Firmen:

<u>Amersham Pharmacia Biotech:</u>	Enzyme „Hyperfilm™ECL™“ – Filme
<u>AppliChem:</u>	NaOH-Plätzchen EDTA Tris β-Mercaptoethanol Formaldehyd
<u>Bio 101:</u>	Gene Clean III Kit
<u>Boehringer Mannheim:</u>	Alkalische Phosphatase
<u>Difco:</u>	Agar Granulated Trypton
<u>Gibco BRL:</u>	Agarose Ultra PUR Select Yeast Extract
<u>Merck:</u>	Kaliumhydrogenphosphat
<u>Roth:</u>	Glycin Natriumcitrat Ethanol
<u>Sigma:</u>	BSA (Bovines Serumalbumin) ABTS (2,2'-azino-di-3ethylbenzthiazoline sulfonic acid) Antibiotika (weitere Antibiotika anderer Herkunft s. Tabelle 2.2)

1.5 Medien und Agarplatten

Die Zusätze für die Medien werden in dest. H₂O gelöst und 20 Minuten autoklaviert.

LB-Medium:

10 g Bacto Trypton

5 g Yeast Extract

5 g NaCl

add 1 l H₂O dest.

B-Medium:

10 g Bacto Trypton

5 g Yeast Extract

5 g NaCl

1 g K₂HPO₄

add 1 l H₂O dest.

Zur Lysierung von Staphylokokken züchtet man Staphylokokken in B-Medium mit 1 % Glycin an. Das zugesetzte Glycin wird in die Pentapeptidbrücken in der Zellwand während der Mureinsynthese eingebaut und ermöglicht so ein leichteres Aufspalten der Bakterien mittels Lysostaphin.

Tryptic Soyabean Broth (TSB) (Difco):

30 g add 1 l H₂O dest.

LB-Agarplatten:

1 l LB-Medium

12 g Agar

Nach Abkühlung des autoklavierten Agars auf ca. 40 °C werden die hitzelablen Antibiotika hinzugesetzt, die Platten gegossen und im Kühlraum bei ca. 4 °C dunkel gelagert.

LB-X-Gal-Platten:

- 1 l LB-Agar autoklavieren
- 500 µl IPTG (100mM)
- 3 ml 2 %X-Gal (in Dimethylformamid)

Kaninchenblutplatten:

- 1 l autoklavierter LB-Agar
- 5 % gewaschene Kaninchenerythrozyten

1.6 Antibiotikazusätze für Medien, Agarplatten und MHK-Bestimmung**Tabelle 2.2:** Verwendete Antibiotika mit dem entsprechenden Lösungsmittel für die Stammlösung und deren Hersteller

Antibiotikum	Stammlösung/Lösungsmittel	Herkunft
Ampicillin	10 mg/ml in H ₂ O bidest.	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Chloramphenicol	10 mg/ml in EtOH	Serva, Heidelberg, Deutschland
Clindamycin	10 mg/ml in H ₂ O bidest.	Sigma
Erythromycin	10 mg/ml in EtOH	Sigma
Gentamicin	10 mg/ml in H ₂ O bidest.	Sigma
Methicillin	10 mg/ml in H ₂ O bidest.	Sigma
Ofloxacin	10 mg/ml in 10 %-Essigsäure	Roussel Uclaf, Romainville, Frankreich
Tetracyclin	10 mg/ml in H ₂ O bidest.	Sigma

1.7 DNA-Größenmarker

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

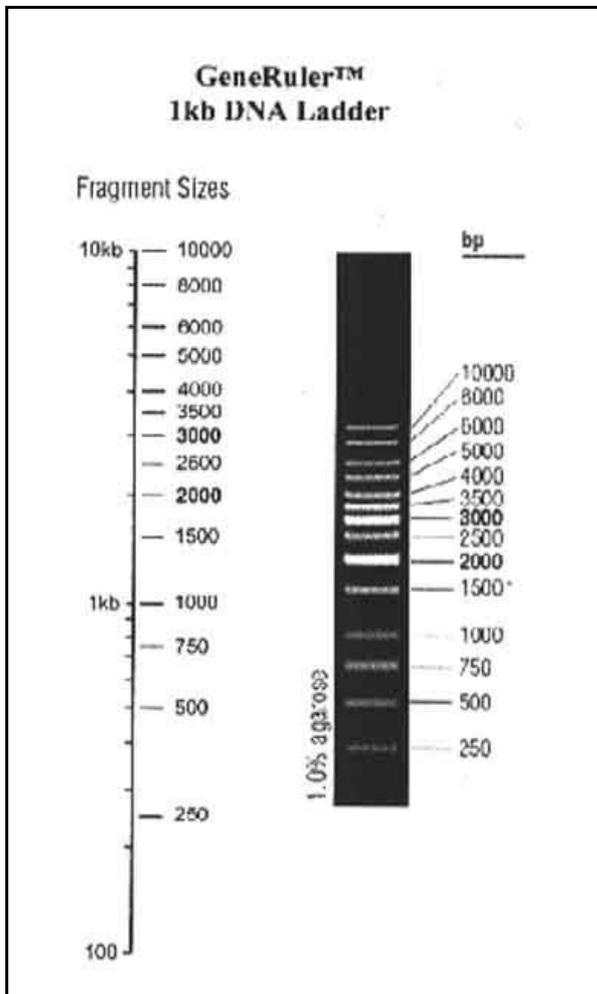


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des GeneRuler™

1.8 Geräte

Tabelle 2.3: Verwendete Geräte

Gerät	Fabrikat
ABI-Sequenzierer	Applied Biosystems (ABI Prism 310 Genetic Analyzer)
Analysewaage	Ohaus Navigator
Autoklaven	Fedegari
Elektrophoresekammer	BioRad
Elektroporationsgerät	EQUIBIO (Easyject prima)
Entwickler	AGFA (Curix 60)
Feinwaage	Chyo
Geldokumentationsanlage	BioRad (GelDoc 2000)
Hybridisierungsöfen	Hybaid
Inkubator	Heraeus
Li-COR-Sequenzierer	MWG-Biotech (Modell 4000)
Magnetrührer	GLW (M21)
pH-Meter	WTW pH526
Photometer	Pharmacia Biotech (Ultraspec 3000)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific (innova 4300)
Spannungsgeräte	BioRad (Power Pac 2000)
SpeedVac	Savant (SC 110)
Sterilbank	Nuaire (Class II Type A/B3)
Thermoblock	Liebisch
Thermocycler	Eppendorf (Mastercycler personal)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Centrifuge 5415 C)
UV-Stratalinker	Stratagene
Vakuumblot-Apparatur	Pharmacia Biotech
Vortexer	Scientific Industries
Wasserbadinkubator	GFL
Westerblotgerät	BioRad

1.9 Verwendete Plasmide

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete und erstellte Plasmide

Plasmid	Eigenschaften
pBT2	7 kb, shuttle Vektor, <i>bla</i> , <i>cat</i> (Brückner, 1997) (s. Abb. 3.18 im Ergebnisteil)
pTG1	pBT2 + „upstream“-Fragment + <i>ErmB</i> + „downstream“-Fragment, 10,65 kb, (im Rahmen dieser Arbeit hergestellt) (s. Abb. 3.19 im Ergebnisteil)

2. Methoden

2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *Staphylococcus aureus* (Pospiech and Neumann, 1995)

2 ml einer in B-Medium + 1 % Glycin gezüchteten ÜN-Kultur werden 5 Minuten bei 6000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml TNE-Puffer gewaschen. Anschließend nimmt man das Pellet in 500 µl TNXE-Puffer auf und gibt der Suspension 40 µl Lysostaphin (1 mg/ml) zu. Die Probe lässt man bei 37 °C ca. 30 Minuten inkubieren bis die Zellen vollständig lysiert sind. Durch die Zugabe von 40 µl Proteinkinase K (10 mg/ml) werden die zellulären Proteine inaktiviert. Die Probe wird ca. 2 h bei 60 °C inkubiert bis die Probe klar erscheint. Anschließend werden 1/3 Volumen 3 M NaCl (188 µl) und 1 Volumen Chloroform unter dem Abzug zur Suspension gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Probe wird 5 - 10 Minuten bei 9000 rpm zentrifugiert, dabei bilden sich 3 Phasen. Die chromosomale DNA befindet sich in der obersten Phase. Diese wird vorsichtig abgenommen und in 2 Volumen 96 % EtOH gefällt. Es erfolgt eine erneute Zentrifugation bei 9000 rpm für 20 Minuten. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1 ml 70 % EtOH gewaschen. Diese

Suspension wird nochmals 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird bei Raumtemperatur ca. 30 Minuten getrocknet und anschließend in 50 µl EB-Puffer aufgenommen.

TNE-Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 8,0

10 mM NaCl

10 mM EDTA pH 8,0

add 500 ml H₂O

TNXE-Puffer:

TNE-Puffer

1 % Triton X 100

EB-Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 8,0

2.2 Phenol-/Chloroform-/Isoamylalkohol-Extraktion

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten, z. B. nach Alkalischer Phosphatase-Behandlung, wird dem Ansatz gleiche Volumina Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25 : 24 : 1 zugefügt. Nach intensivem Mischen wird der Ansatz 2 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Mittels Zugabe des zweifachen Volumens von eiskaltem 96 % EtOH erfolgt die Fällung der DNA. Zur Unterstützung der Fällung lagert man das Gemisch bei -70 °C 20 Minuten. Die DNA wird anschließend bei 4 °C 15 Minuten bei 14000 rpm abzentrifugiert. Das gewonnene Pellet wird anschließend in 500 µl 70 % EtOH gewaschen und erneut 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Dieses Pellet wird ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 10µl H₂O aufgenommen.

2.3 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Zur Überprüfung von Plasmiden oder zu präparativen Zwecken kann DNA an spezifischen Stellen durch die Wahl hierzu geeigneter Restriktionsenzyme gespalten werden. Hierzu geht man wie folgt vor:

- 1 - 2 µg DNA
- 1 µl Enzym A (Bsp: *EcoRI*) (ca. 4U)
- 1 µl Enzym B (Bsp: *BamHI*) (ca. 4U)
- 2 µl 10 x Puffer
- H₂O dest., je nach µl gewählter DNA Auffüllen bis 20 µl Ansatz

Die Restriktion der DNA erfolgt bei den hier verwendeten Enzymen bei 37 °C für ca. 2 - 2,5 h. Die Restriktionszeit ist wichtig einzuhalten bei Enzymen mit „Star-activity“, wie z. B. *EcoRI* und *BamHI*.

2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel (GeneClean-III-Kitt von Bio101)

Um die gesuchten DNA-Teile nach der Gelelektrophorese aus dem Agarosegel zu isolieren, werden die jeweiligen DNA-Fragment-Banden nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten. Die Gelstücke werden in ein Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Zur Lösung des Agarosegels gibt man das dreifache Volumen des gewogenen Stücks an Natriumjodid hinzu und schmilzt es im Heizblock bei 50 °C für ca. 5 - 10 Minuten. Zu dem komplett geschmolzenen Gemisch werden 10 µl Glasmilch hinzugefügt und bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken 5 Minuten inkubieren lassen. Die DNA bindet sich unter diesen Bedingungen an die Glasmilch. Der Ansatz wird kurz (5 Sekunden) bei 9000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Glasmilchpellet wird dreimal mit 200 µl „New-Wash“-Waschpuffer unter immer wieder neuem kurzen Abzentrifugieren gewaschen.

Nach der letzten Zentrifugation entfernt man vollständig den Puffer und resuspendiert das DNA-Glasmilch-Gemisch mit 10 µl H₂O dest.. Dieser Ansatz muss zur Lösung der DNA aus der Glasmilch ca. 5 Minuten bei 45 °C inkubieren. Anschließend zentrifugiert man bei 9000 rpm die gelöste DNA von der Glasmilch ca. 1 Minute ab. Die DNA wird vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und entweder sofort weiter behandelt oder bei minus 20 °C eingefroren.

2.5 „Sticky end“ – Ligation

Zur Herstellung eines gewünschten Plasmids sucht man sich einen geeigneten Vektor, der mit den passenden Restriktionsenzymen geschnitten werden kann, welche es erlauben, das jeweilig gewünschte Insert in der Ligation in sich zu integrieren. Der Vektor und auch das Insert müssen vor der Ligation mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten werden, danach im Agarosegel aufgetrennt und im GeneClean aufbereitet werden. Gereinigter Vektor- und Insert-DNA werden in einem molaren Verhältnis von 1 : 3 in einem 20 µl-Ansatz wie folgt zusammenpipettiert:

- 2 µl Vektor-DNA
- 6 µl Insert-DNA
- 2 µl 5 x Puffer
- 1 µl T4-Ligase
- 9 µl H₂O

Dieser Ligationsansatz wird über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

2.6 Horizontale Gelelektrophorese (Maniatis et al. 1982)

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wird die Plasmid-DNA ihrer Größe nach in einem Agarosegel aufgetrennt. Dabei verhält sich die Größe der Fragmente umgekehrt proportional zu ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im Gel, d. h. je größer das Fragment, desto geringer die zurückgelegte Strecke im Gel.

Zur Herstellung eines 1 %-Agarosegels wird in 200 ml TAE-Puffer 2 g Agarose in der Mikrowelle ca. 2 Minuten gelöst. Das Gel wird auf ca. 60 °C abgekühlt und anschließend in einen Gelschlitten mit justierten Kamm gegossen. Nach ca. 15 Minuten ist das Gel polymerisiert und der Kamm für die DNA-Lauftaschen kann entfernt werden. Das erstarrte Gel kann nun in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt werden.

Die DNA-Spaltansätze versetzt man im Verhältnis von 1 : 10 mit Stopppuffer, d. h. zu einem „Verdau“ von 20 µl gibt man 2 µl Stopppuffer.

Das DNA-Stopppuffer-Gemisch füllt man vorsichtig in die Geltaschen ein. Um später die aufgetrennten Banden ihrer Größe zuordnen zu können, wird zusätzlich eine Spur mit DNA-Größenmarker aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt bei 100 V Spannung über 2 h, bei 80 V über 4 h oder bei 28 V über Nacht. Je langsamer die Laufgeschwindigkeit, desto besser erfolgt die Auftrennung der DNA-Banden. Nach der elektrischen Auftrennung der Banden wird das Gel in einem Spezialbad mit Ethidiumbromid (10 µg/ml) gefärbt. Dadurch interkaliert dieser kanzerogene Farbstoff mit der DNA, wodurch diese unter UV-Licht sichtbar gemacht und entweder fotografiert oder ausgeschnitten werden kann.

50 x TAE-Puffer:

242 g Tris-HCl

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

add 1 l dest. H₂O

Stopppuffer (6 x):

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylen-Cyanol

15 % Ficoll Typ 400

add H₂O, je nach gewünschter Menge

2.7 Transformation in kompetente *E. coli*

Um ein neu hergestelltes Plasmid in Bakterien einzufügen, verwendet man in der Bearbeitungsphase meist *E. coli*-Zellen, da diese genetisch für die Aufnahme von Plasmid-DNA optimiert wurden.

Ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen (150 µl) wird auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA (5-20 µl) hinzugegeben. Die Suspension wird 30 - 60 Minuten auf Eis inkubiert. In einem anschließenden Hitzeschock von 90 Minuten bei 42 °C nehmen die Zellen die DNA auf. Danach wird der Ansatz erneut 5 Minuten auf Eis gestellt. Nun wird dem Ansatz 1 ml steriles LB-Medium zugegeben und 2 h im 37 °C-Schüttler zur phänotypischen Expression inkubiert. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 6000 rpm abzentrifugiert und der Überstand bis auf 300 µl verworfen. Das Pellet wird mit der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und je 150 µl auf entsprechenden Selektions-LB-Platten ausplattiert. Diese Platten werden über Nacht im 37 °C-Brutschrank inkubiert.

2.8 Herstellung kompetenter *E. coli* DH5alpha-Zellen (CaCl₂- Methode)

Eine ÜN-Kultur von *E. coli*-Bakterien wird 1 : 50 in LB-Medium verdünnt. Der Gesamtansatz beträgt insgesamt 50 ml. Diesen Ansatz lässt man bis auf eine optische Dichte (OD_{600nm}) von 0,5 – 0,7 im 37 °C – Schüttler anwachsen. Anschließend wird die Kultur auf Eis abgekühlt und auf zwei 50 ml Greinerröhrchen verteilt. Beide Röhrchen zentrifugiert man 5 Minuten bei 4 °C bei 6000 rpm ab.

Der Überstand wird verworfen und die Pellets werden mit je 12,5 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl₂- Lösung resuspendiert. Diese Zellsuspension wird bei 4 °C und 6000 rpm erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Die Pellets resuspendiert man nun mit 1,25 ml eiskalter, steriler CaCl₂- Lösung und vereinigt die Inhalte der beiden Röhrchen miteinander. Die Kultur wird 1 h auf Eis gestellt und anschließend werden 520 µl 87 %-Glycerin-Lösung zugegeben. Dies entspricht einer Endkonzentration von 15 %. Die Bakterien-Glycerin-Lösung aliquitiert man zu je 150 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße und lagert sie bei –80 °C.

2.9 Herstellung elektrokompenter *S. aureus*-Zellen (Schenk and Laddaga, 1992)

Eine *S. aureus*-ÜN-Kultur wird 1 : 100 in B-Medium + 1 %-Glycin verdünnt, Zellansatz insgesamt 50 ml. Diesen Ansatz lässt man im 37 °C-Schüttler bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 - 0,7 anwachsen. Die Kultur wird in ein 50 ml-Greinerröhrchen überführt und bei 3500 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wird in 50 ml sterilem H₂O resuspendiert und erneut 10 Minuten bei 6000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wird in 10 ml 10 %-Glycerinlösung aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wird nun in 5 ml 10 %-Glycerinlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Je nach Menge des gewonnenen Pellets wird es abschließend in 0,2 - 0,5 ml 10 %-Glycerinlösung aufgenommen und in Aliquots von 70 µl bei -80 °C gelagert.

2.10 Elektroporation in *S. aureus* (Schenk and Laddaga, 1992)

Ein Aliquot elektrokompenter *S. aureus*-Zellen (70 µl) wird bei Raumtemperatur aufgetaut. Es werden 5 µl der gewünschten DNA zugegeben und dann den Ansatz für 15 - 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen. Für die Elektroporation werden 60 µl dieses Ansatzes in eine mit UV-Licht-sterilisierte Porationsküvette mit einem Spalt von 1 mm gegeben. Die Elektroporation erfolgt bei 1,8 - 2,0 kV, 100 Ω und 25 µF. Die optimale Zeitkonstante beträgt 2,5 Millisekunden. Unmittelbar nach dem Impuls werden 390 µl LB-Medium zugegeben und die Suspension in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Dieses Gemisch wird für 2 h im 37 °C-Schüttler zur phänotypischen Expression inkubiert. 200 µl dieser Kultur werden auf speziell gewählten Antibiotikaplatten ausplattiert und je nach verwendeten Zellen bei 30 °C oder 37 °C über Nacht in den Brutschrank gelegt.

2.11 Phagengewinnung mit aufgenommenem Plasmid (Phage 85)

In der Transduktion werden Nukleinsäuren von einer Bakterienzelle auf eine andere mittels eines Bakteriophagens übertragen. Der *S. aureus*-Phage 85 kann verwendet werden, um sowohl Vektoren als auch chromosomale DNA in phagensensitive Staphylokokken zu überführen.

Zur Phagenanzucht werden je 200 µl ÜN-Kultur des Donorstammes, meist *S. aureus* RN4220 mit dem aus der Elektroporation gewonnenen zu übertragenen Plasmid, in vier Reagenzröhrchen gegeben und 100 µl Phagensuspension in vier Verdünnungsstufen hinzugegeben (1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ verdünnt in Phagenpuffer). Die Suspensionen werden 30 - 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird jede Probe mit 4 ml ca. 55 °C warmem Softy-Agar + 5 mM CaCl₂ vermischt und sofort auf LB-Platten gegossen. Die Platten werden über Nacht im 37 °C-Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag auf Lyse geprüft. Von den Platten mit kompletter Lyse (klar) schabt man den Softy-Agar ab, gibt ihn in ein Greinerröhrchen und fügt 1 ml Phagenpuffer hinzu.

Die Probe wird gut gevortext und bei 3500 rpm 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig und vorsichtig mittels einer sterilen 2 ml-Spritze und steriler Nadel (0,8) abgenommen. Die gewonnene Lösung wird mittels eines Millipor-Filters in ein Eppendorf-Gefäß sterilfiltriert.

Softy-Agar (0,6 %):

1,25 g Yeast-Extract

2,5 g Trypton

1,25 g NaCl

1,5 g Agar

add 250 ml H₂O

Phagenpuffer:

LB-Medium

5 mM CaCl₂

2.12 Phagentransduktion in *S. aureus* 8325

Die gewonnenen Phagen (100 µl) werden zu 200 µl Bakterienkultur des multiresistenten Zielstammes *S. aureus* 8325 gegeben und 25 µl 1 M CaCl₂ und 25 µl 20 mM Natriumcitrat zugefügt. Diese Suspension soll 1 h bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend werden 4 ml ca. 55 °C warmer Softy-Agar zugegeben und das Gemisch wird dann sofort auf speziellen Selektionsplatten ausgegossen. Die Platten werden je nach übertragenem Plasmid bei 30 °C (temperatursensitiver pBT2-Vektor) oder 37 °C über Nacht inkubiert.

2.13 Southern Blot (Southern, 1975)

Mittels dieser molekularbiologischen Methode charakterisiert man DNA-Sequenzen durch Kartierung von Restriktionsenzymchnittstellen. Man ermittelt dabei Sequenzhomologien durch Hybridisierungsexperimente. Es wird chromosomale DNA isoliert, deren Konzentration gemessen und ca. 10 - 20 µg DNA für den Restriktionsenzymverdau eingesetzt. Die DNA wird mit einem oder zwei geeigneten Restriktionsenzymen gespalten. Bei der später stattfindenden Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde kann man dann unterschiedliche Banden für Wildtyp und Mutante erwarten. Die Spaltsansätze (20 µl) werden 24 h bei 37 °C inkubiert, wobei nach 12 h erneut Enzym hinzugegeben werden sollte, um eine vollständige Spaltung der chromosomalen DNA gewährleisten zu können. Die gespaltene DNA versetzt man mit 2 µl Blaupuffer und trägt es auf ein 1 %-Agarosegel (TAE-Puffer + Agarose) auf. Zusätzlich trägt man einen DNA-Größenmarker auf und lässt das Gel 3 h bei 80 V in einer mit 1 x TAE-Puffer gefüllten Gelkammer laufen. Anschließend wird das Gel 20 Minuten im Ethidiumbromidbad gefärbt und mit einem fluoreszierenden Lineal fotografiert. Dadurch kann später die Größe der hybridisierenden Fragmente mittels Ausmessung der Laufstrecke der signalgebenden Banden im Vergleich zum Marker bestimmt werden.

Zur Vorbereitung des Gels auf die Hybridisierung wird die DNA erst depurinieren, dann denaturiert und anschließend neutralisiert. Dazu wird das Gel abwechselnd in drei Lösungen gebadet:

1. Lösung I (Depurinierung): 10 - 15 Minuten – Blaupufferbande färbt sich gelb
2. Lösung II (Denaturierung): 20 Minuten – Blaupufferbande färbt sich wieder blau
3. Lösung III (Neutralisation): 20 Minuten

Lösung I - Depurinierung:

0,25 N HCl

- 20,83 ml 37 % HCl

- 979,17 ml H₂O

Lösung II – Denaturierung:

0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

- 20 g NaOH

- 87,66 g NaCl

- add 1 l H₂O

Lösung III – Neutralisation:

0,5 M Tris-HCl

1,5 M NaCl

- 60,5 g Tris

- 87,66 g NaCl

- add 1 l H₂O

Blaupuffer:

0,25 % Bromphenol

0,25 % Xylencyanol FF

15 % Ficoll (Typ 400, Pharmacia)

in H₂O dest.

2.14 Kapillarblot

Eine Nylon-Membran (Nytran Spercharge von Schleiche & Schuell) wird passend zum Gel geschnitten und 5 Minuten in Wasser und 5 Minuten in 20 x SSC geschüttelt.

Den Aufbau der Kapillarblotapparatur kann man aus Abb.2.2 entnehmen:

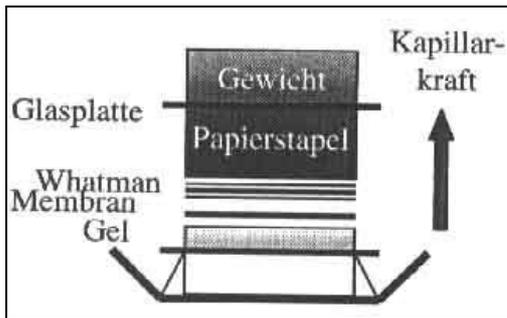


Abb. 2.2: Aufbau des Kapillarblots

In eine passende Schüssel füllt man 20 x SSC-Lösung und legt über ein Gestell eine Brücke aus Whatman-Papier, welches ebenfalls mit SSC getränkt sein sollte. Die Enden des Whatman-Papier sollten in der SSC-Lösung der Schüssel zum Liegen kommen. Das Gel wird mit den Taschen nach unten auf die Whatman-Papierbrücke gelegt. Die Nylon-Membran wird blasenfrei und exakt auf das Gel gebracht und darüber drei Lagen in 20 x SSC getränktes Whatman-Papier in der entsprechenden Größe darüber gelagert. Darauf schichtet man passend zurechtgefalteten Zellstoff zu einem Stapel von ca. 10 cm Höhe und legt darüber eine Glasplatte. Zum Abschluß wird zur Beschwerung des Blots ein geeignetes Gewicht aufgelegt.

Durch Kapillarkräfte wird die Trägerflüssigkeit 20 x SSC über Nacht nach oben gesaugt und die DNA dadurch auf die Membran geblottet.

Am nächsten Tag wird der Blot abgebaut, die Taschen mit einem Stift auf der Membran markiert und die Membran auf Whatman-Papier getrocknet. Anschließend fixiert man die DNA mittels UV-Licht (C2/C3-Stufe, 50 - 250 mJ, ca. 50 - 150 Sekunden) oder bei 80 °C im Backofen für 1 h auf der Membran. Dieser Vorgang wird als Crosslinking bezeichnet.

Um die Membran gut in das Hybridisierungsröhrchen überführen zu können, wird die Membran in 5 x SSC-Lösung geschmeidiger gemacht. Zur sogenannten Vorhybridisierung wird in das Röhrchen 20 ml ECL-Hybridisierungslösung gebracht und den Blot bei 42 °C ca. 2 h inkubieren lassen. Durch diesen Vorgang werden unspezifische Stellen auf der Membran blockiert, so dass später die gewählte Hybridisierungssonde nur spezifisch binden kann.

20 x SSC-Puffer:

300 mM Natriumcitrat pH 7,0

3 M NaCl

- 88,23 g Na-Citrat

- 175,32 g NaCl

- add 1 l H₂O

ECL-Hybridisierungslösung:

500 ml ECL-Puffer

0,5 M NaCl (=14,61 g)

5 % Blocking agents (= 25 g) langsam und sehr vorsichtig auf dem Rührer mit Rührfischchen zugeben, 1 h bei 42 °C mixen und in 20 ml Portionen einfrieren.

2.15 Markierung der DNA-Sonde und Hybridisierung

Das PCR-Produkt zur Herstellung der DNA-Sonde wird aufgereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt. 100 - 200 ng DNA werden in 10 µl H₂O aufgenommen und 5 Minuten bei 95 °C gekocht, hierbei trennen sich die DNA-Stränge auseinander. Danach wird die DNA sofort 5 Minuten auf Eis gestellt um eine erneute Zusammenlagerung der Stränge zu verhindern. Anschließend werden 10 µl Labelling-Reagenz hinzugefügt, dann 10 µl Glutaraldehyd, alles gut gemischt und abzentrifugiert. Das Gemisch wird 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die so markierte Sonde wird in das Hybridisierungsröhrchen mit der vorhybridisierten Membran gebracht und bei 42 °C

erfolgt über Nacht die Anlagerung der DNA-Sonde an die komplementären DNA-Sequenzen der Membran.

Am folgenden Tag wird der hybridisierte Blot 10 Minuten bei 50 °C im Wasserbad mit 5 x SSC-Lösung gewaschen. Anschließend erfolgt eine zweimalige Waschung des Blots mit Waschpuffer, ebenfalls im Wasserbad bei 50 °C. Bei diesem Vorgang wird unspezifisch gebundene DNA-Sonde von der Membran entfernt. Abschließend wird der Blot zweimal für 5 Minuten mit 5 x SSC-Puffer auf dem Schüttler gewaschen. Zwischenzeitlich kann man für die anschließende Fotografie die Exponierkassette vorbereiten. Nach dem Schütteln gibt man die Membran in eine Schüssel, in welche man je 3 ml der beiden Detektionslösungen (I + II) gleichzeitig über den Blot gießt. Unter Schwenken der Schüssel lässt man den Blot darin 1 Minute inkubieren. Danach wird der Blot kurz auf Whatman-Papier getrocknet und möglichst blasenfrei in Frischhaltefolie eingeschlagen und in die Exponierkassette gelegt. In der Dunkelkammer wird unter Rotlicht ein lichtempfindlicher Film aufgelegt und dieser je nach Signalstärke 5 Minuten bis 2 h in der Exponierkammer belichtet. Danach lässt man den Film im elektronischen Entwickler (AGFA Curix 60) entwickeln.

Waschpuffer:

0,5 x SSC (25 ml 20 x SSC)

0,4 % SDS (40 ml 10 % SDS)

add 1 l H₂O

2.16 Entfernen einer Sonde vom Blot (Strippen)

Unter Strippen versteht man die Entfernung der alten Sonde um eine neue Sonde auf den Blot aufbringen zu können, ohne störende Hintergrundsignale der alten Sonde hervorzurufen.

0,05 x SSC (1 ml 20 x SSC) und 0,01 M EDTA pH 8,0 (8 ml 0,5 M EDTA) werden auf 400 ml mit H₂O dest. aufgefüllt und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Die Flüssigkeit wird in zwei Teile zu je 200 ml geteilt und zu jedem Teil 0,1 % SDS (2 ml 10 % SDS) zugegeben. In diese Stripp-Lösung wird der hybridisierte Blot für 15 Minuten gegeben und geschüttelt. Die Lösung sollte dabei so heiß wie möglich sein (ca. 70 °C). Dieser Vorgang wird mit der zweiten Stripp-Lösung wiederholt. Abschließend wäscht man den Blot bei Raumtemperatur mit 0,01 x SSC und trocknet ihn auf Whatman-Papier. Der Blot ist nun fertig für eine weitere Hybridisierung mit einer neuen Sonde.

2.17 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung wird mittels Messung der Absorption bei 260 nm am Photometer bestimmt. Die zu untersuchende Probe wird 1 : 80 mit H₂O verdünnt und in einer speziellen Quarzküvette mit der Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die Konzentration wird unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors aus der Absorption bei 260 nm bestimmt. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine OD von 1,0 einer DNA-Menge von 50 µg/ml (andere Nukleinsäure-Elemente entsprechen anderen Konzentrationen).

$$OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsstufe} = \text{Konzentration in } \mu\text{g/ml}$$

Durch Messung der Absorption bei 280 nm wird die Reinheit der Probe evaluiert. Das Verhältnis von A_{260}/A_{280} sollte über 1,8 liegen.

Lambert-Beer'sches Gesetz:

$$A = \kappa \cdot c \cdot d$$

(Absorptionsmasse= spektralbezogener Absorptionskoeffizient · Konzentration in Mol/l · Schichtdicke in cm)

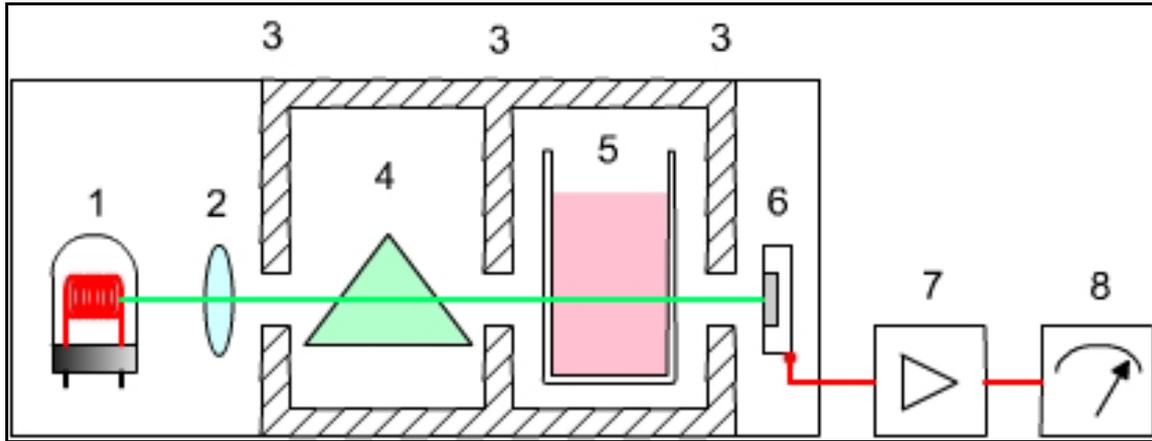


Abb. 2.3: Grundsätzlicher Aufbau eines Photometers (Biorama, 2000)
 1) Lichtquelle 2) Optik 3) Blenden 4) Monochromator 5) Probenraum mit Küvettenhalter
 6) Detektor 7) Verstärker 8) Anzeige

2.18 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine kann man durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE auftrennen. Ein SDS-Gel besteht aus einem Trenn- und Sammelgel. Zunächst wird das Trenngel zwischen zwei Glasplatten ($15 \times 17,5 \text{ cm}^2$) gegossen, welche durch einen 1,2 mm dicken Spacer voneinander getrennt werden, bis nur noch ein ca. 3 cm freier oberer Rand vorhanden ist. Das Ganze wird mit H_2O dest. überschichtet. Die Konzentration des Acrylamid im Trenngel wird anhand der Größe der zu untersuchenden Proteine festgelegt:

Acrylamidkonzentration:

- 15 %
- 10 %
- 7,5 %
- 5 %

Auftrennungsbereich:

- 12-43 kDa
- 16-68 kDa
- 36-94 kDa
- 57-212 kDa

Nach ca. 30 - 60 Minuten wird das Wasser vorsichtig entfernt und geschaut, ob die Trenngelphase fest ist. Ist sie fest, wird darüber das Sammelgel gegossen und der Gelkamm mit der gewünschten Taschenbreite in die Sammelgelphase zwischen den

beiden Glasplatten eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wird das Gel mit den Glasplatten aus der Gießvorrichtung genommen und in die Gelelektrophoresekammer eingebracht. Die Kammer wird mit 1 x Elektrophorese-Puffer gefüllt, der Kamm vorsichtig entfernt und die Taschen mit Elektrophorese-Puffer ausgespült. Die Proben werden je nach Taschengröße 5 - 20 µl vorsichtig in die Taschen pipettiert und in einer Spur ein Proteingrößenmarker (Rainbowmarker) aufgetragen. Das Gel mit den Proteinen wird bei unbegrenzter Voltzahl und 24 mA für eine Stunde elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach der Laufzeit kann das Gel in Coomassie-Blau oder Silberfärbung gefärbt und dadurch die Proteinbanden sichtbar gemacht werden oder auf Nitrocellulose-Membran geblottet und mit Hilfe von immunologischen Antigen-Antikörper-Reaktionen weiter untersucht werden.

Ansatz für zwei Gele:

10 ml eines 15 %-Trenngels:

5,0 ml 30 % Acrylamidlösung (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)

2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

2,3 ml H₂O dest.

100 µl 10 % SDS

100 µl APS (Ammonium Persulfat)

4 µl TEMED

5 ml eines 5 %-Sammelgels:

830 µl 30 % Acrylamidlösung

1,3 ml 1,0 M Tris-HCl pH 6,8

2,7 ml H₂O

50 µl 10 % SDS

50 µl APS

5 µl TEMED

10 x Elektrophoresepuffer:

30 g Tris

144,4 g Glycin

100 ml 10 % SDS

add 1 l H₂O

2.19 Probengewinnung für den Western-Blot

Für die Analyse von intrazellulären Proteinen werden Gesamtzellsate verwendet. Von einer ÜN-Kultur werden 2 ml abzentrifugiert mit 1 ml saliner Lösung (0,9 % NaCl oder PBS) gewaschen, erneut zentrifugiert und in 100 µl H₂O resuspendiert und mit 25 µl 5 x Laemmlipuffer versetzt. Dieser Ansatz wird 5 Minuten bei 100 °C aufgeköcht, 15 Minuten bei 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und ca. 10 - 20 µl vom Überstand auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Für die Untersuchung von extrazellulären Proteinen wird entweder der Überstand der abzentrifugierten ÜN-Kultur direkt zur Analyse verwendet oder bei geringen Proteinkonzentrationen einer Fällung mit TCA unterzogen. Dazu werden 10 ml Kulturüberstand mit 10 ml 20 % TCA versetzt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Dieser Ansatz wird am nächsten Tag 30 Minuten bei 13000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet mit eiskaltem Aceton gewaschen. Nach kurzem Waschen wird das Proteinpellet in 100 µl TE-Puffer gelöst. Vor dem Auftragen auf das Gel werden 40 µl Probenmaterial mit 10 µl 5 x Laemmli-Puffer versetzt, 5 Minuten bei 100 °C aufgeköcht und 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die aufgetragene Menge richtet sich nach der Größe der Taschen im Gel.

