

**Aus der Klinik & Poliklinik für
Allgemein- und Viszeralchirurgie,
Gefäß- und Kinderchirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Christoph-Thomas Germer**

**Entwicklung einer auf Antikörpern basierten Therapie von chirurgischen
Infektionen verursacht durch methicillinresistente und -sensible *Staphylococcus
aureus* (MRSA und MSSA)**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von**

**Patric Bourdet
aus Hamburg
Würzburg, April 2009**

Referent: Prof. Dr. med. Christoph-Thomas Germer

Koreferent: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bhanu Sinha

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25. März 2011

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

<u>I. Einleitung</u>	1
<u>1. Klinik der Infektion mit Staphylokokken</u>	1
1.1. Koagulase-positive Staphylokokken (<i>S. aureus</i>)	1
1.2. Koagulase-negative Staphylokokken (KNS)	4
<u>2. Aktuelle Situation und Bedeutung der Staphylokokken-Infektionen</u>	6
2.1 Problematik der Methicillin-Resistenz	7
2.2. Auswirkungen von Infektionen durch multiresistente Staphylokokken	7
2.3. Epidemiologie von MRSA	8
<u>3. Neue Antibiotika</u>	16
<u>4. Entwicklung von Immuntherapeutika</u>	18
<u>II. Material und Methoden</u>	23
<u>1. Material</u>	23
1.1. Medien und Agarplatten	23
1.2. Puffer und Lösungen	23
1.3. Stammliste	24
<u>2. Methoden</u>	24
2.1. Klonierung von IsaA und IsaB in den Expressionsvektor pQE-30	24
2.1.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	24
2.1.2. Verdau	26
2.1.3. PCR-Ansätze	26
2.1.4. Horizontale Gelelektrophorese	27
2.1.5. Isolierung von DNA-Fragmenten („Gene Clean“-Kit)	28
2.1.6. DNA-Ligation	29
2.1.7. Mini-Prep, mit Diatomeenerde (Sigma)	29
2.1.8. Expressionsvektor pQE-30	31
2.1.9. Das Repressorplasmid pREP-4	32

2.1.10. <i>E. coli</i> M 15 (pREP4)	33
2.1.11. Herstellung kompetenter Zellen (<i>E. coli</i> M15)	34
2.1.12. Transformation kompetenter Zellen (M15)	34
2.1.13. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	35
2.1.14. Comassie-Blau-Färbung von Proteingelen	36
2.2. Überexpression und Reinigung von IsaA und IsaB	37
2.2.1. Testansatz (“small scale”)	37
2.2.2. Hauptansatz (“large scale”)	37
2.2.3. Sonifizierung	38
2.2.4. Ni-NTA-Agarose-Filterung	38
2.2.5. Isolation von Einschlusskörpern („inclusion bodies“)	39
2.2.6. Konzentrierung mit Centricon®	40
2.3. Immunisierung eines Kaninchens mit IsaA	41
2.3.1. Herkunfts- und Immunisierungsnachweis	41
2.3.2. Immunisierungs-/Behandlungsschema	42
2.4. Western-Hybridisierung	42
2.4.1. IgG-Filterung mit Vectron-SA-Cellulose®	42
2.4.2. Western-Hybridisierung	43
2.4.3. Gewinnung von Proben für den Western-Blot	44
2.4.4. Western-Blot	44
2.4.5. Antikörperreaktion	45
2.5. Tierversuch	46
2.5.1. Allgemeiner Versuchsaufbau	46
2.5.2. Peritonitis-Sepsis-Modell	46
2.5.3. Milzaufbereitung und Bauchsitus	47
2.5.4. Statistische Methodik	48

III. Ergebnisse **50**

1. Expression von IsaA und IsaB **50**

1.1. Klonierung von IsaA und IsaB in den Expressionsvektor pQE-30 50

1.2. Überexpression und Reinigung von IsaA und IsaB 52

1.3. Reinigung von IsaA aus Einschlusskörpern („inclusion bodies“)	57
1.4. Überexpression und Reinigung von IsaB	61
1.5. Zusammenfassung	65
<u>2. Immunisierung eines Kaninchens mit IsaA</u>	66
2.1. Westernblot mit polyklonalem Kaninchenantikörper	67
<u>3. Tierversuch</u>	68
3.1. Statistische Auswertung der untersuchten Parameter	69
3.1.1. Gewichtsverhalten der Versuchstiere	69
3.1.2. Makroskopische Beurteilung des intraabdominellen Infektes	73
3.1.3. Milzgewicht	76
3.1.4. Bakterienlast in der Milz (Milzkolonien)	78
3.2. Tabellen der prüfstatistischen Testungen / Signifikanztests	80
3.3. Interkorrelationen	81
3.4. Rohdaten: experimentell erhobene Parameter aller Versuchstiere	83
<u>IV. Diskussion</u>	85
<u>1. Immuntherapie – neue Wege in der Behandlung von Infektionskrankheiten</u>	86
<u>2. Fokus <i>Staphylococcus</i></u>	92
<u>3. Suche nach geeigneten Zielmolekülen (Targets) für eine Immuntherapie</u>	95
<u>4. Immundominante Antigene als neue Targets</u>	97
<u>5. Aussichten</u>	102
<u>V. Zusammenfassung</u>	104
<u>VI. Literaturverzeichnis</u>	106
<u>VII. Anhang</u>	
<u>1. Danksagung</u>	
<u>2. Curriculum vitae</u>	

Abbildungen

Abbildung 1: Vektorkarte des Expressionsplasmides pQE-30	32
Abbildung 2: Vektorkarte des Repressorplasmides pREP4	33
Abbildung 3: Horizontale Gelelektrophorese zur Kontrolle der PCR-Produkte auf <i>isaA</i> und <i>isaB</i> -spezifische DNA-Sequenzen	50
Abbildung 4: Horizontale Gelelektrophorese als Erfolgskontrolle der Ligation der <i>isaA</i> - und <i>isaB</i> -spezifischen DNA in den Klonierungsvektor pQE-30	51
Abbildung 5: SDS-PAGE der Expressionsklone isoliert nach unterschiedlich langer Induktionszeit	53
Abbildung 6: SDS-PAGE zur Überprüfung der Konzentration von IsaA aus den einzelnen Wasch- und Elutionsschritten nach Induktion mit 1 mM IPTG und 4 h Wachstum bei 37°C	54
Abbildung 7: SDS-PAGE zur Überprüfung der Konzentration von IsaA aus den Wasch/Elutionsschritten	55
Abbildung 8: SDS-PAGE zur Überprüfung der Konzentration von IsaA aus den Wasch/Elutionsschritten	56
Abbildung 9: SDS-PAGE zur Überprüfung der Konzentration von IsaA nach Aufreinigung aus „inclusion bodies“	57
Abbildung 10: SDS-PAGE zur Überprüfung der Konzentration von IsaA nach Aufreinigung aus „inclusion bodies“ und anschließender Konzentration mittels Ni-NTA-Agarose mit den Wasch/Elutionsschritten	58
Abbildung 11: Wachstumskurve Small Scale IsaA bei 37°C	60
Abbildung 12: SDS-PAGE der Gesamtzelllysate zur IsaB-Expression nach Kultivierung bei 30°C und 37°C, induziert mit 100 µM und 1 mM IPTG nach 4 h Induktionszeit	62
Abbildung 13: SDS-PAGE zur Überprüfung der Konzentration von IsaB aus den Wasch/Elutionsschritten	63
Abbildung 14: SDS-PAGE zur Kontrolle von IsaB nach Ni-NTA-Agarose-	

Elution und anschließender Centricon®-10-Konzentrierung	64
Abbildung 15: Westernblot, in dem das Präimmenserum des Kaninchens 1:10 verdünnt, das 2. Regular 1:2 verdünnt sowie Kaninchen-IgG (isoliert aus 2. Regular) in den Verdünnungen 1:5 und 1:10 getestet wurden	67
Abbildung 16a: Mittelwerte und Streuungen des Startgewichts der Tiere bei den Versuchsgruppen	71
Abbildung 16b: Mittelwerte und Streuungen des Endgewichts der Tiere bei den Versuchsgruppen	71
Abbildung 16c: Mittelwerte und Streuungen des Differenzgewichts der Tiere bei den Versuchsgruppen	72
Abbildung 17: Mittelwerte und Streuungen des Bauchsitus makroskopisch bei den Versuchstieren	75
Abbildung 18: Mittelwerte und Streuungen des Milzgewichtes bei den Versuchstieren	77
Abbildung 19: Mittelwerte und Streuungen der Milzkolonien pro g Organ bei den Versuchsgruppen	79

Tabellen

Tabelle 1: Die vier häufigsten epidemischen MRSA aufgegliedert nach verursachten Infektionen, basierend auf Einsendungen an das NRZ	10
Tabelle 2: Auftreten der häufigsten Infektionen mit MRSA in verschiedenen klinischen Disziplinen, basierend auf Einsendungen an das NRZ, 2005/2006	12
Tabelle 3: Häufigkeit der Resistenzen bei MRSA gegenüber verschiedenen Antibiotika aus Krankenhausinfektionen in Deutschland 2000-2006, basierend auf Einsendungen an das NRZ	14
Tabelle 4: Dynamik der Verbreitung epidemischer MRSA in Deutschland von 1994 bis 2006, basierend auf Einsendungen an das NRZ	15

Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme	24
Tabelle 6: Immunisierungs- / Behandlungsschema	42
Tabelle 7: Wachstumstabelle für den IsaA-produzierenden Klon bei 37°C	59
Tabelle 8: Deskriptive Statistik der Parameter Start-, End- und Differenzgewicht innerhalb der Versuchsgruppen	70
Tabelle 9: Deskriptive Statistiken des intraabdominellen Infektes makroskopisch (Punkte) bei den Versuchstieren	74
Tabelle 10: Deskriptive Statistiken des Milzgewichtes (g) bei den Versuchstieren	76
Tabelle 11: Deskriptive Statistiken der Bakterienlast in der Milz (Milzkolonien) bei den Versuchstieren	78
Tabelle 12: Mann-Whitney-U-Test auf Unterschied zwischen Gruppe A und B bei Versuchsparametern / Outcome-Variablen	80
Tabelle 13: Mann-Whitney-U-Test auf Unterschied zwischen Gruppe C und D bei Versuchsparametern / Outcome-Variablen	80
Tabelle 14: Mann-Whitney-U-Test auf Unterschied zwischen Gruppe (A+C) und (B+D) bei Versuchsparametern / Outcome-Variablen	81
Tabelle 15: Spearman-Interkorrelationen innerhalb der Menge der Parameter des Tierversuchs	82
Tabelle 16: Rohdaten: Experimentell erhobene Parameter aller Versuchstiere	84
Tabelle 17: Bisher von der FDA (US Food and Drug Administration) bzw. in Deutschland, Australien und Venezuela zugelassene Antikörper (Stand 2004)	90
Tabelle 18: Ausgewählte Antikörper-Therapien in klinischer Entwicklung gegen Pathogene	94

I. Einleitung

1. Klinik der Infektion mit Staphylokokken

Staphylokokken sind grampositiv, werden mikroskopisch durch ihre paarige oder traubenartige Anordnung identifiziert und lassen sich kulturell leicht anzüchten. Die meisten humanpathogenen Stämme sind nicht bekapselt. Staphylokokken sind gegenüber Umwelteinflüssen wie hoher Salzkonzentration, Temperaturen bis 50 °C oder Austrocknung sehr resistent.

1.1. Koagulase-positive Staphylokokken (*Staphylococcus aureus*)

S. aureus kommt ubiquitär vor und ist Bestandteil der normalen Hautflora (bei 30 % aller Menschen in Abstrichen von Nasopharynx und feuchten Hautpartien nachweisbar). *S. aureus*-Infektionen können von offenen Wunden oder Abszessen ausgehen, aber auch von asymptomatischen Trägern oder von kontaminierten Materialien übertragen werden. Dadurch entwickeln sich Infektionsketten in Familien, Wohngemeinschaften oder im Krankenhaus. Offene Wunden und Fremdkörper disponieren für eine Infektion. Besonders gefährdet sind Neugeborene, Immunsupprimierte und Patienten mit Granulozyten-Funktionsstörungen (z.B. chronische ["septische"] Granulomatose [CGD], Hyper-IgE-Syndrom).

Aufgrund langer Zeitabstände zwischen Besiedlung und Infektion kann die Inkubations- oder Latenzzeit von *S. aureus*-Infektionen von einem Tag bis zu Wochen und Monaten reichen. Intoxikationen durch *S. aureus*-kontaminierte Nahrungsmittel haben im Gegensatz dazu eine kurze Inkubationszeit von 30 Minuten bis zu wenigen Stunden. Häufige *S. aureus*-Infektionen sind lokale und kutane Infektionen, Augeninfektionen und Pneumonien (vorwiegend im Säuglingsalter). Typische Komplikationen durch hämatogene Aussaat von *S. aureus*

können Abszesse der inneren Organe oder der Muskulatur, Endokarditiden, Osteomyelitiden oder selten Meningitiden sein.

Zahlreiche biologisch hochaktive Exotoxine (Hämolsine, Leukozidin, Hyaluronidase, Nukleasen, Proteasen, Katalase, Lipasen u.a.) werden von *S. aureus* produziert und sind meist in Kombination an der Pathogenese verschiedener Infektionen wie Wundinfektionen, Sepsis, Pneumonien, Osteomyelitis, Endokarditis beteiligt. Demgegenüber sind einige Toxin-vermittelte Infektionen durch *S. aureus* streng mit der Produktion bestimmter Exotoxine assoziiert. So wird das "Staphylococcal scalded skin syndrom" (SSSS, auch: Dermatitis exfoliativa [neonatorum], altes Syndrom: Morbus Ritter von Rittershain) durch zwei biochemisch und immunologisch differenzierbare Exofoliatine A und B ausgelöst. Das "Staphylococcal Toxic shock syndrome" (TSS) wird durch ein anderes Staphylokokken-Exotoxin verursacht. Dabei handelt es sich um ein nur von wenigen Staphylokokkenstämmen gebildetes Protein mit dem Namen TSST-1 (toxic shock syndrome toxin 1). Verschiedene hitzestabile Enterotoxine (A-E) von *S. aureus* führen in vitro als Superantigene zu einer maximalen T-Zell-Stimulation und sind in vivo für Staphylokokken-assoziierte Nahrungsmittelintoxikationen verantwortlich¹.