Laemmli-Probenpuffer:

1,1 g SDS

0,41 g EDTA

0,17 g NaH₂PO₄

1,1 ml β-Mercaptoethanol

add 10 ml H₂O

1 : 1 mit 0,2 % Bromphenolblau (in 50 % Glycerin) mischen

2.20 Western-Blot

In der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennte Proteine werden im Western-Blot auf Nitrozellulosepapier übertragen. Anschließend kann durch eine antigenspezifische Antikörperreaktion das zu bestimmende Protein sichtbar gemacht werden. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulose-Membran erfolgt horizontal in einer Blotapparatur zwischen zwei Graphitplatten.

Man bereitet 12 Whatman-Papierfilter vor und die Nitrozellulose-Membran (Handschuhe tragen, wegen evtl. Verfälschungen durch Proteinreste an den Händen) in der Größe des Gels. Auf die mit H₂O befeuchtete untere Graphitplatte werden die Blot-Teile wie folgt angeordnet:

- 6 Lagen Whatman-Papier, welche in Anodenpuffer I getränkt wurden,
- 3 Lagen Whatman-Papier, welche in Anodenpuffer II getränkt wurden,
- Nitrozellulosemembran, welche 10 Minuten in Anodenpuffer II lag,
- Gel,
- 3 Lagen Whatman-Papier, welche in Kathodenpuffer getränkt wurden.

Die Teile sollten alle luftblasenfrei übereinander liegen. Abschließend wird die Kathodengraphitplatte aufgelegt und beschwert. Der Transfer der Proteine erfolgt bei unbegrenzter Voltzahl und 0,8 mA/cm² (6 x 9 cm² = 54 mA) Gelfläche für 1 h. Nach dem Blot entfernt man die Spur mit dem Marker von den übrigen Proteinspuren und

kennzeichnet mit einem Stift vorsichtig am Rand die Seiten der Membran zur Identifizierung der Spuren. Das Markerstück wird 15 Minuten in einer PonceauS-Lösung (2 % PonceauS in 30 % TCA) gefärbt.

Nun erfolgt mit der Proteinmembran die Antikörperreaktion.

Anodenpuffer I:

0,3 M Tris

20 % Methanol

Anodenpuffer II:

25 mM Tris

20 % Methanol

Kathodenpuffer:

25 mM Tris

40 mM ϵ -Amino-n-capronsäure

20 % Methanol

2.21 Antikörperreaktion

Nach dem Elektroblothen werden die freien Protein-Bindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran durch Inkubation in PBS-T/5 %-Magermilch im Kühlhaus über Nacht gesättigt. Am nächsten Tag verwirft man die Lösung und wäscht die Membran unter Schwenken dreimal 5 Minuten mit PBS-T. Dann gibt man die Membran in die Primärantikörperlösung (Kaninchen-/Human-Antikörperserum in PBS-T/5 % - Magermilch) und lässt sie 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren. Die Primärantikörperlösung wird abgezogen und kann bei Bedarf wieder verwendet werden. Die Membran wäscht man nun dreimal 10 Minuten mit PBS-T auf dem Schüttler. Anschließend inkubiert man wieder 1 h bei Raumtemperatur die Membran in

der Sekundärantikörperlösung (Schwein-anti-Kaninchen/Human-AK in PBS-T/5 %-Magermilch). Der zweite Antikörper ist mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt, welches mit dem anschließenden Substrat ein Signal zur Detektion auf dem Film hervorruft. Der Blot wird vor der Substratzusetzung von ECL-Entwickler-Lösung noch dreimal 10 Minuten mit PBS-T gewaschen. Abschliessend wickelt man den Blot blasenfrei in Frischhaltefolie ein, gibt ihn in die Entwicklerkassette und legt je nach Signalstärke für eine bestimmte Zeit (Sekunden bis Stunden) den Film auf.

PBS-T-Lösung:

8,77 g NaCl

1,56 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

0,163 g KH₂PO₄

add 1 l H₂O dest. pH 7,4

Tween 20 (0,05 %)

2.22 Wachstumskurven von *S. aureus*-WT/-8325 bei verschiedenen Temperaturen

Zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens von Bakterienstämmen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen werden Wachstumskurven erstellt. Die Bakterienstämme werden in verschiedenen Nährmedien und bei unterschiedlichen Temperaturen kultiviert. Das Wachstumsverhalten eines Mutanten-Stammes unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kann bereits erste Hinweise zu einer möglichen Funktion des untersuchten Gens liefern. Zunächst wird eine ÜN-Kultur des Wildtyp-Stammes und der Mutante bei 37 °C angezüchtet und in 50 ml Medium soweit verdünnt bis eine OD_{600nm} von 0,015 eingestellt war. Anschließend wird das Wachstum über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Dazu werden in den ersten 10 h stündlich und nach 24 h 1 ml Proben entnommen und die OD bei 600 nm im Photometer bestimmt. Zur Kontrolle muss immer das Ausgangsmedium als Referenzwert mitgeführt werden. In

dieser Arbeit werden als Wachstumsmedien TSB und LB, sowie als Inkubationstemperaturen 30 °C, 37 °C und 42 °C gewählt.

2.23 Glucose-/NaCl-Wachstumskurven

Ähnlich der Testung des Wachstumsverhaltens von Bakterienstämmen in unterschiedlichen Medien und bei unterschiedlichen Temperaturen verläuft die Testung des Wachstums bei Zusatz von Glucose oder NaCl. Als Temperatur wählt man die, bei der das beste Wachstum ohne Zusätze erfolgte. Als Nährmedium das, bei welchem die Stämme das beste Wachstumsverhalten im Wachstumskurventest zeigten. Für die nachfolgenden Versuche wurden Kulturen bei 37 °C in LB-Medium angezüchtet. Wie unter 2.22 beschrieben, wird zunächst eine ÜN-Kultur angezüchtet und eine Anfangs-OD von 0,015 eingestellt. Man stellt durch Sterilfiltration eine 2 M sterile Glucoselösung her. Dazu löst man 79 g Glucose in 200 ml H₂O dest.. Nun pipettiert man 47,5 ml des LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben, gibt 2,5 ml der sterilfiltrierten Glucoselösung dazu und anschließend die für eine Ausgangs-OD von 0,015 benötigte Bakterienmenge. Nun werden die Bakterien bei 37 °C inkubiert und jede Stunde die OD bis zum Erreichen der späten stationären Phase („study-state“) mittels Photometer bestimmt. Für die Testung des Wachstumsverhaltens unter NaCl-Stress gibt man 50 ml des LB-Mediums in einen Erlenmeyerkolben, fügt 2,9 g NaCl für eine 1 M NaCl-Lösung hinzu und die nötige Bakterienmenge für die Ausgangs-OD von 0,015. Dieser Ansatz wird ebenfalls bei 37 °C inkubiert und jede Stunde bis zum Erreichen der späten stationären Phase das Wachstum gemessen. Abschließend vergleicht man das Wachstumsverhalten des Wildtyps mit dem der Mutante mit und ohne Zusätze bei 37 °C.

2.24 API-STAPH-Testung zur Charakterisierung von Staphylokokkenstämmen

API STAPH ist ein miniaturisiertes System zur Identifizierung von Staphylokokken und Mikrokokken mit Hilfe standardisierter biochemischer Reaktionen und einer spezifischen Datenbasis. Die verschiedenen Tests des API STAPH-Streifens liegen in dehydrierter Form vor. Die Auflösung erfolgt durch Zugabe des API STAPH-Mediums, das mit dem zu untersuchenden Bakterienstamm beimpft wurde. Der Bakterienstamm muss zuvor in einem geeigneten Medium gezüchtet werden. In jede Mulde des Teststreifens wird 1 ml API STAPH-Bakteriensuspension pipettiert. Die Mulden mit der Beschriftung ADH und URE werden mit ca. 1 ml Paraffinöl zur Herstellung anaerober Bedingungen überschichtet. Nach 18 - 24 Stunden Inkubation bei 37 °C erfolgt die Reaktionsauslösung mittels der untenstehenden Reagenzien und deren Ablesung bzw. Interpretation anhand der Herstellerangaben (*bioMérieux*, Nürtingen).

Reagenzien für diese Testung:

API STAPH-Medium: (6 ml im Set)	0,5 g Hefeextrakt 10 g Bactopepton 5 g NaCl 10 ml Spurenelemente add 1 l H ₂ O dest.
VP 1-Reagenz: (5 ml im Set)	40 g Kaliumhydroxid 100 ml H ₂ O
VP 2-Reagenz: (5 ml im Set)	6 g α -Naphthol 100 ml Ethanol
NIT 1-Reagenz: (5 ml im Set)	0,4 g Sulfanilsäure 30 g Essigsäure 70 ml H ₂ O

NIT 2-Reagenz: 0,6 g N,N-Dimethyl-1-Naphtylamin
 (5 ml im Set) 30 g Essigsäure
 70 ml H₂O

ZYM A-Reagenz: 25 g Tris-Hydroxymethyl-aminomethan
 (8 ml im Set) 11 ml 37 %-HCl
 10 g Na-Laurylsulfat
 100 ml H₂O

ZYM B-Reagenz: 0,35 g Fast Blue BB
 (8 ml im Set) 100 ml 2-Methoxyethanol

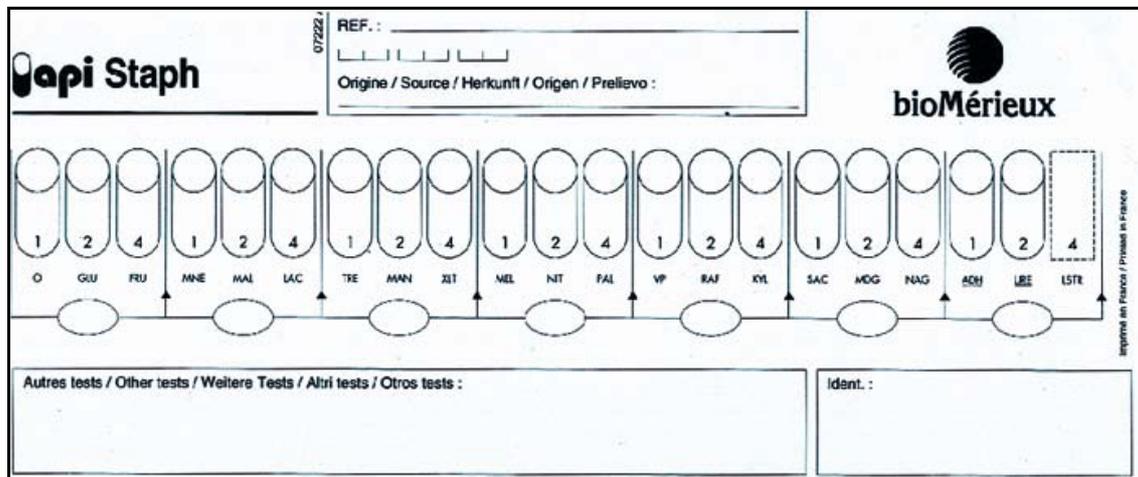


Abb. 2.4: API STAPH Auftrageschema und Auswertkärtchen

2.25 Herstellung von Magermilch- und Blutplatten zur Testung der Hämolyse und Proteolyse

Zur Feststellung des Hämolyse- und Proteolyseverhaltens von Staphylokokkenstämmen werden die Stämme auf Blutplatten und Magermilchplatten ausgestrichen. In Abhängigkeit von der Produktion von Hämolysinen und Proteasen erscheinen nach Inkubation durchscheinende Höfe um die Kolonien. Anhand der Größe der Lysehöfe

kann auf den Grad der Expression und damit Produktion von Hämolytinen und Proteasen geschlossen werden.

Blutplatten:

750 ml LB-Medium

250 ml Kaninchenblut

12 g Agar

Magermilchplatten:

750 ml LB-Medium

250 ml PBS/Magermilch (10 g Magermilch/100 ml PBS)

12 g Agar

2.26 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Zur Bestimmung der MHK eines Antibiotikums wird dieses zunächst in einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen und eine definierte Stammlösung hergestellt. Zuvor wurde über Nacht im 37 °C-Schüttler eine Bakterienlösung in einem geeigneten Medium angezüchtet. Die ÜN-Kultur wird auf 1 : 100 verdünnt und ca. 3 h auf eine OD_{600nm} von ca. 1,0 heranwachsen lassen. Diese Kultur wird 1 : 1000 verdünnt, so dass eine Bakteriensuspension mit einer Konzentration von ca. 10^6 Bakterien/ml vorliegt. In einer Reihe mit 13 Reagenzgläsern werden jeweils 0,5 ml Medium vorgelegt. In das erste Röhrchen werden dann 0,5 ml des Antibiotikums mit einer Konzentration von 1024 µg/ml gegeben, gut gemischt und davon 0,5 ml in das zweite Röhrchen überführt. Nach Mischen werden von dem zweiten Röhrchen 0,5 ml in das dritte Röhrchen pipettiert, wieder gemischt und in das nächste Röhrchen 0,5 ml überführt. Dieses Vorgehen wird bis zum 13. Röhrchen fortgesetzt, aus dem dann 0,5 ml verworfen werden. Nach Zugabe von 0,5 ml der Bakteriensuspension zu den 13 Röhrchen hat man nun eine Verdünnungsreihe von 256 µg/ml bis 0,0064 µg/ml vorliegen. Zusätzlich wird

eine Wachstumskontrolle ohne Antibiotikum mitgeführt. Nach 24 h Inkubation wird das Wachstum der Bakterien in den Röhren kontrolliert. Die geringste Konzentration des Antibiotikums bei der kein Bakterienwachstum mehr beobachtet werden konnte, ist die minimale Hemmkonzentration.

2.27 Lymphknotenverarbeitung

Ein entnommener Lymphknoten wird, wenn er nicht sofort nach Extraktion verarbeitet wird, in einer Petrischale mit RPMI-Medium übergossen. Ein Metallsieb wird auf einer neuen Petrischale vorbereitet. Der Lymphknoten wird mit einem Skalpell zerkleinert und in das Sieb gelegt. Darüber gießt man RPMI-Medium und versucht das zerstückelte Gewebe durch das Sieb zu pressen. Die durchgesiebten Zellen werden in einem 50 ml-Röhrchen mit RPMI aufgenommen und bei 1500 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellsediment erneut mit RPMI-Medium gewaschen und zentrifugiert. Dieser Vorgang wird je nach Fettgehalt des Gewebes wiederholt. Anschließend färbt man die Zellen und zählt sie in der Neubauer-Zählkammer aus; Lymphozyten stellen sich durch die Färbung blau dar und Erythrozyten rot. Die Zellzahl wird auf 10^7 eingestellt, d. h. auf 2 ml $2 - 5 \times 10^6$ Zellen/ml. Die Einfrierröhrchen werden auf Eis bereitgestellt. Das Sediment wird mit soviel RPMI-Medium gelöst, dass in jedes Röhrchen 1 ml der Zelllösung verteilt werden kann. Hierzu gibt man 10 % FCS (Fötale Kälberserum) und gibt die Röhrchen auf Eis. Vor dem Einfrieren gibt man zum Schutz der Zellen vor Gefrierschäden vorsichtig tröpfelnd 10 % DMSO in die Röhrchen.

2.28 Isolierung mononukleärer Blutzellen (Ficoll-Gradient)

Die einzelnen Zellen im Blut besitzen unterschiedliche Dichte. Man kann sie daher durch Hilfe eines Dichtegradienten voneinander trennen. Zur Isolierung der

mononukleären Zellen (wie Lymphozyten und Monozyten) aus dem Blut, hat sich die Ficoll-Lösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml bewährt. Diese fertige Trennlösung besteht aus dem Polydextran Ficoll mit einem Molekulargewicht von 400 kD und Natrium-Amidotrizoat. Die Lösung dieser beiden Komponenten ermöglicht die niedrige Viskosität des Trennmediums. Die Dichte von 1,077 g/ml ist höher als die Dichte der mononukleären Zellen, jedoch geringer als die Dichte von Erythrozyten und Granulozyten. Bei der Zentrifugation wandern die Erythrozyten und Granulozyten durch die Ficoll-Schicht nach unten und setzen sich am Boden des Zentrifugationsröhrchens ab. Die Lymphozyten reichern sich stattdessen zwischen dem Blutplasma und der Ficoll-Schicht in der sogenannten Interphase an.

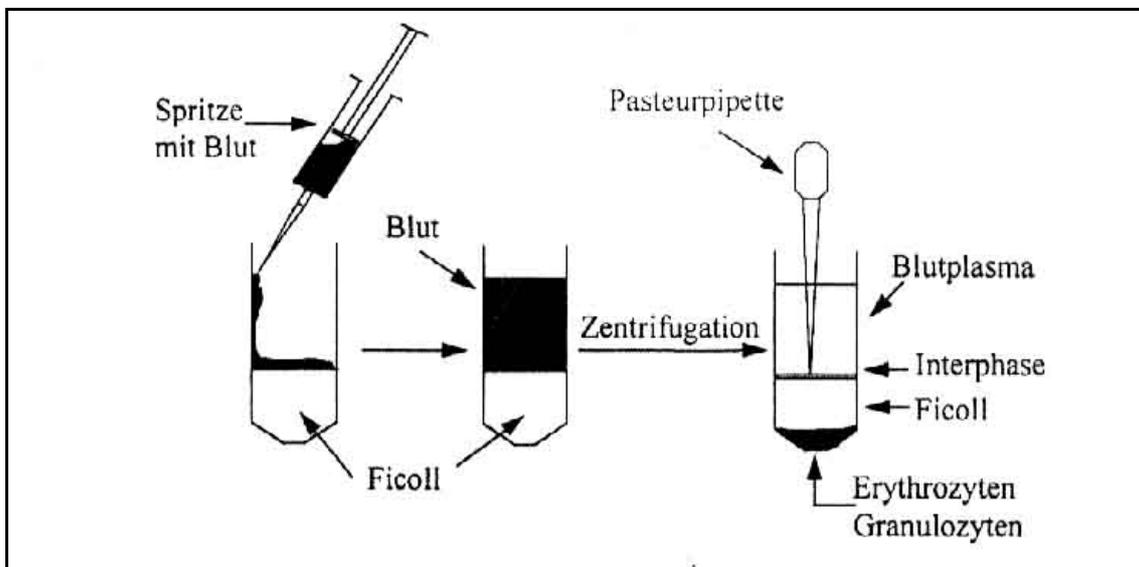


Abb. 2.5: Schematische Darstellung zur Gewinnung mononukleärer Zellen durch Dichtegradienten-Zentrifugation mittels Ficoll-Gradienten

In einem 50 ml Röhrchen werden stets unter sterilen Bedingungen je 25 ml des EDTA-Blutes mit 25 ml PBS vermischt. 30 ml des so verdünnten Blutes werden mit Hilfe einer Spritze aufgezogen und vorsichtig gegen den Rand eines 50 ml-Röhrchens ausgedrückt, in welchem sich 15 ml Ficoll-Lösung befinden. Das Blut sollte sich auf der Oberfläche der Ficoll-Lösung verteilen und nicht vermischen. Die je nach verwendeter Blutmenge vorhandenen Röhrchen werden 20 Minuten bei 980 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dieser Dichtegradienten-Zentrifugation werden die mononukleären Zellen vorsichtig aus der Interphase mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein neues

50 ml-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wird mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, mehrmals geschwenkt und erneut 10 Minuten bei $365 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt oder abgekippt. Die Zellen bilden das helle Sediment am Grund des Röhrchens. Sie werden vorsichtig in 1 ml PBS resuspendiert und mit 50 ml PBS erneut gewaschen und 5 Minuten abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes werden die Zellen in 1 ml Gewebekulturmedium RPMI aufgenommen und mittels Neubauer-Zählkammer die vorhandene Zellzahl bestimmt. Dazu werden 20 μl Zellsuspension mit 100 μl 5 %-Essigsäure vermischt und 20 μl davon in die Zählkammer gegeben. Anhand der neun großen Quadrate am Boden der Kammer kann die Zellzahl ermittelt werden. Jedes Quadrat hat eine Fläche von 1 mm^2 , d. h. bei einer Tiefe von 0,1 mm hat man ein Volumen von 0,1 μl . Man zählt die Zellen der 4 äußeren Quadranten und errechnet den Mittelwert daraus. Der Mittelwert wird mit 10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten. Zusätzlich muss man den Verdünnungsfaktor von 6 in Essigsäure bedenken. Abschließend werden die Zellen auf eine Konzentration von $5 \times 10^6/\text{ml}$ mit RPMI + fötales Kälberserum + DMSO vorsichtig eingestellt und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ weggefroren. Das DMSO schützt die Zellen vor Eisschäden.

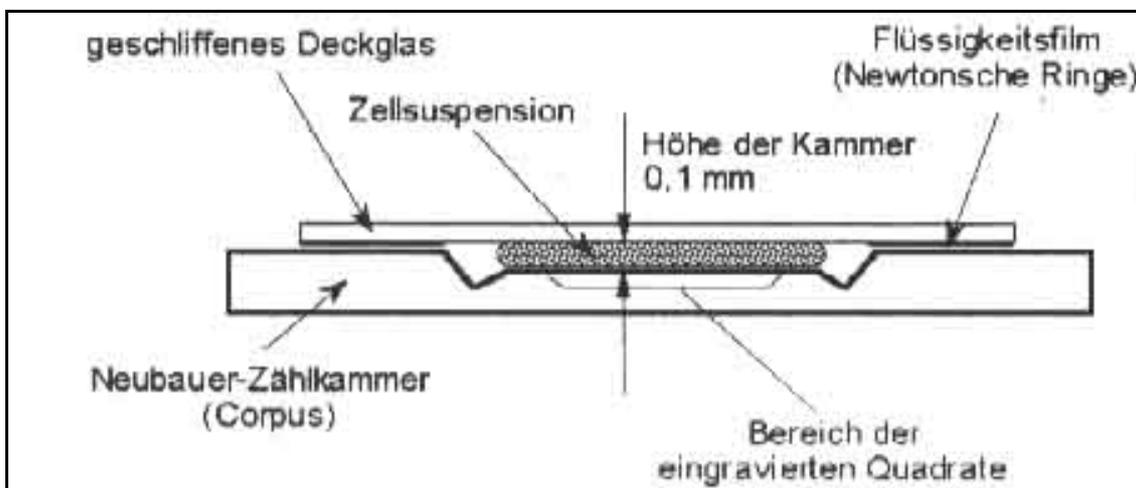


Abb. 2.6: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer zur Bestimmung der Zellzahl

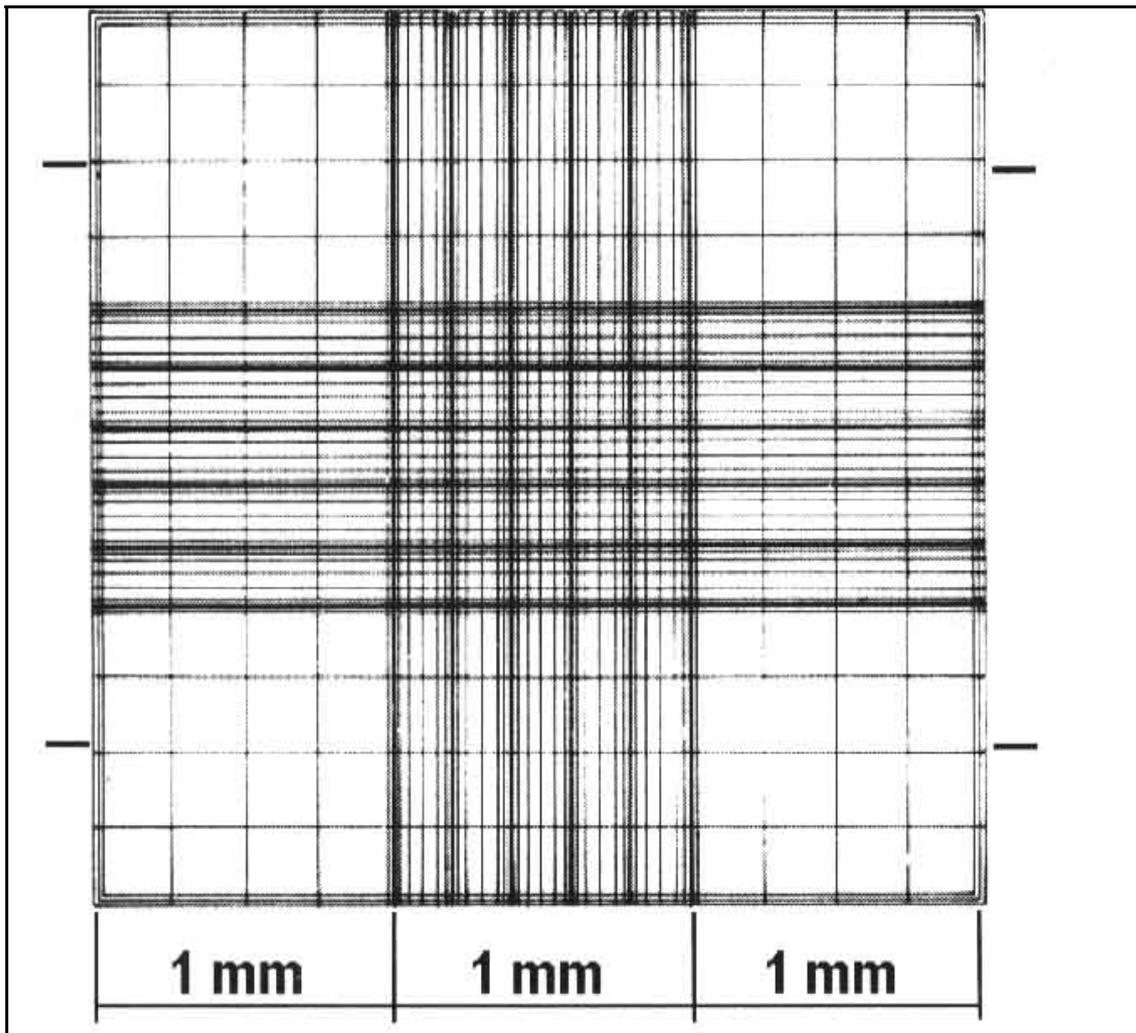


Abb. 2.7: Vergrößerte Darstellung des Zählfeldes einer Neubauer-Zählkammer zur Auszählung von Zellen

2.29 Zellfusion zur Herstellung monoklonaler Antikörper

Für die Fusion zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper wurde die Heteromyelom-Zelllinie HAB-1 eingesetzt. HAB-1-Zellen gingen aus einer Fusion zwischen der murinen Myelomzelllinie Ag8 und humanen Lymphozyten eines malignen B-Zelllymphoms hervor (Faller et al., 1990). Durch Fusionen zwischen HAB-1 Zellen und lymphatischem Gewebe aus dem Menschen konnten bereits stabil humane monoklonale Antikörper produzierende Klone hergestellt werden (Vollmers, 1998,

2002). Für die Fusion wird zunächst PEG (Polyethylenglykol), welches die Zellen geschmeidig macht, in ein Wasserbad mit 37 °C gestellt. In der Zwischenzeit taut man das gewünschte Fusionsgewebe (Lymphknotenmaterial, Blutlymphozyten, Milzzellen) auf. Die aufgetauten Lymphozyten werden in 10 ml RPMI gewaschen und 5 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert. Das DMSO/FCS, welches die Zellen vor Stickstoffschäden beim Einfrieren schützte, wird dabei entfernt. Das gewonnene Sediment wird erneut mit 10 ml RPMI-Medium gelöst. Vor der Fusion zählt man sowohl die HAB-1-Zellen als auch die Lymphozyten erneut aus, um ein optimales Verhältnis von 1 : 3 für die Fusion herzustellen. Danach werden die Zellen erneut abzentrifugiert. Anschließend pipettiert man die beiden Zellpopulationen zusammen und zentrifugiert sie 8 Minuten bei 1500 rpm. Nun bereitet man die 24-well-Fusionsplatten vor, indem man 1 ml HAT-Medium in jedes well vorpipettiert. Das HAT-Medium (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin) gestattet die Selektion von spezifischen Fusionszellen, da die Heteromyelom-Zelllinie über einen Gendefekt in dem Enzym HPGRT (Hypoxanthin-Guanin-Phospho-Ribosyl-Transferase) verfügt, ist eine Neusynthese von Nukleotidbausteinen in Anwesenheit von Aminopterin über den sogenannten „salvage pathway“ blockiert. Somit können nur Wildtyp-Zellen und Fusionszellen wachsen. Da die fusionierten Zellen sich stetig teilen, überwachsen diese die Wildtyp-Zellen und es können spezifische, Antikörper produzierende Zellen selektioniert werden. In jedes well werden 1×10^6 Zellen pipettiert. Dazu wird das Sediment mit dem auf 37 °C erwärmten PEG sehr vorsichtig in einem 25 ml-Röhrchen gelöst. 0,1 ml PEG werden dabei auf 10^7 Zellen langsam und behutsam unter leichtem Schwenken des Röhrchens dazugetropft. Anschließend gibt man das Gemisch 90 Sekunden ins 37 °C-Wasserbad. Vorsichtig füllt man die Röhrchen mit 2×10 ml RPMI-Medium auf. Das Zellgemisch wird bei 1500 rpm erneut 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und mit HAT-Medium gelöst. 0,5 ml des HAT-Zell-Gemischs wird in jedes well hinzupipettiert und anschließend der Fusionsansatz in den 37 °C-Brutschrank gestellt. Wichtige Voraussetzung beim Umgang mit menschlichen Zellen ist das stets sterile Vorgehen, um Verunreinigungen, welche das Wachstum stören könnten, zu vermeiden. Nach ca. 1 - 3 Wochen kann man das erste Wachstum der Hybridomzellen und somit die erfolgreiche Fusion beurteilen. Dazu achtet man auf ein klares Medium und die relativ großen Hybridomzellen. Bei unsauberem Arbeiten

kann sich das Medium durch Bakterien- oder Pilzwachstum trüb-flockig verändern. Nach jeder Woche findet ein Mediumwechsel statt. Dazu werden vorsichtig 1 ml vom oberen well-Rand abgesaugt und 1 ml neues HAT-Medium vorsichtig hinzugegeben. Das Medium verändert während dieser Zeit auf Grund der pH-Änderung durch das Zellwachstum seine Farbe von pink über orange und kurz vor Testung der Hybridomzellen auf monoklonale Antikörperproduktion zu gelb. Die Testung auf monoklonale Antikörperherstellung erfolgt mittels ELISA.

2.30 ELISA (Enzyme-linked immunosorbend assay oder enzymgekoppelter Test der immunologischen Wechselwirkungen)

Durch die hochselektiven Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Antigen können wahlweise, je nach Versuchsanordnung, quantitative oder qualitative Bestimmungen von spezifischen Antikörpern oder Antigenen vorgenommen werden. In unserem Fall zur Identifizierung von monoklonalen Antikörpern gegen IsaA. Nach der Herstellung der benötigten Puffer (Natrium-Bicarbonat pH 9,6; PBS und PBS-T pH 7,4; ABTS-Citrat-Phosphat pH 4,2) wird die Proteinlösung zur Beschichtung der Mikrotiterplatten („Coating“) erstellt.

Natrium-Bicarbonat-Puffer pH 9,6:

1,59 g Na_2CO_3
2,93 g NaHCO_3
add 1 l H_2O dest.

PBS-Lösung:

8,77 g NaCl
1,56 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
0,163 g KH_2PO_4
add 1 l H_2O dest. pH 7,4

PBS-T-Lösung:

8,77 g NaCl

1,56 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

0,163 g KH₂PO₄

add 1 l H₂O dest. pH 7,4

Tween 20 (0,05 %)

ABTS-Citrat-Puffer:

70 mM Citrat-Phosphat-Puffer, pH 4,2

Lösung A = 0,1 M anhydrous citric acid (19,21 g/l)

Lösung B = 0,2 M Na₂Phosphat. 7 H₂O (53,65 g/l)

Für 500 ml Puffer werden 147 ml Lösung A und 103 ml Lösung B gemischt und auf 500 ml mit destilliertem H₂O aufgefüllt.

274 mg ABTS (2,2'-azino-di-3ethylbenzthiazoline sulfonic acid) werden zu diesem Puffer zugegeben (= 1 mM ABTS).

Diese Substratlösung ist bei 4 °C im Dunkeln stabil. Unmittelbar vor Zugabe des Substrates zum Assay muß man zum Starten der Substratreaktion 1 µl 30 % H₂O₂ pro ml ABTS-Substratlösung hinzufügen, sonst findet keine Reaktion statt.

IsaA wird im Verhältnis von 10 µg/ml (1 : 10) und 2 µg/ml (1 : 50) mit Natriumbicarbonatpuffer verdünnt. Jeweils 100 µl dieser verdünnten Proteinlösung werden in die 96 wells der ELISA-Mikrotiterplatten pipettiert. Zur Kontrolle werden die Randwells nur mit Natriumbicarbonatpuffer beschichtet. Die Mikrotiterplatten werden mit passenden Deckeln oder Folie abgedeckt und in einer feuchten Kammer (verschießbare Box mit destilliertem Wasser beschichtet) drei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank (2 - 6 °C) inkubiert. Die Proteinlösung soll sich dabei an die feste Phase adsorbieren. Sie besteht meist aus Cellulose, quervernetzte Dextrane, Polyacrylamid, Polystyrol oder Polypropylen. Anschließend wird das ungebundene Antigen durch schnelles Drehen der Platten,

kräftiges Ausschlagen der Platten auf Papiertücher und dreimaligem Ausspülen der 96 wells mit 300 µl PBS-T entfernt. Getrocknet sind diese vorbereiteten Platten im gefrorenen Zustand auch länger aufbewahrbar. Zur Absättigung reaktiver Gruppen und zur Senkung unspezifischer Bindungen werden alle 96 wells mit 300 µl Blockierungspuffer (entweder 3 % BSA in PBS-T oder 5 % Magermilchpulver in PBS-T) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder mit dreimal 300 µl PBS-T gewaschen. In der Zwischenzeit kann der Primär-/Serumantikörper hergestellt werden. Dazu wird eine serielle Verdünnungsreihe der gewünschten Seren ausgehend von einer 1 : 50-Verdünnung angefertigt (1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800, 1 : 1600, 1 : 3200, 1 : 6400, 1 : 12800, 1 : 25600, 1 : 51200). Die Verdünnungen sollen gut gevortext und bis zur Verwendung auf Eis gelagert werden. 100 µl dieser Antiserenverdünnungen werden dann von links nach rechts in die jeweiligen wells pipettiert (je eine komplette Reihe zur anschließenden Kontrolle und Ermittlung des Mittelwertes – Detektion von „Ausreißern“) und eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Es erfolgt anschließend wieder eine dreimalige Waschung der wells mit 300 µl PBS-T. Nun werden 100 µl des mit einem Enzym gekoppelten Sekundärantikörper (in dieser Arbeit mit Peroxidase gekoppelt) in einer Verdünnung von 1 : 1000 mit PBS-T aufgetragen. Dabei ist es wichtig, den Antikörper zu verwenden, welcher auch der Spezies des Primärantikörpers entspricht und die Fähigkeit besitzt, alle Ig-Klassen zu erkennen, da man noch nicht weiß, welcher Klasse der Serumantikörper entspricht (IgA, IgM oder IgG). Die Inkubation erfolgt eine Stunde bei Raumtemperatur. Auch der Sekundärantikörper wird wieder dreimal mit je 300 µl PBS-T ausgewaschen. Die Entwicklung des Assays erfolgt mit 100 µl ABTS-Substratlösung und Zugabe von H₂O₂ (pro 1 ml ABTS 1 µl H₂O₂). Bei positiver Reaktion entsteht eine blaue Farbe im well. Nach ca. 30 Minuten kann man die Reaktion am ELISA-Reader bei einer OD von 405 nm messen. Die Reaktion braucht nicht gestoppt zu werden, man muß aber bedenken, dass es zu einer Verfälschung der Werte durch Messung an unterschiedlichen Zeitpunkten kommen kann.

III. Ergebnisse

1. Entwicklung und Optimierung eines ELISA-Verfahrens für den Nachweis von IsaA und anti-IsaA-spezifischen Antikörpern

1.1 Auswahl geeigneter Antigenbeschichtungskonzentrationen

Zunächst wurden verschiedene IsaA-Proteinlösungen aus gereinigtem IsaA und Natriumbikarbonatpuffer in verschiedenen Konzentrationen hergestellt, um die optimale Beladung der Festphase mit IsaA für den ELISA-Test zu ermitteln. Es galt die Konzentration an Antigen zu determinieren, die 50 - 90 % vom Maximum des Substratumsatzes ergeben, gemessen durch die optische Dichte bei 405 nm. Die Mikrotiterplatten werden in der Regel mit niedrigen Proteinkonzentrationen von 0,5 µg/ml - 10 µg/ml beschichtet (Grol and Schulze, 1990). Begonnen wurde mit den Beschichtungskonzentrationen 2 und 10 µg/ml, die durch eine 1 : 10-Verdünnung (1 ml IsaA mit einer Konzentration 20 µg/ml und 9 ml Natriumbikarbonatpuffer) und 1 : 50-Verdünnung (0,2 ml IsaA, 20 µg/ml, und 9,8 ml Natriumbikarbonat) als Antigenbeschichtung der ELISA-Platten hergestellt wurden. Die Auswirkungen auf den Test wurden mit unterschiedlichen Kaninchen-Seren in verschiedenen Konzentrationen (1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800, 1 : 1600, 1 : 3200, 1 : 6400, 1 : 12800, 1 : 25600, 1 : 51200) als Primärantikörper ermittelt. Als Sekundärantikörper diente ein HRP-gekoppelter Antikörper, der im Verhältnis 1 : 1000 mit PBS-T-Lösung verdünnt, eingesetzt wurde. Die Einstellungen am ELISA-Reader waren wie folgt: W/L-Modus: DUAL, Testfilter: 405 nm, Referenzfilter: 630 nm.