Therapie

Bei einer *S. aureus*-Infektion sollte - wenn möglich - die chirurgische Drainage eines Eiterherdes erfolgen. Bei der Auswahl geeigneter Antibiotika für die systemische Behandlung von *S. aureus*-Infektionen ist zu berücksichtigen, dass 30 - 50 % der *S. aureus*-Stämme bei ambulanten Patienten und 60 - 80 % der Klinikstämme Penicillin-resistent sind, aber auch gegen penicillinasefeste Isoxazolyl-Penicilline wie Methicillin (in Deutschland nicht im Handel) und Oxacillin vermehrt Resistenzen auftreten (MRSA = Methicillin resistente *S. aureus*). Andere Beta-Lactam-Antibiotika sollen grundsätzlich nicht eingesetzt werden, auch wenn sie in vitro empfindlich sind.

Leichte *S. aureus*-Infektionen können mit einem oralen Antibiotikum behandelt werden (Isoxazolylpenicilline, orale Cephalosporine der 1. und 2. Generation, oder Aminopenicilline in Kombination mit Beta-Lactamase-Hemmer). Bei schweren Infektionen ist eine intravenöse Therapie mit Isoxazolylpenicillinen, Cephalosporinen der 2. Generation, Clindamycin, oder auch mit Rifampicin und Fusidinsäure angezeigt. Methicillin-resistente Stämme erfordern meist den Einsatz von Reserveantibiotika. In Frage kommen etablierte, MRSA-wirksame Substanzen wie Vancomycin oder Teicoplanin, für die bisher nur vereinzelt Resistenzen beschrieben wurden, oder Antibiotika der neueren Generation wie Linezolid, Daptomycin oder Tigecyclin. Die Kombination mit einem Aminoglykosid oder Rifampicin ist evtl. sinnvoll. Verschiedene weitere Antibiotika, die eine gute Wirkung gegen MRSA zeigen,² befinden sich in der präklinischen und klinischen Testung.

Patienten mit SSSS erhalten hochdosiert parenterale Antibiotika mit penicillinasefestem Penicillin, wegen eines möglichen synergistischen Effektes evtl. in Kombination mit einem Aminoglykosid. Im Falle einer MRSA-Infektion wird mit Vancomycin oder Teicoplanin behandelt. Beim SSSS oder auch beim TSS ist alternativ der Einsatz von Clindamycin zu erwägen. Beim TSS steht neben der Drainage des Staphylokokkenherdes die symptomatische Schocktherapie mit der Gabe von Kortikosteroiden bei schweren Fällen im Vordergrund. Bei Patienten mit rezidivierenden *S. aureus*-Infektionen sind häufig Familienangehörige Träger (Nasenschleimhaut). Zur *S. aureus*-Elimination aus der Nase bei Keimträgern bietet sich die Lokalthherapie mit Mupirocin (erste Resistenzen gegen Mupirocin wurden in Deutschland beobachtet³) oder alternativ mit Bactracin an.

Prophylaxe

Eine Impfung gegen *S. aureus* steht bisher nicht zur Verfügung. Der einzige Schutz besteht in der Vorbeugung von Kontakten mit infizierten Personen oder kontaminierten Gegenständen. Zur Vorbeugung des TSS bei Frauen wird eine

optimale Menstruationshygiene bei Verwendung verbesserter Tampons empfohlen. Aufgrund der hohen Infektiosität offener *S. aureus*-Infektionen sollten Patienten nach Beginn einer wirksamen antibiotischen Therapie für mindestens 2 Tage kontaktisoliert werden.

1.2. Koagulase-negative Staphylokokken (KNS)

Von über 20 bekannten KNS ist insbesondere *S. epidermidis* als fakultativ pathogener Keim anzusehen. Die meisten KNS haben nur selten humanpathogene Bedeutung. Die am häufigsten nachgewiesene Art *S. epidermidis* wird (fälschlicherweise) auch als Synonym für die ganze Gruppe verwendet. Der Erreger *S. haemolyticus* spielt eine wichtige Rolle in der Neonatologie, *S. saprophyticus* kann Harnwegsinfektionen bei Adoleszenten verursachen. Vor allem *S. epidermidis* weist eine hohe Haftfähigkeit an Plastikmaterialien auf; viele Stämme produzieren Schleim, der die Bakterienkolonien vollkommen überdeckt. KNS sind ubiquitär auf Haut und Schleimhäuten zu finden.

S. epidermidis wurde in den vergangenen Jahren zu einem der häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen mit vielfältiger Symptomatik, vor allem bei Neugeboreneninfektionen und Fremdkörper-assoziierten Infektionen. Eine besondere Disposition für KNS-Infektionen besitzen immunsupprimierte Patienten und Kinder mit invasiv platzierten Plastikmaterialien (zentrale Venenkatheter, Ventrikel- und Peritonealshunts, künstliche Herzklappen und Gelenke), da *S. epidermidis* eine ausgeprägte Fähigkeit zur Biofilmbildung hat.⁴

Therapie

Die auf der Haut vorkommenden Stämme von KNS sind meist Penicillin-sensibel. Dagegen werden bei nosokomialen Infektionen oder bei kontaminierten Plastikmaterialien in der Regel Penicillin- und zunehmend Methicillin-resistente

Stämme gefunden. Bei Verdacht auf eine Infektion durch KNS wird deshalb aus Sicherheitsgründen bis zum Erhalt der Resistenztestung (Antibiogramm) die intravenöse Behandlung mit Vancomycin oder Teicoplanin empfohlen, eventuell in Kombination mit Gentamicin oder Rifampicin. Wichtig ist, dass in etwa der Hälfte der Fälle eine Fremdkörperinfektion nur erfolgreich behandelt werden kann, wenn der Fremdkörper zusätzlich entfernt wird.

Prophylaxe

Wie bei Koagulase-positiven Staphylokokken liegt der beste Schutz vor KNS-Infektionen in der Vorbeugung von Kontakten mit infizierten oder kolonisierten Personen und Materialien. Bei Gefäßkathetern ist auf eine möglichst kurze Verweildauer zu achten. Es gibt bereits Verbesserungen durch veränderte Kathetermaterialien mit geringerer Haftung von KNS, silberbeschichtet, aber auch antibiotisch beschichtet. Diese schneiden in Studien^{5,6,7} zwar gut ab, haben sich in der klinischen Routine aber bisher nicht durchgesetzt. Bei den antimikrobiell beschichteten Kathetern scheint die Sorge um eine weitere Förderung der Resistenzentwicklung im Vordergrund zu stehen⁸. Die prophylaktische Vancomycingabe zur Vermeidung von Katheterinfektionen wird ebenfalls wegen der Gefahr der Resistenzentwicklung nicht empfohlen. Bei zunehmenden *S. haemolyticus*-Resistenzen gegen Teicoplanin ist zu beachten, dass in Kliniken mit gehäuften *S. haemolyticus*-Infektionen Teicoplanin nicht zur "Blindtherapie" eingesetzt werden sollte.

2. Aktuelle Situation und Bedeutung der Staphylokokken-Infektionen

Etwas mehr als 60 Jahre nach der Entdeckung der ersten Antibiotika ist die Problematik der Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber zahlreichen Antibiotika sehr aktuell geworden. Unter den Bakterien, bei denen die Resistenzentwicklung ein Problem geworden ist, nimmt *S. aureus* eine besondere und gleichzeitig exemplarische Stellung ein⁹. 2004 lag die Oxacillin-Resistenz (Oxacillin- und Methicillinresistenz wird üblicherweise synonym benutzt, wobei in der Regel auf Oxacillin getestet wird) aller getesteten *S. aureus*-Isolate laut der PEG-Resistenzstudie¹⁰ bei 22,6%. Die vor 1940 isolierten Staphylokokken waren gegenüber Penicillin durchweg empfindlich. Bereits 1944 wurden jedoch erste Stämme mit Penicillinresistenz beobachtet. Diese Resistenz wurde durch ein Plasmid vermittelt, das eine Penicillinase kodiert, welche den Betalaktamring zu spalten vermag. In den 50er Jahren wurde *S. aureus* zu einem wichtigen Klinikkeim, der für zahlreiche nosokomiale Epidemien verantwortlich war. Mit der Entdeckung des Methicillins im Jahre 1959 stand schließlich ein Medikament zur Verfügung, das, obwohl es auch zu den Betalaktamen gehört, durch Betalaktamasen nicht inaktiviert werden konnte. Sehr bald nach der Einführung dieser Substanz wurden jedoch die ersten Methicillin-resistenten *S. aureus*-Isolate (MRSA) beobachtet. Neben der Resistenz gegenüber Methicillin weisen diese Stämme sowohl eine Resistenz gegenüber allen anderen Betalaktamen als auch recht häufig gegenüber Antibiotika anderer Klassen auf. Im Laufe der letzten 30 Jahre wurde aus Europa und den USA über zahlreiche durch diese Keime verursachte nosokomiale Epidemien berichtet. In vielen Ländern hat sich die Situation dermaßen verschlechtert, dass sich MRSA als endemischer Keim in Kliniken etablieren konnte.

2.1. Problematik der Methicillin-Resistenz

Die Synthese der bakteriellen Zellwand wird durch die Aktivität mehrerer Enzyme bestimmt. Es handelt sich um die sogenannten Penizillin-bindenden Proteine (PBP). Die Betalaktamantibiotika binden sich an diese PBP und hemmen dadurch zum Beispiel die Synthese von Peptidoglykan, einem wichtigen Bestandteil der Bakterienzellwand. Die Bindung zwischen PBP und dem Betalaktamantibiotikum basiert auf der Affinität zwischen PBP und dem Antibiotikum. Die MRSA unterscheiden sich von den Methicillin-empfindlichen *S. aureus* durch den Besitz eines Gens (genannt *mecA*), dessen Produkt, ein Enzym (PBP2a oder PBP2'), eine äußerst geringe Affinität für Betalaktamantibiotika hat. Dadurch verlieren diese Antibiotika gegenüber *S. aureus* mit Expression von *mecA* ihre Wirksamkeit. Gleichzeitig produzieren beinahe alle MRSA Betalaktamasen und sind sehr häufig gegenüber anderen Antibiotika ebenfalls resistent. So sind zum Beispiel die Mehrzahl der Stämme resistent gegenüber Ciprofloxacin (90 %), Makroliden (70 %), Clindamycin (65%), Gentamicin (13 %), Cotrimoxazol (3 %) und Rifampicin (2,5 %).¹¹

2.2. Auswirkungen von Infektionen durch multiresistente Staphylokokken

In mehreren Studien wurde die Frage untersucht ob MRSA eine größere Pathogenität aufweisen als Methicillin-empfindliche *S. aureus*. Dies ist nicht der Fall¹². Es ist somit nicht die erhöhte Virulenz, die Grund für die besondere Stellung von MRSA bei nosokomialen Infektionen ist, sondern die Tatsache, dass nur wenige wirksame Antibiotika für die Therapie von Infektionen durch MRSA zur Verfügung stehen. Es handelt sich um die Glykopeptide, Vancomycin und Teicoplanin sowie die Antibiotika der neueren Generation wie Linezolid, Synercid, Daptomycin oder Tigecyclin. Diese Antibiotika können nur parenteral verabreicht werden und haben zum Teil eine potentielle Toxizität.

Eine erste verringerte Vancomycinempfindlichkeit bei Staphylokokken (VISA=Vancomycin intermediate resistance *S. aureus*) wurde 1997 aus Japan berichtet¹³. Seit 2002 gibt es voll Vancomycin-resistente *S.aureus*¹⁰ (VRSA), allerdings bislang nur 8 Fälle, alle in den USA. Dies sind bislang Einzelfälle geblieben und es hat (noch) keine berichteten Epidemien gegeben. Große Probleme herrschen bereits in gewissen Kliniken, die eine hohe Prävalenz von Vancomycin-resistenten Enterokokken aufweisen. Für Daptomycin wurde ebenfalls aus den USA ein Fall der Resistenzentwicklung unter Langzeittherapie bekannt¹⁴. Neben diesen Entwicklungen, die eine "postantibiotische Ära" in Zukunft möglich erscheinen lassen, unterstreicht eine weitere Feststellung die Bedeutung der MRSA. Infektionen durch MRSA lösen nicht einfach Infektionen durch empfindliche Keime ab, sondern sie treten in der Regel als zusätzliche Infektionen auf. Diese Tatsache hat negative Auswirkungen auf die Krankenhauskosten (Liegezeiten, Intensivstation) ebenso wie auf die durch den vermehrten Einsatz von Antibiotika verursachten Kosten.

Aus all diesen Gründen hat die Mehrzahl der Kliniken Strategien entwickelt und Richtlinien implementiert, die zur Kontrolle und Prävention von MRSA-Infektionen beitragen sollen. Diese Strategien verursachen ebenfalls Kosten, die umso höher sind, je höher die Rate der durch MRSA infizierten bzw. kolonisierten Patienten ist. Es besteht deshalb ein vitales Interesse, das MRSA-Problem frühzeitig in den Griff zu bekommen.

2.3. Epidemiologie von MRSA

Die MRSA-Prävalenz weist eine ausgeprägte geographische Variabilität auf. Diese Variabilität ist global ausgeprägt, kann aber auch regional zwischen Kliniken einer bestimmten Region oder sogar innerhalb der Klinik von Abteilung zu Abteilung beobachtet werden. MRSA wird relativ häufig auf chirurgischen Abteilungen, Intensivpflegestationen inklusive Verbrennungsstationen sowie internistischen Abteilungen isoliert.