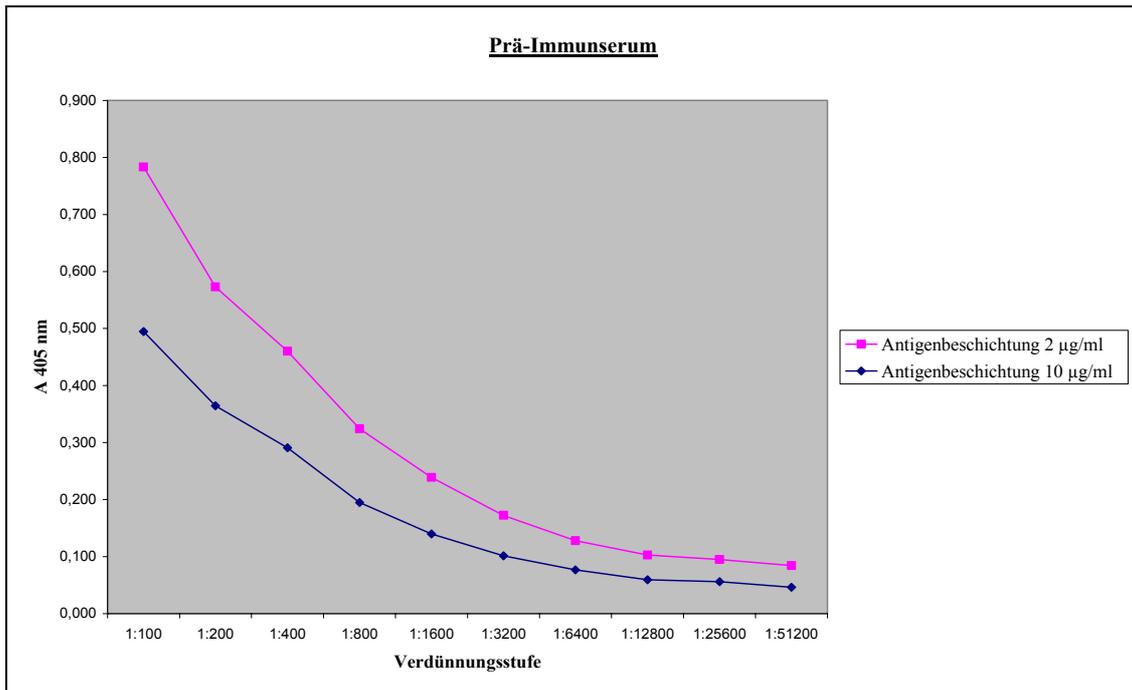


Abb. 3.1: Bestimmung der Anti-IsaA-spezifischen Aktivität des Kaninchenserums vor der Immunisierung mit IsaA im ELISA. Die Mikrotiterplatten wurden mit zwei verschiedenen Antigenkonzentrationen (2 und 10 µg/ml) beschichtet und mit verschiedenen Konzentrationen eines Kaninchenserums (Prä-Immuneserum = Serum vor der Immunisierung mit IsaA) inkubiert. Das Prä-Immuneserum zeigte bereits eine Anti-IsaA-spezifische Aktivität.

Um die Aktivitätszunahme der Kaninchenserum im Laufe der mehrmaligen Immunisierungsschritte besser quantifizieren zu können und um auch die kaninchen-eigene Grundimmunisierung mit IsaA zu erfassen, wurde zu Beginn der ELISA-Entwicklung auch, wie in Abb. 3.1 dargestellt, die Aktivität des Prä-Immuneserums im ELISA getestet.

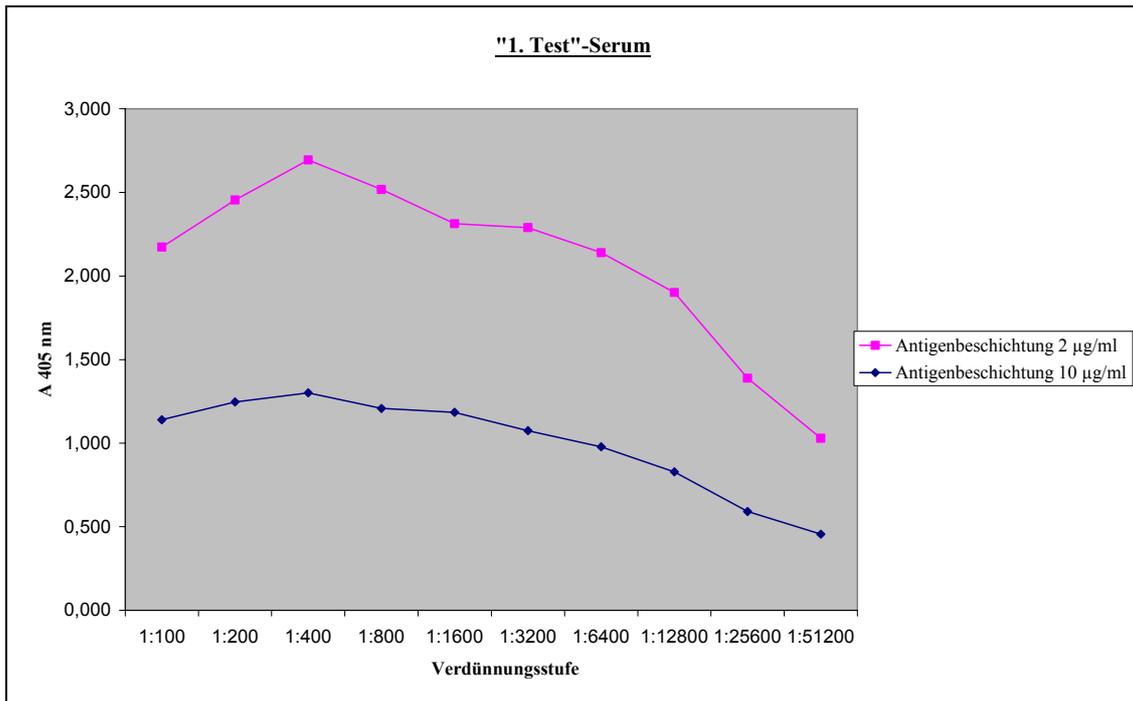


Abb. 3.2: Titration des Anti-IsaA Antiserums zur Bestimmung der optimalen Verdünnungsstufe für den ELISA-Test. Die Mikrotiterplatten wurden mit zwei verschiedenen Antigenkonzentrationen (2 und 10 µg/ml) beschichtet und mit verschiedenen Konzentrationen eines Kaninchenserums („1. Test“-Serum = Serum nach der ersten Immunisierung mit IsaA) inkubiert. Das Anti-Serum wurde aus einem Kaninchen drei Wochen nach der Immunisierung mit ca. 0,5 mg IsaA gewonnen.

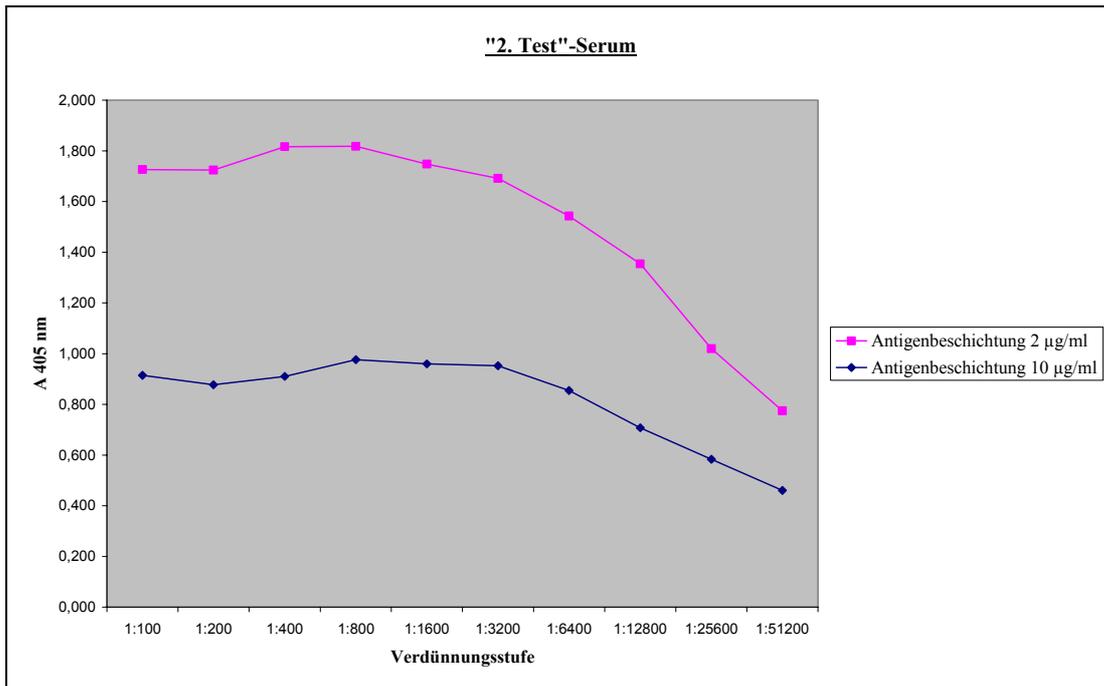


Abb. 3.3: Titration des Anti-IsaA Antiserums zur Bestimmung der optimalen Verdünnungsstufe für den ELISA-Test. Die Mikrotiterplatten wurden mit zwei verschiedenen Antigenkonzentrationen (2 und 10 µg/ml) beschichtet und mit verschiedenen Konzentrationen eines Kaninchenserums („2. Test“-Serum = Serum nach zweimaliger Antigengabe) inkubiert. Das Antiserum wurde aus einem Kaninchen sechs Wochen nach der Immunisierung mit zweimal ca. 0,5 mg IsaA gewonnen.

Aus den graphischen Gegenüberstellungen der beiden Antigenbeschichtungen der Mikrotiterplatten mit IsaA wurde ersichtlich, dass bei einer Antigenbeschichtung von 2 µg/ml IsaA die Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion durch ein ausgewogeneres Antigen-Antikörper-Bindungsverhältnis im ELISA deutlichere Absorptionsunterschiede als bei einer Beschichtungskonzentration von 10 µg/ml hervorgerufen werden.

Auf der Grundlage der erzielten Ergebnisse wurde für die nachfolgenden Optimierungsschritte eine Beschichtungskonzentration von 2 µg/ml IsaA-Proteinlösung gewählt (s. Abb. 3.4).

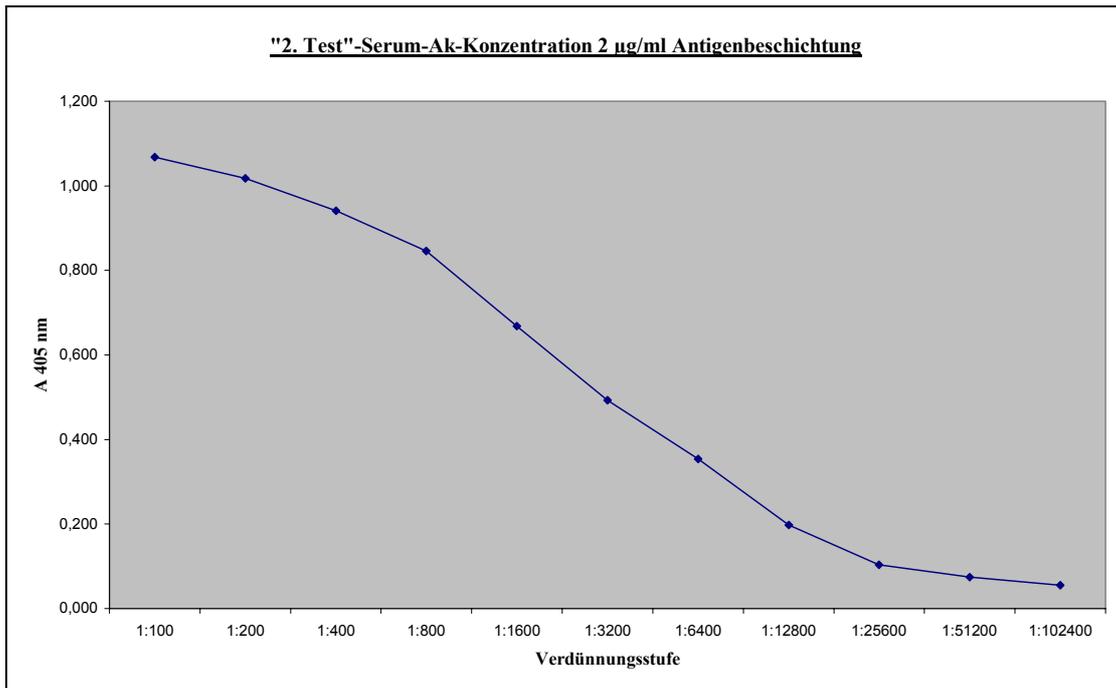


Abb. 3.4: Bestimmung der optimalen Antikörperverdünnung für eine IsaA-Detektion im ELISA. Die Mikrotiterplatten wurden mit 2 µg/ml IsaA beschichtet und mit einem Kaninchen-anti-IsaA-AK („2. Test“-Serum) in 11 Verdünnungsstufen (1 : 100 bis 1 : 102400) inkubiert.

1.2 Optimale Konzentration des Primärantikörpers

Nachdem eine geeignete Festphasen-Beschichtungskonzentration bestimmt wurde, konnte anschließend die optimale Verdünnungsstufe des Primärantikörpers ausgetestet werden. Dazu wurden in den folgenden Tests die Mikrotiterplatten mit der Antigenkonzentration 2 µg/ml (1 : 50) beschichtet und die zu testenden Seren in einer seriellen Verdünnungsreihe von 1 : 100 bis 1 : 51200 aufgetragen. Es galt die Antikörperkonzentration zu ermitteln, bei der die Antigenbindung ein außerhalb des Sättigungsbereiches liegendes starkes Signal bei OD_{405 nm} ergibt und im Vergleich zur Prä-Immuserumkontrolle einen möglichst großen Unterschied lieferte.

Wie in Abb. 3.5 zu erkennen, konnte bei einer Serumverdünnung von 1 : 6400 und 1 : 51200 ein deutlicher Signalunterschied zum Prä-Immuserum und zu einem Negativ-Kontrollserum ermittelt werden.

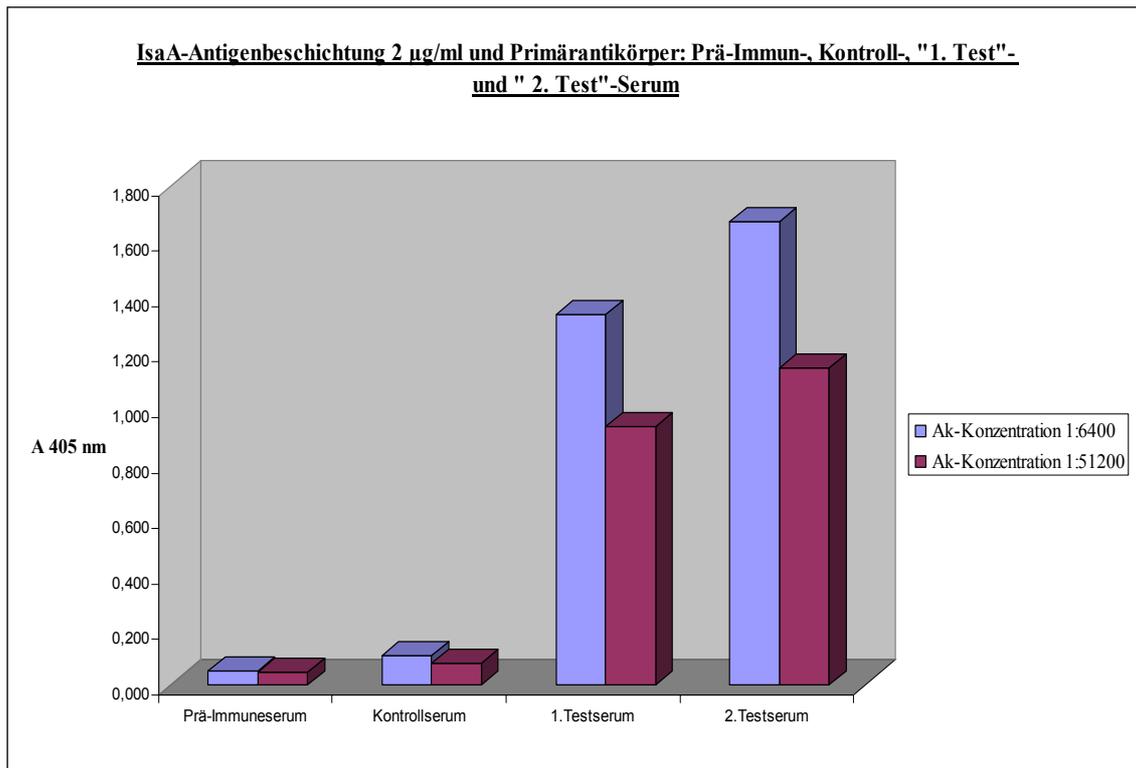


Abb. 3.5: Anti-IsaA-spezifische Aktivität verschiedener Kaninchenserum bei einer Beschichtungskonzentration von 2 µg/ml IsaA. Die verwendeten Seren wurden jeweils 1 : 6400 und 1 : 51200 verdünnt. Es wurden folgende Seren im ELISA getestet: Prä-Immuneserum vor Immunisierung, Kontroll-Serum gegen ein nicht verwandtes Enterokokken-Antigen, „1. Test“-Serum nach einmaliger Antigengabe und „2. Test“-Serum nach zweimaliger Antigengabe.

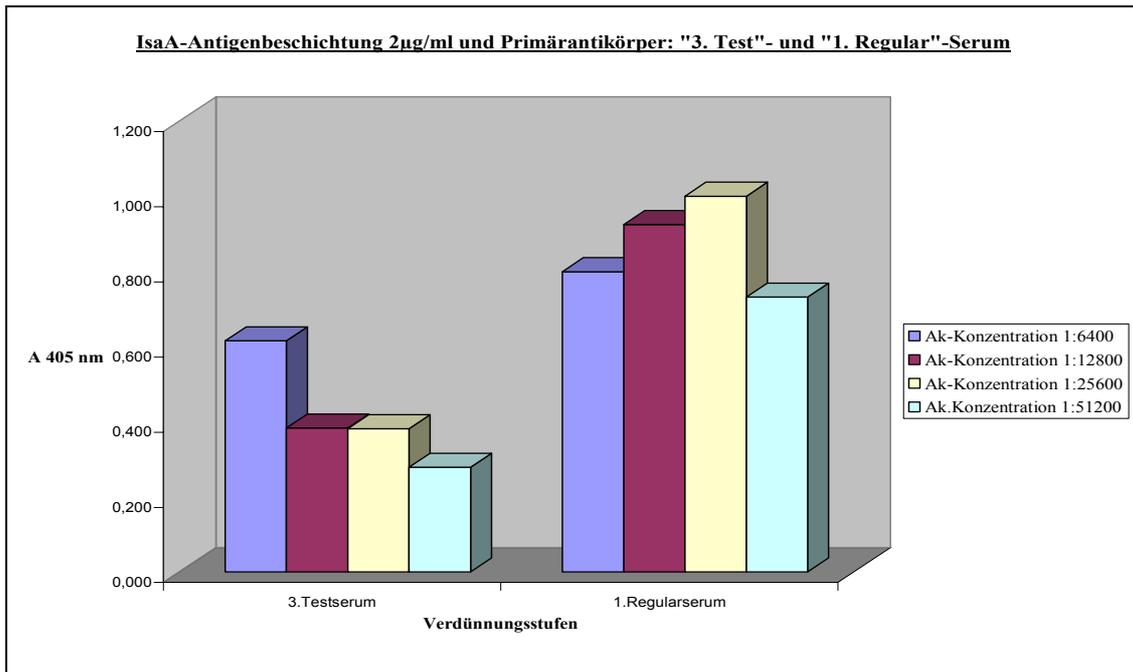


Abb. 3.6 : Anti-IsaA-spezifische Aktivität verschiedener Kaninchenseren bei einer Beschichtungskonzentration von 2 µg/ml IsaA. Die verwendeten Seren wurden jeweils 1 : 6400, 1 : 12800, 1 : 25600 und 1 : 51200 verdünnt. Es wurden folgende Seren im ELISA getestet: „3. Test“-Serum (=Serum nach dreimaliger Antigengabe) und „1. Regular“-Serum (=größere Serumabnahme nach dreimaliger Antigengabe).

Im weiteren Verlauf der Immunisierungen wurden die Kaninchenseren für die ELISA-Testung noch höher verdünnt, wie in Abb. 3.7 zu erkennen ist.

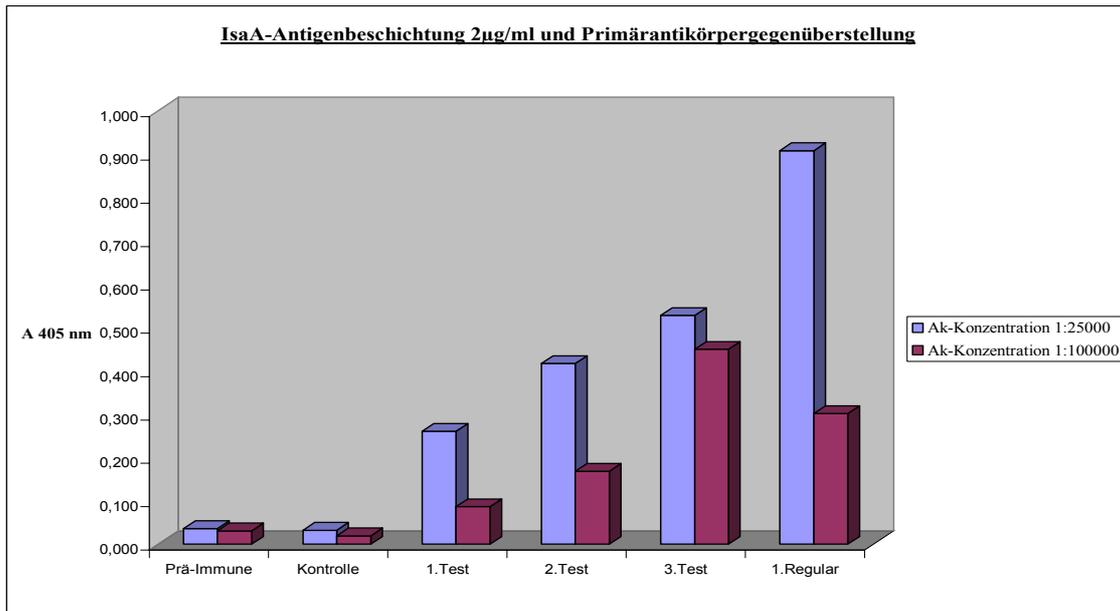


Abb. 3.7: Anti-IsaA-spezifische Aktivität verschiedener Kaninchenseren bei einer Beschichtungskonzentration von 2 µg/ml IsaA. Die verwendeten Seren wurden jeweils 1 : 25000 und 1 : 100000 verdünnt. Es wurden folgende Seren im ELISA getestet: Prä-Immunsrum (=Serum vor Immunisierung), Kontroll-Serum (=Serum gegen ein nicht verwandtes Enterokokken-Antigen), „1. Test“ (=Serum nach einmaliger Antigengabe), „2.Test“ (=Serum nach zweimaliger Antigengabe), „3. Test“ (=Serum nach dreimaliger Antigengabe) und „1.Regular“ (=größere Serumabnahme nach dreimaliger Antigengabe)

Wie aus den Abb. 3.5 bis 3.7 zu erkennen ist, treten zwischen den Konzentrationen 1 : 6400 und 1 : 100000 die besten Absorptionsunterschiede auf. Daher sollte für die Anwendung des ELISAs eine Antikörperkonzentration in diesem Intervall zur Gewinnung von optimalen Ergebnissen gewählt werden.

Zusätzlich wurde eine Anti-IsaA-spezifische Aktivität bei weiteren Kaninchenseren untersucht (vgl. Abb. 3.8). Da bereits das Prä-Immunsrum eine relativ starke Reaktion gegen das IsaA-Antigen zeigte (vgl. Abb. 3.1), sollten diese Untersuchungen Klarheit erbringen, ob bei Kaninchen generell mit einer Kreuzreaktivität von Nullseren zu rechnen ist. Die Seren wurden von der Firma Immuno-Globe Antikörpertechnik GmbH (Großostheim) zur Verfügung gestellt und von Tieren unterschiedlichen Alters gewonnen. Die Seren wurden in einer Konzentration von 1 : 200 im optimierten ELISA getestet.

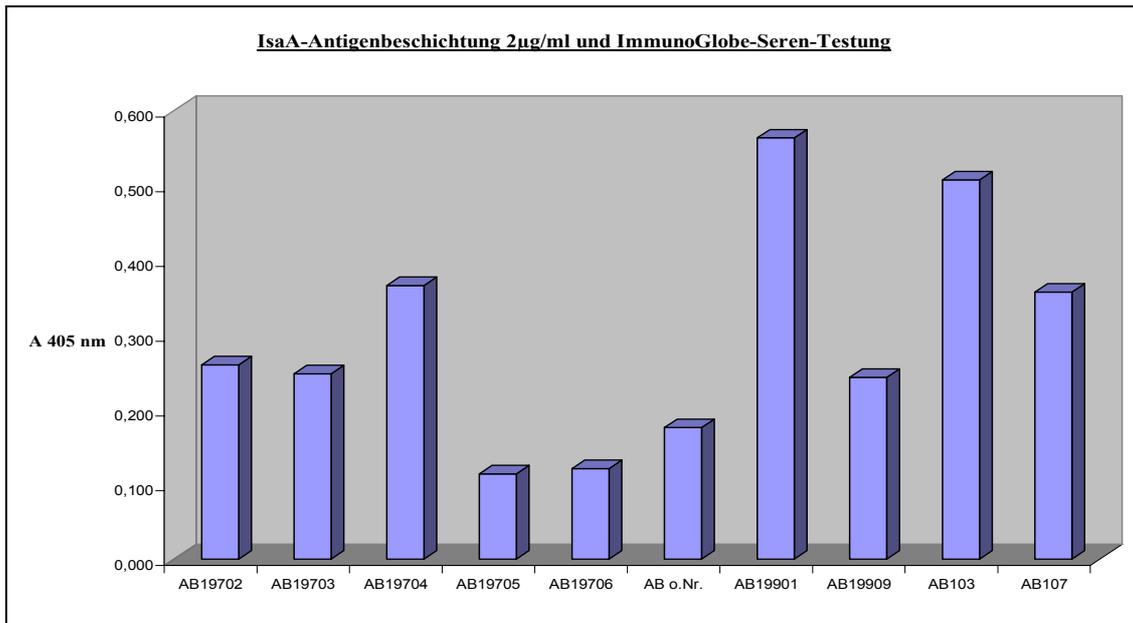


Abb. 3.8 : Anti-IsaA-spezifische Aktivität verschiedener Kaninchenserum bei einer Beschichtungskonzentration von 2 µg/ml IsaA. Es wurden Seren der Firma immunoGlobe® verwendet, um eine generelle Kreuzreaktion von Nullseren zu ermitteln. Die Kaninchen waren dabei unterschiedlichen Alters.

Die erste Säule in Abb. 3.8 zeigt die Reaktion des Kaninchenserums AB19702 eines ca. 1 Jahr alten Kaninchens. Die zweite Säule zeigt ebenfalls die Reaktivität des Serums eines ca. 1 Jahr alten Kaninchens AB19703 an. Die dritte Säule stellt das Serum eines 5 Monate alten Kaninchens AB19704 dar. Die vierte Säule spiegelt die Reaktivität des Serums eines 6 Monate alten Kaninchens AB19705 wider. Bei der fünften Säule handelt es sich wieder um die Aktivität des Serums eines einjährigen Kaninchens AB19706. Die sechste Säule, mit dem Kaninchenserum ohne Nummer, zeigt die Reaktion eines sehr jungen Kaninchens von 2,5 Monaten. Säule 7 zeigt die Aktivität des Serums des ältesten Kaninchens mit 2,5 Jahren AB19901. Säule 8 und 9 zeigen die Reaktion der Kaninchenserum der 21 Monate alten Kaninchen AB19909 und AB1-103. Die letzte Säule spiegelt die Reaktivität des Serums eines 5 Monate alten Kaninchens AB1-107 wider. Aus diesen Untersuchungen wurde deutlich, dass mit zunehmendem Alter der Tiere eine erhöhte Reaktivität gegen IsaA vorlag. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Kaninchen im Verlaufe ihres Lebens entweder mit *S. aureus* in Kontakt kommen oder mit einem Erreger, der zu einer Kreuzreaktivität beiträgt.

Weiterhin wurde das etablierte ELISA-System eingesetzt, um verschiedene humane Seren aus septikämischen Patienten zu untersuchen. Die Mehrzahl der Patientenserum stammten von Patienten mit einer nachgewiesenen *S. aureus*-Sepsis, jedoch hatten diese eine deutlich eingeschränkte Immunlage. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abb. 3.9 dargestellt. Primär reagierten alle Patientenserum im ELISA. Die Absorptionskurven zeigen einen ähnlichen Verlauf hinsichtlich der AK-Konzentrationen. Patient 2 zeigte im Vergleich zu den beiden anderen Patienten jedoch die stärkste Reaktion im ELISA. Bei ihm wurden die maximalen Absorptionswerte erzielt. Dies lässt vermuten, dass dieser Patient mit einer adäquaten Immunantwort auf die Infektion mit MRSA reagiert. Interessanterweise lag bei diesem Patienten eine Myelodysplasie vor, bei welcher das körpereigene Immunsystem deutlich geschwächt ist, daher würde man eigentlich eine geringere Immunantwort erwarten. Zieht man eine Parallele zu den Tierversuchen, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Patient, was aufgrund seiner geschwächten Immunlage denkbar wäre, schon früher Kontakt mit MRSA hatte und daher eine Boosterung stattgefunden hat.

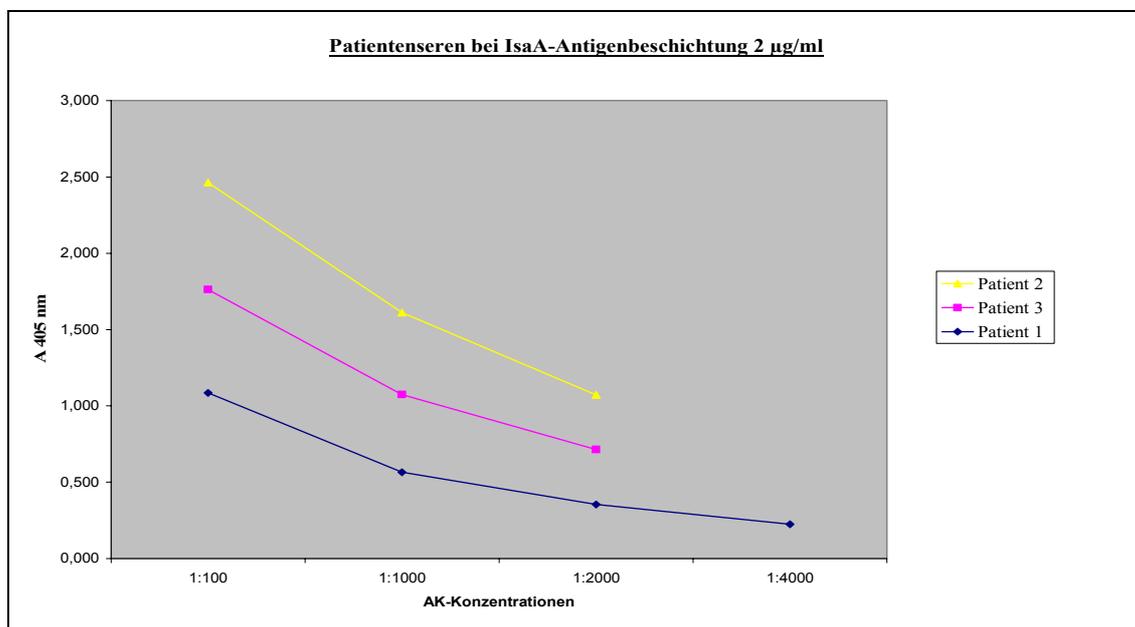


Abb. 3.9: Anti-IsaA-spezifische Aktivität humaner Patientenserum bei einer Beschichtungskonzentration von 2 µg/ml IsaA. Es wurden Patientenserum verwendet, welche eine *S. aureus*-Sepsis aufwiesen. Patient 1 mit „Initiale“ F (keine näheren Angaben), Patient 2 mit Myelodysplasie und Patient 3 mit den „Initialen“ ZF.

1.3 Optimiertes Protokoll zur Bestimmung einer Anti-IsaA-Aktivität in verschiedenen menschlichen Seren und in Tierseren

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, wurden die zuverlässigsten Resultate in dem erprobten ELISA für IsaA und den dazugehörigen Antikörper mit einer Festphasenbeschichtung von 2 µg/ml IsaA-Antigen (1 : 50 Verdünnung mit Natrium-Bicarbonat) erzielt. Das optimale Protokoll lautet wie folgt: Jedes well wird mit 100 µl einer Proteinlösung (20 µg/ml) beschichtet. Das Antigen sollte mindestens 3 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer oder noch besser über Nacht im Kühlschrank bei 2 - 6 °C inkubieren. Nach Entfernung ungebundenen Antigens durch kräftiges Ausschlagen der Platten und anschließendem dreimaligem Waschen der 96 wells der Mikrotiterplatten mit 300 µl PBS-T, können diese Platten nach Trocknung tiefgekühlt aufbewahrt werden. Führt man den ELISA fort, müssen auf allen wells vor Auftragung des Primärantikörpers je 300 µl 5 % Magermilchpulver/PBS-T zur Blockierung freier Adsorptionsstellen aufgetragen werden. Danach erfolgt eine zweimalige Waschung der 96 wells mit je 300 µl PBS-T. Der Primärantikörper sollte nach den oben erzielten Ergebnissen in einer Konzentration zwischen 1 : 6400 und 1 : 51200 gewählt werden, da hierbei die besten Unterschiede im ELISA-Reader zur Differenzierung der optimalen Antigen-Antikörperbindung ermittelbar sind. Optimal erscheint eine Verdünnungsstufe von 1 : 25000. Die Antikörperverdünnung erfolgt mit PBS-T. Die Mischungen sollten gut gevortext und bis zur Verwendung auf Eis gelagert werden. Es werden je 100 µl Primärantikörper pro well aufgetragen und entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank bei 2 - 6 °C inkubieren lassen. Danach erfolgt eine erneute dreimalige Waschung der wells mit je 300 µl PBS-T. Anschließend wird der Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper im Verhältnis von 1 : 1000 mit PBS-T verdünnt und wieder je 100 µl pro well aufgetragen. Auch er sollte 1 h bei Raumtemperatur inkubieren. Wichtig ist es hierbei, den speziesspezifischen Sekundärantikörper (humane oder tierische IgA, IgM, IgG oder alle Immunglobuline betreffend) zu verwenden und darauf zu achten, welche Antikörperklassen sich durch den Sekundärantikörper nachweisen lassen. Die Platten werden danach wieder dreimal mit PBS-T gewaschen. Nun erfolgt die Substratreaktion indem man dem Assay 100 µl ABTS/H₂O₂ je well zugibt. Wichtig ist, dass H₂O₂ erst unmittelbar zuvor mit dem

ABTS gemischt wird und diese Substratlösung sofort aufgetragen wird. Die anschließende Blaufärbung zeigt die positive Reaktion an. Nach ca. 30 Minuten sollte die Ablesung im ELISA-Reader bei einer OD von 405 nm erfolgen. Die Reaktion braucht nicht gestoppt zu werden, jedoch sollte der ELISA zur gleichen Zeit und optimal nach 30 - 40 Minuten abgelesen werden. Da die Reaktion nicht abgestoppt wird und weiter abläuft, ist bei dem Vergleich der absoluten Werte immer die Zeit der Inkubation der Substratlösung zu berücksichtigen, um keine Ergebnisverfälschungen zu erhalten.

2. Fusion

Neben der Etablierung eines optimierten ELISA für IsaA, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Gewinnung eines humanen monoklonalen Antikörpers gegen IsaA. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Würzburg, speziell mit Prof. Dr. med. H.-P. Vollmers und Frau Dr. S. Brändlein, sollte eine Fusion eines mit MRSA-infizierten Lymphknotens (2000/164038), gewonnen durch Dr. med. U. Lorenz aus der Chirurgie des Universitätsklinikums Würzburg, mit humanen Hybridomzellen, sogenannter HAB-Zellen, in RPMI-Medium stattfinden. Man erhoffte sich, daraus einen humanen Anti-MRSA-Antikörper zu erhalten, der gezielt für eine Therapie gegen den Problemkeim MRSA eingesetzt werden kann. In dieser Fusion sollte es zu einer Verschmelzung von humanen B-Lymphozyten und den HAB-Zellen kommen, wodurch stabile Antikörper produzierende Klone geschaffen werden sollten. Einmal pro Woche wurde das Wachstumsverhalten der Zellen kontrolliert und das RPMI-Medium gewechselt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C gehalten. Nach 2 - 6 Wochen sollte eine erste Aussage über die Entwicklung der Antikörper produzierenden Zellen möglich sein. Diese Zellen unterscheiden sich von anderen Zellen und Zellresten dadurch, dass sie größer sind und die unfusionierten Zellen durch ihr Wachstum verdrängen. Ab einer Zahl von ca. 100 Zellen pro Gesichtsfeld wurde ein unspezifischer ELISA, welcher lediglich die Produktion unspezifischer Antikörper vom Typ IgA, IgG und IgM anzeigt, zur

Erfolgstestung angewandt. Waren die Fusionszellen in der Lage, in irgendeiner Form Antikörper herzustellen, wurden diese auf ihre Spezifität bzgl. IsaA im oben beschriebenen optimierten ELISA weiter getestet. Leider waren die Ergebnisse aus der Fusion mit Lymphknoten stets negativ.

Aufgrund der operativ-invasiven und damit relativ schwierigen Materialgewinnung von MRSA-infizierten Lymphknoten verwendete man zu weiteren Fusionsversuchen B-Lymphozyten aus humanem Blut von Patienten mit einer im Blut nachgewiesenen MRSA-Infektion. Die B-Lymphozyten wurden mittels eines Ficoll-Gradienten von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Die anschließende Fusion und Weiterverarbeitung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die des Lymphknotens. Auch diese Versuche waren ohne Erfolg.

Grund für diese erfolglosen Fusionen könnte die unzureichende Anzahl von Antikörper produzierenden B-Lymphozyten im Blut bei immungeschwächten Patienten sowie die die meist nur lokal vorliegende Infektion oder die ledigliche Bakteriämie bei MRSA-infizierten Patienten sein. Dadurch bliebe eine adäquate Immunreaktion mit ausreichender Zahl funktionstüchtiger B-Lymphozyten, welche in der Lage wären, Antikörper zu produzieren, aus. Nach mehreren gescheiterten Fusionsversuchen und unzureichender Menge lymphatischen Gewebes bzw. Zellen MRSA-septischer Patienten wurde die Entwicklung eines humanen monoklonalen Antikörpers in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

3. Ermittlung der Spezifität von IsaA anhand der Auftrennung von Proteinfractionen verschiedener Bakterienstämme und Detektion mittels Immunoblottings

Um zu ermitteln, ob das aus *S. aureus* isolierte Protein IsaA spezifisch für das Bakterium *S. aureus* ist oder ob es auch noch von anderen Bakterienarten exprimiert wird, wurden verschiedene Bakterienstämme, vor allem unterschiedliche *S. aureus*-Stämme, aber auch andere Bakterienarten, im Westernblot untersucht.

Es kamen folgende *S. aureus*-Stämme zum Einsatz: Von der Firma Intervet *S. aureus*-Stämme (456-460), TSST-positive *S. aureus*-Bakterien (463-468), ET-positive *S. aureus*-Kulturen (477-482), Stämme aus Osteomyelitis (512-516) und Endokarditis-Patienten (517-521), Blutkulturen aus *S. aureus*-Septikämien (33-39, 59-61) und *S. aureus*-Befall von Nasenschleimhaut gesunder Patienten (761, 782, 785, 794, 809).

Wie in den folgenden Abbildungen (3.10 – 3.17) erkennbar, reagiert ein polyklonales Anti-IsaA-Serum spezifisch mit einem ca. 28 kDa großen *S. aureus* Protein. Bei koagulasenegativen Staphylokokkenarten, wie *S. saprophyticus* (189), *S. carnosus* (190), *S. hominis* (191), *S. lugdenensis* (192), *S. warnerii* (193) und *S. cohnii* (194) war keine IsaA-spezifische Reaktion nachweisbar. Dies deutet auf eine hohe Spezifität des Antikörpers gegen *S. aureus* IsaA hin, da keinerlei Kreuzreaktion zu beobachten war. Jedoch ist nicht bekannt, ob Staphylokokken außer *S. aureus* und *S. epidermidis* ein IsaA-homologes Protein exprimieren. Auch gegen Enterokokken (395, 418) und *S. haemolyticus* (174, 188) konnte keine IsaA-spezifische Reaktion nachgewiesen werden.

Proteinextrakte des gramnegativen Bakteriums *E. coli* reagierten ebenfalls nicht mit dem Anti-IsaA-Serum. (397). Diese Ergebnisse deuten auf eine ausschließlich gegen das *S. aureus* IsaA gerichtete Aktivität des Antiserums hin. Eine Kreuzreaktion zwischen dem *S. aureus* IsaA und dem *S. epidermidis* IsaA besteht nicht.

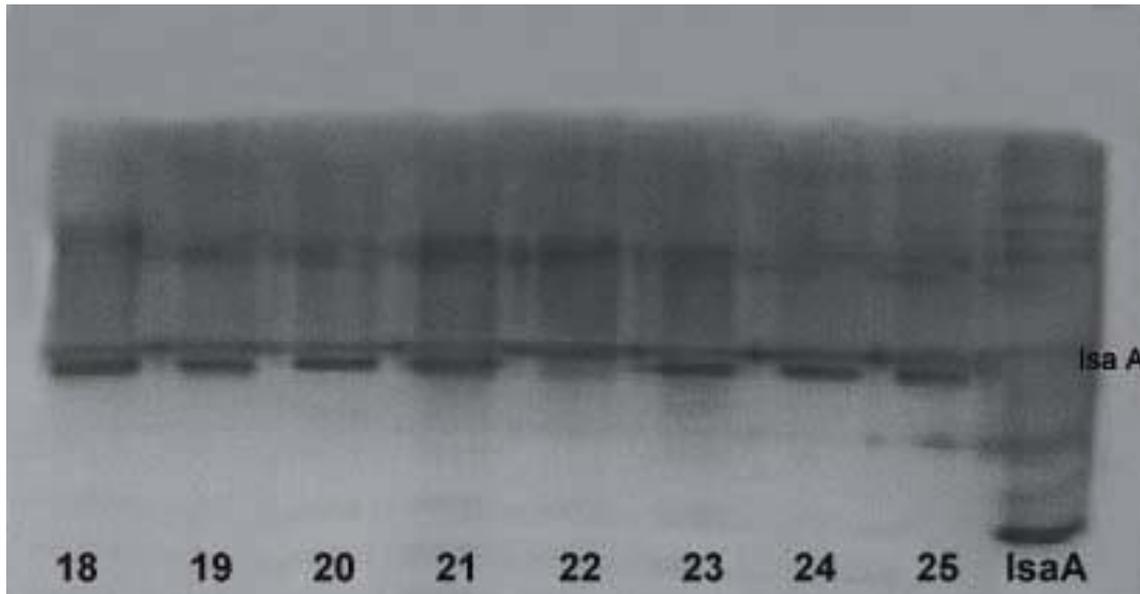


Abb. 3.10: Western-Blot-Analyse zur Testung der IsaA-Expression verschiedener *S. aureus*-Blutkultur-Stämme (18-25). Die Expression von IsaA ist bei allen Bakterien als einheitliche Bande erkennbar.

Um zu überprüfen, ob IsaA spezifisch mit *S. aureus*-Stämmen aus bestimmten Infektionstypen assoziiert vorliegt, wurden verschiedene Patientenisolat analysiert. Dazu wurden Proteinextrakte aus *S. aureus*-Stämmen aus Blutkulturen (18-39) durch SDS-PAGE aufgetrennt und das Vorhandensein von IsaA durch Immunoblotting geprüft. Es ist davon auszugehen, dass bei einem *S. aureus*-Nachweis in der Blutkultur eine Sepsis oder zumindest eine Bakteriämie mit *S. aureus* vorliegt. Es liegt hier eine invasive bakterielle Infektion vor, wovon der ganze Organismus im Sinne einer Systeminfektion betroffen ist. Wie in den Abbildungen 3.10 – 3.12 zu erkennen, war die IsaA-spezifische Bande bei allen getesteten Sepsis-Isolaten erkennbar. IsaA wird demnach bei allen untersuchten *S. aureus*-Blutkulturstämmen aus der Laborstammsammlung exprimiert.

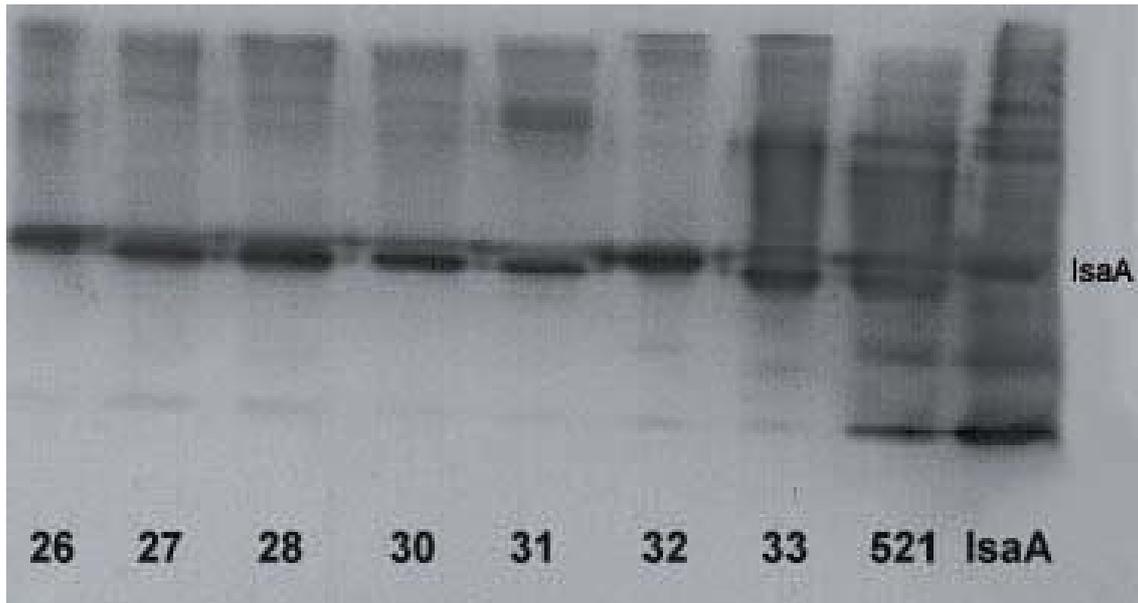


Abb. 3.11 : Western-Blot-Analyse zur Testung der Expression von IsaA bei verschiedenen *S. aureus*-Blutkultur-Stämmen (26-33, 521). Die Expression von IsaA ist bei allen Bakterien als einheitliche Bande erkennbar. In der rechten Spur wurde gereinigtes IsaA als Kontrolle mit aufgetragen.

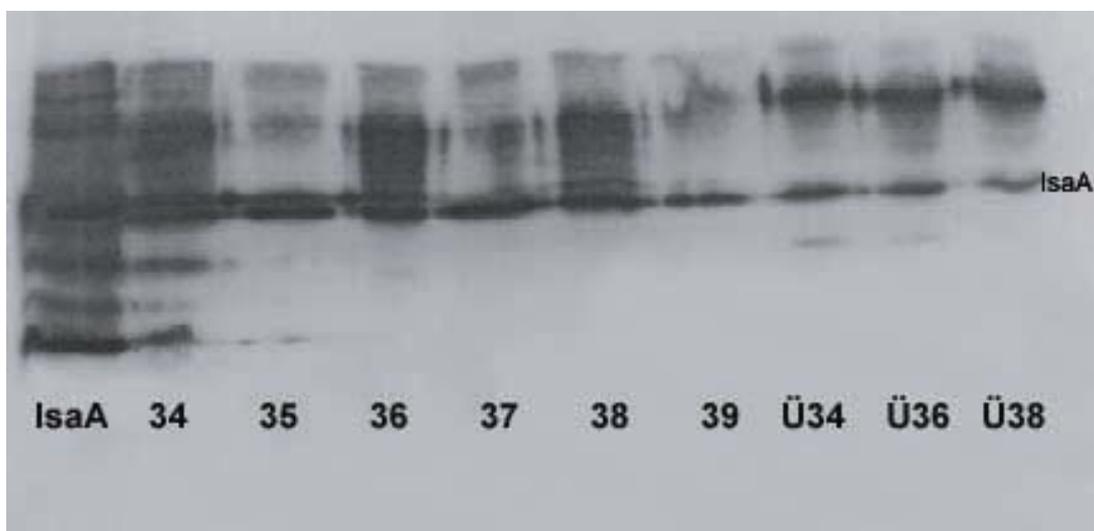


Abb. 3.12: Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Expression von IsaA bei verschiedenen *S. aureus*-Blutkultur-Stämmen (34-39, Ü=Überstand). Die Expression von IsaA ist bei allen Bakterien als einheitliche Bande erkennbar.

Im Weiteren wurde untersucht, ob auch bei Isolaten anderer Herkunft IsaA exprimiert wird, ohne dass eine generalisierte Infektion vorliegt. Dazu wurden Stämme aus Osteomyelitiden und Endokarditiden eingesetzt. Auch Proteinfractionen aus diesen Stämmen reagierten mit dem IsaA-spezifischen Antiserum (Abb. 3.13). Demnach exprimieren auch *S. aureus*-Stämme, die eine Endokarditis und Osteomyelitis verursachen können, IsaA.

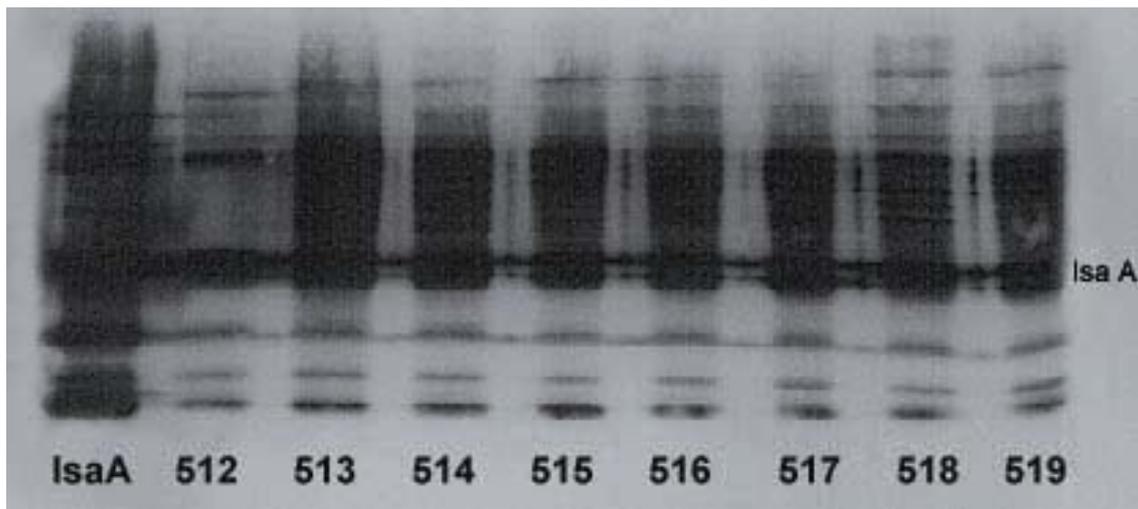


Abb. 3.13 : Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Expression von IsaA bei verschiedenen *S. aureus*-Osteomyelitis-Stämmen (512-516) und Endokarditis-Stämmen (517-519). Die Expression von IsaA ist bei allen Bakterien als einheitliche Bande erkennbar.

Weiterhin wurden Stämme aus der Nasenschleimhaut gesunder Probanden und Enterotoxin-bildende *S. aureus*-Stämme durch Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 3.14). Interessant ist, dass auch hier die IsaA-spezifische Bande nachweisbar war. Somit exprimieren auch *S. aureus*-Stämme aus gesunden Probanden IsaA. Damit liegt die Vermutung nahe, dass die Expression von IsaA durch *S. aureus* unabhängig von der Herkunft der Stämme und der Art des Krankheitsbildes sowie von der Immunlage des Patienten ist. Weiterhin haben alle untersuchten Stämme IsaA exprimiert. Dies deutet auf eine wichtige Funktion des Proteins für physiologische Prozesse von *S. aureus* hin.

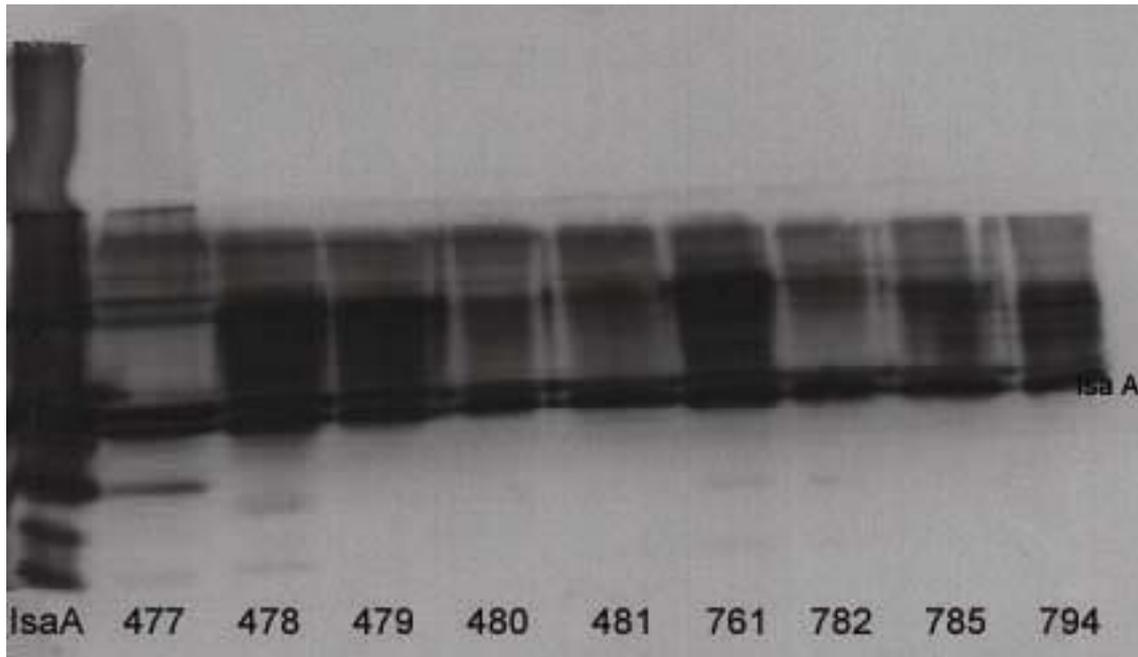


Abb. 3.14: Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Expression von IsaA bei verschiedenen Enterotoxin-produzierenden *S. aureus*-Stämmen (477-482) und Stämmen aus der Nasenschleimhaut (761, 782, 785, 794). Die Expression von IsaA ist bei allen Bakterien als einheitliche Bande erkennbar.

Weiterhin wurden verschiedene Methicillin-resistente und –sensible Isolate untersucht. Die Abbildung 3.15 zeigt die Expression von IsaA von Methicillin-sensiblen (10 - 13) und Methicillin-resistenten (14 - 17) *S. aureus*. Trotz der leichten Verunreinigungen ist bei allen aufgetragenen Bakterien deutlich eine intensive IsaA-spezifische Bande zu erkennen. All diese *S. aureus*-Bakterien scheinen das Targetprotein IsaA zu exprimieren. Daraus lässt sich schließen, dass eine veränderte Resistenzlage und damit auch ein verändertes Genom, solange es sich immer noch um Bakterien der Spezies *S. aureus* handelt, keinen Einfluss auf die Expression des immunodominanten Antigens IsaA haben.

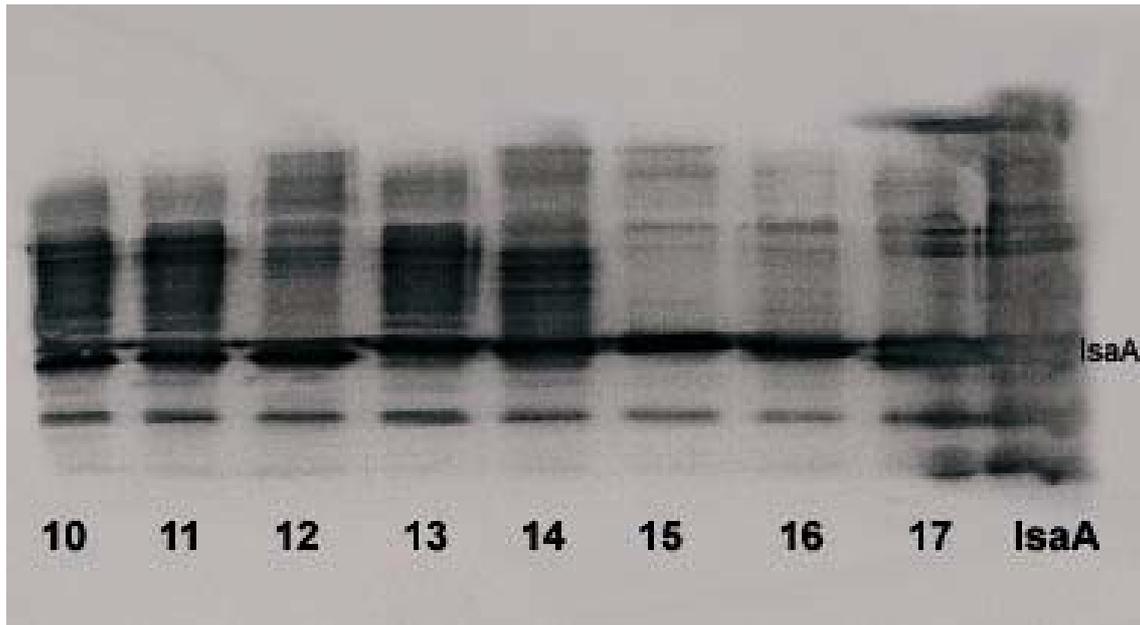


Abb. 3.15: Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Expression von IsaA in Methicillin-sensiblen (10-13) und Methicillin-resistenten *S. aureus* (14-17). Die Expression von IsaA ist bei allen Bakterien als einheitliche Bande erkennbar.

Weiterhin wurden verschiedene andere Bakterienspezies auf Expression eines IsaA-homologen Proteins untersucht. Dazu wurden Proteinextrakte von *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. canosus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. warnerii* und *S. cohnii* sowie von *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* und *Escherichia coli* im Western Blot analysiert (Abb. 3.16 – 3.17).

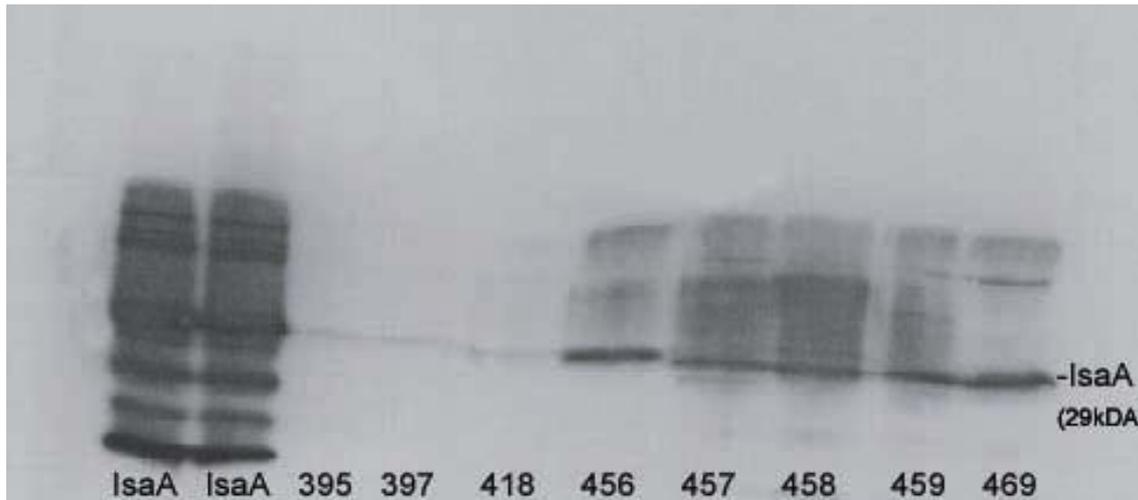


Abb. 3.16: Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Expression von IsaA und IsaA-homologen Proteinen in verschiedenen Bakterienspezies. Es wurden Kulturüberstände von *Enterococcus faecalis* (395), *E. coli* (397), *Enterococcus faecium* (418) und von *S. aureus*-Stämmen (456 - 469), die von der Firma Intervet, Schwabenheim, zur Verfügung gestellt wurden, mit einem IsaA-spezifischen Antikörper analysiert. Die Expression von IsaA ist nur bei den *S. aureus*-Stämmen als Bande nachweisbar.

Die Abbildung 3.16 zeigt deutlich eine Expression von IsaA durch die untersuchten *S. aureus*-Stämme. Proteinextrakte von *Enterococcus faecalis*, *E. coli* und *Enterococcus faecium* zeigten keine Reaktion mit dem IsaA-spezifischen Antiserum. Die Proteinextrakte von *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. canosus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. warnerii* und *S. cohnii* reagierten unterschiedlich mit dem IsaA-spezifischen Antiserum (Abb.3.17). Die untersuchten *S. haemolyticus*-Stämme reagierten deutlich mit dem Antiserum. Auch *S. hominis* (191), *S. lugdunensis* (192), *S. warnerii* (193) und *S. cohnii* (194) zeigten eine schwache Reaktion. Diese Ergebnisse belegen eine Aktivität des verwendeten Antiserums vorwiegend gegen *S. aureus* IsaA. Ob die anderen untersuchten Bakterienarten ein IsaA-homologes Protein exprimieren, konnte durch die Untersuchungen nicht abschließend beantwortet werden. Zumindest exprimieren einige Spezies (z. B. *S. haemolyticus*, aber auch *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. warnerii* und *S. cohnii*) ein Protein, das mit dem Antiserum reagierte. Ob es sich dabei um ein IsaA-homologes Protein handelt und dadurch eine Kreuzreaktion mit konservierten Domänen von IsaA stattfand, müssen zukünftige genetische Untersuchungen zeigen.

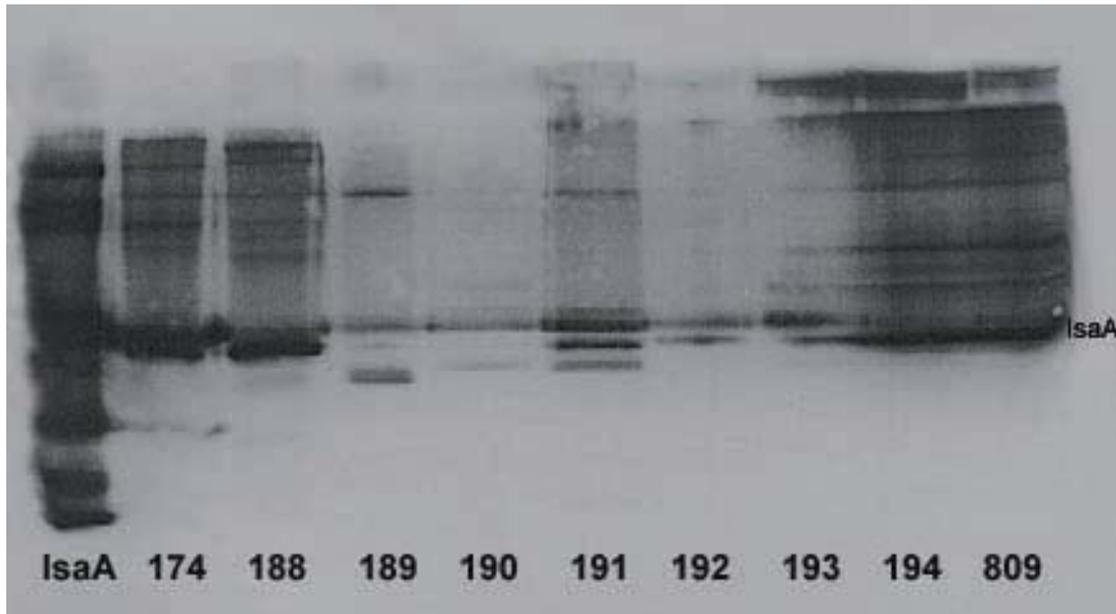


Abb. 3.17: Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Expression von IsaA und IsaA-homologen Proteinen in verschiedenen Bakterienspezies. Es wurden Kulturüberstände von *S. haemolyticus*-Stämme (174 und 188), *S. saprophyticus* (189), *S. carnosus* (190), *S. hominis* (191), *S. lugdunensis* (192), *S. warnerii* (193), *S. cohnii* (194) und *S. aureus* aus der Nasenschleimhaut eines gesunden Probanden (809) mit einem IsaA-spezifischen Antikörper analysiert. Die Expression von IsaA ist bei dem *S. aureus*-Stamm als deutliche Bande nachweisbar. Auch die *S. haemolyticus*-Stämme reagierten deutlich mit dem Antiserum. *S. hominis* (191), *S. lugdunensis* (192) und *S. warnerii* (193) und *S. cohnii* (194) zeigten eine schwache Reaktion.

Die Ergebnisse der Untersuchungen belegen, dass offensichtlich alle *S. aureus*-Stämme, unabhängig von Herkunft, Infektionsart, Resistenzlage, IsaA exprimieren. IsaA besitzt demzufolge eine wichtige Funktion für *S. aureus*. Ob andere Staphylokokkenarten ein IsaA-homologes Protein exprimieren, scheint nach den hier erzielten Ergebnissen wahrscheinlich, muss jedoch in zukünftigen Arbeiten experimentell bestätigt werden.

4. Herstellung einer IsaB-Mutante

In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Protein IsaA (Lorenz et al., 2000) auch das Protein IsaB charakterisiert, welches ebenfalls als ein neues Angriffsziel in der Therapie von MRSA-Infektionen dienen könnte. In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse zu den funktionellen Untersuchungen des IsaB beschrieben. Um die Funktion von IsaB im Stamm *S. aureus* 8325 näher beurteilen zu können, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine IsaB-Deletionsmutante hergestellt. Hierfür wurde der kodierende IsaB-Genbereich durch eine Erythromycin-Resistenzkassette ersetzt. Zunächst wurden in den temperatursensitiven Vektor pBT2 (Brückner, 1997) ein „upstream“- und „downstream“-Fragment des *IsaB*-Gens kloniert. Zwischen den Fragmenten wurde dann eine Erythromycinkassette kloniert. Nach erfolgter Klonierung des Plasmids in *E. coli* wurde der Vektor zuerst in *S. aureus* RN4220 transformiert. Anschließend wurde der Vektor in den eigentlichen Zielstamm *S. aureus* 8325 transduziert. Diese Zwischentransformation war notwendig, da der Stamm *S. aureus* RN4220 aufgrund chemischer Mutagenisierung kein funktionstüchtiges Restriktionsenzymssystem aufweist und daher Fremd-DNA leichter akzeptiert und staphylokokkenspezifisch methyliert (Novick et al., 1983). Die Mutation wurde anschließend durch Southern-Hybridisierung bestätigt und funktionell charakterisiert.

4.1 Konstruktion eines temperatursensitiven Integrationsvektors mit Antibiotikamarker und IsaB-flankierenden Bereichen

Der Vektor pBT2 (Brückner, 1997) wurde als Basis des herzustellenden Integrationsvektors verwendet. Es handelt sich um einen Shuttle-Vektor, welcher sowohl im grampositiven als auch im gramnegativen Stammhintergrund repliziert. Er besitzt zwei Replikationsursprünge („origin of replication“), wobei nur der grampositive „ori“ eine Temperatursensitivität aufweist. Sind grampositive Bakterien einer Temperatur über 37 °C ausgesetzt, kommt es zu keiner Vermehrung des Vektors, so dass nach einer gewissen Generationsfolge durch die fehlende Weitergabe des Vektors

dieser verloren geht, wenn nicht durch homologe Bereiche im Vektor eine ortsspezifische Rekombination mit der chromosomalen DNA erfolgt. Der pBT2-Vektor besitzt darüber hinaus Antibiotika-Resistenzmarker für grampositive und für gramnegative Bakterien. In gramnegativen Mikroorganismen, wie *E. coli*, selektiert man mit der Ampicillin-Resistenz, während in grampositiven Bakterien, wie in *S. aureus*, eine Chloramphenicol-Resistenz exprimiert wird. Die Vektorkarte des pBT2 ist der Abbildung 3.18 zu entnehmen.

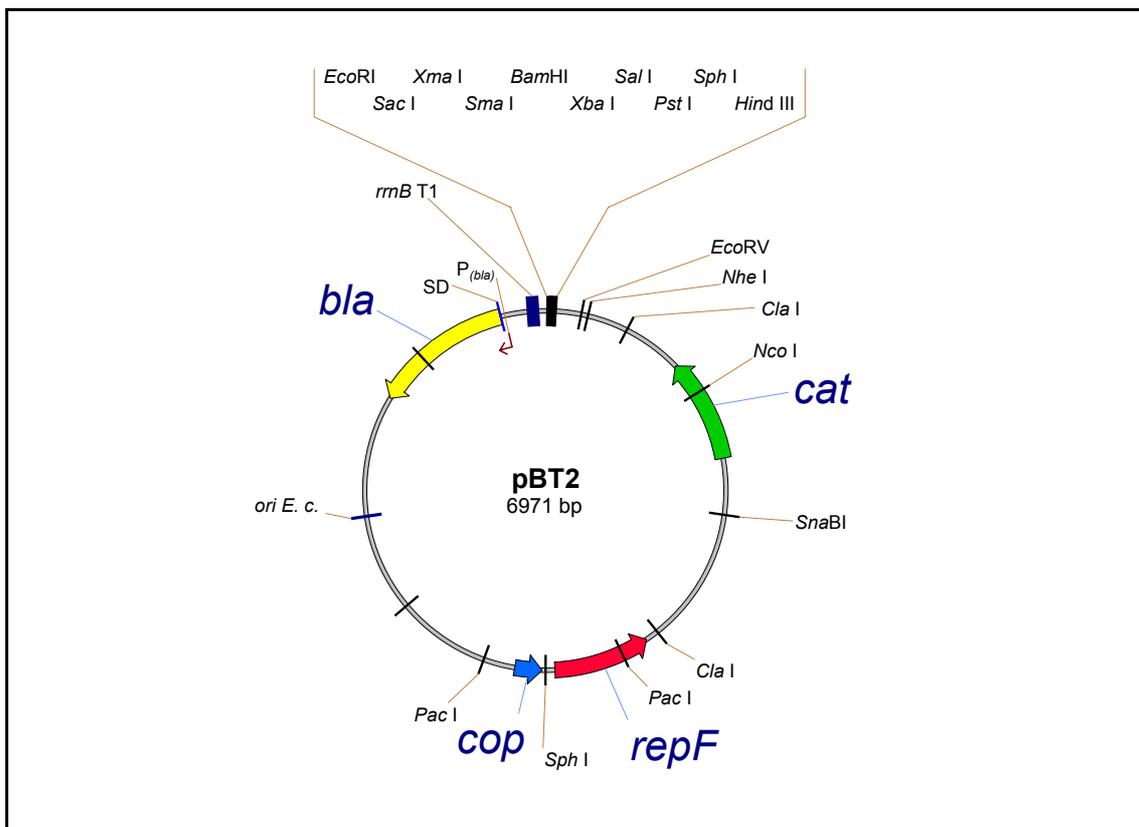


Abb. 3.18: Schematische Darstellung des pBT2- Vektor (Brückner, 1997)

Zwei Bereiche „upstream“ und „downstream“ des *isaB*-Gens wurden ausgewählt und mittels PCR amplifiziert. Für die Amplifikation wurden Primer mit angehängten Schnittstellen (*EcoRI*, *PstI*, *BamHI* und *HindIII*) verwendet, die eine nachfolgende Klonierung erleichterten. Das durch PCR (Anlagerungstemperatur der Primer von 45 °C, Elongationszeit von 2 Minuten bei 72 °C) erhaltene „upstream“-Fragment weist eine Größe von 1,15 kb (*EcoRI* und *BamHI*) auf und wurde zunächst in den Vektor pGEM-T ligiert und anschließend in *E. coli* amplifiziert. Das „downstream“-Fragment

ist 1,1 kb groß (*Pst*I und *Hind*III) und wurde ebenfalls zuerst in pGEM-T ligiert und in *E. coli* amplifiziert. Die Erythromycinkassette, 1,45 kb, wird durch PCR mit den Primern *Pst*I und *Bam*HI vervielfältigt (Template Plasmid pEC1 aus *E. coli*) und ebenso in pGEM-T ligiert und in *E. coli* amplifiziert. Eine gleichzeitige Ligation aller oder mehrerer Fragmente in einem Arbeitsschritt war nicht erfolgreich. Daher wurden die Fragmente einzeln in den pBT2-Vektor kloniert.