Bei Infektionen mit MRSA wird zwischen „hospital acquired“ MRSA (haMRSA) und „community acquired“ MRSA (caMRSA) unterschieden. Unter den haMRSA gibt es Stämme mit einer ausgeprägten Ausbreitungsfähigkeit im Krankenhaus, die als epidemische MRSA besonders hervortreten. MRSA der klonalen Linien ST22 („Barnim-Epidemiestamm“) und ST45 („Berliner Epidemiestamm“) sind vor allem in der Nordhälfte des Bundesgebietes verbreitet, MRSA der Gruppe „Rhein-Hessen“ (ST5/ST225) waren früher vor allem im Westen und Südwesten der Republik verbreitet, werden jetzt aber im gesamten Bundesgebiet nachgewiesen.

Tabelle 1: Die vier häufigsten epidemischen MRSA aufgegliedert nach verursachten Infektionen, basierend auf Einsendungen an das NRZ.¹⁵ Für diese Darstellung wurden MRSA der klonalen Linien ST5 und ST225 zusammengefasst als „Rhein-Hessen“-MRSA dargestellt.

Infektion	Barnim Epidemie- stamm ST22		Berliner Epidemie- stamm ST45		Rhein- Hessen Epidemie- stamm ST5/ST225		Süddeutsche r Epidemie- stamm ST228		Sum- me
Abszess	14	58,3%	1	4,2%	9	37,5%	0	0,0%	24
Bakteriämie/ Sepsis	54	47,8%	9	8,0%	46	40,7%	4	3,5%	113
Bakteriämie/ Sepsis bei Katheter/Shunt	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%	1
Decubitus	5	45,5%	0	0,0%	6	54,5%	0	0,0%	11
Empyem	2	66,7%	1	33,3%	0	0,0%	0	0,0%	3
Endokarditis	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1
Gangrän (diabetisch)	3	75,0%	0	0,0%	1	25,0%	0	0,0%	4
Harnwegs- infektion	59	53,6%	7	6,4%	40	36,4%	4	3,6%	110
Konjunktivitis	1	25,0%	0	0,0%	3	75,0%	0	0,0%	4
Osteomyelitis/ Ostitis	0	0,0%	2	66,7%	1	33,3%	0	0,0%	3
Otitis	3	50,0%	2	33,3%	1	16,7%	0	0,0%	6
Peritonitis	3	60,0%	0	0,0%	2	40,0%	0	0,0%	5
Phlegmone	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	1
Pneumonie	114	53,5%	20	9,4%	60	28,2%	19	8,9%	213
Pyodermie	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	1
Ulcus cruris	0	0,0%	0	0,0%	1	50,0%	0	0,0%	2
Verbrennung/ Verbrühung	1	50,0%	0	0,0%	1	50,0%	0	0,0%	2
Wundinfektion	307	47,7%	78	12,1%	212	32,9%	47	7,3%	644
Summe	567	49,3%	120	10,4%	386	33,6%	75	7,2%	1148

Wie die in Tabelle 1 zusammengestellten Daten zeigen können die vier am weitesten verbreiteten klonalen Linien (klonale Komplexe) epidemischer MRSA als Verursacher schwerer nosokomialer Infektionen wie Bakteriämie/Sepsis, Beatmungspneumonien und Wundinfektionen auftreten. Einige der Epidemiestämme treten bei bestimmten Infektionen stärker hervor. So dominieren beispielsweise unter den Isolaten aus Blutkulturen die klonalen Linien ST5/ST225 („Rhein-Hessen-Epidemiestamm“) und ST22 („Barnim-Epidemiestamm“). Bemerkenswert ist der Anteil von Isolaten aus Harnwegsinfektionen. Es wird deutlich, dass aktuell zumindest 5 verschiedene Stämme von MRSA in Deutschland als Verursacher schwerer Infektionen zu beachten sind. Bei einer möglichen Immuntherapie und der Suche nach Targets sollten alle epidemischen MRSA Stämme erfasst werden.

Tabelle 2: Auftreten der häufigsten Infektionen mit MRSA in verschiedenen klinischen Disziplinen, basierend auf Einsendungen an das NRZ, 2005/2006.¹⁶

Infektion	Harnwegs- infektion	Pneu- monie	Sepsis	Wund- infektion	Ge- samt
Gesamt	130	260	141	847	1378
Innere Medizin	40 13,2%	66 21,7%	57 18,8%	141 46,4%	304 22,1%
Intensivstation	2 0,8%	131 51,5%	39 15,5%	80 31,7%	252 18,3%
Chirurgie	7 2,0%	9 2,6%	20 5,8%	307 36,2%	343 24,9%
Neurologie	18 29,5%	10 16,4%	3 4,9%	30 0,7%	61 0,6%
Dermatologie	1 6,7%	0 0,0%	0 0,0%	30 0,7%	15 1,1%
Orthopädie	12 15,8%	4 5,3%	6 7,9%	54 6,4%	76 5,5%
Urologie	13 29,5%	4 9,1%	3 6,8%	24 2,8%	44 3,2%
Gynäkologie	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	3 0,4%	3 0,2%
„ambulant“	19 14,4%	2 1,5%	1 0,8%	110 13%	132 9,6%
andere	18 2,7%	22 13,1%	12 10,0%	83 12,9%	132 9,8%

Bei den in Tabelle 2 aufgeführten Infektionen stehen die größeren klinischen Disziplinen Chirurgie, Innere Medizin und Intensivmedizin im Vordergrund. Operationen im Bereich der Orthopädie sind überwiegend Eingriffe in nicht kontaminierte Regionen, die allerdings aufgrund der Operationsdauer und Komplexität (Gelenkersatz) besondere Aufmerksamkeit im Hinblick auf die Prävention von Infektionen erfordern. Der niedrige Anteil von MRSA an Einsendungen aus dieser klinischen Disziplin ist wahrscheinlich Ausdruck einer erfolgreichen Präventionsstrategie. Erfreulich ist auch der vergleichsweise niedrige Anteil von MRSA in der Dermatologie, stand doch diese Disziplin bezüglich MRSA vor 10–15 Jahren noch im Vordergrund. Den größten Anteil relevanter Infektionen insgesamt machen die Wundinfektionen aus. In den Fächern Orthopädie, Urologie, Dermatologie, Neurologie und „ambulant“ überwiegen die Harnwegsinfektionen. In der Intensivmedizin dominiert mit über 50% die Pneumonie.

Tabelle 3: Häufigkeit der Resistenzen bei MRSA gegenüber verschiedenen Antibiotika aus Krankenhausinfektionen in Deutschland 2000-2006, basierend auf Einsendungen an das NRZ.¹⁷

Antibiotika	2000 (n=3091)	2002 (n=2238)	2003 (n=2234)	2004 (n=3071)	2005 (n=2610)	2006 (n=2196)
Ciprofloxacin	95,3%	97,18%	96,41%	93,8%	93,7%	93,8%
Erythromycin	72,8%	72,3%	71,21%	71,7%	70,9%	72,5%
Clindamycin	64,3%	67,7%	67,77%	66,4%	66,1%	65,4%
Gentamicin	41,3%	23,95%	23,46%	16,9%	11,8%	13,3%
Oxytetracyclin	9,2%	4,58%	5,42%	6,2%	6,4%	7,4%
Trimethoprim/ Sulfonamid	9,7%	3,61%	3,36%	3,6%	2,8%	3,1%
Rifampicin	4,1%	1,87%	2,55%	2,0%	1,7%	2,5%
Fusidinsäure	3,4%	2,44%	3,28%	4,6%	4,8%	6,4%
Mupirocin	2,6%	1,65%	1,25%	2,9%	1,4%	2,6%
Quinupristin/ Dalfopristin	0,8%	0,05%	0	0	0	0
Vancomycin	0	0	0	0	0	0
Teicoplanin	0	0	0,22%	0,1%	0	0
Linezolid	0	0	0	0	0	0,04%
Fosfomycin	2,8%	2,7%	2,4%	4,1%	1,2%	3,3%

Das Auftreten von Mehrfachresistenzen in Deutschland geht aus Tabelle 3 hervor. Erfreulich hierbei sind die durchweg niedrigen Werte bei Rifampicin, Fosfomycin und Trimethoprim/Sulfonamid sowie das Fehlen von Resistenzen gegenüber den so genannten Reserveantibiotika Quinupristin/Dalfopristin, Vancomycin und Teicoplanin. Bei Linezolid ist im Jahre 2006 zum ersten Mal in Deutschland über eine Resistenz eines MRSA berichtet worden.¹⁸

Tabelle 4: Dynamik der Verbreitung epidemischer MRSA in Deutschland von 1994 bis 2006, basierend auf Einsendungen an das NRZ.¹⁹

E.-stamm = Epidemiestamm, PEN = Penicillin, OXA = Oxacillin, GEN = Gentamicin, ERY = Erythromycin, CLI = Clindamycin, OTE = Oxytetracycline, SXT = Trimethoprim/Sulfonamid, RIF = Rifampicin, CIP = Ciprofloxacin, FUS = Fusidinsäure-Natrium

Molekulare Typisierung	Resistenzphänotyp	Häufigkeit von Epidemiestämmen in Krankenhäusern (sporadische Infektionen)			
		1994 n=121	2000 n=567	2002 n=747	2006 n=341
t051-ST247 norddt. E.-Stamm	PEN OXA GEN ERY CLI OTE SXT RIF CIP	22%	1,3%	0,4%	0,1%
t001-ST288 süddt. E.-stamm	PEN OXA ERY CLI CIP (GEN) (OTE)	16%	36,8%	15,2%	6,4%
t009-ST254 Hann. E.-stamm	PEN OXA GEN ERY CLI SXT CIP	32%	3,5%	0,7%	0,5%
t002-ST05 + t003-ST225 Rh.- Hess. E.-stamm	PEN OXA ERY CLI CMP CIP	5%	-	23,3%	33%
t037-ST239 Wien. E.-stamm	PEN OXA GEN ERY CLI SXT CIP OTE (FUS)	4%	0,1%	0,2%	1,2%
t004,038, 0665- ST45 Berl. E.- stamm	PEN OXA CIP (GEN ERY SXT)	11%	26,7%	18,2%	9%
t022,032-ST22 Barnim E.- stamm	PEN OXA ERY CLI CIP	-	19,8%	28%	38,8%
t036-ST36	PEN OXA (ERY CLI)	1%	1,5%	0,7%	0,6%
andere	variable	10,0%	10,3%	13,3%	10%
Anzahl Krankenhäuser mit Epidemiestämmen		98	309	333	178

In Tabelle 4 sind die wichtigsten in Deutschland auftretenden MRSA-Stämme mit ihrer molekularen Typisierung (linke Spalte) aufgeführt. In der nächsten Spalte die jeweiligen Resistenzen gegen Antibiotika. Im rechten Abschnitt ist beispielhaft für die Jahre 1994, 2000, 2002 und 2006 die Häufigkeit des Auftretens von Epidemiestämmen in Krankenhäusern aufgezeigt. Dabei fällt auf, dass Stämme, die in den 1990er Jahren die weiteste Verbreitung zeigten (ST239, ST247, ST245), bis zum Jahr 2006 deutlich an Bedeutung verloren, wohingegen andere Stämme (ST22, ST5, ST225) im gleichen Zeitraum eine anhaltende Zunahme der Verbreitung in Deutschland zeigen.

3. Neue Antibiotika

Eine neue Klasse von Antiinfektiva stellen die kürzlich in die klinische Praxis eingeführten 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 für den Menschen zugelassene 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 wurden aus dem bekannten Stoffwechselprodukt Pristinamycin von *Streptomyces pristinae spiralis* die halbsynthetischen Derivate Quinupristin und Dalfopristin entwickelt. In einer 30 : 70-Mischung dieser beiden synergistischen Antibiotika, welche man auch als Streptogamine 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 (Glykopeptid-intermediär resistente *S. aureus*). 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 z. B. Oritavancin, Telavancin und Dalbavanacin. Ihre Wirkung liegt wie die von Vancomycin und Teicoplanin in der Hemmung der Zellwandsynthese, 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.

Ein weiteres neueres Antibiotikum mit grampositivem Wirkspektrum ist das 2003 in den USA und seit 2006 in Deutschland zugelassene Daptomycin (Cubicin®). Daptomycin ist ein zyklisches Lipopeptid und wirkt als Ionenkanal nach Einbau in die grampositive Zellmembran, gramnegative Bakterien werden nicht erfasst.

Tigecyclin (Tigacyl®) ist das erste Glycylcyclin, eine neue, von den Tetracyclinen abgeleitete Antibiotikaklasse, die zur Therapie von Haut- und Weichteilinfektionen sowie komplizierten intraabdominellen Infektionen eingesetzt werden kann.

Tigecyclin wirkt wie die Tetracycline bakteriostatisch durch Bindung an die 30S-Untereinheit der Ribosomen und die daraus resultierende Hemmung der Proteinsynthese. Sein Wirkungsspektrum umfasst grampositive, gramnegative und atypische Erreger mit einer Wirkungslücke bei *Pseudomonas aeruginosa*. Wichtig ist die Wirksamkeit gegen multiresistente Erreger wie MRSA, VRE und ESBL-Klebsiellen. Auch Tetracyclin-resistente Erreger werden erfasst²⁰.

Auch in anderen Antibiotikaklassen werden immer wieder neue Wirkstoffe entwickelt, welche sich durch verbesserte Eigenschaften gegenüber ihren „Vorgängern“ im Hinblick auf Wirkung und Nebenwirkungen auszeichnen. Ceftobiprolmedocaril²¹ beispielsweise ist das erste gegen MRSA wirksame Cephalosporin. Die innovative Struktur in diesem Cephalosporin ist eine Vinylpyrrolidin-Seitenkette.