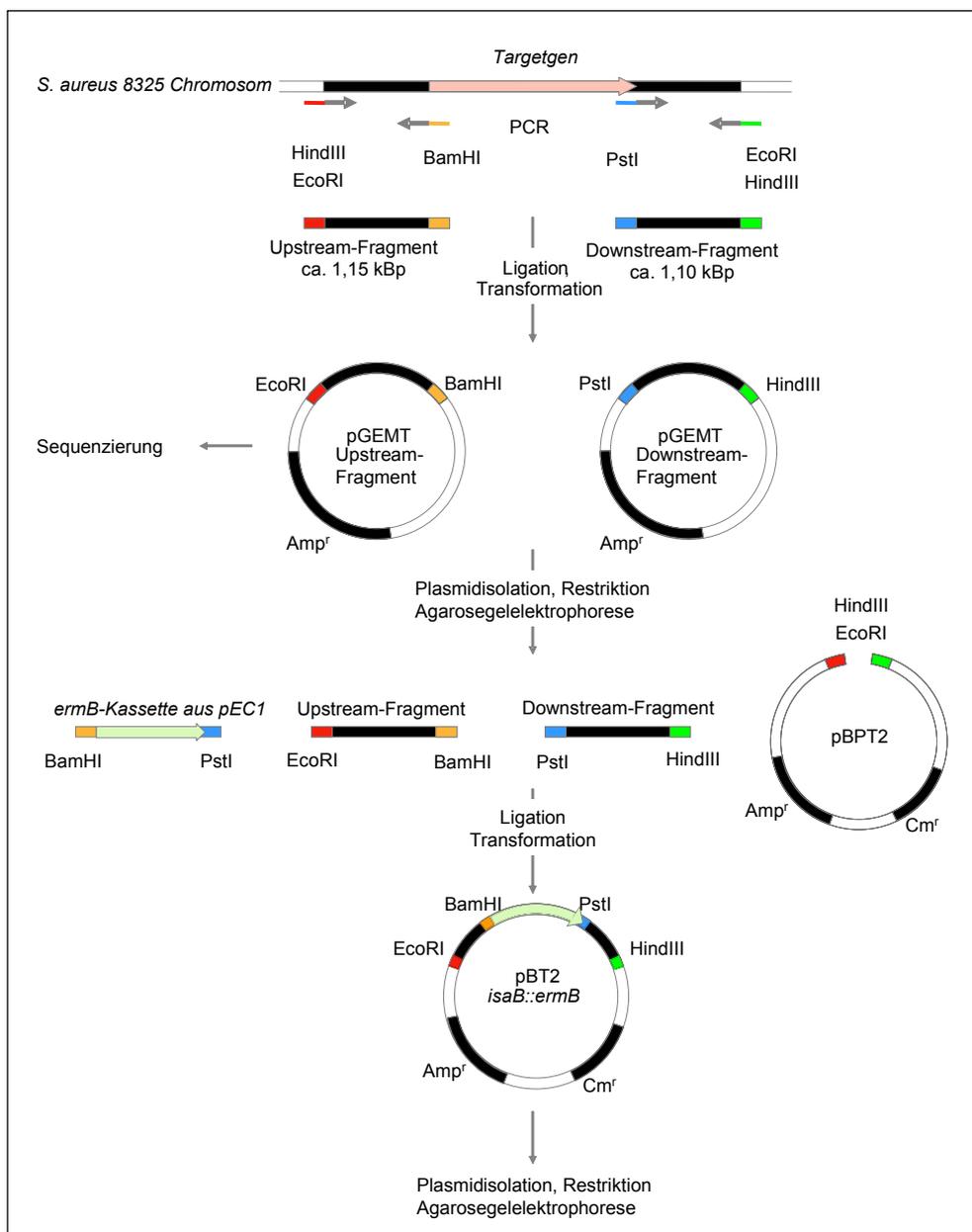


Abb. 3.19: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte zur Herstellung einer *isaB*-Deletionsmutante.

Nach Fertigstellung des Vektor-Konstruktes wurde dieses durch Spaltungsanalysen und anschließende Sequenzierung der eingefügten Bereiche überprüft. Die einzelnen Fragmente wurden mit den jeweiligen Enzymen im Restriktionsenzymverdau für 2 - 3 h herausgespalten, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechende Gel-Bande mittels GeneClean aufgereinigt. Zuerst wurde das „upstream“-Fragment mit dem durch die Enzyme *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen Vektor pBT2 über Nacht ligiert. Anschließend fügte man in einer weiteren Ligation die Erythromycinkassette in den aus der ersten Ligation entstandenen Vektor ein, welcher hierzu mit den Enzymen *BamHI* und *PstI* geschnitten wurde. In der letzten Ligation fügte man dem Vektor aus der zweiten Ligation das „downstream“-Fragment hinzu. Hierzu wurde der Vektor der zweiten Ligation mit *PstI* und *HindIII* geschnitten. Der nun fertige Integrationsvektor wurde durch unterschiedliche Restriktionsspaltungen in seinen Fragmenten überprüft. Die Abbildung 3.20 zeigt die Restriktionsanalysen des Integrationsvektors.

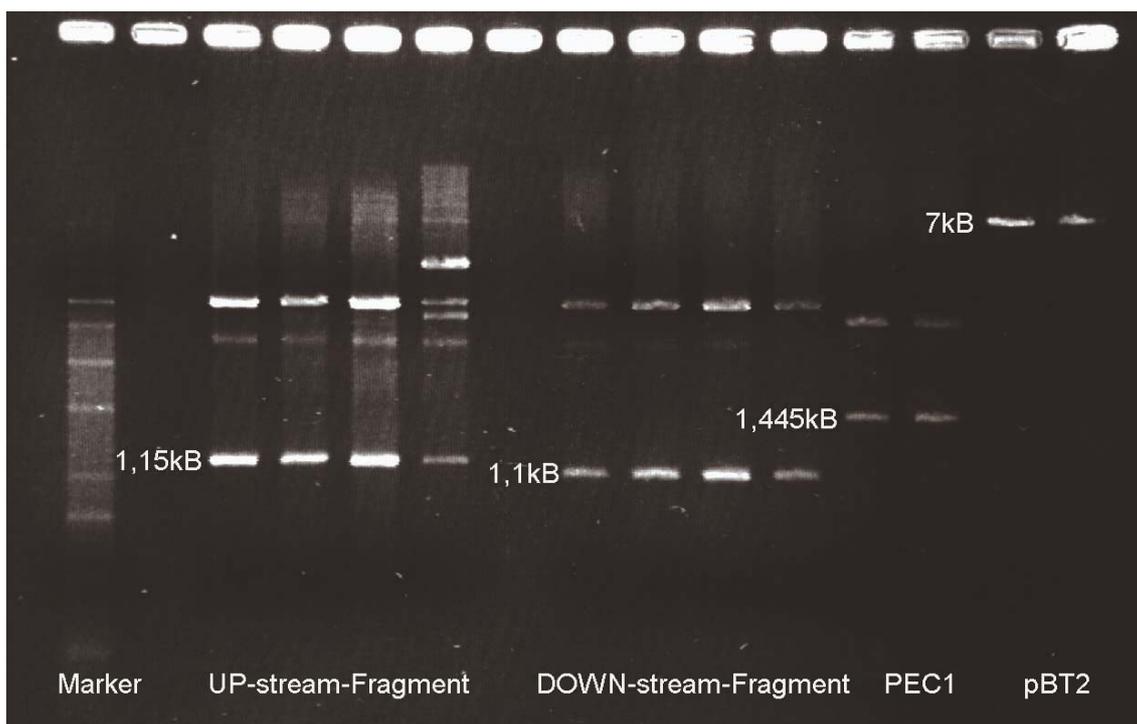


Abb. 3.20: Darstellung der aufgespaltenen Restriktionsfragmente: 1. Spur: Marker (von oben nach unten: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 B-Bande), 3. - 6. Spur: Upstream-Fragment mit 1,15 kB, 8. - 11. Spur: Downstream-Fragment mit 1,1 kB, 12./13. Spur: PEC1-Fragment mit 1,445 kB und 14./15. Spur: pBT2-Vektor mit 7 kB.

Folgende Enzymkombinationen wurden für den Restriktionsverdau verwendet:

“upstream”-Fragment	→	<i>EcoRI</i> -/ <i>Bam</i> HI-Enzym
“downstream”-Fragment	→	<i>Pst</i> I-/ <i>Hind</i> III-Enzym
PEC 1-Fragment	→	<i>Bam</i> HI-/ <i>Pst</i> I-Enzym
pBT2-Vektor	→	<i>Eco</i> RI-/ <i>Hind</i> III-Enzym

Ligation I (*Eco*RI und *Bam*HI): “upstream”-Fragment und pBT2-Vektor
 Ligation II (*Bam*HI und *Pst*I): Vektor nach Ligation I und Erythromycinkassette
 Ligation III (*Pst*I und *Hind*III): Vektor nach Ligation II und „downstream“-
 Fragment = vollständiger Integrationsvektor in *E. coli*

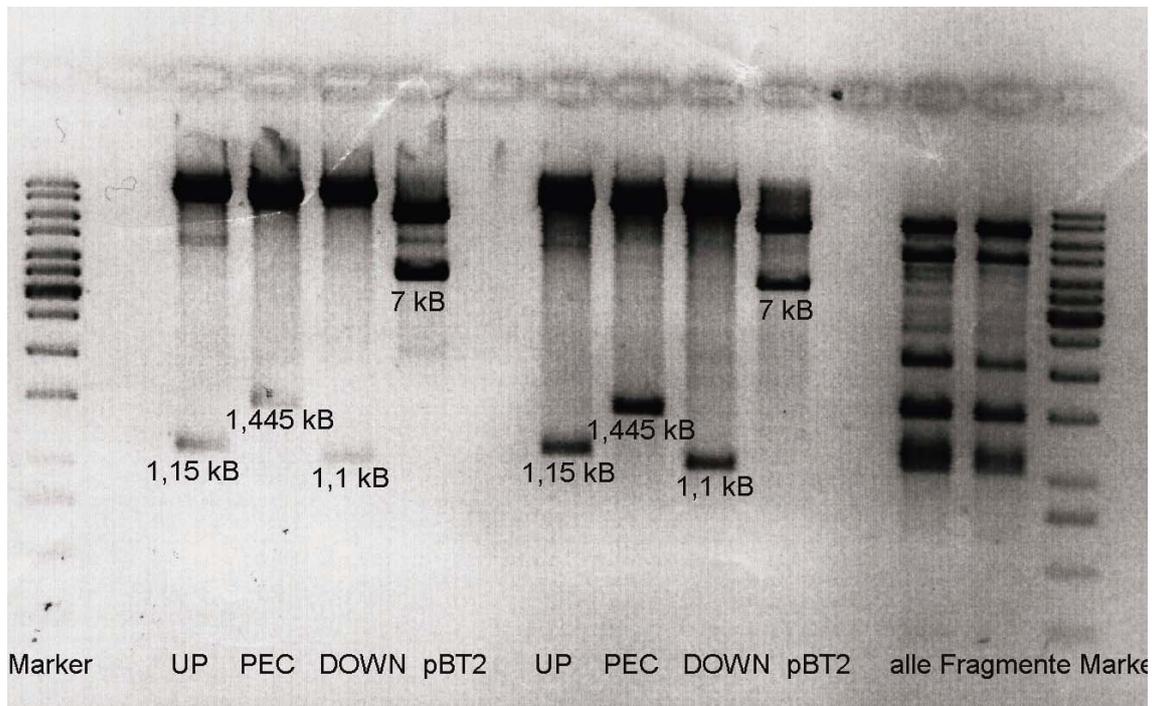


Abb. 3.21: Darstellung der Ligationsergebnisse in *S. aureus* 8325 und nach Rücktransformation in *E. coli*: 1. Spur: Marker, 3. Spur: UP-stream-Fragment in *S. aureus* 8325, 4. Spur: PEC-Fragment in *S. aureus* 8325, 5. Spur: DOWN-stream-Fragment in *S. aureus* 8325, 6. Spur: pBT2-Vektor in *S. aureus* 8325, 8. Spur: Up-stream-Fragment in *E. coli* nach Rücktransformation, 9. Spur: PEC-Fragment in *E. coli* nach Rücktransformation, 10. Spur: DOWN-stream-Fragment in *E. coli* nach Rücktransformation, 11. Spur: pBT2-Vektor in *E. coli*, nach Rücktransformation, 13./14. Spur: Versuch alle verwendeten Fragmente aufzuspalten in *E. coli* nach Rücktransformation (leider ist keine exakte Auftrennung der vier Fragmente möglich gewesen – vermutlich Probleme bei Restriktionsverdau), 15. Spur: Marker (von oben nach unten: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 B-Bande)

Der hergestellte Deletionsvektor wurde mehrfach durch Restriktionsverdau überprüft. Dabei konnten die Fragmente der errechneten Größe herausgespalten werden. Durch einen *EcoRI/BamHI*-Verdau wurde das „upstream“-Fragment als eine Bande von 1,15 kb sichtbar. Weiterhin erschien eine 2. Bande bei ca. 9 kb, die sich aus dem pBT2-Vektor, der Erythromycinkassette und dem „downstream“-Fragment zusammensetzt. Gab man zu dem oben genannten Verdau mit *PstI* ein weiteres Enzym dazu, wurde die Erythromycin-Kassette herausgespalten. Auf dem Agarosegel waren dadurch drei Banden sichtbar: Die des „upstream“-Fragments bei 1,15 kb, die der Erythromycin-Kassette bei 1,45 kb und die des pBT2-Vektors und des „downstream“-Fragment bei ca. 8 kb. Verdaute man das Plasmid mit vier Enzymen (*EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*), konnten alle Bestandteile des Deletionsvektors sichtbar gemacht werden: „upstream“-Fragment bei 1,15 kb, Erythromycin-Kassette bei 1,45 kb, „down“-Fragment bei 1,1 kb und pBT2-Vektor bei ca. 7 kb (Abb. 3.21). Damit war der Beweis erbracht, dass der Vektor komplett und korrekt hergestellt worden war.

4.2 Integration des Vektors in das Chromosom von *S. aureus* 8325

Die Klonierungsschritte wurden primär in *E. coli* durchgeführt. Die Vektor-DNA wurde aus den *E. coli*-Zellen isoliert und mittels Elektroporation direkt auf *S. aureus* RN4220 (Schenk and Laddaga, 1992) übertragen und anschließend mittels Phagentransduktion in den *S. aureus* 8325-Wildtyp überführt.

Die Elektroporations suspension wurde auf Antibiotikaselektionsplatten (Chloramphenicol-Platten, Cm 10 µg/ml) ausplattiert. Der aufgenommene Vektor sollte den grampositiven Bakterien eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol verleihen. Im Gegensatz zu *E. coli* wird der Vektor in *S. aureus* bei 30 °C (Temperatursensitivität) amplifiziert. Der nun Staphylokokken-spezifisch methylierte Vektor wurde danach mittels Phagen in den Zielwirt *S. aureus* 8325 transduziert.

Für die Überprüfung der möglichen Klone wurden diese in einer ÜNK mit Chloramphenicol und Erythromycin (Em) in mit Glycin versetztes B-Medium angezüchtet. Durch die Zugabe von Glycin stellt man sicher, dass die Peptidbrücken, die für die Quervernetzung der Zellwandbausteine verantwortlich sind, ausschließlich aus Glycin aufgebaut sind und dadurch einem Lysostaphinverdau zugänglich gemacht wurden. Für die Übertragung des Vektors mittels Phagen wurde eine Phagenverdünnungsreihe aus Phagenpuffer und Phage 85 verwendet.

Der Vektor pTG1 wurde erfolgreich in den Endwirt *S. aureus* 8325 eingebracht, die Erythromycin-Kassette musste nun durch Doppel-Crossover in die chromosomale DNA integriert werden.

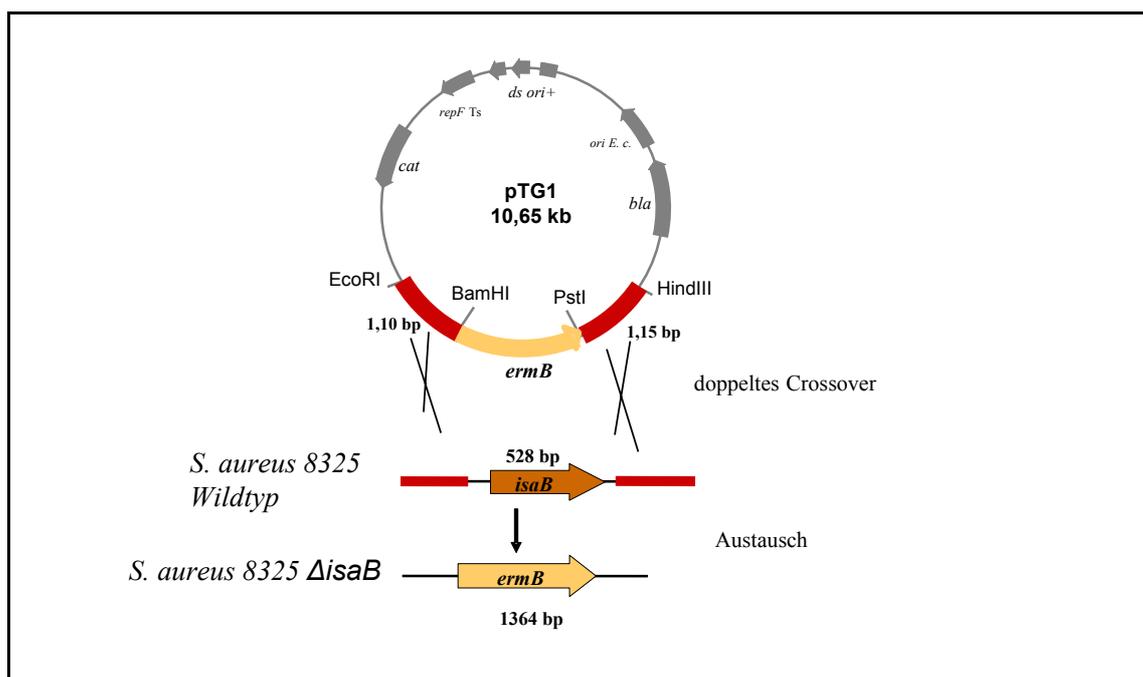


Abb. 3.22: Integrationsstrategie des Vektors pTG1 in die chromosomale DNA des Zielstammes *S. aureus* 8325 zur Herstellung einer *IsaB*-Deletionsmutante.

Hierzu setzte man eine ÜN-Kultur des entsprechenden Klons in LB mit 10 µg/ml Em an und schüttelte das Gemisch bei 42 °C. Die Prozedur wurde an den beiden darauf folgenden Tagen wiederholt und die Kultur passagiert. Am dritten Tag wurden in einer Verdünnungsreihe von 0 bis 10⁻⁶ die Bakterienkulturen verdünnt und auf

Selektionsplatten (Em, 20 µg/ml) ausgestrichen. Es kam dabei zum Wachstum von Klonen, die entweder die Em-Kassette in die chromosomale DNA integriert hatten oder den vorhandenen Vektor. Um Letzteres ausschließen zu können, wurden die gewachsenen Klone nicht nur auf Em-Selektionsplatten (Em, 20 µg/ml) sortiert, sondern ebenfalls auf Cm-Selektionsplatten (Cm, 10 µg/ml) und Blutagar-Platten ausgestrichen. Wuchsen die Klone ebenfalls auf den Cm-haltigen Platten, so handelte es sich nicht um die gewünschten Deletionsmutanten, sondern um Bakterien, die restlichen Vektor pTG1 enthielten. Der Ausstrich auf Blutagarplatten konnte zusätzliche Auskunft über mögliche Defekte im Hämolyseverhalten der Mutanten geben. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert. Von 100 untersuchten Klonen zeigte eine Kolonie den erhofften Phänotyp, nämlich Em-resistent und Cm-sensitiv. Zusätzlich war dieser Klon weniger hämolytisch.

4.3 Southern Blot-Analyse der IsaB-Mutante

Für die Southern-Blot-Analyse der IsaB-Mutante wurden die Klone 2, 3 und 6 des *S. aureus*-Stammes RN4220, der Klon 6 des *S. aureus* 8325 sowie die Wildtypen *S. aureus* RN4220 und 8325 in einer Übernachtskultur in B-Medium mit Glycin angezüchtet. Das Ergebnis der Hybridisierung ist in Abbildung 3.23 zu erkennen.

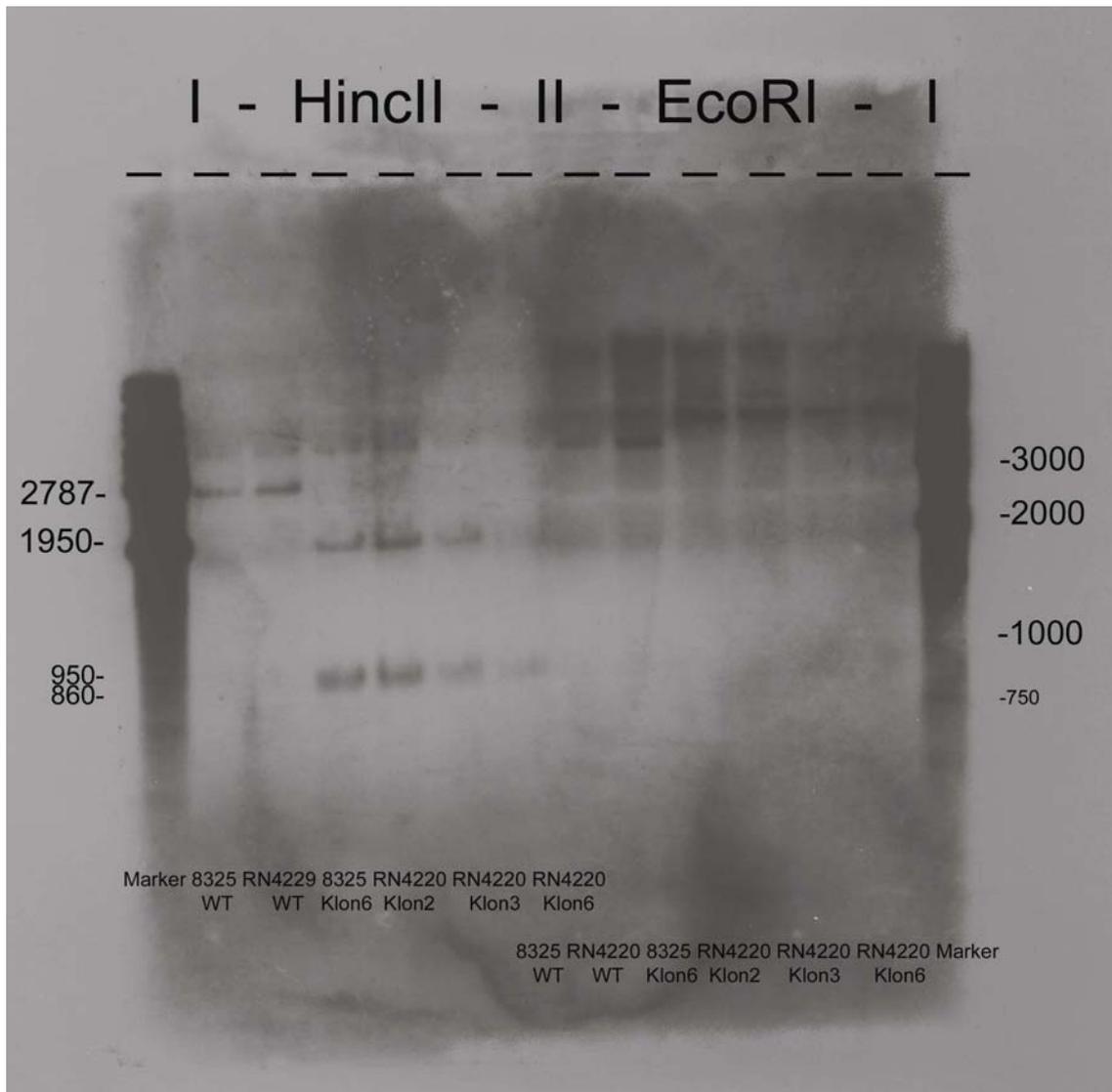


Abb. 3.23: Southern-Blot-Hybridisierung zur Überprüfung der *isaB*-Mutante: 1. Spur: Marker 2. Spur: 8325 WT (*HincII*), 3. Spur: RN4220 WT (*HincII*), 4. Spur: 8325-*IsaB*-Klon6 (*HincII*), 5. Spur: RN4220-*IsaB*-Klon2 (*HincII*), 6. Spur: RN4220-*IsaB*-Klon3 (*HincII*), 7. Spur: RN4220-*IsaB*-Klon6 (*HincII*), 8. Spur: 8325 WT (*EcoRI*), 9. Spur: RN4220 WT (*EcoRI*), 10. Spur: 8325-*IsaB*-Klon6 (*EcoRI*), 11. Spur: RN4220-*IsaB*-Klon2 (*EcoRI*), 12. Spur: RN4220-*IsaB*-Klon3 (*EcoRI*), 13. Spur: RN4220-*IsaB*-Klon6 (*EcoRI*), 14. Spur: Marker – Hybridisierungssonde: *EcoRI-HindIII*

Die Isolierung der chromosomalen DNA erfolgte in modifizierter Form nach Grünberg et al. (1989) mit Lysostaphin. Die Enzyme für die passenden Schnittstellen wurden so gewählt, dass anschließend in der Hybridisierung die errechneten Banden auch eindeutig eine Integration nachvollziehen lassen. Es sollten nicht zu viele Banden entstehen und keine Größenüberschneidungen stattfinden, um keine Verwechslung zu verursachen.

Für den ersten Verdau-Ansatz wurden als Enzym *HincII* (GTPy↓PuAC) und für den zweiten Ansatz *EcoRI* (G↓AATTC) eingesetzt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C. Die Auftrennung wurde in einem 1 %-TBE-Agarose-Gel bei 200 V über 1,5 h durchgeführt. Die Ergebnisse der Hybridisierung sind in Abb. 3.23 dargestellt. Als Sonde für die Hybridisierung wurde das Fragment *EcoRI-HindIII* (ca. 3,7 kb) aus dem pBT2-Vektor gewählt. Dazu erfolgte zur Kontrolle ein Probeverdau des pBT2-Vektors mit *EcoRI/HindIII*, *EcoRI/BamHI*, *BamHI/PstI* und *PstI/HindIII*. Die Banden bei der anschließenden Southern-Hybridisierung waren wie folgt zu erwarten:

Beim Verdau mit *HincII*:

WT: 1 Bande mit der Größe 2787 bp

IsaB-Klon: 3 Banden mit „shift“ nach unten bei ca. 860bp, ca. 950bp und ca. 1950bp

Beim Verdau mit *EcoRI*:

WT: 1 Bande mit der Größe 3589 bp

IsaA-Klon: 1 Bande mit der Größe 4782 bp mit „shift“ nach oben

Der Verdau mit *EcoRI* und die anschließende Hybridisierung ergaben den eindeutigen Beweis der erfolgreichen Herstellung einer Mutante im Gen *isaB* (Abb. 3.23). Das erwartete Bandenmuster konnte somit experimentell bestätigt werden. Die Ergebnisse der Hybridisierung nach *HincII* –Verdau waren nicht eindeutig auswertbar (Abb. 3.24).



Abb. 3.24: Southern-Blot-Hybridisierung zur Überprüfung der *isaB*-Mutante: : 1. Spur: Marker 2. Spur: 8325 WT (*HincII*), 3. Spur: RN4220 WT (*HincII*), 4. Spur: 8325-IsaB-Klon6 (*HincII*), 5. Spur: RN4220-IsaB-Klon2 (*HincII*), 6. Spur: RN4220-IsaB-Klon3 (*HincII*), 7. Spur: RN4220-IsaB-Klon6 (*HincII*), 8. Spur: 8325 WT (*EcoRI*), 9. Spur: RN4220 WT (*EcoRI*), 10. Spur: 8325-IsaB-Klon6 (*EcoRI*), 11. Spur: RN4220-IsaB-Klon2 (*EcoRI*), 12. Spur: RN4220-IsaB-Klon3 (*EcoRI*), 13. Spur: RN4220-IsaB-Klon6 (*EcoRI*), 14. Spur: Marker – Hybridisierungssonde: *HincII*

5. Phänotypische Charakterisierung der *ΔisaB*-Mutante

Um mehr über die mögliche Funktion des Proteins IsaB (SA-Nr. 2431) für das Bakterium *S. aureus* zu erfahren, wurde im Rahmen dieser Arbeit das in vitro-Verhalten der IsaB-Mutante mit dem des Wildtyps anhand verschiedener Experimente verglichen.

5.1 Wachstumskurve von Wildtyp 8325 und *ΔisaB*-Mutante 8325 in LB- und TSB-Medium bei 30 °C, 37 °C und 42 °C

Zunächst sollte die Wachstumsgeschwindigkeit der IsaB-Mutante in verschiedenen Medien mit der des Wildtyps *S. aureus* 8325 verglichen werden. Hierzu wurden die beiden Stämme auf eine Anfangskonzentration von $OD_{600} = 0,02$ in LB- und TSB-Medium verdünnt und bei 30 °C, 37 °C und 42 °C in Erlenmeyer-Kolben inkubiert. Den Ansätzen wurde kein Antibiotikum zugesetzt. Jede Stunde wurden Proben entnommen und im Photometer bei OD_{600nm} vermessen. Die daraus resultierenden Wachstumskurven der beiden Stämme in den gewählten Medien bei den drei Temperaturstufen sind in den Abb. 3.25 bis 3.30 dargestellt.

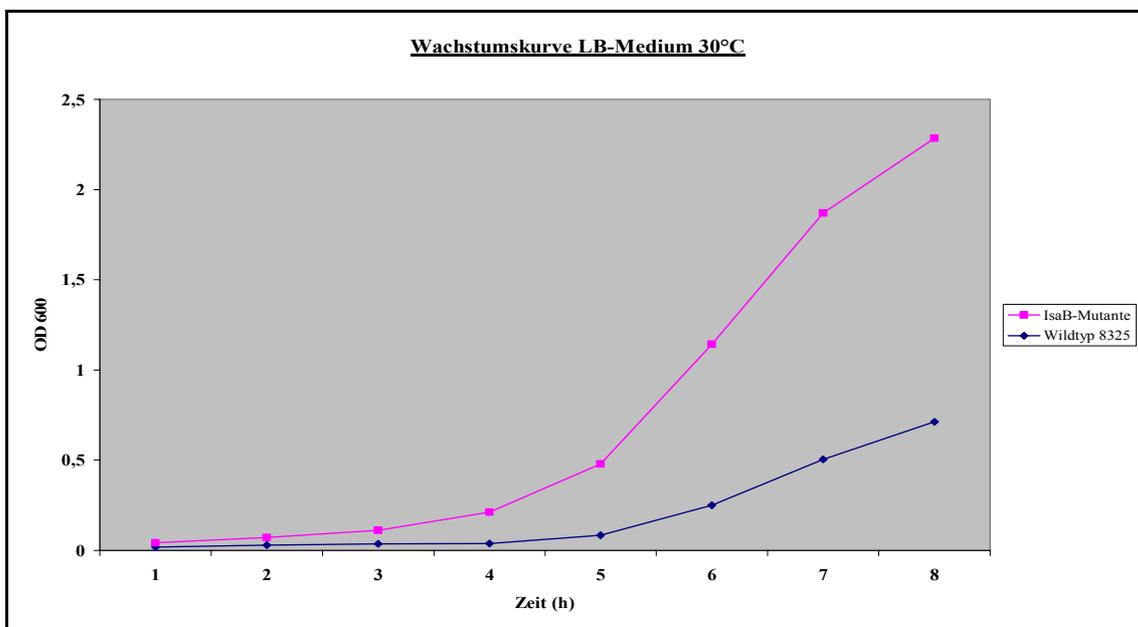


Abb. 3.25: Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der IsaB-Mutante: Wachstumskurve der Mutante (rote Linie) im Vergleich zum Wildtyp bei 30 °C in LB-Medium. Die optische Dichte gemessen bei 600 nm (OD_{600}) wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Bei 30 °C ist die lag-Phase bei beiden Stämmen im Vergleich zu den höheren Temperaturen, 37 °C und 42 °C, verlängert. Sowohl Mutante als auch Wildtyp benötigen mehr Zeit um die kritische Grenze des „normalen“ Wachstumverhaltens zu erreichen. Die Mutante gelangt früher in die log-Phase des Wachstums. Hier beginnt sich der Wachstumsvorteil der IsaB-Mutante abzuzeichnen. Nach ca. acht Stunden erreichen beide die stationäre Phase. Hier ist das bessere Wachstumsverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp durch eine OD₆₀₀-Differenz von mehr als 1 deutlich sichtbar (vgl. Abb. 3.25).

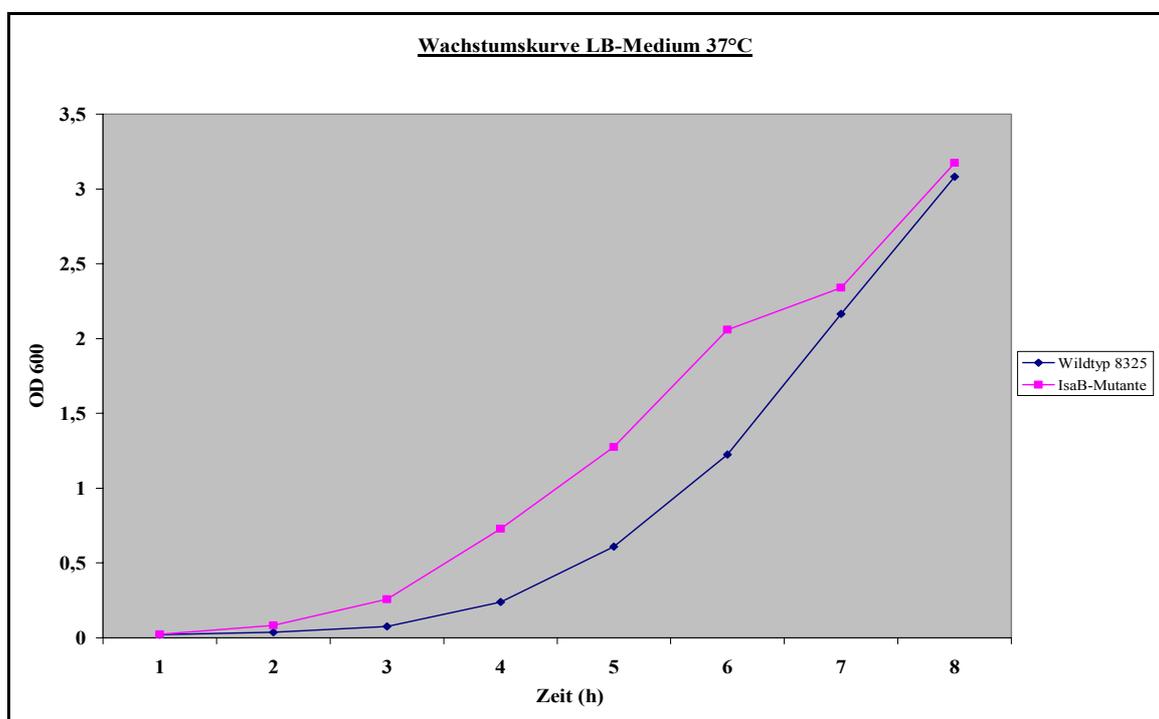


Abb. 3.26: Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der IsaB-Mutante: Wachstumskurve der Mutante (rote Linie) im Vergleich zum Wildtyp bei 37 °C in LB-Medium.. Die optische Dichte gemessen bei 600 nm (OD600) wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Bei 37 °C ist die Adaptionphase beider Stämme im Vergleich zum 30 °C-Experiment um ca. zwei Stunden verkürzt. Die beiden Stämme erreichen früher die sogenannte log-Phase, in der sie das volle Nährstoffangebot zum optimalen Wachstum nutzen können. Der Zeitpunkt der stationären Phase ist sowohl bei Wildtyp als auch bei Mutante nach ca. acht Stunden Wachstum erreicht. Die Mutante wächst auch in diesem Experiment schneller als der Wildtyp, jedoch ist der Wachstumsvorteil nicht so markant wie im

30 °C-Experiment. Die OD_{600} ist nach ca. acht Stunden bei den beiden Stämmen fast gleich (vgl. Abb. 3.26).

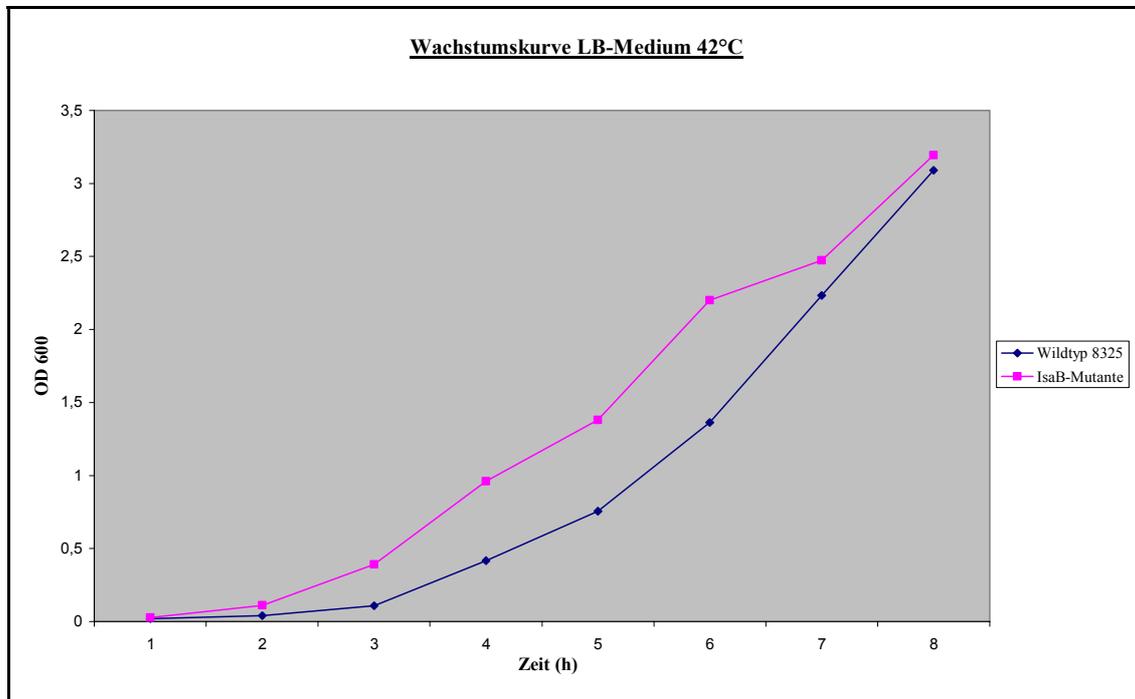


Abb. 3.27: Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der IsaB-Mutante: Wachstumskurve der Mutante (rote Linie) im Vergleich zum Wildtyp bei 42 °C in LB-Medium. Die optische Dichte gemessen bei 600 nm (OD_{600}) wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Im 42 °C-Experiment ist die Startphase bei beiden Stämmen noch kürzer. Wieder hat die IsaB-Mutante im Vergleich zum Wildtyp einen Wachstumsvorteil, der sich wie im 37 °C-Wachstumsexperiment über die log-Phase hält und in der stationären Phase fast angleicht (vgl. Abb. 3.27).

Zusammenfassend zeigte die IsaB-Mutante bei 30 °C einen deutlichen Wachstumsvorteil im Vergleich zum Wildtyp 8325. Bei 37 °C und 42 °C sank dieser Vorteil der Mutante gegenüber dem Wildtyp ab, jedoch war das schnellere Wachstum der Mutante immer noch deutlich erkennbar.

Das Wachstum der beiden Stämme in TSB-Medium zeigte noch deutlicher als in LB-Medium das proportional schnellere Wachstumsverhalten der Mutante im Vergleich

zum Wildtyp. Dieser Unterschied war wieder bei allen drei Temperaturstufen nachweisbar.

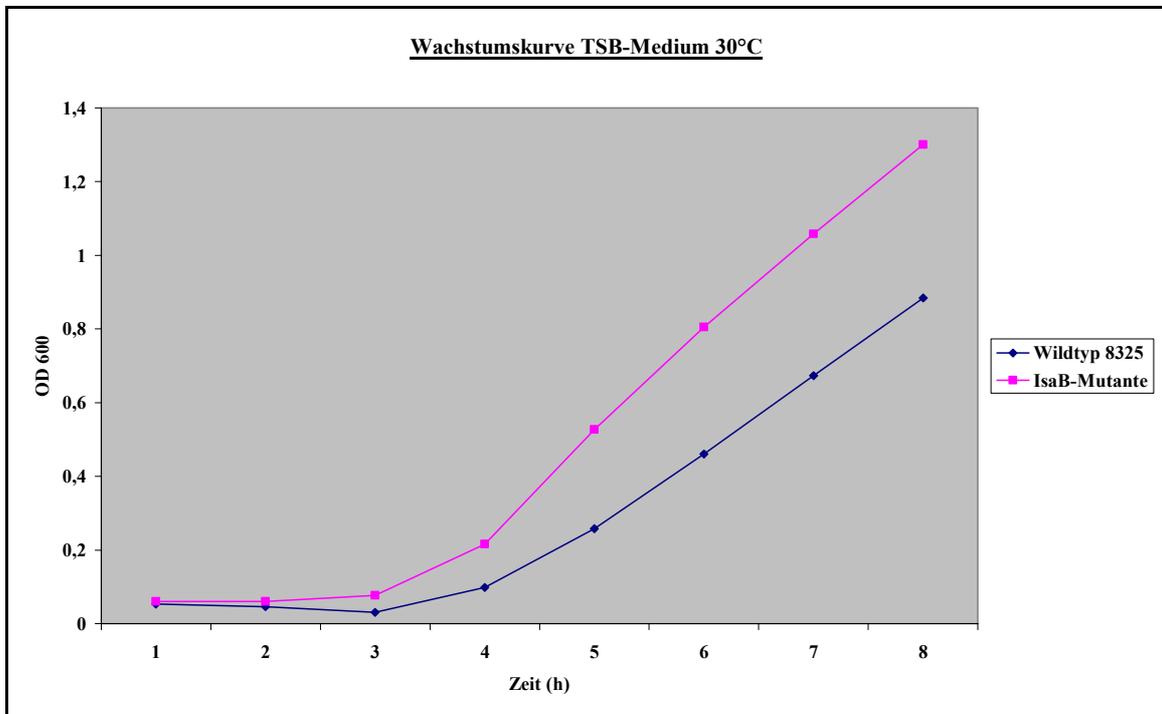


Abb. 3.28: Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der IsaB-Mutante: Wachstumskurve der Mutante (rote Linie) im Vergleich zum Wildtyp bei 30 °C in TSB-Medium. Die optische Dichte gemessen bei 600 nm (OD₆₀₀) wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Bei 30 °C dauerte die lag-Phase bei Wildtyp und Mutante ungefähr gleich lang. Nach ca. drei Stunden erreichten beide eine logarithmische Wachstumsgeschwindigkeit. In dieser Phase wurde ein deutlicher Wachstumsvorteil der IsaB-Mutante gegenüber dem Wildtyp beobachtet, der bis zum Erreichen der stationären Phase anhält (vgl. Abb. 3.28).

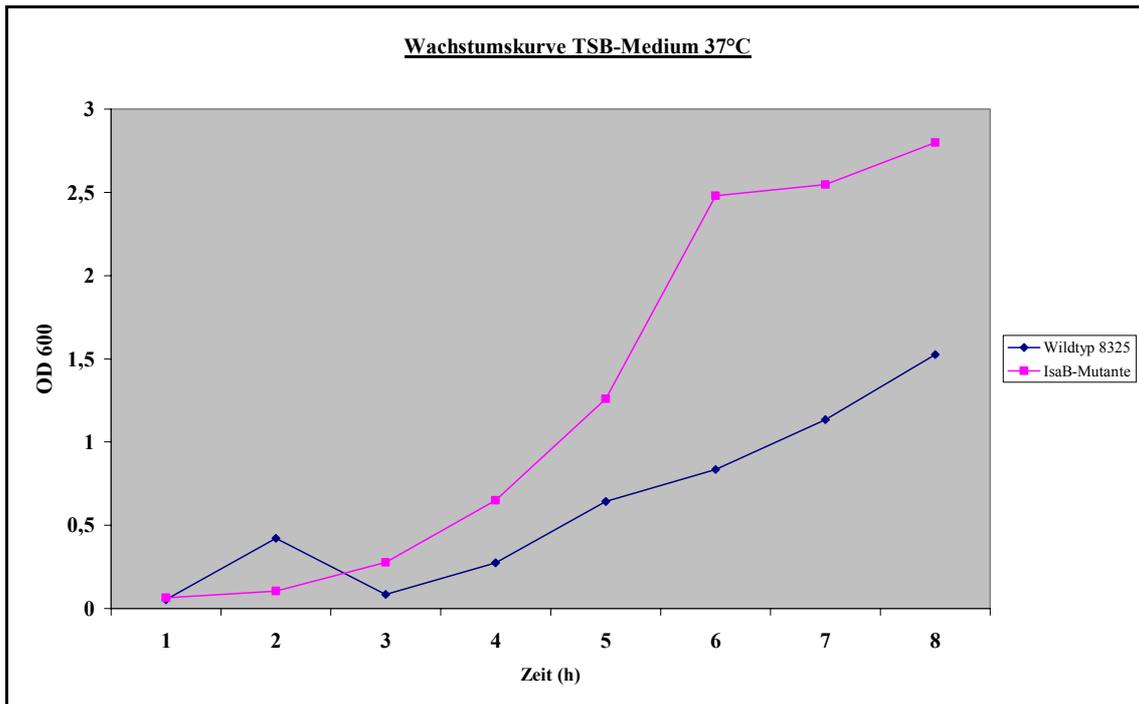


Abb. 3.29: Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der IsaB-Mutante: Wachstumskurve der Mutante (rote Linie) im Vergleich zum Wildtyp bei 37 °C in TSB-Medium. Die optische Dichte gemessen bei 600 nm (OD₆₀₀) wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Im 37 °C-Experiment in TSB-Medium ist die lag-Phase der Mutante kürzer als beim Wildtyp. Nach ca. 2 Stunden erreicht die Mutante schon die log-Phase. Der Wildtyp kommt erst nach ca. 3 Stunden in die logarithmische Wachstumsphase. Die Mutante besitzt somit auch hier einen deutlichen Wachstumsvorteil im Vergleich zum Wildtyp. Nach ca. 8 Stunden erreicht die IsaB-Mutante die stationäre Phase. Die Mutante gelangt erst später in die Stationsphase (vgl. Abb. 3.29).

Interessant ist, dass der Wachstumsvorteil der IsaB-Mutante im Vergleich zum vorherigen Wachstumsexperiment in LB-Medium in TSB-Medium auch in der stationären Phase deutlich ausgeprägt ist.

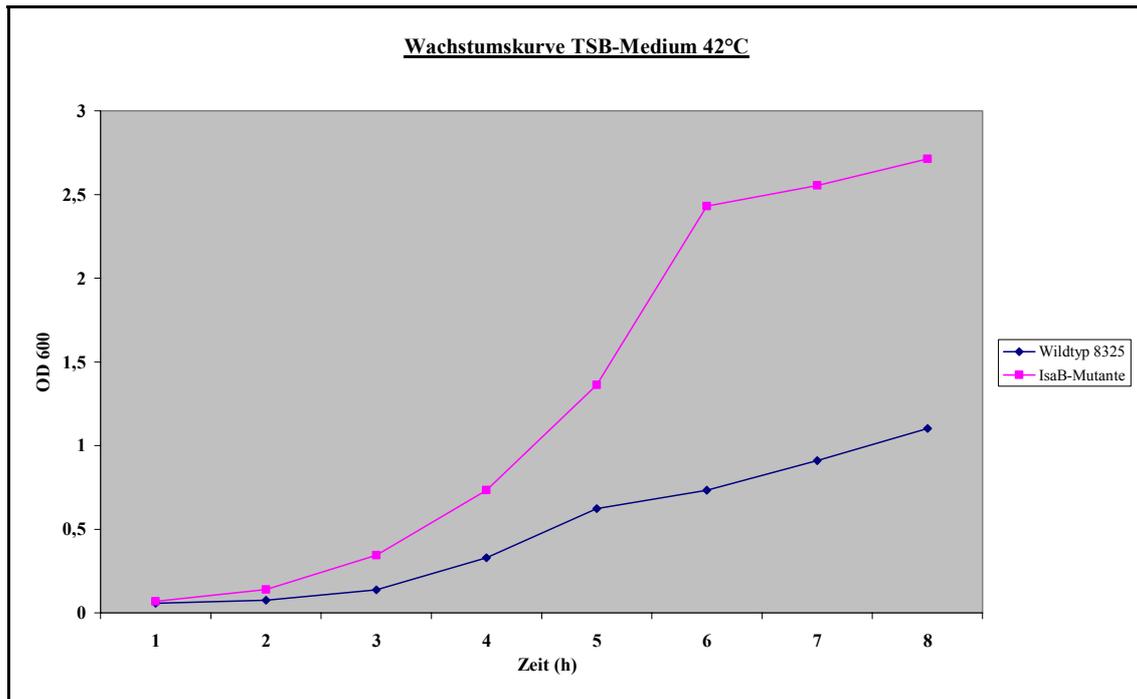


Abb. 3.30: Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der IsaB-Mutante: Wachstumskurve der Mutante (rote Linie) im Vergleich zum Wildtyp bei 42 °C in TSB-Medium. Die optische Dichte gemessen bei 600 nm (OD₆₀₀) wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Das 42 °C-Experiment in TSB-Medium unterscheidet sich nur unwesentlich von dem mit 37 °C. Die Startphase ist bei der Mutante etwas kürzer als beim Wildtyp. Sie ist schon nach ca. 1 Stunde abgeschlossen, wohingegen der Wildtyp erst nach ca. 3 Stunden von der lag-Phase in die logarithmische Wachstumsphase übergeht. Hier zeigt sich durch deutlich bessere OD-Werte der Mutante im Vergleich zum Wildtyp der Wachstumsvorteil der IsaB-Mutante. Die stationäre Phase erreicht die IsaB-Mutante nach ca. 7 Stunden mit einer OD von 2,554, der Wildtyp erst nach den untersuchten 8 Stunden mit einer OD von 1,101 (vgl. Abb. 3.30).

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so besitzt die Mutante einen deutlichen Wachstumsvorteil im Vergleich zum Wildtyp. Daraus lässt sich vermuten, dass das Protein IsaB Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *S. aureus*-Stämmen haben muss, denn das Wachstum ohne IsaB ist deutlich schneller.

Tabelle 3.1: Erreichte Gesamt-OD-Werte (nach 6 h) im Wachstumsexperiment in LB-Medium bei 30 °C, 37 °C und 42 °C von Wildtyp 8325 und IsaB-Mutante

	LB-Medium 30 °C	LB-Medium 37 °C	LB-Medium 42 °C
Wildtyp 8325	0,71	3,081	3,09
IsaB-Mutante	1,573	3,174	3,195

Tabelle 3.2: Erreichte Gesamt-OD-Werte (nach 6 h) im Wachstumsexperiment in TSB-Medium bei 30 °C, 37 °C und 42 °C von Wildtyp 8325 und IsaB-Mutante

	TSB-Medium 30 °C	TSB-Medium 37 °C	TSB-Medium 42 °C
Wildtyp 8325	0,884	1,526	1,101
IsaB-Mutante	1,301	2,798	2,712

5.2 Wachstumsvergleich von Wildtyp und Mutante bei Glucose- und NaCl-Zusatz

Um den Einfluss von unterschiedlichen externen Stressfaktoren auf das Wachstum von Mutante und Wildtyp zu analysieren, wurden Wachstumsexperimente beider Stämme bei 37 °C mit 2 M LB-Glucose und 1 M LB-NaCl-Lösung durchgeführt. Die Bakterienkulturen wurden in LB-Medium auf eine Anfangskonzentration von 0,02 bei einer OD₆₀₀ verdünnt, den einzelnen Stressfaktoren, Glucose bzw. NaCl ausgesetzt, bei 37 °C im Erlenmeyer-Kolben geschüttelt und jede Stunde im Photometer ihre jeweilige Konzentration bei OD₆₀₀ gemessen. Den Ansätzen wurde dabei wie im vorausgegangenen Experiment kein Antibiotikum zugesetzt. Die typischen Wachstumsverläufe der Mutante und des Wildtyps sind in der Abb. 3.31 dargestellt.

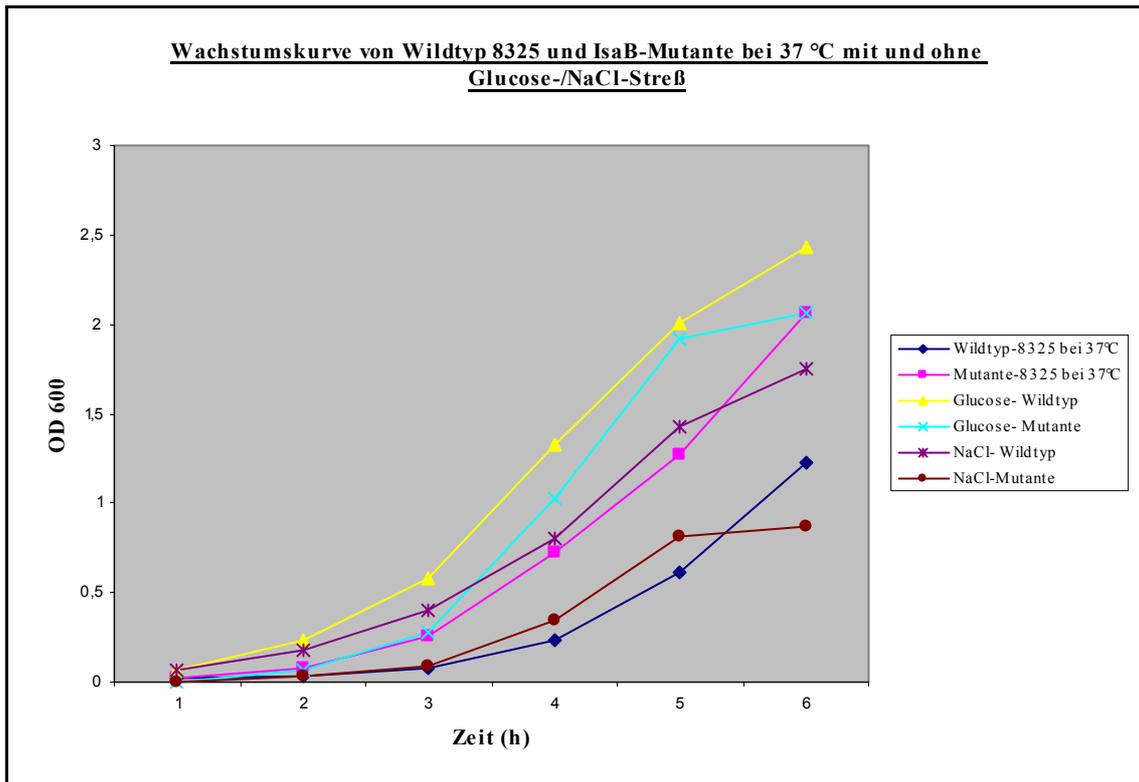


Abb. 3.31: Zusammenfassende Abbildung des Wachstumsverhaltens der *IsaB*-Mutante und des Wildtyps: Wachstumskurve der Mutante ohne Zusatz (rosa Linie) im Vergleich zur Kultivierung mit 2 M Glucose (türkise Linie) und 1 M NaCl (braune Linie) bei 37 °C in LB-Medium und des Wildtyps ohne Zusatz (dunkelblaue Linie), mit 2 M Glucose (gelbe Linie) und mit 1 M NaCl (lila Linie). Die optische Dichte gemessen bei 600 nm (OD₆₀₀) wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Nach einer 2 - 3stündigen lag-Phase traten die Stämme unter den gewählten Wachstumsbedingungen in die log-Phase ein. Dabei wurde deutlich, dass der Wildtyp in Anwesenheit von Glucose und NaCl eine höhere Zelldichte erreichte als die *isaB*-Mutante. Besonders bei Wachstum mit 1 M NaCl wurde der Wachstumsvorteil des Wildtyps deutlich. Die Startphase der *isaB*-Mutante ist bei NaCl-Zusatz im Vergleich zum Wildtyp, der sich ca. eine Stunde in der lag-Phase hält, verlängert auf ca. drei Stunden. Die darauffolgende Phase optimalen Wachstums ist bei der *isaB*-Mutante gegenüber dem Wildtyp verkürzt. Die Mutante erreicht schon nach fünf Stunden die stationäre Phase (Abb. 3.31: lila = Wildtyp und braune Linie = *IsaB*-Mutante). Nach 6 Stunden erreichte der Wildtyp eine OD_{600nm} von ca. 1,7 und die Mutante von 0,8. Auch bei Wachstum mit Glucose war während der gesamten Wachstumszeit ein leichter Wachstumsvorteil des Wildtyps zu beobachten. Die Mutante erreicht auch früher als der Wildtyp die stationäre Phase (Abb. 3.31: gelbe Linie = Wildtyp und türkise Linie =

IsaB-Mutante). Nach 6 h erreichte der Wildtyp eine OD_{600nm} von ca. 2,5 und die Mutante von 2,0. Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante einen Wachstumsvorteil bei Kultur ohne Zusatz von Stressoren. (Abb. 3.31: dunkelblaue = Wildtyp und rosa Linie = IsaB-Mutante). Die Mutante erreichte nach 6 h Kultur eine OD_{600nm} von 2,0 im Vergleich zu ca. 1,0 beim Wildtyp.

Fasst man die Ergebnisse aus diesem Wachstumsexperiment zusammen, wies die IsaB-Mutante im Vergleich zum Wildtyp sowohl im Glucose-Ansatz als auch im NaCl-Ansatz ein deutlich schlechteres Wachstum auf. Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem Wachstum beider Stämme ohne Zusätze, so ist erkennbar, dass die Mutante ihren Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp durch Glucose- und NaCl-Zugabe verliert. Dies lässt vermuten, dass das Protein IsaB dem Bakterium *S. aureus* eine Resistenz gegenüber Stress- und Umwelteinflüssen verleiht. Diese interessanten Beobachtungen müssen durch weitere Untersuchungen bei verschiedenen Stresssituationen (z. B. oxidativer Stress, Ethanolstress) vervollständigt werden, um generelle Aussagen zur Rolle von IsaB bei der Stressbewältigung treffen zu können.

5.3 Api-Staph

Ein miniaturisiertes System zur schnellen Identifizierung von Staphylokokken und Enterokokken bietet das von der Firma *bioMérieux* entwickelte Api-Staph-System. Mit Hilfe von standardisierten biochemischen Reaktionen und einer spezifischen Datenbasis können hiermit einzelne Bakterienspezies einer Gattung identifiziert werden.

Mutante und Wildtyp unterschieden sich in dieser Testung lediglich im „ADH-Test“. Die IsaB-Mutante erzielte ein positives Ergebnis, der Wildtyp war negativ. Dieser Test besitzt als Substrat Arginin und als korrespondierendes Reaktionsenzym die Arginin-Dihydrolase.

Identifikations-Code (Auswertung des Api-Staph-Streifens anhand der Anleitung von bioMérieux und ATCC, American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA):

Wildtyp: ATCC 6736112

Mutante: ATCC 6736113

Dieser Identifikations-Code entsprach bei beiden weitestgehend dem des Typus *Staphylococcus aureus*. Eine Abweichung betrifft das Substrat Arginin. Dies zeigt, dass die Mutante durch die Inaktivierung von IsaB, Defizite im Argininstoffwechsel besitzen muss.

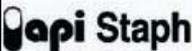
		REF.: <u>IsaB-Mutante</u> Origine / Source / Herkunft / Origen / Prelievo : _____																		
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
O	GU	FRU	MNE	HAL	LAC	TRE	MAN	XIT	MEL	NIT	FAL	VP	RAF	KYL	SAC	MDG	NAG	ACH	LBE	LSTR
-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
6		7			3			6			1			1			3			
Autres tests / Other tests / Weitere Tests / Altri tests / Otros tests :																Ident. : 6736113				

Abb. 3.32: Verhalten der **IsaB-Mutante** im apiStaph-Test (+ entspricht einer Substratreaktion, - entspricht keiner Substratreaktion). Die Ziffern sind der Identifikationscode für die Spezies *S. aureus*.

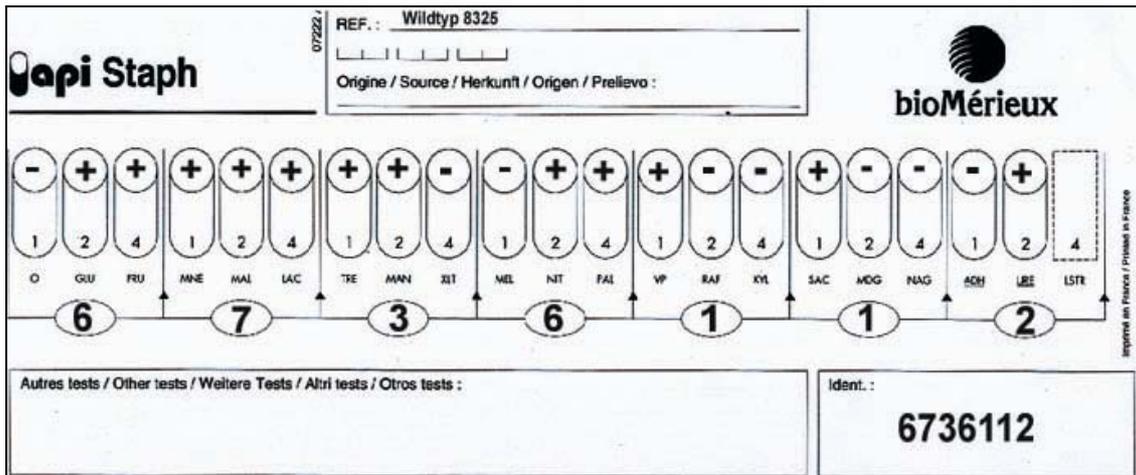


Abb. 3.33: Verhalten des **Wildtyps 8325** im apiStaph-Test (+ entspricht einer Substratreaktion, - entspricht keiner Substratreaktion) siehe vorherige Abb. Die Ziffern des Identifikationscodes unterscheiden sich von der Mutante lediglich in der letzten Ziffer. Gemäß der apiStaph-Anleitung handelt es sich hierbei auch eindeutig um die Spezies *S. aureus*.

5.4 Blutplatten – Hämolyseverhalten von Mutante und Wildtyp

Wichtige Virulenzfaktoren von *S. aureus* sind die vier sekretierten Hämolsine (Toxine) α -, β -, δ - und γ -Toxin. Ein Stamm kann verschiedene Kombinationen der vier Hämolsintoxine exprimieren und dementsprechend stark Erythrozyten zerstören. Die jeweiligen Toxine besitzen eine unterschiedlich ausgeprägte Aktivität gegenüber Erythrozyten verschiedener Tierspezies. Zum Beispiel sind Kaninchen-Erythrozyten besonders empfindlich gegenüber dem α -Toxin. Wie in Abbildung 3.34 zu erkennen ist, war die Fähigkeit der Mutante Kaninchen-Erythrozyten zu lysieren im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringer ausgeprägt. Dies kann auf eine verringerte Toxin-Produktion der Mutante zurückzuführen sein und könnte damit eine verringerte Virulenz der Mutante anzeigen. IsaB hat somit einen Einfluss auf das Erythrozyten-Lyseverhalten von *S. aureus* und beeinflusst möglicherweise direkt die Virulenz des Organismus.



Abb. 3.34: Hämolyseverhalten des Wildtyps 8325 (links) und der *isaB*-Mutante. Beide Stämme wurden auf Kaninchen-Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.5 Magermilchplatten – Proteolyseverhalten von Wildtyp und Mutante

Wie Abbildung 3.35 zeigt, war das Lyseverhalten der Mutante auf einer Magermilchplatte stärker ausgeprägt als beim Wildtyp. Dies kann an einer unterschiedlichen Expression von Proteasen in Wildtyp 8325 und der *IsaB*-Mutante liegen. Dies verstärkt die Vermutung, dass *IsaB* wichtige Virulenzfaktoren in ihrer Aktivität moduliert.



Abb. 3.35: Proteolyseverhalten des Wildtyps 8325 (links) und der *isaB*-Mutante. Beide Stämme wurden auf Milcheiweiß-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.6 Biofilmbildung

Im Weiteren wurde die Fähigkeit einen Biofilm auszubilden bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dafür wurden zwei Testsysteme verwendet: Zum einen wurden die Stämme in Glasröhrchen kultiviert (Abb. 3.36), um einen ersten Hinweis auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung zu bekommen, andererseits wurde die Biofilmbildung quantitativ in einem Mikrotiterplattentest bestimmt (Abb. 3.37). Bei diesen Experimenten wurde deutlich, dass die Mutante eine ca. vierfach verringerte Fähigkeit zur Biofilmbildung besitzt.

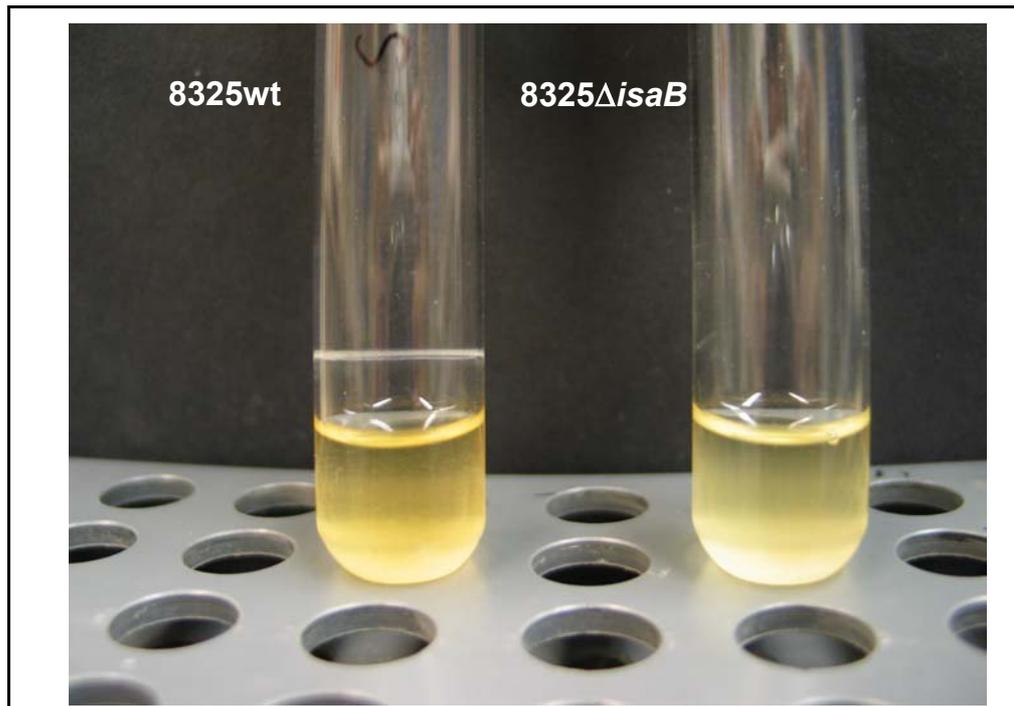


Abb. 3.36: ÜN-Kulturen des Wildtyps (links) und der *isaB*-Mutante (rechts) in TSB-Medium mit 0,25 % Glukose. Deutlich ist ein Ring adhärenter Bakterien bei der Wildtypkultur zu erkennen, die bei der Mutantenkultur fehlt.

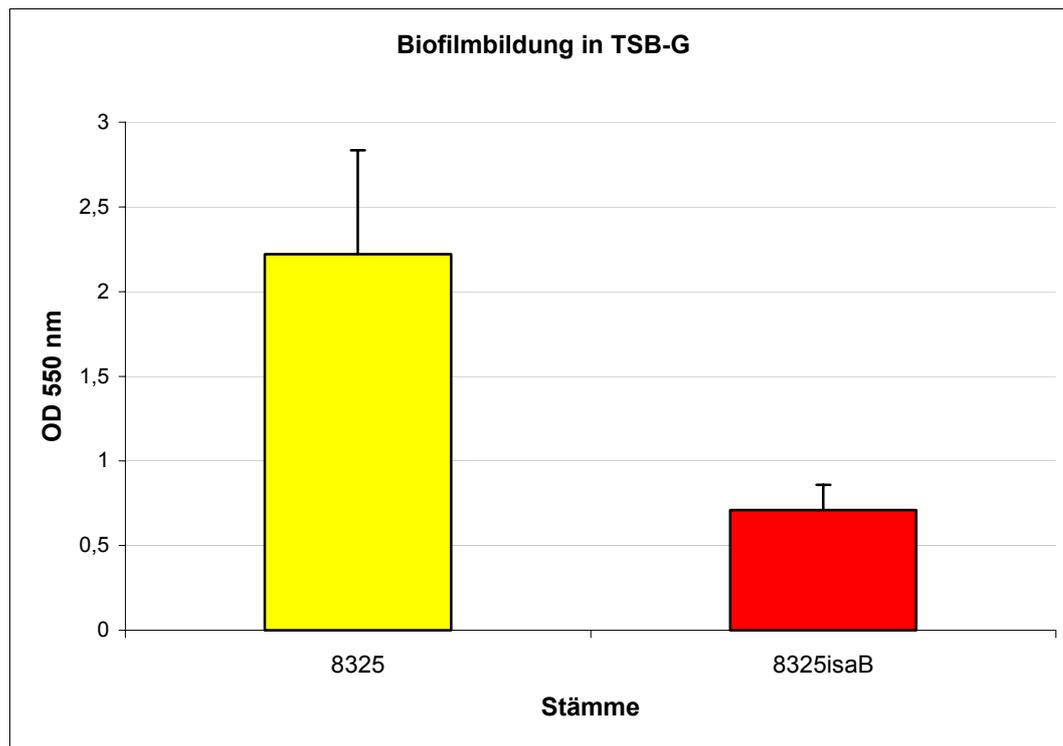


Abb. 3.37: Quantitative Biofilmbestimmung des Wildtyps 8325 und der *isaB*-Mutante im Mikrotiterplattentest. Die Bakterien wurden in TSB mit 0,25 % Glukose über Nacht kultiviert. Die Biofilmbildung wurde mittels Kristallviolett sichtbar gemacht und im ELISA-Reader bei 550 nm gemessen.

5.7 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Wildtyp 8325 und *IsaB*-Mutante

In der weiteren Charakterisierung der Mutante war die Ermittlung der Empfindlichkeit der Mutante gegenüber Antibiotika im Vergleich zum Wildtyp interessant. Das Wachstum des Wildtyps 8325 und der *IsaB*-Mutante in Medien mit verschiedenen Antibiotika zeigte ein unterschiedliches Wachstumsverhalten *in vitro* der beiden Stämme. Durch die Erythromycinkassette hatte die Mutante eine Resistenz gegenüber dem Makrolid Erythromycin erworben. Weiterhin besaß die *IsaB*-Mutante eine *in vitro*-Resistenz gegenüber dem Lincosamidantibiotikum Clindamycin und eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Chinolon Ofloxacin (8 µg/ml Wildtyp versus 64 µg/ml bei der Mutante). Keinen Unterschied im Wachstumsverhalten zeigten die beiden

Bakterienstämme für das Aminoglykosidantibiotikum Gentamicin und das β -Lactamase-feste Penicillin Methicillin (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Wildtyp 8325 und der IsaB-Mutante.

Antibiotikum	Wildtyp 8325	IsaB-Mutante
Gentamicin	64 $\mu\text{g/ml}$	64 $\mu\text{g/ml}$
Erythromycin	4 $\mu\text{g/ml}$	>512 $\mu\text{g/ml}$
Clindamycin	1 $\mu\text{g/ml}$	>512 $\mu\text{g/ml}$
Methicillin	<0,5 $\mu\text{g/ml}$	<0,5 $\mu\text{g/ml}$
Ofloxacin	8 $\mu\text{g/ml}$	64 $\mu\text{g/ml}$

Interessant erscheint die erhöhte Resistenz der IsaB-Mutante gegenüber Ofloxacin. Weitere Untersuchungen zum Resistenzmechanismus müssen zeigen, ob die bekannten Resistenzmechanismen mit Mutationen in der DNA-Gyrase (*gyrA*) und Topoisomerase IV (*grlA*) und das Vorhandensein von Multi-Drug-Transportern (NorA) betroffen sind oder zusätzliche Faktoren wirken.

IV. Diskussion

Nosokomiale Infektionen sind keine neu entdeckten Infektionen des 20. Jahrhunderts, sondern sind schon so lange bekannt, wie Krankenhäuser zur Behandlung von Kranken existieren. Nach dem Infektionsschutzgesetz wird eine Infektion als nosokomial bezeichnet, wenn sie neben den allgemeinen Definitionen einer Infektion (lokale oder systemische Infektionszeichen im zeitlichen Zusammenhang mit Erregern oder Toxinen) erst durch den stationären Krankenhausaufenthalt aufgetreten sind, d. h. vor Aufnahme ins Krankenhaus weder bestanden noch in der Inkubationsphase waren. Aufgrund der wissenschaftlichen Errungenschaften der heutigen modernen Medizin, mit der Möglichkeit durch Medikamente und neuen invasiven therapeutischen und diagnostischen Verfahren den Patienten länger am Leben zu erhalten, nahmen auch die nosokomialen Infektionen zu. Multimorbide, alte, polytraumatisierte und immungeschwächte Patienten sind davon besonders betroffen. Hinzu kommt die Zunahme von Resistenzen und Multiresistenzen der Erreger von Krankenhausinfektionen, welche die Behandlung und Prävention von nosokomialen Infektionen deutlich aggravierend machen. Die Ursachen und Risiken von Krankenhausinfektionen liegen somit auf vielen verschiedenen Ebenen. Zum einen liegen sie am Patienten, zum anderen an der Umwelt, des Weiteren an der Medizintechnik, an den Behandlungsformen, am medizinischen Personal und nicht zuletzt an den für uns interessanten mikrobiologischen Faktoren. Die erste repräsentative Studie zur Prävalenz von nosokomialen Infektionen in Deutschland von 1994 (NIDEP 1) ergab, dass die meisten Krankenhausinfektionen auf den Intensivstationen (15,3 %) anzutreffen sind. Auf chirurgischen Stationen betrug die Prävalenz 3,8 %, auf internistischen Stationen 3,0 % und in der Gynäkologie und Geburtshilfe ebenso 3,0 %. Die häufigsten nosokomialen Infektionen waren dabei Harnwegsinfektionen (40 %), Infektionen der Atemwege (20 %), postoperative Wundinfektionen (15%) und Sepsis (8 %). Die Erreger von Krankenhausinfektionen fallen durch ihre zunehmenden Multiresistenzen auf. Es handelt sich dabei vor allem um *S. aureus*, koagulasenegative Staphylokokken, *Pseudomonas aeruginosa*, Klebsiellen, *E. coli* und Enterokokken. Der Trend der vergangenen Jahre zeigt einen interessanten Erregerwechsel an. Während in den 80iger Jahren vorwiegend gramnegative Bakterien

als Ursache von nosokomialen Infektionen identifiziert wurden, überwiegen gegenwärtig die grampositiven Erreger. In Tabelle 4.1 sind die fünf häufigsten Erreger von Katheter-assoziierten Infektionen sowie von Beatmungspneumonien im Zeitraum 1997 - 2002 in Deutschland aufgelistet (Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 8 des RKI, Juni 2002).