4. Entwicklung von Immuntherapeutika

Da davon auszugehen ist, dass sich dieser Trend auch in Zukunft fortsetzen wird, d.h. dass wichtige Epidemiestämme an Bedeutung verlieren und andere im Laufe von Jahren an Bedeutung gewinnen werden, muss auch bei der Suche nach geeigneten Targets bei der Entwicklung einer Immuntherapie gegen MRSA diesem Umstand Rechnung getragen werden.

Nachdem es lange Zeit keine vernünftige Alternative zu Antibiotika bei Infektionen gegeben hat, geben nun die in den letzten Jahren auf den Markt gekommenen Antikörper vor allem aus den Bereichen Immunologie und Onkologie Anlass zur Hoffnung, dass es auch bald eine wirksame Antikörpertherapie gegen bestimmte besonders gefürchtete Keime wie MRSA geben könnte. Zum einen haben sich die labortechnischen Möglichkeiten in den letzten zehn bis fünfzehn Jahren enorm entwickelt, zum anderen ist heutzutage das Genom vieler *S. aureus*-Stämme

bekannt, so dass es nur noch eine Frage der Zeit zu sein scheint, bis ein Antigen identifiziert ist, gegen welches eine Antikörpertherapie gerichtet sein kann.

Infektionskrankheiten stehen weltweit an zweiter Stelle der Todesursachen, und die Entwicklung von Resistenzen vieler pathogener Keime gegen Antibiotika hat das Interesse an der Entwicklung von Impfstoffen zur Heilung oder Vorsorge stark erhöht. Obwohl Polysaccharidvakzine geeignet sind, Infektionskrankheiten vorzubeugen, induzieren sie doch Serotyp-spezifische Immunantworten und fördern die Serotyp-Neuverteilung²². Deswegen sind Antigen-Proteine mit wenigen Sequenz-Variationen wahrscheinlich besser geeignet, um ein Vakzin gegen bestimmte Keime herzustellen. Zusätzlich müssen diese Antigene vom Immunsystem als fremd erkannt werden. Die Verfügbarkeit kompletter Genomsequenzen pathogener Bakterien vereinfacht die Suche nach solchen Antigenen. Bei *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* ist es bereits durch Vorhersagen von Bioinformatikern gelungen, Oberflächenproteine als mögliche Vakzin-Kandidaten zu identifizieren^{23,24}. Die Identifizierung relevanter Proteine durch Algorithmen und die Tatsache, dass diese in voller Länge exprimiert und später aufgereinigt werden müssen, limitiert die Auswahl geeigneter Kandidaten. Auch von *Helicobacter pylori* und *Mycobacterium tuberculosis* sind bereits einige Vakzinkandidaten durch Kombination von Genom- und Proteomdaten identifiziert worden^{25,26}. Bisher ist der Erfolg noch durch die Anzahl der unter in vitro Wachstumsbedingungen exprimierten Proteine begrenzt. Die hier beschriebenen Versuche haben entweder die Immunogenität der rekombinanten Proteine in Tierversuchen bestimmt^{27,28} oder Tiermodelle verwendet, um mAk für die Selektion zu benutzen²⁹. Etz et al.³⁰ nutzten bei der Suche nach geeigneten Zielantigenen Peptid-Genom-Datenbanken und inkubierten diese mit Humansenen. Das Screening mittels magnetic cell sorting (MACS) identifizierte bestimmte Antigene, die in vivo exprimiert werden und im Menschen eine Immunantwort auslösen. Angewendet wurde dieses Verfahren nun auf den Methicillin-resistenten *S. aureus* Stamm COL³¹. Mehr als sechzig Proteine mit antigenen Eigenschaften und

ihre Ak-Bindungsstellen wurden dabei identifiziert. Die meisten dieser Proteine befinden sich auf der Zelloberfläche oder werden dort sezerniert.

Ein weiterer Schritt war die Arbeit von Lorenz et al.³². Hier gelang es, durch das Screening von Patientenserum immunodominante Antigene zu identifizieren, welche während einer Sepsis mit MRSA exprimiert werden. Es handelt sich dabei um vier staphylokokkenspezifische 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. Um zwei der identifizierten Antigene, IsaA und IsaB, geht es in der hier vorliegenden Arbeit.

S. aureus ist nicht nur ein Hauptverursacher von Infektionen bei Patienten mit Hypo- und Agammaglobulinämie, sondern auch bei Neutrophilendefekten eine Infektionsursache. Das legt nahe, dass die humorale Immunantwort und die Opsonierung von Antikörpern Eckpfeiler der Immunabwehr gegen *S. aureus* darstellen. Die Identifizierung von *S. aureus* Proteinen als Antigene durch Antikörper aus Humanserum ist ein starker Hinweis darauf, dass diese Antigene in vivo exprimiert werden und eine Immunantwort auslösen, die Voraussetzung für die Entwicklung eines effektiven Vakzins ist. Etz et al.³³ analysierten hierzu 150 Serumproben von drei verschiedenen Gruppen. Patienten mit *S. aureus* Infektion, gesunde Erwachsene und Kleinkinder. Die ersten beiden Gruppen dienten als Quelle antistaphylokokkaler Antikörper, während die 6- bis 24-monatigen Kinder als Negativkontrolle dienten. Obwohl Antikörper in Patienten wohl nicht protektiv sind, weil sie Infektionen nicht verhinderten, so könnte doch ihre ungenügende Anzahl ursächlich sein. Eine Induktion solcher Antikörper durch ein Vakzin könnte somit zu einem Schutz vor einer Infektion führen. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass die Impfung von Tieren mit Oberflächenproteinen³⁴ und sezernierten Toxinen³⁵ zu einem Infektionsschutz von Mäusen in verschiedenen Infektionsmodellen geführt hat, obwohl Antikörper zum Beispiel gegen Fnbp A/B

auch in Sera von Gesunden und bei Patienten ohne Impfung gefunden wurden. Andererseits könnten identifizierte Antigene von Gesunden eine wichtige Rolle spielen, weil man spekulieren könnte, dass diese die Gesunden vor einer Infektion schützen, während Patienten nicht in der Lage waren, eine effektive Immunantwort zu erbringen.

Sowohl von Patienten als auch von gesunden Erwachsenen wurden Sera mit hohen antistaphylokokalen Antikörpertitern durch Messung von IgG-Antikörpern gegen verschiedene Antigene von *S. aureus* ausgewählt. Auf Basis der kumulativen Titer wurden ca. 10-15% der Gesunden und ca. 30% der Patientensera klassifiziert. Fünf Sera wurden gesammelt und ihre aufgereinigten IgGs nach funktioneller Aktivität in einem *in vitro* Opsonierungs-Phagozytose-Assay getestet. Die Phagozytose von Bakterien durch frisch isolierte Neutrophile wurde durch Komplement beschleunigt und war von der IgG Konzentration abhängig. IgGs von Patienten und Gesunden erzielten ähnliche Effizienz bei der Opsonierung. Die beiden Peptid-Datenbanken (LamB-LSA50 und FhuA-LSA250) wurden mit zwei Serumpools mit MACS untersucht. Eine representative Anzahl entdeckter Klone (500-1000) wurde zufällig ausgewählt und sequenziert. Am Protein Empbp wird deutlich, dass sich antigene Regionen oft wegen der zufälligen Auswahl aus den Datenbanken überlappen. Die am häufigsten entdeckten Epitope kamen in beiden Protein-Screenings vor, zum Beispiel Empbp, SA2581³⁶, ProteinA, SA2291, Lipase, Autolysin und **IsaA**³⁷. Im LamB-SA50-Screen wurde häufig LPXTGp5 gefunden, während SA0723, SA1472 und Coagulase nur im FhuA-LSA250-Screen vorkamen. Diese Analyse zeigt, dass der Gebrauch mehrerer Verfahren zu umfassenderen Ergebnissen führt. Obwohl SA2291, SA2006, SA1472, Autolysin, SA0723, SA2581, Empbp und ProteinA in beiden Serum-Pools vorkamen, wurden SA1781, Lipase und **IsaA** überwiegend in Patientenserum gefunden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die zuletzt genannten Proteine überwiegend während der Infektion mit *S. aureus* entstehen.

Somit ist davon auszugehen, dass die meisten Menschen in der Lage sind, eine effektive Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen zu generieren. Deshalb

wurde die Reaktivität von 40 Patientensera sowie 30 Sera Gesunder mit den identifizierten Epitopen getestet. Immerhin 15 Antigene reagierten mit mehr als 70% aller getesteten Sera. Zusätzlich wurde die Gegenwart der entsprechenden Gene in 30 Stämmen von *S. aureus* mittels PCR analysiert. 9 von 13 getesteten immunogenen Proteinen waren in allen 30 Stämmen vorhanden, wohingegen nur 4 Gene in 5-30% aller Stämme nicht vorkamen. Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse vermuten, dass ein potentielles auf diesen Antigenen basierendes Vakzin gegen *S. aureus* gegen ein großes Spektrum klinisch relevanter Stämme wirksam sein könnte. In einem Tiermodell wurden die identifizierten Antigene in Mäusen auf Immunogenität und ihren protektiven Wert hin getestet³⁸. Es wurden vier Epitope ausgewählt, die die Häufigkeiten der vorhergehenden Screenings widerspiegeln: ein Epitop von SA0723 (sehr häufig), je eines von Empbp und Coagulase (beide mittlere Häufigkeit) und eines von SA0507 (selten). Nach i.v. Injektion von 10⁹ toten Bakterienzellen in Mäuse wurden nach 2 und 4 Wochen Serumproben entnommen. Dabei korrelierte der induzierte Antikörpertiter stark mit denen der Klone aus den Screenings. Die stärkste Reaktion zeigte SA0723, eine mittelstarke Empbp und Coagulase und eine schwache SA0507. Die Ergebnisse dieser Versuche belegen die antigenspezifische Immunantwort bei einer *S. aureus* Infektion und unterstreichen die Bedeutung der Targetauswahl für den Erfolg einer Immuntherapie.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, zwei der von Lorenz et al. (siehe oben) identifizierten immundominanten Antigene von *S. aureus*, IsaA und IsaB, zu exprimieren, um anschließend über die Immunisierung eines Kaninchens mit IsaA einen polyklonalen Antikörper zu gewinnen. Dieser Antikörper sollte die Grundlage für erste Tierversuche mit Ratten bilden, um das Konzept einer passiven Immunisierungsstrategie mit IsaA als Targetantigen im Kleintiermodell zu prüfen.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1. Medien und Agarplatten

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

LB-Medium: 10g Bacto Trypton
 5g Yeast Extract
 5g NaCl
 ad 1 l H₂O dest.

LB-Agarplatten: 1 l LB-Medium
 14g Agar

1.2. Puffer und Lösungen

Für Enzymreaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer und Lösungen verwendet. Alle selbst angesetzten Puffer und Lösungen sind bei den jeweiligen Methoden beschrieben. Steriles H₂O bidest. wurde für Enzymreaktionen, H₂O dest. für alle anderen Lösungen verwendet.

1.3. Stammliste

Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme

Organismus	Stamm	Eigenschaften
<i>S. aureus</i>	COL	MRSA, Institutsstammsammlung
<i>S. aureus</i>	134	Isolat Universitätsklinik Würzburg
<i>S. aureus</i>	418	Isolat Universitätsklinik Würzburg
<i>S. aureus</i>	B 129	Isolat Universitätsklinik Würzburg
<i>S. aureus</i>	MH 12	Isolat Universitätsklinik Würzburg

2. Methoden

2.1. Klonierung von IsaA und IsaB in den Expressionsvektor pQE-30

2.1.1. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)³⁹

Diese Methode gestattet die Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen. Darüber hinaus ist es durch entsprechendes Primerdesign möglich, gewünschte Restriktionsschnittstellen in das zu amplifizierende Fragment einzubauen. Dadurch wird eine nachfolgende Klonierung des entsprechenden Fragments erleichtert. Bei der Auswahl der Oligonukleotid-Primer ist zu beachten, dass diese möglichst 50% GC enthalten und nicht durch längere komplementäre Abschnitte gegenseitig aneinander binden können. Für die PCR-Reaktion werden folgende Komponenten in ein Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel pipettiert:

10 x	Taq-Polymerase-Puffer	10 µl
50 mM	MgCl ₂	1 µl
20 mM	dNTP-Mix	4 µl
100 vg/ml	Template-DANN	1 µl
1 µg/ml	Primer 1	1 µl
1 µg/ml	Primer 2	1 µl
5 U/µl	Taq-Polymerase	1 µl
	ad H ₂ O bidest.	100 µl

Am Thermocycler wird der Ablauf der Reaktion programmiert. Zunächst erfolgt ein zweiminütiges Denaturieren bei 94°C. Im Anschluss werden 30 Amplifizierungszyklen durchgeführt: Denaturierung der DNA für 90 s bei 94°C, gefolgt vom Annealing der Primer für 60 s bei der errechneten Temperatur sowie der Primer-Extension bei 72°C (1 min je kb zu amplifizierender DNA). Anschließend wird noch eine 5minütige Amplifizierung bei 72°C durchgeführt, um noch nicht vollständig synthetisierte PCR-Produkte aufzufüllen. Ein Teil des Ansatzes (10 µl) wird dann zur Überprüfung der Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen. Zur Klonierung des Fragmentes wird der Ansatz mit dem „Gene Clean“-Kit gereinigt und entweder „blunt end“ oder nach Spaltung mit Restriktionsenzymen kloniert.

Formel zur Errechnung der Primer-Annealing-Temperatur:

$$T_m = 69,3 + 0,4 (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650 / \text{Länge des Oligos}$$

2.1.2. Verdau

10 µl Mini-Prep

1 µl BamH I

1 µl Hind III

2 µl Puffer

6 µl H₂O

Dieser Ansatz wird für 2 h bei 37°C verdaut und anschließend per horizontaler Gelelektrophorese überprüft.