Tabelle 4.1: Anteil der fünf häufigsten Erreger an den insgesamt erfassten Erregern für die drei *device*-assoziierten nosokomialen Infektionen im Zeitraum Januar 1997 bis Juni 2002 (Epidemiologisches Bulletin des RKI, Ausgabe 9/2003)

Rangfolge	Beatmungs-assoziierte Pneumonie	ZVK-assoziierte Sepsis	Katheter-assoziierte HWIs
1.	<i>S. aureus</i> (24,1 %)	Koagulase-neg. Staphylokokken (30,9 %)	<i>Enterobacter spp.</i> (25,8 %)
2.	<i>P. aeruginosa</i> (16,8 %)	<i>S. aureus</i> (15,5 %)	<i>E. coli</i> (25,6 %)
3.	<i>Klebsiella spp.</i> (12,1 %)	<i>Enterobacter spp.</i> (11,6 %)	<i>P. aeruginosa</i> (12,9 %)
4.	<i>E. coli</i> (10,5 %)	<i>E. coli</i> (5,8 %)	<i>C. albicans</i> (8,8%)
5.	<i>Enterobacter spp.</i> (9,1 %)	<i>Klebsiella spp.</i> (5,0 %)	<i>Klebsiella spp.</i> (6,1 %)

Besonders problematisch zeigt sich die Entwicklung bei durch Staphylokokken verursachte Krankenhausinfektionen, da der Anteil methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) in einigen klinischen Bereichen bereits bei über 40 % liegt (Tab. 4.2).

Tabelle 4.2: Infektionen mit MRSA in verschiedenen klinischen Disziplinen nach Art der Infektion, Deutschland 2002 (Epidemiologisches Bulletin des RKI, Ausgabe 35/2003) auf welcher Grundlage beruhen diese Zahlen, da es sich nur um einen Ausschnitt aller Infektionen handelt)

	Innere Medizin	Intensiv	Chirurgie	Neurologie	Dermatologie	Orthopädie	Urologie	Gynäkologie	Ohne Angabe
Sepsis	39 % (n=86)	28 % (n=63)	17 % (n=37)	3 % (n=7)	-	-	-	-	13 % (n=30)
Pneumonie	31 % (n=134)	44 % (n=192)	6 % (n=26)	6 % (n=26)	-	-	-	-	13 % (n=13,4)
Wund-Infektion	23 % (n=291)	6,6 % (n=84)	40 % (n=512)	2,7 % (n=34)	2,8 % (n=35)	2,5 % (n=31)	1,1 % (n=14)	1,2 % (n=15)	13,4 % (n=162)
HWI	31 % (n=44)	-	10 % (n=40)	8,5 % (n=12)	-	-	20 % (n=29)	-	30,5 % (n=162)
Summe	27 % (n=555)	16 % (n=339)	29 % (n=589)	3,8 % (n=79)	1,7 % (n=35)	1,5 % (n=31)	2 % (n=43)	0,7 % (n=15)	14,2 % (n=295)

Neben präventiven Maßnahmen zur Bekämpfung von nosokomialen Infektionen wie z. B. strenge Hygienemaßnahmen ist es wichtig, die Therapie zu verbessern. Dabei sind auch Alternativen zur Antibiotikabehandlung notwendig und somit das Ziel vieler aktueller Forschungsvorhaben. Die Weiterentwicklung der unspezifischen und spezifischen Immuntherapie nimmt dabei einen hohen Stellenwert ein und soll in dieser Arbeit näher betrachtet werden.

1. Einsatz von monoklonalen Antikörpern im Rahmen der Immuntherapie

Schon im Jahre 1900 beschrieb Paul Ehrlich in der Croonian-Lecture, dass die Funktion von Antikörpern nicht nur in der Abwehr von Infektionen zu sehen ist und stellte die Hypothese auf, das Immunsystem zur spezifischen Therapie von Tumoren nutzen zu können (Ehrlich, 1900). Leider fehlte ihm hierzu der molekulargenetische Hintergrund über die Struktur der Immunglobuline. Durch den technischen Fortschritt konnten Porter und Edelman 1972 den molekularen Aufbau der Immunglobuline entschlüsseln und somit die Forschung auf diesem Gebiet vorantreiben (Porter, 1967; Edelman, 1968). Immunglobuline gehören dem spezifischen humoralen (löslichen) Immunsystem an. Nach Eindringen des Antigens in den Organismus, bilden unspezifische Abwehrmechanismen wie Bestandteile des zellulären Immunsystems (NK-Zellen, Makrophagen, Granulozyten) eine erste Abwehrfront. Dabei werden eindringende Mikroorganismen von spezifischen Antigen präsentierenden Zellen molekular zerlegt und deren spezifische Antigene T-Helferzellen präsentiert, die B-Lymphozyten aktivieren. Durch vielfältige Botensignale und weiteren humoralen Faktoren kommt es zur Reifung der Antikörper produzierenden Plasmazelle. Durch klonale Selektion (Burnet, 1959) wird genau der Antikörper synthetisiert, der den Rezeptoren des eingedrungenen Antigens entspricht. Die Grundstruktur eines Immunglobulinmoleküls besteht aus vier Proteinketten, zwei schweren (heavy) H-Ketten von ca. 50 kD und zwei leichten (light) L-Ketten von ca. 25 kD, diese sind in Form eines Y über zwei Disulfidbrücken verknüpft. Die Antigenbindungsstelle befindet sich an den Enden der

beiden kurzen Arme des Y. Dieser Teil des Antikörpers, auch Fab-Fragment („fragment antigen binding“) genannt, lässt sich durch das Enzym Papain von dem homogenen Fc-Fragment („fragment crystalline“ – kristallisiert in Lösung leicht aus) spalten. Das Fc-Fragment ist für die biologische Aktivität (ADCC-„antibody dependent cellular cytotoxicity“, CDC-„complement mediated cytotoxicity“) verantwortlich. Diese beiden Teile erklären auch die Begriffe der direkten und indirekten Schutzfunktionen der Antikörper. Die direkte Wirkung erfolgt durch Bindung bzw. Neutralisierung des Antigens/Toxins am Fab-Fragment. Die indirekte Wirkung entspricht der biologischen Aktivität des Antikörpers (Fc-Fragment).

Antikörper sind sehr flexible Moleküle. Die Ketten bestehen aus mehreren Domänen, welche beweglich miteinander verbunden sind. Die Domänen repräsentieren den genetischen Aufbau des jeweiligen Immunglobulins. Der Mensch besitzt fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen:

- IgA: Dimer, Hauptimmunglobulin der externen Sekretion über Schleimhäute (Speichel, Schleim, Darmsekret, Tränen, etc.),
- IgD: Oberflächenrezeptor auf B-Lymphozyten, Beteiligung an deren Differenzierung,
- IgE: hohe Affinität zu Mastzellen und basophilen Leukozyten – Degranulation dieser und Freisetzung von Histamin, Leukotriene, Heparin, etc.; Überempfindlichkeitsreaktion; Abwehr von Parasiten,
- IgG: fünf Unterklassen, häufigstes Immunglobulin, plazentagängig, Makrophagenaktivierung, Prozessierung des Antikörper-Antigenkomplexes,
- IgM: Antikörper der Frühphase, Komplementaktivierung.

Therapeutisch und diagnostisch einsetzbare Antikörper sollen ihren physiologischen „Vorbildern“ entsprechen. Revolutioniert wurde dieses Gebiet durch Köhler und Milstein, welche 1975 für ihre Hybridomtechnik zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern den Nobelpreis bekamen (Köhler and Milstein, 1975). Durch Immunisierung von Mäusen mit humanen Antigenen gewann man murine Antikörper (Endung: -omab) mit entsprechendem antigenen Epitop. Problematisch in der Anwendung muriner Antikörper ist jedoch die Mauskomponente, welche häufig zur

Aktivierung des humanen Immunsystems und Bildung von Anti-Antikörpern, sogenannten HAMAs – „human anti-mouse antibody“, führt (Hasholzner et al., 1997). Die murinen Antikörper werden von den HAMAS gebunden, neutralisiert und eliminiert. Diese „allergische Reaktion“ kann bis zur Anaphylaxie reichen. Daher werden nun große Anstrengungen unternommen, die tierischen Antikörper so weit wie möglich zu humanisieren. Eine Möglichkeit besteht in dem Ersatz des konstanten murinen Teils des Antikörpers durch humane Komponenten. Diese erhält man durch vielfältige rekombinante gentechnische Verfahren. Dabei bleibt der Antigen bindende Teil des murinen Antikörpers bestehen, nur der konstante Teil, welcher die biologische Aktivität des Antikörpers repräsentiert, ändert sich. Solche Antikörper nennt man „chimäre“ Antikörper (Endung: -ximab). Erste Erfolge mit chimären Antikörpern hatten Veihoeven et al. 1988. Ersetzt man in weiteren Schritten noch Teile der variablen Domäne durch humane Gensequenzen gewinnt man „humanisierte“ Antikörper (Endung: -zumab). Diese sehr zeitaufwendigen und teuren Verfahren machen es zum Ziel der heutigen Forschung, vollständig „humane“ Antikörper (Endung: -umab) produzieren zu können, um dadurch gezielter in das menschliche Immunsystem einzugreifen und Nebenwirkungen durch tierische, fremde Anteile zu reduzieren. Eine Möglichkeit wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt, die Fusion von HAB-Zellen (humane Hybridomzellen) mit MRSA-infizierten B-Lymphozyten, jedoch leider ohne Erfolg. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, „transgene“ Mäuse zu gewinnen, deren Ig-kodierende DNA durch humane Sequenzen ersetzt wurden (Li et al, 2005). Die Gewinnung humaner Antikörper ist sehr schwer und aufwendig, daher ist es nicht verwunderlich, dass bisher zugelassene Antikörper keine reinen humanen Antikörper sind.

Es ist, nach wie vor, eine große Herausforderung für die Forschung, humane Antikörper zu entwickeln. Es wird zur Zeit an mehr als 400 möglichen Kandidaten für therapeutische monoklonale Antikörper geforscht, doch nur 17 sind bisher (Stand 2004) von der FDA (US Food and Drug Administration) bzw. einzelne nur in Deutschland, Australien und Venezuela zugelassen (Brekke and Loset, 2003; Stern and Herrmann, 2005).

Tabelle 4.3: Bisher von der FDA (US Food and Drug Administration) bzw. in Deutschland, Australien und Venezuela zugelassene Antikörper (Stand 2004), (Brekke and Loset, 2003 und Stern and Herrmann, 2005).

Antikörper	Handelsname/ Firmen/ Zulassung	Zielantigen	Indikation	Herstellung/Art des AK
Muromab	<i>OKT 3®/</i> Johnson&Johnson/ Juni 1986	CD 3	Transplantatabstoßung	Murin
Abciximab	<i>ReoPro®/</i> EliLilly/ Dezember1994	GPIIa/IIIb	Koronare Revaskularisation	Chimär
Edrecolomab	<i>Panorex®/</i> Centocor/ 1995 <i>(nur in Deutschland zugelassen)</i>	EpCam	Colon-Ca Stadium Dukes C	Murin
Rituximab	<i>Mabthera®/</i> Genentech/ November 1997	CD 20	Rezidiertes follikuläres B-Non- Hodgkin-Lymphom	Chimär
Daclizumab	<i>Zenapex®/</i> Roche/ Dezember 1997	CD 25	Transplantatabstoßung	Humanisiert
Basiliximab	<i>Simulect®/</i> Novartis/ Mai 1998	CD 25	Transplantatabstoßung	Chimär
Pavilizumab	<i>Synagis®/</i> MedImmune/ Juni 1998	RSV	Prophylaxe gegen RSV-Infektion	Humanisiert
Infliximab	<i>Remicade®/</i> Johnson&Johnson/ August 1998	TNF- α	Rheumatoide Arthritis, M. Crohn	Chimär

Trastuzumab	<i>Herceptin®</i> / Genentech/ September 1998	Her2/neu	Metastasiertes Mamma-Ca	Humanisiert
Gemtuzumab- Zogamicin	<i>Mylotarg®</i> / American Home Products/ Mai 2000	CD 33	Rezidierte (oder rezidivierende) akute myeloische Leukämie	Humanisiert (Toxin gekoppelt)
Alemtuzumab	<i>Campath®</i> / Millenium Pharmaceuticals/ Mai 2001	CD 52	Chronisch lymphatische Leukämie	Humanisiert
Ibritumomab- Tiuxetan	<i>Zevalin®</i> / IDEC Pharmaceuticals/ Februar 2002	CD 20	Non-Hodgkin- Lymphom	Chimär (Radionukleoid- gekoppelt)
Omalizumab	<i>Xolair™</i> / Tanox/Genentech/ Novartis/ 2002 <i>(nur in Australien und Venezuela zugelassen)</i>	IgE-Fc-Teil	Allergien	Humanisiert
Adalimumab	<i>Humira™</i> / Abbott/CAT/ 2003	TNF- α	Rheumatoide Arthritis	Humanes IgG1
¹³¹ I- tositumomab	<i>Bexxar®</i> / GlaxoSmithKline/ Corixa/ 2003	CD20	B-Zell-Lymphom	Murin (Radionukleoid- gekoppelt)
Efalizumab	<i>Raptiva®</i> / Serono Pharma/ 2003	CD 11a	Psoriasis	Humanisiert Antikörper
Bevacizumab	<i>Avastin®</i> / Roche/2004	VEGFR	Colon-Ca	Humanisiert

Cetuximab	<i>Erbix[®]</i> Merck/ 2004	EGFR	Colon-Ca	Chimär
-----------	--	------	----------	--------

Ein Grund für die in dieser Arbeit misslungenen „Fusionsversuche“ von HAB-Zellen mit B-Lymphozyten von Patienten mit Nachweis einer MRSA-Infektion im Blut, könnte zum einen die geringe Zahl der gewonnenen B-Lymphozyten aus dem zur Verfügung gestellten Patientenmaterial sein. B-Lymphozyten befinden sich im menschlichen Körper zum einen im Blut, Gewebe, Lymphknoten, -bahnen und natürlich dem größten lymphatischen Organ, der Milz. Leider konnte man für diese Arbeit nur Blut und Lymphknotengewebe gewinnen, so dass mit einer geringeren Menge an B-Lymphozyten die Versuche gestartet wurden.

Ein weiterer Grund könnte im defekten Immunsystem der betroffenen Patienten liegen und damit evtl. auch defekten B-Lymphozyten, so dass keine funktionsfähige Antikörperproduktion von Seiten der B-Lymphozyten möglich war.

Auffällig bei dem Auftreten von bakteriämischen und septischen MRSA-Infektionen ist nämlich die deutlich eingeschränkte Abwehrfunktion der Patienten (Bsp.: Patient mit Myelodysplastischem Syndrom, s. o.), ansonsten handelt es sich meist um lokale Infektionen bei immungeschwächten Patienten (Diabetiker, Hospitalinfektionen, Polytraumen, geriatrische Patienten, Intensivpatienten, Kinder, v. a. Früh- und Neugeborene). Der MRSA-Nachweis gelingt dabei nur aus Gewebe-Abstrichen, nicht aus dem Blut. Dies ist aber auch ein wichtiger Hinweis, dass die humorale und zelluläre Immunreaktion ein wichtiger Bestandteil der Infektion mit *S. aureus* ist und daher ideale Ansatzmöglichkeiten für neue Therapien von bakteriellen Infektionen bietet (Etz et al., 2002).

Weiterhin könnte man vermuten, dass es bei MRSA-Infektionen zur Produktion von Substanzen kommt, welche das Immunsystem des Körpers zum Wachstumsvorteil der Bakterien verändert und so keine adäquate Abwehrreaktion stattfinden kann.

Eine weitere Möglichkeit des Scheiterns der Fusion könnte in der oft schon stattgefundenen Antibiotikatherapie liegen, so dass zu wenige Erreger dem Immunsystem präsentiert wurden.

Weiterhin muss auch das Antigen, gegen das ein spezifischer Antikörper produziert werden soll, bestimmte Kriterien erfüllen. Zum einen sollte es spezifisch für die Zielzelle/Bakterium sein. Dieses Kriterium erfüllt IsaA wie durch Testung verschiedener Bakterienarten im Westernblot gezeigt werden konnte. IsaA ist spezifisch für *S. aureus*. Ein IsaA-spezifischer monoklonaler Antikörper würde somit nur gegen *S. aureus* gerichtet sein und die physiologische Flora im Darm und auf der Haut sowie auf Schleimhäuten nicht schädigen. Dadurch sollte die Antikörpertherapie ein geringeres Nebenwirkungspotential besitzen als eine herkömmliche Antibiotikatherapie. Allerdings ist die Möglichkeit des Entstehens von Immunkomplexen sorgfältig zu untersuchen.

Außerdem muss ein potentielles Antigen in ausreichender Dichte an der Oberfläche der Zielzelle exprimiert werden, damit der Antikörper effektiv andocken kann. Ob diese Voraussetzung für die Expression von IsaA zutrifft, ist nicht ausreichend dokumentiert. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass IsaA Zellwand-assoziiert vorliegt (Sakata, 2005). Mittels Immunogold-Techniken konnte IsaA in der *S. aureus*-Zellhülle sichtbar gemacht werden. Diese in vitro-Ergebnisse unterstützen in vivo-Beobachtungen von Lorenz et al. (2000), die eine erhöhte Anti-IsaA-Immunabwehr bei Sepsispatienten beschrieben und somit eine effektive Präsentation des IsaA-Antigens nahe legten.

Darüber hinaus ist es wichtig, dass die Antigene nicht von der Zell-/Bakterienoberfläche abgegeben werden können, sogenanntes „shedding“. Denn dadurch würde das lösliche Antigen bereits im Serum durch die Antikörper neutralisiert werden und nicht seine Wirkung an der Zielzelle entfalten. Das Antigen darf aber auch nicht durch die Zielzelle internalisiert werden, denn dadurch verliert der Antikörper im Antigen-Antikörperkomplex seine Funktion in der Aktivierung immunologischer Effektorzellen und des Komplementsystems. Ob IsaA all diese Anforderungen erfüllt, ist noch nicht eindeutig geklärt und bedarf weiterer Forschungen.

Aufgrund der zunehmenden Ausbreitung antibiotikaresistenter Keime und der drastische Anstieg multiresistenter Staphylokokken in den Krankenhäusern ist es wichtig, dass neue Therapiemöglichkeiten entwickelt und erprobt werden. Vor allem seit dem Auftreten von Vancomycin-resistenten Staphylokokken in den USA im Jahre 2002. Dies fordert nicht nur die Entwicklung von neuen potenteren Antibiotika, wie zum Beispiel Synercid und Linezolid, sondern weitere Angriffsmöglichkeiten im Kampf gegen MRSA.

Ist ein geeignetes Zielantigen gefunden und ein passender Antikörper entwickelt, bieten sich verschiedene Therapien an:

Als sogenannte naive monoklonale Antikörper:

- Blockade des Zielantigens (Bsp.: Infliximab – Blockade von TNF- α und Unterbindung der Entzündungskaskade, oder Abciximab – Blockade des Glycoproteinrezeptors GIIb/-IIIa und damit Verhinderung der Rethrombosierung),
- Opsonierung und Vermittlung weiterer Reaktionen (Bsp.: Pavilizumab – Prophylaxe von RSV-Infektionen bei Frühgeborenen),
- Direkte Wirkung auf die Zielzelle durch Signaltransduktion (Bsp.: Rituximab – Eingriff in den Zellzyklus bei malignen Lymphomen).

Weiterhin können die gewonnenen Antikörper mit zytotoxischen Agenzien konjugiert werden. Diese sogenannten „Prodrug-Immunkonjugate“ (ADEPT – „antibody-directed enzyme prodrug therapy“) mittels radioaktiver Stoffe, Immuntoxine, Zytostatika und anderen Stoffen, wie zum Beispiel Antibiotika, ist jedoch bisher nur wenig erforscht. Die Idee der Kopplung von Antikörpern mit anderen Arzneimitteln stammt aus der Diagnostik bestimmter Erkrankungen.

Meist sind es sogenannte „Problemkeime“, wie Erreger von nosokomialen Infektionen, welche durch ihre zunehmende Virulenz und Resistenzentwicklung gegen bisherige antimikrobielle Substanzen, die Forschung zur Etablierung von neuen Therapieansätzen treibt.

Vielversprechende Ergebnisse für die Entwicklung und den Einsatz von monoklonalen Antikörpern in der Therapie von Staphylokokkeninfektionen zeigen die Arbeiten von Hall et al.. Diese Arbeitsgruppe hat sich mit sogenannten MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), insbesondere dem Virulenzfaktor Clumping Faktor, beschäftigt und den murinen monoklonalen Antikörper MAb 12-9 dagegen entwickelt. Die tierexperimentellen Untersuchungen zeigen, dass der Einsatz von MAb 12-9 in mehr als 90 % der Fälle die Bindung von Fibrinogen durch *S. aureus* verhindert und somit die Virulenz reduzieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch eine einmalige Gabe von MAb 12-9 ein Schutz vor einer MRSA-Sepsis erreicht wird (Hall et al., 2003).

Weitere erfolgreiche Entwicklungen von Antikörpern in der Therapie von infektiösen Erkrankungen werden von Dunman und Nesin (2003) beschrieben. So zum Beispiel der chimäre monoklonale Antikörper BSYX-A110 gegen die Lipoteichinsäure in der Zellwand von koagulasenegativen *S. epidermidis*. Dieser soll Neugeborene mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht und nicht ausreichendem Immunsystem vor Neugeborensen schützen (Weisman et al., 2001).

Ein monoklonaler Antikörper gegen Shigatoxin 2 von *E. coli* O157:H7, welches mit dem hämolytisch-urämischem Syndrom (Gasser-Syndrom) assoziiert ist, wird derzeit in Tierexperimenten erprobt (Mukherjee et al., 2002). Ebenso strebt man bei der Behandlung von Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* (Corbett et al., 2002) und Streptokokken (Beninati et al., 2001) die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern an.

In der Therapie von viralen Erkrankungen nimmt die Immuntherapie noch einen höheren Stellenwert ein als bei anderen infektiösen Krankheiten, da derzeit fast keine effektiven antiviralen Chemotherapien zur Verfügung stehen und die Entwicklung von effizienteren antiviralen Chemotherapeutika stagniert. Meist resultiert nur eine Virenminderung, jedoch oft keine Elimination aus der Therapie. Die Entwicklung von Antikörpern in der Therapie von viralen Erkrankungen stellt jedoch ein großes Problem der Forschung dar und scheitert oft in der Praxis, was sich vor allem an der HIV-

Forschung der letzten Jahre zeigt. Meist konnten dabei nur die opportunistischen Infektionen eingedämmt werden, jedoch nicht das HI-Virus selbst eliminiert werden. Der erste zugelassene monoklonale Antikörper bei viralen Infektionen ist Palivizumab gegen RSV-Infektionen bei Neugeborenen und Kleinkindern (Sorrentino et al., 2000).

2. ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit sollte neben der Gewinnung eines monoklonalen Antikörpers gegen IsaA ein ELISA-Verfahren etabliert und eingearbeitet werden, um diesen speziellen Antikörper spezifisch nachzuweisen. Grundlage aller Immuntechniken ist die Bildung von Immunkomplexen beim Zusammentreffen von multivalenten Antigenen mit dem spezifischen Antikörper. Diese Immunkomplexe können agglutinieren, wenn partikuläres Antigen und agglutinierende Antikörper aufeinander treffen oder präzipitieren, wenn sich das Antigen in Lösung befindet und präzipitierende Antikörper zugegeben werden. Entsprechend diesen Eigenschaften der Immunkomplexe sind verschiedene vitro-Immuntechniken entwickelt worden:

- Immunpräzipitationstechniken: Immunelektrophorese, Immundiffusion nach Ouchterlony und Mancini,
- Immunagglutinationstechniken: Blutgruppenserologie, serologische Nachweismethoden bei Virus-/Bakterieninfektionen,
- Bindungstechniken: Immunfluoreszenz, Radioimmun- und Enzymimmunassay.

Dadurch lässt sich je nach Konzentration der zu analysierenden Substanz ein quantitativer und qualitativer Nachweis von Antigen oder Antikörper erbringen. Ohne Markierung, d. h. ohne Einsatz von Fluoreszenz, radioaktiven Stoffen oder Enzymen, lassen sich nur Substanzen in einer Konzentration von mehr als 1 mg/l nachweisen.

In dieser Arbeit wurde als Immunverfahren zum Nachweis eines spezifischen monoklonalen Antikörpers gegen IsaA ein indirekter, nicht-kompetitiver Enzymimmunassay gewählt. Er ist eine empfindliche Methode zum Nachweis geringer Mengen an Antikörper. Er ist spezifisch für den zu analysierenden Antikörper, leicht reproduzierbar durch etablierte und standardisierte Vorgehensweisen, die Kosten sind im Vergleich zu anderen Immunverfahren gering. Die verwendeten Reagenzien sind von langer Lebensdauer und die Auswertung entspricht den wissenschaftlichen Standards für Tests bzw. Nachweisverfahren. Durch die Verwendung von harmlosen Enzymen zur Detektion werden keine großen Sicherheitsmaßnahmen für das entsprechende Labor vorausgesetzt, so dass der ELISA auch in kleinen Labors ohne die Ausstattung eines großen Zentrallabors durchführbar ist. In Tabelle 4.4 sind Merkmale von ELISA, RIA und FIA gegenübergestellt.

Tabelle 4.4: Vergleich der Effizienz der Bindungsimmunotechniken (Boffey et al., 1985)

	ELISA	RIA	FIA
Spezifität	+	+	+
Empfindlichkeit	+	+	+
Reproduzierbarkeit	+	+	+
Kosten	+	-	-
Lebensdauer der Reagenzien	+	-	+
Auswertung (objektiv mit Geräten)	+	+	+
Auswertung (automatisiert)	+/-	+/-	+/-
Auswertung (subjektiv)	+	-	-
Sicherheit	+	-	+
Anwendbarkeit in großen klein. Zentren	+	+	+
Anwendbarkeit in kleinen Laboratorien	+	-	+/-

Ein ELISA kann prinzipiell auf drei Arten durchgeführt werden:

- direkter ELISA
- indirekter ELISA
- Sandwich ELISA

Aus diesen drei Arten kann dann sowohl ein kompetitives (Konkurrenz zweier Antigen oder Antikörper) als auch ein inhibitorisches (Blockierung durch ein weiteres Antigen bzw. Antikörper) ELISA-Verfahren entwickelt werden. Dadurch lässt sich die Affinität

des zu bestimmenden Antigens oder Antikörpers genauer beurteilen. Die unter Standardbedingungen gemessene Menge der Enzymaktivität im ELISA-Reader ist der Menge des gesuchten spezifischen Antigens oder Antikörpers direkt proportional.

Das einfachste Verfahren ist der direkte ELISA. Das zu bestimmende Antigen oder der zu bestimmende Antikörper wird an die Festphase gebunden. Nach Inkubation, Waschung und Blockierung erfolgt die Zugabe des spezifischen, an ein Enzym gekoppelter Antikörper oder Antigen. Nach erneuter Inkubation und Waschung setzt man nun das Enzymsubstrat hinzu und es kommt zur Farbreaktion, welche am ELISA-Reader gemessen werden kann. Der direkte ELISA setzt voraus, dass man das zu bestimmende Antigen bzw. den Antikörper kennt und birgt eine große Fehlerrate durch unspezifische Bindungen.

Der indirekte ELISA, für welchen wir uns in dieser Arbeit entschieden haben, setzt eben dies nicht voraus und bindet spezifischer das gesuchte Antigen bzw. in unserem Fall den Antikörper. Außerdem können dadurch Antikörper verschiedener Spezies detektiert und differenziert werden. Das spezifische Antigen, in unserem Fall IsaA, wird an die feste Phase adsorbiert. Nach Inkubation, Waschen und Blockierung setzt man das Versuchsserum, in dem man den spezifischen Antikörper vermutet (Primärantikörper), hinzu. Nach der Inkubation der spezifischen Antikörpermoleküle erfolgt ein erneutes Waschen und anschließend die Gabe des speziesspezifischen Sekundärantikörpers (Anti-Immunglobulin-Serum) mit dem angekoppelten Enzym. Nach erneuter Inkubation und Waschen wird das Enzymsubstrat zur Detektion zugesetzt.

Bei dem Sandwich-ELISA dient der Primärantikörper zur Beschichtung der Festphase. Nach den Waschsritten erfolgt die Zugabe und Inkubation des Antigens von unbekannter Menge. Nach erneutem Waschen setzt man den zweiten, an ein Enzym gekoppelten Antikörper hinzu und inkubiert den Ansatz erneut. Den abschließenden Schritt bildet wieder die Detektion des enzymatischen Substratumsatzes. Der Vorteil dieses Verfahrens ist die hohe Selektivität. Der Nachteil ist jedoch die Bereitstellung zweier spezifischer Antikörper gegen das Antigen, welche sich nicht in ihrer Bindung

behindern dürfen. Dies widerspricht den Voraussetzungen dieser Arbeit und kam daher nicht zur Anwendung (Crowther, 2001).

Da eines der Ziele dieser Arbeit die Herstellung humaner monoklonaler Antikörper mittels der Hybridomtechnik gegen IsaA war, lagen zu Beginn der Etablierung des ELISAs noch keine solchen humanen monoklonalen Antikörper vor. So dass man sich, wie schon erwähnt, für einen indirekten ELISA mit der Möglichkeit des Einsatzes verschiedener speziesspezifischer Antikörper entschied. Zuerst galt es, die optimale Konzentration der Antigenbeschichtung für die Festphase durch Verwendung verschiedener Antigenkonzentrationen zu ermitteln. Bei Antigenüberschuss kommt es zu einem Abfall des Messsignals am ELISA-Reader da die Antigen-Antikörper-Komplexe in dieser Konstellation löslich sind. Nachdem die geeignete Konzentration, in diesem Fall bei einer Verdünnung von 1 : 50 von IsaA mit Natrium-Bicarbonat-Puffer lag, wurde im nächsten Schritt die optimale Konzentration des Primärantikörpers gesucht, um den Äquivalenzbereich für eine maximale Antigen-Antikörper-Komplexbildung, gemäß der „Heidelberger-Kurve“, zu erhalten.

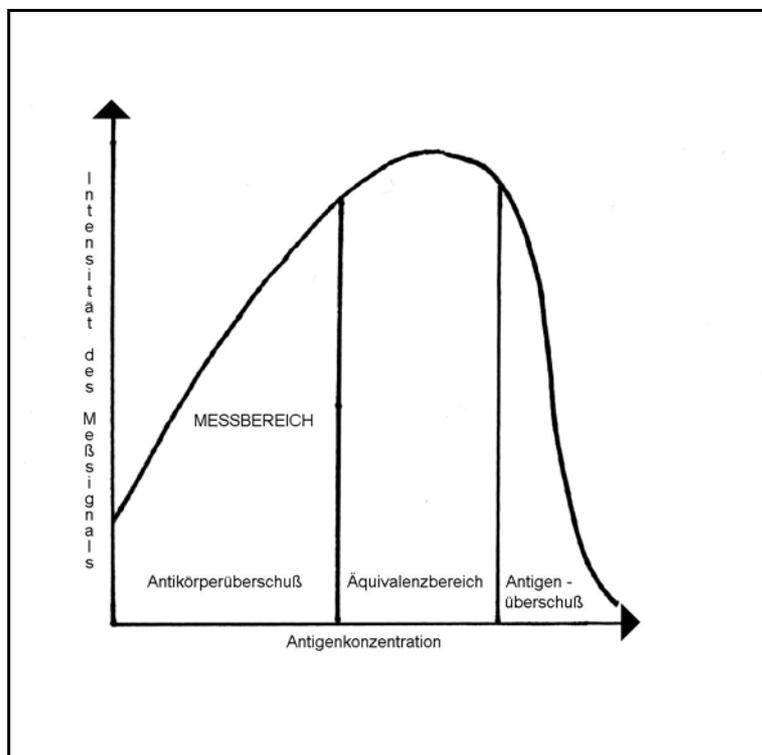


Abb. 4.1: Heidelberger-Kurve (Dörner, 2001)

Denn nur innerhalb dieses Sättigungsbereiches lassen sich Messsignalunterschiede für die einzelnen Immunsereen durch eine größere Differenz der einzelnen Messsignale feststellen. Dieser lag für die getesteten Kaninchensereen bei einer Verdünnung von 1 : 6400 und 1 : 51200. Interessant ist, dass nach der Präimmunisierungsphase die Antigen-Antikörper-Komplexe in der Sekundärimmunisierungsphase ein deutlich besseres Messsignal im ELISA hervorrufen. Dies kann durch die Differenzierung von Gedächtniszellen im Immunsystem des Tieres sowie der Umstellung der Produktion von IgM-Antikörpern der Frühphase zu IgG-Antikörpern und der sogenannten Maturation der Antikörper-Affinität, d. h. Zunahme der Affinität (Bindungsstärke) liegen (Kleber et al., 1997). Bedauerlicherweise konnte der ELISA nicht zum eigentlichen Nachweis humaner monoklonaler Antikörper aus den Hybridomversuchen eingesetzt werden, da es zu keiner Bildung von monoklonalen Antikörpern aus der Zellfusion kam. Doch die zuverlässigen Ergebnisse mit den Antikörpern aus den Tierversuchen zeigen, dass der ELISA bei vorhandenen humanen Antikörpern jederzeit angewendet werden kann. Dieser Ansatz wurde bereits im Rahmen der Entwicklung anderer monoklonaler Antikörper erfolgreich angewandt (Glikmann et al., 1995, Tadjine et al., 2004).

3. IsaA

Nach der Entdeckung geeigneter Zielstrukturen für den Einsatz der Immuntherapie ist es von großem Interesse für die Forschung, die Funktion bzw. Bedeutung dieser möglichen Zielantigene für den Mikroorganismus herauszufinden. Wie schon erwähnt, besteht eine Anforderung an ein optimales Antigen in dessen Spezifität für den zu bekämpfenden Mikroorganismus. Dadurch entsteht ein günstigeres Nebenwirkungsprofil beim Einsatz monoklonaler Antikörper, aber man kann auch neue Hinweise auf die möglichen Expressionsbedingungen der isolierten Struktur im Bakterium erlangen. Solche phänotypischen Charakterisierungsexperimente speziell für IsaA untersuchte Herr Lucas Wehling in einer eigenen Arbeit.

Die Westernblots zur Testung der Spezifität von IsaA zeigen, dass dieses Protein ausschließlich von *S. aureus* exprimiert wird und nicht bei anderen Staphylokokkenarten oder Strepto- und Enterokokken.

Die erstmalige Entschlüsselung des kompletten Genoms von *S. aureus* durch den Japaner Kuroda et al. (2001) und dessen weitere Erforschung erbrachten in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse und Ansatzmöglichkeiten in der Therapie von *S. aureus*-Infektionen, vor allem im Hinblick auf die zunehmenden Multiresistenzen und den damit verbundenen Problemen.

Auf der Suche nach potentiellen Immunogenen zur Entwicklung einer aktiven oder passiven Immuntherapie bei *S. aureus*-Infektionen haben Weichhart et al. (2003) neue Methoden zur in vitro-Selektion von Proteinen, das sogenannte „ribosome display“ entworfen. Damit können nicht nur mögliche immunogene Proteine des *S. aureus*-Genoms identifiziert, sondern auch katalogisiert werden. Mittels verschiedener Cluster und sogenannten „open reading frames“ ist mit dieser Methode eine rasche in vitro-Untersuchung der Genomexpression möglich.

Dubrac und Msadek wiesen 2004 nach, dass die Expression von IsaA über das sogenannte „Zwei-Komponenten-System“ (TCS – Two-Component System) YycG/YycF reguliert wird. Dieses TCS wurde erstmals bei dem grampositiven Bakterium *Bacillus subtilis* identifiziert und ist weit verbreitet bei grampositiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt. Interessanterweise ist dieses TCS essentiell in einer Reihe von grampositiven pathogenen Mikroorganismen wie *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* und *Listeria monocytogenes* enthalten (Dubrac and Msadek, 2004). Studien in *B. subtilis* konnten eine Beteiligung von YycG/YycF an der Zellteilung nachweisen. Wahrscheinlich steuert YycG/YycF die Expression des *ftsAZ* Operons. Gene die durch YycG/YycF reguliert werden, besitzen eine spezifische Erkennungssequenz, die sich durch zwei hintereinanderliegende Hexanukleotide (5'-TGT(A/T)A(A/T/C)-N₅-TGT(A/T)A(A/T/C)-3'), die durch fünf Nukleotide getrennt sind, auszeichnet (Dubrac und Msadek, 2004). Eine genomweite Suche nach dieser spezifischen Erkennungssequenz führte zur Identifizierung von 12 Genen bei *S. aureus*,

die vermutlich durch YycG/YycF reguliert werden. 5 dieser 12 Gene spielen vermutlich eine Rolle bei der Virulenz des Erregers (siehe Tabelle 4.5). Durch verschiedene in vitro-Untersuchungen konnte die Bindung des Response-Regulators YycF an Promotor nahe Regionen der Gene *isaA*, *ssaA* und *lytM* nachgewiesen werden (Dubrac und Msadek, 2004).

Tabelle 4.5: Putative YycG/YycF-regulierte Gene in *S. aureus* (nach Dubrac und Msadek, 2004).