2.1.3. PCR-Ansätze

PCR-Ansatz IsaA: 5 µl 10 x Puffer

4 µl dNTP

1 µl Pfu

1 µl Template Col

1 µl Primer Isa A Exp I

1 µl Primer Isa A Exp II

37 µl H₂O

Exp I IsaA: 5'- GGA TCC GCT GAA GTA AAC GTT GAT CAA GC – 3'

Exp II IsaA: 5'- AAG CTT TTA GAA TCC CCA AGC ACC TA – 3'

Der PCR-Ansatz für IsaB ist identisch außer der IsaB-spezifischen Primer. Außerdem wird bei verschiedenen Stämmen jeweils das entsprechende Template (1 µl) verwendet (hier Stamm COL).

Exp I IsaB: 5'-GGA TCC GCA ATA ACC CCA TAT TAT ACT-3'

Exp II IsaB: 5'-AAG CTT TTA TTT ACT TGT TTT GTA TGG-3'

- 1) 2 Min. Denaturierung 94° C
- 2) 30 Zyklen
 - a) 60 sec Denaturierung 94° C
 - b) 60 sec Annealing Primer 45° C
 - c) 80 sec Amplifizierung 72° C
- 3) 5 Min Amplifizierung 72° C

Verdau: 10 µl Miniprep
 1 µl Bam H I
 1 µl Hind III
 2 µl Puffer
 6 µl H₂O
 für zwei Stunden bei 37° C

2.1.4. Horizontale Gelelektrophorese

Zur Analyse von Plasmid-DNA-Fragmenten wird ein Restriktionsansatz nach der entsprechenden Reaktionszeit durch Auftragen auf ein 0,8 – 1,5%iges Agarosegel und anschließender Elektrophorese aufgetrennt. Für die Herstellung der Gele wird die gewünschte Agarosemenge in den geeigneten Laufpuffer (z.B. 1 x TAE, 1 x TPE) gegeben, im Mikrowellenofen geschmolzen, und nach Abkühlung auf ca. 60°C wird die flüssige Agarose in eine Gelwanne mit justiertem Kamm gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wird dann der Kamm sorgfältig entfernt und das Gel in eine mit entsprechendem Laufpuffer gefüllte Gelkammer gelegt. Die Spaltansätze werden mit $\frac{1}{10}$ -Stopppuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Zusätzlich wird in einer Spur ein DNA-Größenmarker mit aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe erfolgt bei 90 V über 2 h oder bei 35 V über Nacht. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird das Gel in einem Ethidiumbromidbad (10 µg/ml) angefärbt, kurz mit Wasser gespült und unter UV-Licht fotografiert.

- 10 x TPE-Puffer : 108 g Tris
15 ml 85%ige Phosphorsäure
40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1 l H₂O
- 50 x TAE-Puffer : 242 g Tris
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1 l H₂O
- 6 x Auftragspuffer: 0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylen-Cyanol
15% Ficoll Typ 400 in H₂O

2.1.5. Isolierung von DNA-Fragmenten („Gene Clean“- Kit)

Mit Ethidiumbromid angefärbte Gele werden auf einen Transilluminator gelegt und unter UV-Licht angeschaut. Die gewünschten DNA-Fragmentbanden werden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend pipettiert man 3 Volumen einer NaI-Lösung in die Reaktionsgefäße und schmilzt die Agarosestücke bei 50°C im Wasserbad. danach werden 5-10 µl Glasmilch hinzugefügt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Glasmilch mit der gebundenen DNA wird dann durch kurzes (ca. 5 s) Zentrifugieren bei 13.000 rpm pelletiert und in 200 µl „new wash“-Lösung resuspendiert. Man zentrifugiert wieder kurz und wiederholt den Waschvorgang noch zweimal. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt werden alle Waschlösungsreste sorgfältig entfernt, das Pellet in 10 µl H₂O bidest. gelöst und 5 min bei 50°C inkubiert. Die Glasmilch wird 1 min abzentrifugiert, der Überstand mit der gelösten DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.1.6. DNA-Ligation

Gereinigte Vektor- und Insert-DNA werden im molaren Verhältnis 1:3 in insgesamt 15 µl H₂O zusammenpipettiert. Dazu gibt man 4 µl 5 x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1U). Bei Ligation von „sticky end“-Fragmenten erfolgt die Inkubation über Nacht bei 14°C und bei „blunt end“-Fragmenten über Nacht bei Raumtemperatur.

2.1.7. Mini-Prep, mit Diatomeenerde (Sigma)

2,0 ml einer ÜN-Kultur werden 2 min abzentrifugiert und das Pellet in 150 µl Puffer I gelöst (die Lösung wird hierbei trüb). Es werden 150 µl Puffer II zugegeben, die Probe leicht geschüttelt und ca. 5 min auf Eis gestellt bis die Lösung klar wird. Anschließend werden 150 µl Puffer III zugegeben, die Probe einige Male gewendet, 5 min auf Eis gestellt und schließlich 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Cap gefüllt, mit 900 µl L6 und 50 µl Diatoms aufgefüllt, kurz geschüttelt und ca. 1 min stehengelassen. Das Gemisch wird in eine 5ml-Spritze gegeben, und unter die Spritzen werden 15 ml-Röhrchen gestellt. Das Gemisch wird durchgesaugt und anschließend werden 2 ml Wash durchgesaugt. Die Filtereinsätze werden herausgenommen, auf ein Cap gesetzt und 20 sec abzentrifugiert. Anschließend werden die Filtereinsätze auf ein neues Cap gesetzt, 50 µl H₂O hinzu gegeben und die Proben ca. 5 min stehengelassen. Abschließend wird 20 sec abzentrifugiert und 10 µl des Mini-Prep für den Verdau eingesetzt.

Lösungen:

L6: 100 ml 0,1 M Tris-HCl pH 6,4
8,8 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
13,2 ml H₂O
2,6 ml Triton X 100
120 g Guanidin (Thiocyanat-Salz, Sigma)

Wash: 10 ml 5 M NaCl
5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5
2,5 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
ad 250 ml H₂O
+ 250 ml EtOH

Puffer I: 5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5
2,0 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
1 ml RNase 10 mg/ml
ad 100 ml H₂O

Puffer II: 200 mM NaOH
1% SDS

Puffer III: 3 M Na-Acetat pH 4,8

Diatoms: 10 g Diatommeenerde (Sigma)
50 ml H₂O
500 ml HCl konz.

2.1.8. Expressionsvektor pQE-30

Der Expressionsvektor pQE-30 (siehe Abb. 1 und 2) der Firma Qiagen ermöglicht die Expression von Proteinen in *E. coli*. Er gehört zur pDS-Familie⁴⁰ und ist von den Plasmiden pDS56/RBSII und pDS781/RBSII-DHFRS⁴¹ abgeleitet. Als low-copy-number Plasmid liegt es nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vor (10 Kopien pro Zelle). Die Überexpression von Proteinen basiert auf dem T5-Promoter Transkriptions-Translationssystem. Neben dem Promoter des Phagen T5, der von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird, besitzen pQE-Vektoren zwei *lac*-Operatorsequenzen, eine synthetische Ribosomenbindungsstelle (RBSII) und eine multiple cloning site (MCS). Der Vektor pQE-30 besitzt vor der MCS eine für sechs Histidinreste kodierende Sequenz, sodass sich am N-Terminus des Fusionsproteins ein Hexahistidin-tag befindet. Am Ende der MCS befinden sich drei Translations-Stopcodons in allen Leserastern. Die starken Transkriptionsterminatoren t0 aus dem Phagen Lambda⁴² und t1 aus dem *rrn*-Operon von *E. coli* verhindern eine Fortsetzung der Transkription in den Vektor. Das β -Lactamase-Gen (*bla*) bewirkt eine Resistenz gegen Ampicillin⁴³ bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$.

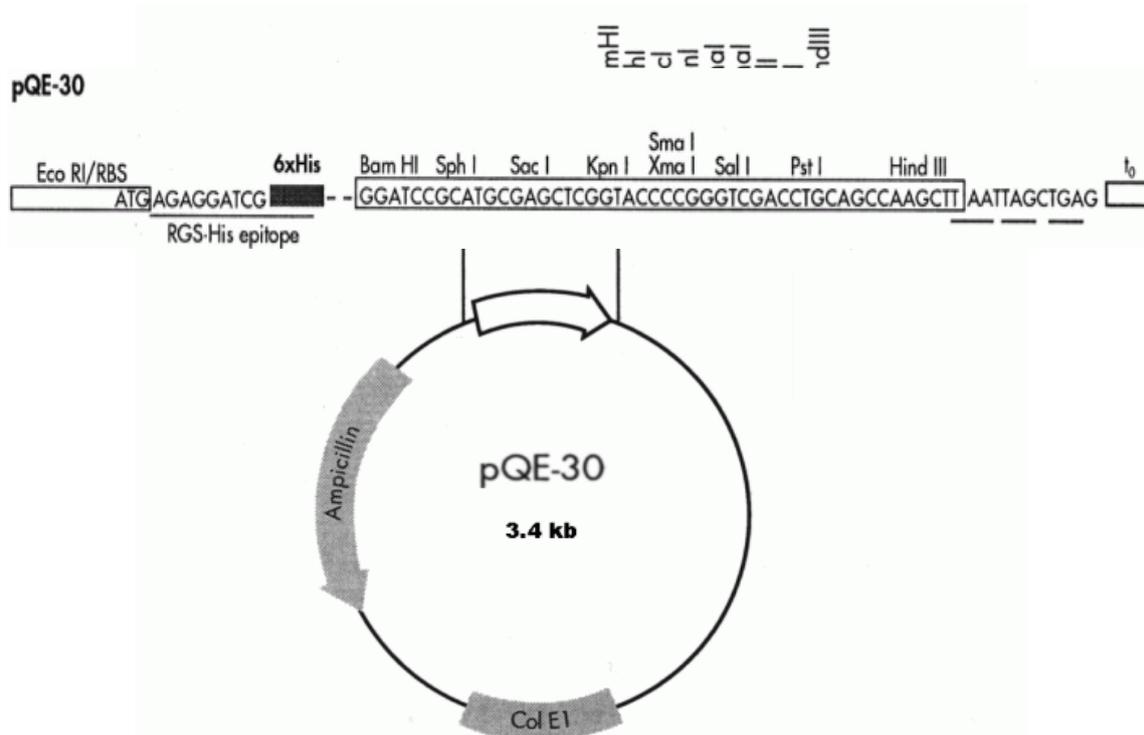
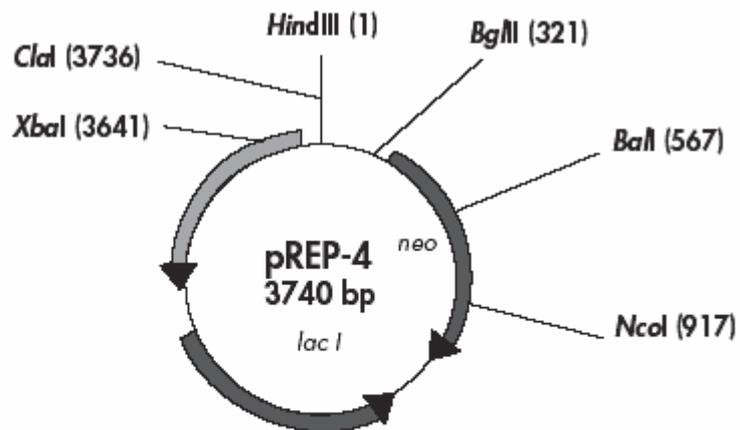


Abbildung 1: Vektorkarte des Expressionsplasmides pQE-30 ⁴⁴

2.1.9. Das Repressorplasmid pREP-4

Die extrem hohe Transkriptionsrate, die am T5-Promoter initiiert wird, kann nur durch große Mengen an *lac*-Repressor-Protein effizient reguliert und reprimiert werden. Daher besitzt der Wirtstamm *E. coli* M15 bereits das Repressorplasmid pREP-4. Wie der pQE-Vektor ist auch dieses ein low-copy-number Plasmid. pREP-4 ist abgeleitet vom pACYC und trägt eine Kanamycinresistenz (Gen *neo*), die Resistenz gegenüber Kanamycin bis zu einer Konzentration von 25 µg/ml bewirkt. Der Vektor trägt das Lac-Repressor-Protein, welches vom *lacI*-Gen⁴⁵ kodiert wird. Die Expression rekombinanter Proteine, die in pQE-Vektoren kodiert sind, wird durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) zügig induziert. Indem es an ihn bindet, inaktiviert IPTG das Lac-Repressor-Protein. Somit kann die RNA-Polymerase der Wirtszelle die Sequenzen stromabwärts des Promoters transkribieren.

Restriction map of pREP4



Restriction map of pREP4

Abbildung 2: Vektorkarte des Repressorplasmides pREP4⁴⁶

2.1.10. *E. coli* M 15⁴⁷ (pREP4)

Genotyp: *nal^S*, *str^S*, *rif^S*, *thi⁻*, *lac⁻*, *ara⁺*, *gal⁺*, *mtl⁻*, *f⁻*, *recA⁺*, *uvr⁺*, *lon⁺*

Dieser Stamm diente als Wirtstamm für das Plasmid pQE-30 und wurde zur Überexpression der Proteine IsaA und IsaB verwendet.

2.1.11. Herstellung kompetenter Zellen (*E. coli* M15)

CaCl₂-Methode:

1 ml einer ÜN-Kultur wird mit 49 ml LB-Medium versetzt, bis zu einer optischen Dichte von 0,7 bei 600 nm bei 37°C 2,5 bis 3 Stunden geschüttelt und auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wird auf zwei 50ml-Röhrchen verteilt und 5 min bei 6000 rpm, 4 min abzentrifugiert. Die Pellets werden dann in je 12,5 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl₂-Lösung suspendiert und wieder abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4°C). Der Überstand wird verworfen und die Bakterienpellets werden nun in je 1,25 ml eiskalter, CaCl₂-Lösung resuspendiert, vereinigt und etwa für 1 h auf Eis gestellt. Anschließend werden 520 µl 87% Glyzerin (Endkonzentration 15%) zugegeben. Die Bakterien werden in 150 µl Aliquots bei -70°C gelagert.

2.1.12. Transformation kompetenter Zellen (M15)

CaCl₂-kompetenter Zellen:

Ein Aliquot kompetenter Zellen wird auf Eis aufgetaut, mit der Hälfte eines Ligationsansatzes (10 µl) gemischt und 30-60 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Zellen erfolgt durch einen Hitzeschritt für 90 s bei 42°C. Anschließend wird das Reaktionsgefäß sofort für 5 min auf Eis gestellt. Der Ansatz wird dann mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 150 µl verworfen. In der verbliebenen Flüssigkeit werden die Zellen resuspendiert und auf eine Selektionsplatte ausplattiert.

2.1.13. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Proteine werden durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt. Ein SDS-Gel besteht aus einem Trenn- und Sammelgel. Zunächst wird das Trenngel zwischen zwei Glasplatten (15 x 17,5 cm), die durch 1,2 mm Spacer voneinander getrennt werden, bis etwa 3 cm unter den oberen Rand gegossen und mit n-Butanol überschichtet. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels wird in Abhängigkeit von der Grösse der zu untersuchenden Proteine gewählt (siehe unten). Nach ca. 1 h wird das Butanol vorsichtig entfernt und das Sammelgel (5%ig) auf das Trenngel gegossen. Es wird dann ein Gelkamm mit der gewünschten Taschenbreite zwischen die Glasplatten eingeschoben. Nach Polymerisierung des Sammelgels wird die Gelkammer mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt, der Gelkamm entfernt und die Taschen mit Elektrophoresepuffer ausgespült. Die Proben werden in die Taschen pipettiert und die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 24 V über 2 h. Zusätzlich wird separat ein Proteingrößenmarker mit aufgetragen. Nach Fertigstellung des Gels können Proteine durch Anfärbung (Coomassie-Blau-Färbung, Silberfärbung) sichtbar gemacht werden oder durch Transfer auf eine Nitrozellulosemembran im Western-Blot untersucht werden.

15% Trenngel (10 ml): 2,3 ml H₂O
 5,0 ml 30% Acrylamidlösung
 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
 0,1 ml 10% SDS
 0,1 ml 10% APS
 0,004 ml TEMED

5% Sammelgel (5 ml): 3,4 ml H₂O
 0,83 ml 30% Acrylamidlösung
 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
 0,63 ml 1,0 M Tris-HCl pH 6,8

0,05 ml SDS
0,05 ml 10% APS
0,005 ml TEMED

10 x Elektrophoresepuffer: 30 g Tris
144,4 g Glycin
100 ml 10%SDS
ad 1 l H₂O

Größenauftrennung:	Acrylamidkonzentration	Linearer Bereich der Trennung
	15%	12-43 kDa
	10%	16-68 kDa
	7,5%	36-94 kDa
	5%	57-212 kDa

2.1.14. Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen

Nach der SDS-PAGE werden die Glasplatten entfernt und das Gel unter leichtem Schütteln für ca. eine Stunde mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt. Anschließend wird das Gel so lange entfärbt, bis die Hintergrundfärbung ausgewaschen wurde und die Proteinbanden deutlich zu erkennen sind.

Coomassie-Färbelösung: 0,2% Coomassie Brilliant Blue R250
227 ml Methanol
46 ml Eisessig
ad 500 ml H₂O

Entfärber: 30% Methanol

10% Eisessig

2.2. Überexpression und Reinigung von IsaA und IsaB

2.2.1. Testansatz („small scale“)

Zunächst werden die Klone mit Ampicillin (25 mg/ml) und Kanamycin (100 mg/ml) ÜN angeimpft. 10 ml vorgewärmtes Medium (mit Antibiotikum) und 1 ml der ÜN-Kultur werden bei 37°C 30-120 min geschüttelt bis zu einer optischen Dichte von 0,5-0,7 bei 600 nm. Anschließend wird die Expression mit IPTG (1 µM, 10 µM, 100 µM und 1 mM) induziert und jeweils nach 1h 2 ml abpipettiert, wovon 1 ml abzentrifugiert wird und das Pellet bei -20°C eingefroren und von dem anderen ml die OD gemessen wird. Mit den Daten von 5 h wird eine Wachstumskurve erstellt, die für den Hauptansatz (large scale, siehe unten) gebraucht wird. Nach 5 h wird der Ansatz zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und aufbereitet.

Aufbereitung der Aliquots:

Es werden 100 µl Puffer B (Qiagen) + 18 µl 6 x Laemmli Puffer hinzugegeben. Dann wird das Aliquot für 5 min aufgekocht und auf Eis gestellt. Anschließend wird es bei 20°C bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand danach in ein neues Cap gefüllt. Die Probe wird nun mittels SDS-PAGE überprüft.

2.2.2. Hauptansatz („large scale“)

Wie beim Testansatz (small scale) werden die Klone ÜN angeimpft, der zweite Schritt jedoch wiederholt, sodass ein Volumen von 1,5-2 l Zelllösung wie oben

beschrieben induziert wird. Anhand der Wachstumskurve (siehe Abb. 11, S.60) wird der Zeitpunkt bestimmt, an dem der Ansatz abzentrifugiert wird.

2.2.3. Sonifizierung

Das Pellet wird zunächst in 20 ml Lysispuffer (Qiagen Puffer B) gelöst. Danach werden die Zellen auf Eis mittels Ultraschall (Skala auf Voreinstellung, Power 70-90) 5 x 30 sec lang mit je 3 min Pause aufgelöst. Anschließend werden sie bei 6000 rpm für 15 min zentrifugiert. Man zieht nun eine 100 µl Probe von Überstand und Pellet und friert sie ein. Der Rest vom Pellet wird eingefroren und gebraucht, falls es sich beim exprimierten Protein um sogenannte „inclusion bodies“ handelt. Der Rest vom Überstand wird mit Hilfe eines Nickel-NT-Agarose Filtersystems gefiltert (siehe unten).

Qiagen Puffer B (1 Liter):	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	20 mM Imidazol
	pH mit NaOH auf 8,0 justieren

2.2.4. Ni-NTA-Agarose-Filterung

Dem Überstand werden pro 20 ml 3 ml Ni-NTA-Agarose beigemischt und für 1 h bei 4°C geschüttelt. Man gießt dies anschließend über eine mit 2-3 ml Lysispuffer vorequilibrierte Säule (Flow through). Danach wird 4-5 x Waschpuffer über die Säule gegossen, gefolgt von zwei verschiedenen Elutionspuffern (je 2-3 ml), die erst jeweils 10 min in der Säule einwirken. Von jeder Fraktion wird ein 50 µl Aliquot gewonnen, mit Laemmli aufgekocht, zentrifugiert und mittels horizontaler Gelelektrophorese überprüft. Die Säule wird mit Waschpuffer gewaschen und bei 4°C gelagert.

Lysispuffer: 100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-Cl
8 M Urea
pH auf 8,0 mit NaOH einstellen

Waschpuffer: 100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-Cl
8 M Urea
pH auf 6,3 mit HCl einstellen

Elutionspuffer I: 50 mM Tris
150 mM NaCl
100 mM Imidazol
pH 8,0

Elutionspuffer II: 50 mM Tris
150 mM NaCl
250 mM Imidazol
pH 8,0

2.2.5. Isolation von Einschlusskörpern („inclusion bodies“)

Für eine 1,5 l Kultur:

Die gezüchteten Zellen werden pelletiert, indem sie 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert werden. Danach wird das Pellet in 80 ml Lysispuffer bei 4°C resuspendiert und gevortext. Nach 30 min Inkubation auf Eis wird die Lösung für 10 min sonifiziert (50% intensity, 50% cycle) und 200 ml Detergent-Puffer dem Lysat hinzugefügt.

Wieder wird für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (leicht orange gefärbt) wird vorsichtig entfernt und das Pellet komplett in Waschpuffer resuspendiert. Erneutes Zentrifugieren für 10 min bei 5000 rpm und vorsichtiges Entfernen des milchigen Überstandes. Dieses wird so oft wiederholt bis ein festes Pellet übrig bleibt. Anschließend wird das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen.

Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
 1 mM EDTA pH 8,0
 25% Sucrose (w/v)

Detergent Puffer: 0,2 M NaCl
 1% Deoxycholic acid (w/v)
 1% Nonidet P-40 (v/v)
 20 mM Tris-HCl pH 7,5
 2 mM EDTA pH 8,0

Waschpuffer: 0,5% Triton X-100
 1 mM EDTA pH 8,0

2.2.6. Konzentrierung mit Centricon[®]

Die Fraktion oder Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration werden mit Hilfe von Centricon-10[®] Röhrchen 1 h bei 5000 rpm konzentriert. Anschließend wird abermals ein Kontrollgel angefertigt.

2.3. Immunisierung eines Kaninchens mit IsaA

2.3.1. Herkunfts- und Immunisierungsnachweis

Kaninchen ID: AB 19970

Züchter: immunoGlobe, Antikörpertechnik GmbH,
Pflaumheimer Str. 3
D – 63762 Großostheim
Tel./Fax: 09364 810 610
Registrierungsnummer Landratsamt
Aschaffenburg, Veterinäramt: AB1

Rasse: Bastard

Geschlecht: weiblich

Geboren: 20.07.1999

Auftraggeber Immunisierung: Dr. Knut Ohlsen
Institut für Molekulare Infektionsbiologie
Universität Würzburg
Röntgenring 11
97070 Würzburg

Aktenzeichen der zuständigen Genehmigungsbehörde:
621-2531.01-36/98,
Regierung von Unterfranken

2.3.2. Immunisierungs- / Behandlungsschema

Tabelle 6: Immunisierungs- / Behandlungsschema

Datum	Eingriff	Bemerkung
19.11.2000	Präimmunserum	
19.11.2000	Immunisierung	<u>Antigen:</u> <i>S. aureus</i> IsaA (His6-tag) in PBS (ca. 1 mg/ml); Präparation vom 17.11.00 <u>Emulsion:</u> 570 µl Antigen + 570 µl Montanide ISA 206 Injektionen i.d.
02.12.2000	Immunisierung	<u>Antigen:</u> <i>S. aureus</i> IsaA (His6-tag) in PBS (ca. 1 mg/ml); Präparation vom 17.11.00 <u>Emulsion:</u> 570 µl Antigen + 570 µl Montanide ISA 206 Injektionen i.d.
17.12.2000	Immunisierung	<u>Antigen:</u> <i>S. aureus</i> IsaA (His6-tag) in PBS (ca. 1 mg/ml); Präparation vom 17.11.00 <u>Emulsion:</u> 570 µl Antigen + 570 µl Montanide ISA 206 Injektionen i.d.
01.01.2001	Testblutung	
17.01.2001	Immunisierung	<u>Antigen:</u> <i>S. aureus</i> IsaA (His6-tag) in PBS (ca. 1-2 mg/ml); Präparation vom 16.01.01 <u>Emulsion:</u> 500 µl Antigen + 500 µl Montanide ISA 206 Injektionen i.d.
27.01.2001	Testblutung	
11.02.2001	1. große Blutung	
25.02.2001	Finale Blutung	Tier getötet

2.4. Western-Hybridisierung

2.4.1. IgG-Filterung mit Vectron-SA-Cellulose®

Diese Methode ermöglicht es, spezifisch die IgG-Fraktion des Serums des immunisierten Kaninchens herauszufiltern. Die Säule wird zunächst mit 3 ml

Bindungspuffer vorequibriert. Der pH-Wert des Serums muss um plus minus 0,5 dem des Tris-Puffers entsprechen. Bei 280 nm wird die optische Dichte des Tris-Puffers gemessen und als Nullwert benutzt. Anschließend gibt man das Serum über die Säule. Dabei sollte die Proteinkonzentration des Serums zwischen 0,7-7,0 mg/ml liegen. Danach wird die Säule sooft mit jeweils 2 ml Tris-Puffer gewaschen bis alle anderen Proteine herausgelöst sind und die OD wieder beim Nullwert ist. Nun wird 2-3 x 2 ml Elutionspuffer zum Lösen der gebundenen Antikörper über die Säule gegeben. Diese Fraktion wird aufgefangen und mittels Proteingel kontrolliert. Abschließend wird die Säule mit 10-15 Füllungen NaOH gereinigt und mit 20% Ethanol gefüllt gelagert.

Antikörper Bindungspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Antikörper Elutionspuffer: 50 mM Na-Acetat, pH 3-4

Waschpuffer: 0,5 mM NaOH

Lagerpuffer: 20% Ethanol/Wasser

2.4.2. Western-Hybridisierung⁴⁸

Bei der Western-Hybridisierung, dem so genannten „western blot“, werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen Träger, z.B. Nitrocellulose oder Nylon, übertragen. Das Proteingel wird dabei kopiert und die Proteine auf dem Filter immobilisiert. Das im Gel enthaltene Proteintrennmuster bleibt dabei erhalten. Funktionalität und Immunreaktivität der Proteine bleiben in der Regel ebenfalls erhalten. Somit erlaubt die Methode neben qualitativer und quantitativer Bestimmung auch eine Identifikation von Proteinen.