Gen	Funktion
<i>lytM</i> (SA0265)	Peptidoglycanhydrolase (Zellwandmetabolismus)
<i>Prs</i> (SA0458)	Ribose-Phosphat-Pyrophosphokinase
<i>sdrD</i> (SA0520)	Sialoproteinbindeprotein
<i>Hu</i> (SA1305)	DNA-Bindeprotein II
<i>ebpS</i> (SA1312)	Elastin-Bindeprotein
<i>phoP</i> (SA1516)	Regulatorprotein für Transkription
<i>sak</i> (SA1758)	Precursor für Staphylokinase
<i>isaA</i> (SA2356)	Immunodominantes Antigen (Virulenzfaktor)
<i>oppB</i> (SA1214)	Oligopeptidtransporter mit permeabler Membrandomäne
<i>ndhF</i> (SA0411)	NADH-Dehydrogenase
trx SA1221	Thioreoxinreduktase
<i>ssaA</i> (SA2093)	<i>Stahylococcus</i> sekretorisches Antigen

Die Westernblots zur Testung der Speziesspezifität von IsaA ergaben, dass IsaA spezifisch für *S. aureus* ist und nicht von anderen Bakterien exprimiert werden. Die bisherigen Erkenntnisse über IsaA und die Ergebnisse aus den Westernblots sind, wie schon erwähnt, optimale Voraussetzungen für die Entwicklung eines anti-IsaA spezifischen monoklonalen Antikörpers und deren Einsatz im Rahmen einer Immuntherapie von *S. aureus*-Infektionen.

4. Phänotypische Untersuchungen putativer Targetproteine durch Mutationsexperimente

Neben der Gewinnung von humanen monoklonalen Antikörpern gegen das Targetprotein IsaA war ein weiterer Teil dieser Arbeit, Untersuchungen zur biologischen Funktion des Targetproteins IsaB anzustellen. Dieses Protein wurde wie IsaA von Lorenz et al. (2000) als immundominantes Antigen von *S. aureus* erkannt. Um die Bedeutung von IsaB für das Bakterium herauszufinden, wurde eine IsaB-Deletionsmutante erstellt und mit dem ursprünglichen Wildtyp *S. aureus* 8325 in phänotypischen Tests verglichen.

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der beiden Stämme in verschiedenen Medien bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Diese Wachstumsexperimente ergaben ein unterschiedliches Wachstum von Mutante und Wildtyp. Daraus lässt sich folgern, dass eine Expression von IsaB das Wachstum der Bakterien beeinflusst. Unter Standardbedingungen, d. h. bei Temperaturen von 30 - 37°C und physiologischen Nährmedien (LB- und TSB-Medien ohne Antibiotikazusätze) ohne äußere Umwelteinflüsse, hat die Mutante einen leichten Wachstumsvorteil im Vergleich zum Wildtyp. Ändern sich jedoch die Umweltbedingungen, verändert sich auch das Wachstumsverhalten der untersuchten Stämme. Erhöhte Temperaturen minimieren den Wachstumsvorteil der Mutante gegenüber dem Wildtyp. Demnach ist IsaB für das Wachstum bei hohen Temperaturen von Bedeutung. Es gibt eine Reihe von klinischen Situationen, bei denen Infektionserreger auf veränderte Umweltbedingungen reagieren müssen. So ist der Stoffwechsel von polytraumatisierten, multimorbiden oder immungeschwächten Patienten meist deutlich gestört und es kommt zu Temperaturregulationsstörungen mit Hypo- und Hyperthermiephasen. Unter solchen sich ändernden Umgebungsbedingungen im Wirt ist eine schnelle Anpassung der Genexpression der Bakterien für ein Überleben notwendig. IsaB könnte als ein wichtiger Faktor bei der Bewältigung von Stresssituationen fungieren.

Auch Glucose- und NaCl-Konzentrationen variieren bei verschiedenen Patienten und innerhalb verschiedener Regionen. Die Mutante wächst unter Zusatz von Glucose oder

NaCl deutlich schlechter als der Wildtyp, so dass IsaB hier dem Wildtyp deutliche Vorteile gegenüber der Mutante zu verschaffen scheint. Dies unterstreicht wiederum die Bedeutung von IsaB bei der Bewältigung von Stresssituationen im Rahmen einer Infektion durch *S. aureus*. Demnach könnte IsaB wichtig für die Virulenz von *S. aureus* sein. Zukünftige Arbeiten, in denen der Einfluss der *isaB*-Deletion auf die Infektion von *S. aureus* in einem Infektionsmodell in vivo untersucht wird, werden weitere Erkenntnisse zur Rolle von IsaB während einer Infektion liefern.

Um mehr über die Auswirkungen der *isaB*-Deletion auf verschiedene Stoffwechsellleistungen von *S. aureus* zu erfahren, wurde eine Testung mit dem ApiStaph-System durchgeführt. Dieses System dient eigentlich zur Bestimmung der Spezieszugehörigkeit von Staphylokokken-Isolaten, kann jedoch aufgrund seiner Zusammensetzung auch zur Untersuchung von Stoffwechseleränderungen wie Verstoffwechslung verschiedener Zucker, Ureaseaktivität, Arginin-Dihydrolase-Aktivität u. a. eingesetzt werden. Diese Untersuchungen ergaben einen Unterschied in der Fähigkeit Arginin als Substrat zu nutzen, so dass IsaB höchstwahrscheinlich nicht in typische Stoffwechselwege von *S. aureus* involviert ist.

Um weitere Erkenntnisse über mögliche Virulenz-modulierende Eigenschaften von IsaB zu erlangen, wurden Hämolyse-, Proteolyse-, und Biofilmtests durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben einige interessante Ergebnisse. Der Ausstrich der Mutante und des Wildtyps auf Blutplatten ergab, dass IsaB nicht nur Einfluss auf das Wachstum von *S. aureus* hat, sondern auch die Expression von Hämolysinen beeinflusst. Der Hämolysetest auf den Blutplatten ergab bei der Mutante einen deutlich kleineren Hämolysehof um die Kolonie als bei dem Wildtyp. IsaB fördert demnach die Ausprägung der Hämolysefähigkeit von *S. aureus*. Inwieweit dies die Folge eines direkten Einflusses von IsaB auf die Hämolysinexpression ist oder der Transport der Hämolysine betroffen ist, müssen zukünftige Experimente zeigen. Da Hämolysine als wichtige Virulenzfaktoren gelten, ist dieses Ergebnis der erste Hinweis, dass IsaB bedeutsam für die Virulenz von *S. aureus* ist.

Weiterhin wurden die Mutante und der Wildtyp auf die Fähigkeit Proteasen zu exprimieren untersucht. Dazu wurde die Deletionsmutante und der Wildtyp *S. aureus* 8325 auf Magermilchplatten ausgestrichen, um eine Lyse der dort enthaltenen Milcheiweiße zu erkennen. Die Mutante wies einen größeren Lysehof um die Kolonien auf als der Wildtyp. IsaB scheint damit auch die Expression von Proteasen zu beeinflussen. *S. aureus* exprimiert eine Vielzahl von Proteasen, darunter Serin-Proteasen (z.B. *sspA*, *splA-F*), Cystein-Proteasen (z.B. *sspB*, *sspC*) und Metalloproteasen (z. B. Aureolysin). Viele dieser Proteasen werden durch globale Regulatoren reguliert. Zum Beispiel wird die Expression vieler Proteasen durch *agr* (accessory gene regulator) positiv reguliert und von *sarA* negativ reguliert (Novick, 2003, Cheung, 2004). Es ist gegenwärtig nicht untersucht, ob in der *isaB*-Mutante eine bestimmte Protease oder eine Gruppe von Proteasen hoch reguliert werden oder ob globale Regulatoren wie *agr* oder *sarA* durch die Deletion von *isaB* in ihrer Expression moduliert werden. Dies ist Inhalt zukünftiger Arbeiten. Ein weiteres interessantes Ergebnis war die reduzierte Fähigkeit der Mutante, einen Biofilm auszubilden. Die Biofilmbildung in *S. aureus* ist ein zweiphasiger Prozess an dem unterschiedliche molekulare Faktoren beteiligt sind. In einer ersten Phase haften die Bakterien an einer Oberfläche an. Dieser Vorgang wird initiale Adhärenz genannt und wird durch physiko-chemische Wechselwirkungen (hydrophobe Wechselwirkungen) und spezifischen Oberflächenfaktoren der Bakterien wie das Autolysin (*atl*) und Teichonsäuren vermittelt (Götz, 2002). Darüber hinaus besitzt *S. aureus* eine Vielzahl von extrazelluläre Matrix bindende Proteine wie das Fibronectin-, Fibrinogen-, Laminin- und Collagen-Bindeproteine. Werden Oberflächen mit diesen Matrixmolekülen überzogen, kommt es ebenfalls zu einem Anhaften der Bakterien an Oberflächen. In einer zweiten Phase wird ein mehrschichtiger Biofilm ausgebildet, der durch ein enges Zusammenkleben der Staphylokokken zustande kommt. Hier spielt v. a. die Expression des *ica*-Operons (intercellular adhesin) eine entscheidende Rolle (Götz, 2002). Gene dieses Operons kodieren für Faktoren, die für die Bildung extrazellulärer Polysaccharide verantwortlich sind, die die Bakterien als eine „schleimige“ Hülle umgeben. *Staphylococcus*-Biofilm besteht aus β -1,6 verknüpftem N-Acetylglucosamin und wird als PIA (polysaccharide intercellular adhesin) bezeichnet. Mutanten, die kein PIA produzieren, sind auch nicht mehr in der Lage, einen Biofilm zu bilden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen deutlich, dass IsaB einen wichtigen Einfluss auf die Expression unterschiedlicher Virulenzmechanismen von *S. aureus* ausübt. Bei einem Ausschalten dieses Proteins durch monoklonale Antikörper würde *S. aureus* vermutlich in der Pathogenität deutlich geschwächt werden. Die Herstellung eines humanen monoklonalen Antikörpers wäre demnach eine gute Ergänzung oder sogar Alternative zur bisherigen antimikrobiellen Therapie.

Abschließend wurde der Einfluss der *isaB*-Mutation auf die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika getestet. Dazu wurde die MHK (Maximale inhibitorische Konzentration) gegenüber zugesetzten Antibiotika der beiden Stämme bestimmt. Dazu wurden Antibiotika verschiedenster Klassen ausgewählt. Als Vertreter der Aminoglykoside wurde Gentamicin getestet. Aminoglykoside wirken bakterizid durch Störung der Proteinsynthese. Sie binden die 30S-Untereinheit bakterieller Ribosomen und führen dadurch zu einem Ablesefehler an der Messenger-RNA. In höheren Dosen kommt es zur Synthese von sogenannten „falschen“ Proteinen, welche in der Zytoplasmamembran eingelagert sind und so die Membranpermeabilität stören. Das Bakterium verliert dadurch lebenswichtige Bestandteile und wird permeabel für schädigende Stoffe. Die inhibitorische Antibiotikakonzentration für Gentamicin war für beide Stämme gleich. Sowohl Mutante als auch Wildtyp wiesen ab einer Konzentration von 64 µg/ml kein Wachstum mehr auf. Überträgt man diese in-vitro-Experimente auf das in-vivo-Verhalten im Klinikalltag sind Aminoglykoside in höheren Dosen effektive Antibiotika in der Therapie von *S. aureus*-Infektionen.

Als Vertreter der Makrolide wurde Erythromycin ausgewählt. Makrolide wirken bakteriostatisch indem sie die Proteinsynthese hemmen. Man vermutet, dass das Ribosom nach der Peptidsynthetasereaktion an der mRNA nicht weiterrücken kann und damit die Anlagerung eines Basentriplets am tRNA-Aminosäurekomplex ausbleibt. Makrolide wirken vor allem im grampositiven Bereich und besitzen ein ähnliches Wirkspektrum wie Penicillin G, das die Zellwandsynthese hemmt. Durch die Erythromycinkassette in der Deletionsmutante erwarb die Mutante Resistenz gegenüber Erythromycin, welche bei dem Wildtyp nicht vorhanden ist. Gleichzeitig wurde durch die *ermB*-Resistenzkassette auch eine Resistenz gegenüber Clindamycin vermittelt

(MLS_B-Resistenztyp-Makrolide-Lincosamide-Streptogramine TypB). Lincosamide wirken bakteriostatisch durch Hemmung der Proteinbiosynthese ähnlich den Makroliden. Die eingefügte Erythromycin-Kassette bewirkt demnach nicht nur eine spezielle Resistenz gegenüber Erythromycin, sondern auch gegenüber Antibiotika mit ähnlicher Wirkungsweise. Somit war das Ergebnis der MHK-Bestimmung nicht überraschend.

Zur Empfindlichkeitstestung gegenüber Penicillinen wurde das penicillinasefeste Methicillin verwendet. Penicilline wirken auf proliferierende Bakterien bakterizid durch Hemmung der Zellwandbiosynthese. Auf ruhende Keime wirken sie bakteriostatisch durch Unterdrückung der Proliferation. Einige Bakterien haben im Laufe der Zeit die Fähigkeit entwickelt, β -Lactamase zu bilden (Penicillinase), welche den β -Lactam-Ring von Antibiotika aufspaltet und sie so inaktiviert. Durch Zusatz von Hemmstoffen der β -Lactamasen, wie Clavulansäure oder synthetisch hergestellten säurestabilen 3-Phenyl-5-methyl-isoxazolyl-Penicillinen, wie Methicillin, Oxacillin und anderen, versucht man, den Abbau der Penicilline durch die Bakterien zu unterdrücken. Diese Penicilline sind jedoch starke Induktoren der bakteriellen β -Lactamase und führen so zu einer raschen und massiven Ausbreitung von Resistenzen gegenüber herkömmlichen Penicillinen und sind daher nur unter gezielter und strenger Indikation anzuwenden. Sie sind bei gezielter Gabe gegen Penicillinase produzierende Staphylokokken hoch wirksam. Die Deletionsmutante-IsaB und der Wildtyp *S. aureus* 8325 unterschieden sich nicht in der Empfindlichkeit gegenüber Methicillin. Beide sind sensibel gegenüber Methicillin und unter Einhaltung der Anwendungskriterien in der Klinik, kann auch eine *isaB*-Mutante effektiv mit Methicillin behandelt werden.

Weiterhin wurde die MHK beider Stämme gegenüber dem Gyrasehemmer Ofloxacin ermittelt. Gyrasehemmer, oder auch Chinolone genannt, haben eine bakterizide Wirkung durch Hemmung der bakteriellen Gyrase, die eine wichtige Funktion bei der Spiralisierung der DNA ausübt. Dadurch sind Prozesse der Transkription und Replikation gestört. Interessanterweise zeigte die *isaB*-Mutante eine erhöhte Resistenz gegenüber Ofloxacin. Inwieweit IsaB die Spiralisierung der DNA bei *S. aureus* beeinflusst, ist unbekannt, erscheint jedoch für weitere Studien interessant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Entwicklung humaner monoklonaler Antikörper eine hervorragende Ergänzung oder sogar Alternative für die Therapie bakterieller Infektionen ist. Dies zeigt der erfolgreiche Einsatz von bisher gewonnenen Antikörpern in der Therapie bestimmter Krankheiten, zur Zeit vor allem in der Behandlung maligner Tumoren. Wichtig ist es, geeignete Targetstrukturen als Zielantigene zu identifizieren und näher zu untersuchen, damit diese die Kriterien eines optimalen Zielantigens für den Einsatz monoklonaler Antikörper erfüllen. Die Experimente von Lucas Wehling mit IsaA und die Ergebnisse dieser Arbeit über IsaA und IsaB zeigen, dass mit diesen beiden Targetstrukturen, welche das Wachstum und die Virulenz des Erregers beeinflussen, wichtige Grundlagen für eine Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern geschaffen werden konnten.

V. Zusammenfassung

Staphylococcus aureus ist einer der häufigsten Erreger von nosokomialen Infektionen. Die grampositiven in Haufen angeordneten kokkoiden Bakterien verursachen neben harmlosen lokal-oberflächlichen Hautinfektionen auch gefürchtete lebensbedrohliche Systeminfektionen. Ein großes Problem in der Therapie von *S. aureus*-Infektionen stellen die zunehmenden Multiresistenzen dieses Erregers dar. Die Entwicklung neuer Antibiotika reicht hierbei auf Dauer oft nicht aus, da immer wieder neue Resistenzen der Bakterien zu erwarten sind. Es besteht daher dringender Bedarf an der Entwicklung alternativer Therapieformen im Kampf gegen multiresistente Problemkeime wie *S. aureus*. Eine Möglichkeit besteht in der Immuntherapie, zum Beispiel durch Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen geeignete Targetstrukturen von *S. aureus*.

In den beiden immundominanten Antigenen IsaA und IsaB scheinen solche geeigneten Angriffsstrukturen gefunden zu sein. In dieser Arbeit wurde eine IsaB-Mutante hergestellt und nachfolgend phänotypisch charakterisiert. Diese Arbeiten bilden die Grundlage für die Aufklärung der Funktion von IsaB. Weiterhin sollte ein humaner monoklonaler Antikörper gegen IsaA generiert werden. Zur Testung der Antigenspezifität war es notwendig einen anti-IsaA-spezifischen ELISA zu entwickeln.

Durch die Fusion der Hybridomzelllinie HAB mit B-Lymphozyten aus lymphatischem Gewebe septikämischer Patienten sollten Fusionszellen gewonnen werden, die spezifische anti-IsaA-Antikörper produzieren. Durch den Einsatz einer humanen Hybridomzelllinie sollten Kreuzspezies-Reaktionen, wie sie bei murinen therapeutischen Antikörpern beobachtet wurden, ausgeschaltet werden. Es wurden mehrere Fusionen mit lymphatischem Material (Lymphknoten, Blut-B-Lymphozyten) durchgeführt. Eine spezifische Antikörperproduktion blieb hierbei jedoch aus.

Ein anti-IsaA-spezifischer ELISA konnte auf der Grundlage polyklonaler anti-IsaA-Antikörper aus immunisierten Kaninchen erfolgreich etabliert werden. Der ELISA

zeigte die höchste Spezifität bei einer Antigenbeschichtung von 2 µg/ml IsaA und einer optimalen Primärantikörperkonzentration von 1 : 25600.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte die Spezifität des polyklonalen Antikörpers und das Vorkommen von IsaA bei verschiedenen *Staphylococcus aureus*-Stämmen und anderen Bakterienspezies getestet werden. Dazu wurde mittels Western-Blot die Expression von IsaA untersucht. Ergebnis dieser Untersuchung war, dass IsaA unabhängig von der Herkunft, vom Infektionstyp oder Resistenzeigenschaften von allen *S. aureus*-Isolaten exprimiert wird. Von den anderen untersuchten Bakteriespezies zeigte der IsaA-spezifische polyklonale Antikörper auch eine Reaktion gegen *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. warnerii* und *S. cohnii*. Ob diese Staphylokokkenarten ein IsaA-homologes Protein mit konservierten Domänen exprimieren, das mit dem Antiserum kreuzreagiert, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Die Herstellung der IsaB-Mutante erfolgte durch Konstruktion eines Inaktivierungsplasmides (pTG1), in dem eine Erythromycinkassette zwischen ein „upstream“- und „downstream“-Fragment kloniert wurde. Als Grundlage diente der temperatursensitive „shuttle“-Vektor pBT2, der bei erhöhter Temperatur in *S. aureus* nicht weiter replizieren kann und dadurch homologe Fragmente auf dem Vektor mit genomischen Abschnitten rekombinieren. Die erfolgreicher Herstellung der *isaB*-Mutante wurde im Southern-Blot überprüft.

Die Mutante wurde verschiedenen vergleichenden Experimenten mit dem Wildtyp unterzogen, um Informationen über die mögliche Funktion des Targetproteins IsaB im Hinblick auf Wachstum und Virulenz für *S. aureus* zu gewinnen. Die Wachstumsexperimente ergaben einen deutlichen Unterschied im Wachstumsverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Da die Mutante deutlich schneller wuchs als der Wildtyp scheint IsaB wichtig für das Wachstum von *S. aureus* zu sein. In vitro-Experimente zur Testung von möglichen in vivo-Umwelteinflüssen bzw. Stressfaktoren auf das Wachstum der Stämme erfolgten mittels Zusetzung von Glucose und NaCl. Hier zeigte sich ein deutlicher Wachstumsvorteil des Wildtyps gegenüber der *isaB*-Mutante,

so dass unter extremen Umweltbedingungen IsaB *S. aureus* ein besseres Wachsen ermöglicht. In weiteren Experimenten wurde das Hämolyseverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Die Mutante weist einen kleineren Hämolysehof auf Blutagarplatten als der Wildtyp auf. IsaB hat somit auch Einfluss auf die Expression von Hämolysinen, die ein wichtiger Virulenzfaktor von *S. aureus* sind. Die Ergebnisse aus den Proteolyse-Experimenten auf Magermilchplatten ergaben ein stärkeres Lyseverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp, so dass IsaB auch in der Expression von Proteasen involviert ist. IsaB spielt demnach eine wichtige Rolle in der Ausprägung von Virulenzfaktoren von *S. aureus*. Die Untersuchungen zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Wildtyp und Mutante ergaben ebenfalls Unterschiede der beiden für verschiedene Antibiotika, so dass auch IsaB Einfluss auf die Antibiotikaempfindlichkeit zu nehmen scheint. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse verdeutlichen die prinzipielle Eignung von IsaB als Targetprotein für eine Antikörpertherapie bei lebensbedrohlichen *S. aureus*-Infektionen.

VI. Literatur

Baker, M. D. and Acharya, K. R. (2004): Superantigens: structure-function relationships. *Int. J. Med. Microbiol.*; 293(7-8): 529 - 537

Balaban, N., Singh, B., Novick, R. P., Goldkorn, T., Rasooly, A. and Torres, J. A. (2000): Activation and inhibition of the *Staphylococcal agr* System. *Science*; 287: 391 - 399

Beninati, C., Oggioni, M., Mancuso, G., Midiri, A., Polonelli, L., Pozzi, G. and Teti, G. (2001): Anti-idiotypic vaccination against group B streptococi. *Int. Rev. Immunol.*; 20: 263 - 273

Berthold, H. (1998): *Klinikleitfaden Arzneimitteltherapie*. Urban&Fischer-Verlag, München – Jena, 1. Auflage

Biorama (2000): www.biorama.ch

Boffey, S. B., Burrin, D. H., Davis, M. G., Fasold, H., Goulding, K. H., Jenkins, M. R., Simpkins, I. and Wilson, K. (1985): *Methoden der Biochemie*. Thieme-Verlag, Stuttgart, 3. Auflage

Bojum, A. (1968): Separation of leucocytes from blood and bone marrow *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*; 21: 77 - 85

Borchmann, P., Riethmüller, G. and Engert, A. (2001): Monoklonale Antikörper: Entwicklung und klinische Perspektiven. *Der Internist* 2001; 42: 803 - 814

Brändlein, S., Vollmers, H.-P. (2004): Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumor immunity. *Histol. Histopathol.*; 19 (3): 897 – 905

Brekke, OH and Loset, GA (2003): New technologies in therapeutic antibody development. *Curr. Opin. Pharmacol.*; 3: 544 - 550

Brückner, R. (1997): Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*; 151 (1): 1 - 8

Burnet, F. M. (1959): The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. Cambridge, University Press

Cheung, A. L., Bayer, A. S., Zhang, G., Gresham, H. and Xiong, Y. Q. (2004): Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*; 40(1): 1 - 9

Corbett, C. R., Kooi, C., Woods, D. E. and Sokol, P.A. (2002): Passive immunotherapy of experimental *Pseudomonas aeruginosa* lung infections with monoclonal antibodies generated to a *P. aeruginosa* elastase peptide. In 42nd Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego CA; 2002: 46

Crowther, J. R. (2001): The .ELISA Guidebook, Methods in molecular biology Humana press, Totowa – New Jersey

Daranyi, J. (1956): Facial folliculitis as a wide spread disease; pathology and dissemination. *Arch Hyg Bakteriol.*, 140 (1-2): 38 - 43

Dörner, K. (2001): Klinische Chemie und Hämatologie. Thieme-Verlag, Stuttgart, 4. Auflage

Dubrac, S. and Msadek, T. (2004): Identification of Genes Controlled by the Essential YycG/YycF Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*; Vol.186, No. 4: 1175 - 1181

Dunman, P. M. and Negin, M. (2003): Passive immunization as prophylaxis: when and where will this work? *Curr. Opin. Pharmacol.*; 3: 486 - 496

Edelmann, G. M., Gall, W. E., Waxdall, M. J. and Konigsberg, W. H. (1968): The covalent structure of a human gamma-immunglobulin/Isolation and characterization of the whole molecule, the polypeptide chains, and the tryptic fragments. *Biochemistry*; 7: 1950 - 1958

Ehrlich, P. (1900): On Immunity with Special Reference to Cell Life. *Proc. R. Soc.*; 66: 424 - 448

Etz, H., Minh, D. B., Henics, T., Dryla, A., Winkler, B., Triska, Ch., Boyd, A. P., Söllner, J., Schmidt, W., Ahsen, v. U., Buschle, M., Gill, S. R., Kolonay, J., Khalak, H., Fraser, C. M., Gabain, v.A., Nagy, E. and Meinke, A. (05/2002) Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. *PNAS*; 99.10: 6573 - 6578

Faller, G., Vollmers, H. P., Weiglein, I., Marx, A., Zink, C., Pfaff, M. and Müller-Hermelink, H. K. (1990): HAB-1, a new heteromyeloma for continuous production of human monoclonal antibodies. *Br. J. Cancer*; 62(4): 595 - 598

Foster, T. J. and McDevitt, D. (1994): Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their roles in virulence. *FEMS Microbiol. Lett.*; 118: 199 - 205

Fournier, B., Klier, A. and Rapaport, G. (2001): The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*; 41(1): 247 - 261

Geckeler, K. E. and Eckstein, H. (1998): Bioanalytische und biochemische Labormethoden, Vieweg-Lehrbuch, Springer-Verlag, Berlin

Gemmel, C. G., Tree, R., Patel, A., O'Reilly, M. and Foster, T. J. (1990): Susceptibility to opsonophagocytosis of proteinA, α -haemolysin, and β -Toxin deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. Zbl. Bakt. Suppl.; 21: 231 – 236

Glikmann, G., Chen, S. N., Mordhorst, C. H. and Koch, C. (1995): Monoclonal antibodies for the rapid diagnosis of influenza-B virus infections by ELISA: production and characterization. Clin. Diagn. Virol.; 4(1): 27 - 42

Götz, F. (2002): *Staphylococcus* and biofilms. Mol. Microbiol.; 43 (6): 1367 – 1378

Gura, T. (06/2002): Magic bullets hit the target. Nature; 417: 584 - 586

Hall, A. E., Domanski, P. J., Patel, P. R., Vernachio, J. H., Syribeys, P. J., Gorovits, E. L., Johnson, M. A., Ross, J. M., Hutchins, J. T. and Patti, J. M. (2003): Characterization of a Protective Monoclonal Antibody Recognizing *Staphylococcus aureus* MSCRAMM Protein Clumping Factor A. Infect. Immun.; 71.12: 6864 - 6870

Hasholzner, U., Stieber, P., Meier, W. and Lamerz, R. (1997): Value of HAMA – determination in clinical practice – an overview. Anticancer Res.; 17(4B): 3055 - 3058

Heinzl, S. (2003): Neue Antiinfektiva. Chemotherapie Journal; 12: 22 - 30

Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. and Zinkernagel (1998): Medizinische Mikrobiologie. Thieme-Verlag, Stuttgart, 9. Auflage

Kleber, H.-P., Schlee, D. and Schöpp, W. (1997): Biochemisches Praktikum. Gustav Fischer- Verlag, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm

Kloos, W. E. and Banneman, T. L. (1994): Update on clinical significance of coagulase-negative *Staphylococci*. Clin. Microbiol. Rev.; 7: 117 - 140

Kloos, W. E. and Lambe, D. W., Jr. (1991): *Staphylococcus*. p. 222 - 237. In Balows, A., Hausler, W. J., Jr., Herrmann, K. L., Isenberg, H. D. and Shadomy, H. J. (ed.), Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Köhler, G. and Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*; 256: 495 - 497

Kornblum, J., Kreiswirth, B. N., Projan, S. J., Ross, H. and Novick, R. P. (1990): Agr: A polycistronic locus regulation exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Biology of Staphylococci*. New York: VCH Publishers, pp. 373 - 401

Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K.-I., Nagai, N., Ito, T. Lian, J., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.-K., Sawano, T., Inoue, R.-I., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, H., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. and Hiramatsu, K. (2001): Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*; Vol. 357: 1225 - 1240

Li, J., Geissal, E.D., Li, W. and Stollar, B.D. (2005): Repertoire diversification in mice with an IgH-locus-targeted transgene for the rearranged VH domain of a physiologically selected anti-ssDNA antibody. *Mol. Immunol.*; 42 (12). Epub 2005 Mar 5

Liang, O. D., Flock, J. I. and Waldstrom, T. (1995): Isolation and characterisation of vitronectin-binding surface protein from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Acta*; 1250: 110 - 116

Lindsay, J. A. and Foster, S. J. (1999): Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability in response to environmental conditions in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.*; 262: 1259 - 1266

Lindsay, J. A. and Holden, M. T. G. (2004): *Staphylococcus aureus*: superbug, super genom? Trends Microbiol.; 12 (8): 378 - 385

Le Loir, Y., Baron, F. and Gautier, M. (2003): *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet. Mol. Res.; 2 (1): 63 - 76

Loeb, L. (1903): The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. J. Med. Res.; 10: 407-419

Lorenz, U., Ohlsen, K., Karch, H., Hecker, M., Thiede, A. and Hacker, J. (2000): Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol. Med. Microbiol.; 29: 145 - 153

Lowy, F. D. (1998): *Staphylococcus aureus* Infections. N. Engl. J. Med.; 339 (8): 520 - 532

Lüllmann, H. and Mohr, K. (1999): Pharmakologie und Toxikologie. Thieme- Verlag, Stuttgart, 14. Auflage

Maniats, T. Frisch, E. F. and Sambrook, J. (1982): Molecular cloning. Cold Spring Harbour Laboratory, N.Y.

McNamara, P. J., Milligan-Monroe, K. C., Khalili, S. and Proctor, R. A. (2000): Identification, cloning and initial characterisation of *rot*, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol.; 182 (11): 3197 - 3203

Much, H. (1908): Über eine Vorstufe des Fibrinfermentes in Kulturen von *S. aureus*. Biochem. Zeitschr.; 14: 143-155

Mukherjee, J., Chios, K., Fishwild, D., Hudson, D., O'Donnell, S., Rich, S. M., Donohue-Rolfe, A. and Tzipori, S. (2002): Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect Immun.*; 70: 612 - 619

Ogsten, A. (1881): Report upon microorganism in surgical diseases. *Br. Med. J.*; May: 369 - 375

Ohlsen, K. (1997): Molekulargenetische Untersuchungen zur Expression des α -Toxin-Gens von *Staphylococcus aureus*. Dissertation, Universität Würzburg

O'Riordan, K. and Lee, J. C. (2004): *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.*; 17(1): 218 - 234

Peters, G. and Pulverer, G. (2001): Die Familie der *Micrococcaceae*. In Brandis, H., Eggers, H.-J., Köhler, W., Pulverer, G. *Lehrbuch für Mikrobiologie*, Urban&Fischer-Verlag, München-Jena, 8. Auflage

Porter, R. R. (1967): The structure of antibodies. *Sci. Am.*; 217: 81 - 87

Pospiech, A., and Neumann, B. (1995): A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet.*; 11: 217 - 218

Renner, Ch., Hartmann, F. and Pfreundschuh, M. (2002): Immuntherapeutische Strategien zur Behandlung solider Tumoren. *Dtsch. Ärztebl.*; 99: A 850 - 858

Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin Aktuelle Daten des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) – Stand Juni 2002, 9/2003: 63 - 64

Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin Staphylokokken-Infektionen in Deutschland im Jahr 2002, 35/2003: 277 - 280

Robert Koch Institut, Gesundheitsberichterstattung des Bundes-Heft 8, Nosokomiale Infektionen (06/2002)

Robert Koch Institut, Heuck, D. (2003): Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) – Auftreten, Verbreitung, Prävention (05/2003)

Robert Koch Institut, Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA (11/2003)

Rosenberg, M. and Moore, G. P. (1994): The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg,

Sakata, N., Tarakuba, S. and Mukai, T. (2005): Subcellular location of the soluble lytic transglycosylase homologue in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.*; 50 (1): 47 - 51

Schenk, S. and Laddaga, R. A. (1992): Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*; 94: 133 - 138

Schmunis, G. A. and Corber, S. J. (1999): Tourism and Emerging and Re-emerging Infectious Diseases in the Americas: What Physicians Must Remember for Patient Diagnosis and Care. *Braz. J. Infect. Dis.*; 3(2): 31 - 49

Sorrentino, M. and Powers, T. (2000): Effectiveness of palivizumab: evaluation of outcomes from 1998 to 1999 respiratory syncytial virus season. The Palivizumab Outcome Study Group. *Pediatr. Infect. Dis.*; 19: 1068 - 1071

Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*; 51: 503 - 517

Stern, M. and Herrmann, R. (2005): Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.*; 54: 11 - 29

Tadjine, M., Mittel, K. R., Bourdon, S. and Gottschalk, M. (2004): Production and characterization of murine monoclonal antibodies against *Haemphilus pavausis* and study of their protective role in mice. *Microbiol.*; 150 (Pt12): 3935 - 3945

Tauchnitz, R. (2003): Hinweise zur antibakteriellen Chemotherapie. Bayer-Vital, 3.Auflage, Bayer Vital GmbH, Leverkusen

Veihoeven, M., Milstein, C. and Winter, G. (1988): Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science*; 239 (4847): 1534 - 1536

Vollmers, H.-P., Brändlein, S. (2002): Nature's best weapons to fight cancer. Revival of human monoclonal IgM antibodies. *Hum. Antibodies.*; 11 (4): 131 – 142

Vollmers, H.-P., Zimmermann, U., Krenn, V., Timmermann, W., Illert, B., Hensel, F., Hermann, R., Thiede, A., Wilhelm, M., Ruckle-Lanz, A., Reindl, L., Müller-Hermelink, H.-K. (1998): Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: first clinical and histopathological results. *Oncol. Rep.*; 5 (3): 549 – 552

Weichhart, Th., Horky, M., Söllner, J., gangl, S., Henics, T., Nagy, E., Meinke, A., Gabain, v. A., Fraser, C. M., Gill, S. R., Hafner, M. and Ahsen, v. U. (08/2003): Functional Selection of Vaccine Candidate Peptides from *Staphylococcus aureus* Whole-Genom Expression Libraries In Vitro. *Infect. Immun.*; 71.8: 4633 – 4641

Weisman, L. E., Schuman, R. F., Lukomska, E., Stinson, J. R., Parks, O. and Fischer, G. W. (2001): Effectivness and pharmacokinetics of an antilpoteichoic acid humanized mouse chimeric monoclonal antibodies. *Pediat. Res.*; 49: 301 A. Abstract 1722

Winter, G. and Milstein, C. (1991): *Nature*; 349 (6307): 293 - 299

V. Anhang

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. J. Hacker bedanken, dass ich die vorliegende Arbeit unter seiner Leitung am Institut für Molekulare Infektionsbiologie anfertigen durfte.

Ich danke Herrn Professor Dr. A. Thiede, dass er sich als Prüfer dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Einen ganz besonderen Dank gilt Herrn Dr. Knut Ohlsen, der als Betreuer dieser Arbeit, mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine intensive Unterstützung, sein Vertrauen in mich und sein Engagement verdienen große Anerkennung.

Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe „Staphylokokken“, insbesondere Herrn Dr. Christian Hüttinger und Herrn Dr. med. Udo Lorenz, meinen Kollegen Lucas Wehling und Patric Bourdet, sowie dem gesamten Labor für die Hilfsbereitschaft und nette Atmosphäre während der Zeit im Labor.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. med. H.-P. Vollmers und Frau Dr. S. Brändlein aus dem Institut für Pathologie für die Unterstützung der Fusionsversuche.

Ein herzliches Dankeschön an Irmi Schmid für die Hilfe bei der abschließenden Korrekturlesung dieser Arbeit.

Danke auch an Christian Schmid für seine aufmunternden und verständnisvollen Worte während der Zeit der Anfertigung der Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich nochmals ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, welche mir nicht nur mein Medizinstudium ermöglichte, sondern mich auch stets liebe- und verständnisvoll in meinem Leben unterstützt.

VIELEN DANK!

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Tanja Geis
geboren am: 19.05.1976
in: Aschaffenburg
Familienstand: ledig

Eltern

Vater: Robert Geis
geboren am: 06.02.1956

Mutter: Sigrid Geis, geb. Röckel
geboren am: 22.09.1959

Geschwister:

Bruder: Thomas Geis
geboren am: 02.05.1982

Schulbildung

1982 – 1986	Grundschule Bessenbach
1986 – 1994	Hanns-Seidel-Gymnasium, Hösbach (1. Fremdsprache: Englisch, 2. Fremdsprache: Französisch, Wirtschaft-Wissenschaftlicher Zweig)
1994 – 1996	Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Aschaffenburg (Leistungskurse: Deutsch/Französisch)

Studium

seit 1997	Studium der Humanmedizin, Universität Würzburg
1999	Physikum
2000	1. Staatsexamen (<u>Famulaturen</u> : Innere Medizin im Kreiskrankenhaus, Lohr; Anästhesie in Anästhesiepraxis in Aschaffenburg; Tropenmedizin an der Universitätsklinik Leipzig; Gynäkologie im Klinikum Aschaffenburg)
2002	2. Staatsexamen <u>Praktisches Jahr</u> : 1. Tertial: Innere Medizin im Spital Flawil, Schweiz 2. Tertial: Kinderheilkunde im Klinikum Aschaffenburg 3. Tertial: Chirurgie im Klinikum Aschaffenburg
2003	3. Staatsexamen

Beruf

seit 2004	ÄiP, anschließend Assistenzärztin zur Weiterbildung in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Würzburg
-----------	--

Würzburg, den 27.07.2005