2.4.3. Gewinnung von Proben für den Western –Blot

Für die Analyse von intrazellulären Proteinen werden Gesamtzelllysate verwendet. Gleiche Zellmengen werden nach Wachstum entsprechend der Versuchsstellung abzentrifugiert, mit Saline gewaschen, in 100 µl H₂O resuspendiert und mit 25 µl 5 x Laemmli-Puffer versetzt. Der Ansatz wird dann 5 min bei 100°C aufgekocht, 15 min bei 13000 rpm, RT zentrifugiert und ca. 10-20 µl vom Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.4.4. Western-Blot

In der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennte Proteine werden auf einen Nitrozellulosefilter übertragen. Durch eine antigenspezifische Antikörperreaktion wird dann ein bestimmtes Protein aus dem Gemisch an aufgetrennten Proteinen sichtbar gemacht. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgt horizontal in einer Blotapparatur mit Graphitplatten. Zunächst werden 12 Whatmanpapiere und die Nitrozellulosemembran auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Auf die mit H₂O dest. befeuchtete untere Graphitplatte legt man zunächst 6 Lagen in Anodenpuffer I getränkte Whatmanpapiere, dann 3 Lagen mit Anodenpuffer II befeuchtete Papierfilter und auf diese eine Nitrozellulosemembran, die für 10 min in Anodenpuffer II eingeweicht wurde. Auf die Membran wird das Gel luftblasenfrei aufgelegt und mit 3 Lagen in Kathodenpuffer getränkte Whatmanpapiere bedeckt. Die Graphitplatte der Kathode wird nun aufgelegt und der Transfer der Proteine erfolgt für 1 h bei 0,8 mA/cm² Gelfläche. Nach dem Transfer der Proteine wird die Spur auf der Nitrozellulose mit den Markerproteinen abgeschnitten und für ca. 15 min in eine PonceauS-Lösung (2% PonceauS in 30% TCA) gefärbt. Der Teil mit den aufgetrennten Proteinproben wird in einer Antikörperreaktion (siehe unten) eingesetzt.

Anodenpuffer I: 0,3 M Tris
 20% Methanol

Anodenpuffer II: 25mM Tris
20% Methanol

Kathodenpuffer: 25 mM Tris
40 mM ϵ -Amino-n-capronsäure
20% Methanol

2.4.5. Antikörperreaktion

Nach dem Elektroblothen werden zuerst die freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulose durch einstündige Inkubation in PBS-T/5% Magermilch bei RT abgesättigt. Die Lösung wird verworfen und durch die Primärantikörperlösung (Kaninchen-anti-IsaA-AK, 1:5000 in PBS-T/3% Magermilch) ersetzt und 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Primärantikörperlösung wird abgezogen (kann erneut verwendet werden) und es wird 3 x 10 min mit PBS-T gewaschen. Im Anschluss erfolgt eine einstündige Inkubation mit einem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper (Schwein-anti-Kaninchen-AK, 1:2000 in PBS-T, 3% Magermilch). Anschließend wird wiederum 3 x 10 min mit PBS-T gewaschen und der Blot entwickelt. Als Substrat verwendet man ECL-Entwicklungslösung (Amersham) oder, wenn eine längere Exposition erforderlich ist, Super-Signal[®] für Western-Blots (Pierce).

PBS-T-Lösung: 8,77 g NaCl
1,56 g Na₂HPO₄ x 2H₂O
0,163 g KH₂PO₄
ad 1l H₂O, pH 7,4 einstellen
Tween 20 (0,05%)

2.5. Tierversuch

2.5.1. Allgemeiner Versuchsaufbau

Für den ersten Teil des Versuchsvorhabens werden insgesamt 118 männliche Sprague Dawley Ratten verwendet. Es werden 18 Ratten in einem Vorversuch benötigt, um die kleinste zur Auslösung einer Infektion notwendige Bakterienmenge zu ermitteln. Anschließend werden 24 Ratten für das Peritonitis Sepsismodell verwendet. Die biometrischen Anforderungen an die Experimentalplanung machen eine Stichprobengröße von mindestens 6 Tieren pro Versuchsgruppe notwendig. Die Tiere werden mit der im Vorversuch ermittelten Menge Bakterien infiziert. Fünf Tage nach der erfolgten Infektion werden die Tiere euthanasiert. Der Schweregrad der Infektion wird an Hand der Beurteilung des Bauchsitus und der Bakterienzahl der Milz ermittelt und quantitativ die Schweregrade der Infektion zwischen den beiden Gruppenkollektiven verglichen.

Als präoperative Schmerzprophylaxe erhalten alle Tiere 4 h vor dem Eingriff Acetylsalizylsäure 100 mg/kg per os (in Coca Cola light® gelöst). Die Tiere werden während der Aufwachphase überwacht. Die Tiere werden warm gehalten (Heizlampe) und es wird eine weiche und isolierende Unterlage zur Verfügung gestellt. Als postoperative Schmerzbehandlung erhalten die Tiere 20 mg/kg Tramal alle zwei Stunden peroral (mit Trinkwasser verabreicht).

2.5.2. Peritonitis Sepsis-Infektions-Modell

Zunächst werden alle 24 Ratten gewogen, um das Startgewicht festzustellen. Zwei Gruppen zu jeweils zwölf männlichen Sprague-Dawley Ratten erhalten eine jeweilige Bakterienmenge von 10^8 und 10^9 Kolonie bildenden Einheiten (KBE) des *Staphylococcus aureus* Wildtyp-Stammes intraperitoneal in einer Kapsel. Jeweils sechs Tiere aus jeder Gruppe erhalten zusätzlich eine Kapsel mit 0,5 ml

Kaninchenserum mit dem IsaA-Antikörper, ebenfalls intraperitoneal. Die jeweils sechs anderen Tiere jeder Gruppe erhalten als Kontrolle eine Kapsel mit 0,5 ml PBS Puffer. Das Einbringen der Kapseln erfolgt in einer Inhalationsnarkose mit Isofluran. In Narkose wird das Tier zunächst am Bauch rasiert, die Stelle desinfiziert und die beiden Kapseln durch einen circa zwei cm großen Bauchschnitt ins Peritoneum eingeführt. Anschließend wird die Wunde genäht.

2.5.3. Milzaufbereitung und Bauchsitus

Nach der Euthanasierung der Tiere werden sie erneut gewogen, um das Endgewicht festzustellen. Danach wird das Abdomen freipräpariert und das Stadium der Infektion an Hand einer Punkteskala quantitativ beurteilt.

Dabei finden folgende Punkte Beachtung:

1. Infektiöses Aszites
2. Leberabszesse
3. subhepatische Abszesse
4. Abszesse am großen Netz/Netz verklumpt
5. Abszesse an der Milz
6. Abszesse am Peritoneum
7. Abszesse an Dick- und Dünndarm
8. Abszesse an den Nieren
9. Abszesse an der Leberpforte

Jeweils können 0 bis 3 Punkte vergeben werden.

Anschließend wird die Milz aus dem Situs entfernt und gewogen. Es werden 5 ml PBS-Puffer zugegeben und die Milzen zermahlen. Jeweils 100 µl sowie 0,1 µl werden auf einer Agarplatte ausplattiert und nach zwei Tagen Inkubation bei 37°C die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

2.5.4. Statistische Methodik

Vorab wurden sämtliche graduierten und kontinuierlichen Parameter des Tierversuchs dieser Studie – im Einzelnen Startgewicht, Endgewicht und Differenzgewicht der Tiere in Gramm, Bauchsitus makroskopisch (Punktzahl), Milzgewicht (g) sowie Milzkolonienanzahl pro Gramm Organ – mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest (K-S-Test) auf Übereinstimmung mit der Normalverteilung nach Gauß ge-testet, wobei sich lediglich die Verteilung der Milzkolonien pro Gramm Organ signifikant ($p \leq 0.05$) von dieser „idealen“ symmetrischen Verteilungsform unterschied. Auf Grund der relativ kleinen Stichprobengröße ($N=24$; $n=6$ bzw. 12)^a wurden die Versuchsfragestellungen mittels nonparametrischem, „verteilungsfreien“ Mann-Whitney-U-Test (M-W-Test / U-Test) analysiert.

Sämtliche prüfstatistischen Tests wurden bei Zugrundelegung des folgenden – weithin üblichen – Signifikanzstufensystems durchgeführt:

„signifikant“: Signifikanz-Niveau = 5% bzw. $\alpha=0.05$ ($p \leq 0.05^*$)

„sehr signifikant“: Signifikanz-Niveau = 1% bzw. $\alpha=0.01$ ($p \leq 0.01^{**}$)

„hoch signifikant“: Signifikanz-Niveau = 1‰ bzw. $\alpha=0.001$ ($p \leq 0.001^{***}$).

Die Notierung signifikanter Resultate erfolgt im Text durch Angabe des jeweiligen testspezifischen p-Wertes in Verbindung mit den üblichen „Sternchen“.

Als deskriptiv-statistische Kennwerte werden arithmetischer Mittelwert nebst Standardabweichung, Median nebst Quartilabstand^b sowie Minimum und Maximum tabellarisch und grafisch angegeben/dargestellt. Die gültige Gesamtstichprobengröße beträgt bei sämtlichen Analysen $N=24$; fehlende Werte sind nicht vorhanden. Als Grafik-Typ bietet sich das klassische Balkendiagramm mit Fehlerbalken an, um die

^a Vier Versuchsgruppen je $n=6$ Tiere; zwei Versuchsgruppenkombinationen je $n=12$ Tiere

^b Der Quartilabstand ist definiert als die Differenz zwischen dem Wert des 25. und dem Wert des 75. Perzentils, wird auch als Interquartilabstand (QA) bezeichnet und repräsentiert ein ordinalskaliertes Maß für die Messwertstreuung des jeweiligen Parameters.

arithmetischen Gruppenmittelwerte sowie die Streuungen/Standardabweichungen der Versuchsgruppen angemessen zu visualisieren.

Alle statistischen Analysen und grafischen Darstellungen wurden unter Zugriff auf das Statistik-Programm-System SPSS (Superior Performing Software System) für Windows, Version 17.0 deutsch, auf einem Arbeitsplatz-PC mit Intel-Prozessor der neuesten Generation unter dem Betriebssystem Windows Vista ausgeführt.

III. Ergebnisse

1. Expression von IsaA und IsaB

Ziel der Arbeiten war die Klonierung und Überexpression der Proteine IsaA und IsaB. Dies war notwendig, um die Proteine für die Herstellung eines polyklonalen Antiserums in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben.

1.1. Klonierung von IsaA und IsaB in den Expressionsvektor pQE-30

Zu Beginn wurde aus verschiedenen Stämmen von *S. aureus* die für die beiden Proteine IsaA und IsaB kodierenden DNA-Sequenzen mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurde an Hand eines Agarosegels eine Erfolgskontrolle durchgeführt (Abb. 3).

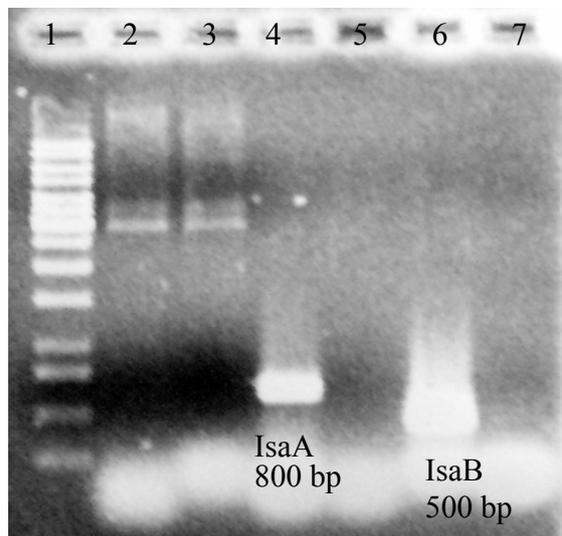


Abbildung 3: Horizontale Gelelektrophorese zur Kontrolle der PCR-Produkte auf *isaA* und *isaB*-spezifische DNA-Sequenzen:

Spur 1 Marker; Spur 2 Negativkontrolle IsaA; Spur 3 Negativkontrolle IsaB; Spur 4 *S. aureus*-Stamm 418 mit Bande bei ca. 800 Basenpaaren (IsaA); Spur 5 *S. aureus*-Stamm 134; Spur 6 *S. aureus*-Stamm 134 mit Bande bei ca. 500 Basenpaaren (IsaB); Spur 7 *S. aureus*-Stamm 418.

Abbildung 3 zeigt DNA-Banden auf einem Agarosegel nach PCR. In Spur 4 sieht man deutlich eine Bande bei ca. 800 Basenpaaren, was der Größe der *IsaA* kodierenden Gensequenz entspricht. In Spur 6 sieht man bei ca. 500 Basenpaaren das *isaB*-spezifische PCR-Produkt. Für *IsaA* zeigte sich Stamm 418 als besonders geeignet, für *IsaB* Stamm 134. Für andere Stämme wie z. B. Stamm COL ließen sich ebenfalls die DNA-Sequenzen von *isaA* und *isaB* mittels PCR amplifizieren. Jedoch gab es deutliche Unterschiede in der Bandenstärke. Für die nachfolgende Klonierung wurden die in Abb. 4 dargestellten Banden der Stämme 418 (*isaA*) und 134 (*isaB*) verwendet.

Anschließend wurde die DNA mittels Gene Clean aus den Gelen isoliert und mit Restriktionsenzymen (BamHI/HindIII) geschnitten. Danach erfolgte die Ligation der DNA in den Expressionsvektor pQE-30, der die Expression der Zielproteine in *E. coli* ermöglicht. Der Erfolg der Ligation wurde nach Isolierung der Plasmid-DNA und nachfolgendem Verdau überprüft (Abb. 4).

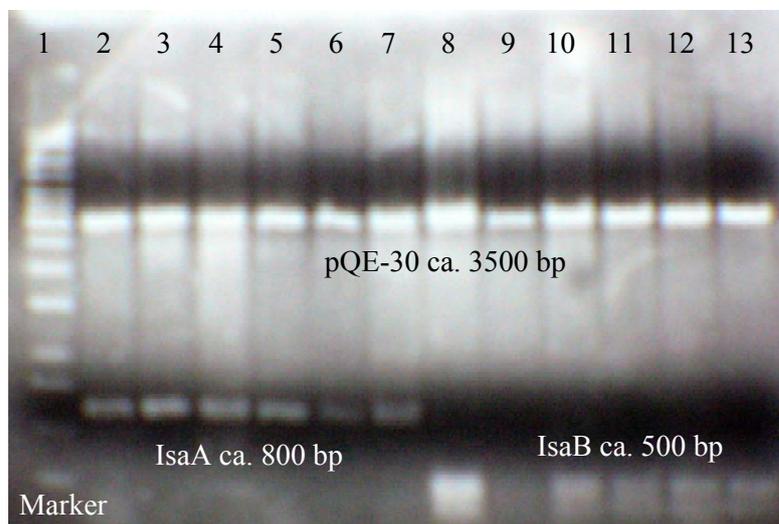


Abbildung 4: Horizontale Gelelektrophorese als Erfolgskontrolle der Ligation der *isaA*- und *isaB*-spezifischen DNA in den Klonierungsvektor pQE-30:

Spur 1 Marker; Spur 2 - 7 je eine aufgetrennte Kolonie des *E. coli* mit auffälliger Bande bei ca. 800 Basenpaaren (*IsaA*); Spur 8 - 13 je eine aufgetrennte Kolonie des *E. coli* mit auffälliger Bande bei ca. 500 Basenpaaren (*IsaB*).

Abbildung 4 zeigt eine horizontale Gelelektrophorese mit DNA-Banden der gespaltenen Plasmid-DNA. In den Spuren 2 - 13 ist der Klonierungsvektor pQE-30 mit ca. 3500 Basenpaaren (bp) in der oberen Bildhälfte zu sehen. In der unteren Bildhälfte ist in den Spuren 2 - 7 eine ca. 800 bp große Bande zu erkennen und in den Spuren 8-13 eine Bande bei ca. 500 bp.

Somit gelang es, die kodierende DNA für die Proteine IsaA und IsaB in einen Expressionsvektor zu klonieren. Diese Vektoren wurden im Anschluss für die Überexpression und Aufreinigung der beiden Proteine IsaA und IsaB verwendet.

1.2. Überexpression und Reinigung von IsaA und IsaB

Im Folgenden wurden aus den hergestellten Klonen die Proteine IsaA und IsaB aufgereinigt. Zunächst wurden die Expressionsbedingungen optimiert. Dazu wurden die Klone in Testansätzen, so genannten „small-scale“-Ansätzen, angezüchtet. Dabei wurden die Zellen bei 30°C (nur IsaB) und 37°C mit verschiedenen Konzentrationen IPTG (1 µM, 10 µM, 100 µM und 1 mM) getestet. IPTG diente dabei zur Induktion der Überexpression des jeweiligen klonierten Gens. Diese Ansätze wurden jeweils 5 Stunden beobachtet. Dabei wurde stündlich 1 ml entnommen und bei 600 nm die optische Dichte gemessen. Gleichzeitig wurden nach jeder Stunde Proben für Proteingele entnommen, um die Konzentration des gebildeten Proteins einschätzen zu können. Um die Proben auf ein Proteingel auftragen zu können, mussten die Zellen zunächst aufgeschlossen werden. Dies erfolgte mittels Sonifizierung. Die folgenden Abbildungen zeigen Proteingele (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese = SDS-PAGE) der „small-scale“-Ansätze.

Testansatz (small scale) IsaA und IsaB

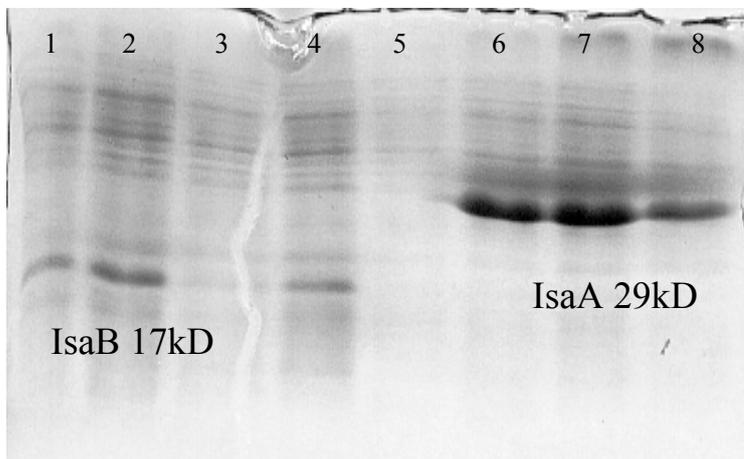


Abbildung 5: SDS-PAGE der mit 1 mM IPTG induzierten Expressionsklone isoliert nach unterschiedlich langer Induktionszeit. Pro Spur wurden jeweils 10 µl aufgetragen:

Spur 1 IsaB nach 4 h; Spur 2 IsaB nach 3 h; Spur 3 IsaB nach 2 h; Spur 4 IsaB nach 1 h; Spur 5 IsaA nach 4 h; Spur 6 IsaA nach 3 h; Spur 7 IsaA nach 2 h; Spur 8 IsaA nach 1 h.

Abbildung 5 zeigt einen Testansatz („small scale“ Ansatz) bei 37°C mit den mit 1 mM IPTG überexprimierten Proteinen IsaA und IsaB nach jeweils ein, zwei, drei und vier Stunden Wachstum. Für IsaA ist die Konzentration nach zwei Stunden am höchsten (Spur 7) und nach drei Stunden am zweithöchsten (Spur 6). Bei der IsaB Expression erscheint nach drei Stunden (Spur 2) die stärkste Bande.

Nachdem der Nachweis gelungen war, dass sich sowohl IsaA als auch IsaB überexprimieren ließen, erfolgte in den nächsten Schritten die Isolierung und Aufreinigung der beiden Proteine IsaA und IsaB. Dabei wurde nach der Sonifizierung die Zelllösung über einen Ni-NTA-Agarosefilter laufen gelassen. Die beiden Proteine IsaA und IsaB binden durch ihren 6-His-tag selektiv an Nickel-Ionen. Anschließend wurden die beiden Proteine durch mehrfaches Waschen und Eluieren wieder vom Agarosegel abgelöst. Es wurde jeder Wasch- und Eluierungsschritt einzeln auf seine Proteinkonzentration hin überprüft.

IsaA nach Elution über eine Ni-NTA-Agarose-Säule

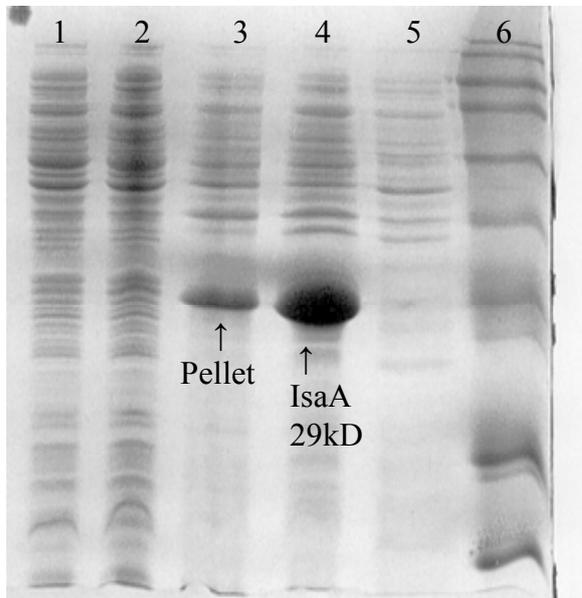


Abbildung 6: SDS-PAGE zur Überprüfung der Konzentration von IsaA aus den einzelnen Wasch- und Elutionsschritten nach Induktion mit 1 mM IPTG und 4 h Wachstum bei 37°C. Aufgetragen wurden pro Spur 10 µl:

Spur 1 IsaA Flow through; Spur 2 IsaA Überstand; Spur 3 IsaA Pellet; Spur 4 IsaA gesamt (vor Ni-Bindung und Elution); Spur 5 IsaA uninduziert (Negativkontrolle); Spur 6 Marker.

Abbildung 6 zeigt IsaA-spezifische Banden nach Kultivierung im Testmaßstab (small-scale) bei 37°C nach Überexpression und Induktion mit 1 mM IPTG, Ni-NTA-Agarose-Bindung und Elution. Diese initialen Versuche ergaben eine starke IsaA-spezifische Bande des Gesamtaufschlusses vor der Elution (Spur 4) und eine schwächere Bande im Pellet. Im Überstand und „Flow through“ war kein nennenswertes Signal zu erkennen. Es wurden weitere Experimente zur Optimierung der Kultur- und Aufreinigungsbedingungen durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedliche Expressionszeiten, Induktionskonzentrationen und Kultivierungstemperaturen getestet.

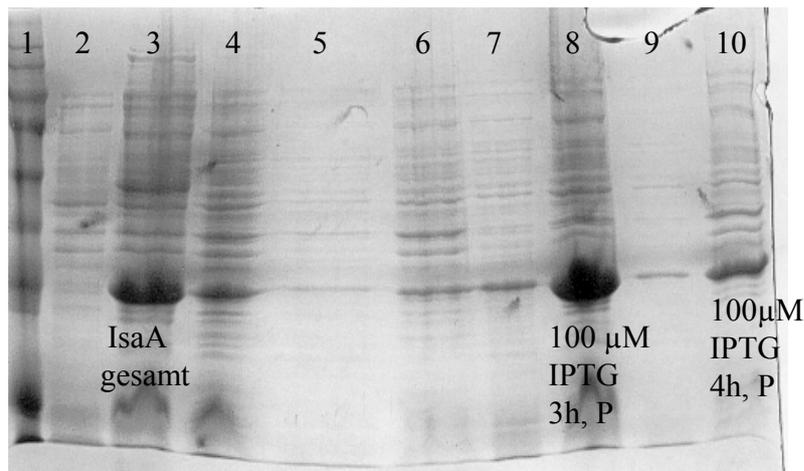


Abbildung 7: SDS-PAGE zur Überprüfung der Konzentration von IsaA aus den Wasch/Elutionsschritten. Überstand und Pellet wurden nach Induktion mit 10 und 100 µM IPTG und nach einer Wachstumszeit von 3 und 4 h gewonnen. Aufgetragen wurden pro Spur 10 µl:

Spur 1 Marker; Spur 2 IsaA uninduziert (Negativkontrolle); Spur 3 IsaA gesamt (vor Ni-Bindung und Elution, nach Induktion mit 100 µM IPTG und 4 h Wachstum); Spur 4 10 µM IPTG, nach 3 h Wachstum, Pellet (P); Spur 5 10 µM IPTG, nach 3 h Wachstum, Überstand (Ü); Spur 6 10 µM IPTG, nach 4 h Wachstum, Pellet (P); Spur 7 10 µM IPTG, nach 4 h Wachstum, Überstand (Ü); Spur 8 100 µM IPTG, nach 3 h Wachstum, Pellet (P); Spur 9 100 µM IPTG, nach 3 h Wachstum, Überstand (Ü); Spur 10 100 µM IPTG, nach 4 h Wachstum, Pellet (P).

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen Ansätze der IsaA-Expression bei 37°C, nach unterschiedlich langen Induktionszeiten und verschiedenen IPTG-Konzentrationen. Es wurden 10 und 100 µM sowie 1 mM IPTG verwendet. Die Proben wurden nach 3 und 4 h Kultivierung über Ni-NTA-Agarose gereinigt. In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass, wie auch schon in Abbildung 6, der größte Anteil von IsaA jeweils im Pellet nachzuweisen war. Die höchste Konzentration von IsaA fand sich in Spur 8, im Pellet nach 3 h Induktion mit 100 µM IPTG. Das Pellet besteht aus nicht löslichen Zellbestandteilen, sodass davon auszugehen ist, dass IsaA nicht frei löslich im Zytoplasma vorliegt.

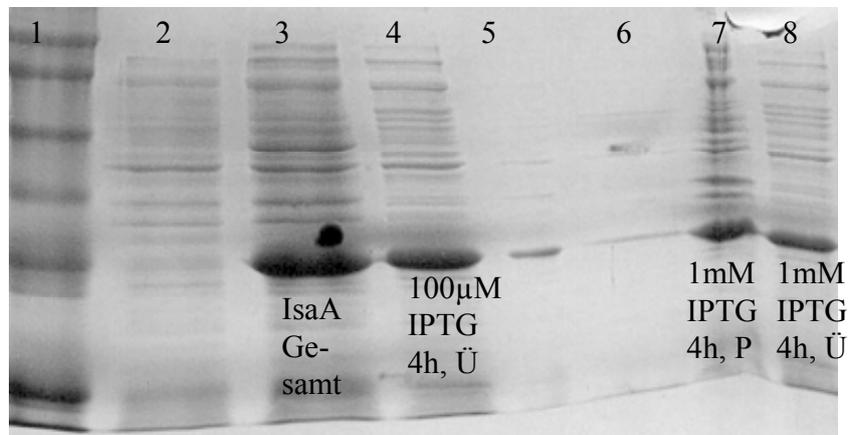


Abbildung 8: SDS-PAGE zur Überprüfung der Konzentration von IsaA aus den Wasch/Elutionsschritten Überstand und Pellet nach Induktion mit 100 μ M und 1 mM IPTG und nach einer Wachstumszeit von 3 und 4 h. Aufgetragen wurden jeweils 10 μ l:
 Spur 1 Marker; Spur 2 IsaA uninduziert (Negativkontrolle); Spur 3 IsaA gesamt (vor Ni-Bindung und Elution, nach Induktion mit 100 μ M IPTG und 4 h Wachstum); Spur 4 100 μ M IPTG, nach 4 h Wachstum, Überstand (Ü); Spur 5 1 mM IPTG, nach 3 h Wachstum, (P); Spur 6 1 mM IPTG, nach 3 h Wachstum, (Ü); Spur 7 1 mM IPTG, nach 4 h Wachstum, (P); Spur 8 1 mM IPTG, nach 4 h Wachstum, (Ü).

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse weiterer Expressionsbedingungen erkennbar. Ein starkes Signal erschien in Spur 3, dem Gesamtzelllysat und in Spur 4 im Überstand nach Induktion mit 100 μ M IPTG. Schwächere Signale sind in den Spuren 7 (1 mM IPTG, 4 h, Pellet) und 8 (1 mM IPTG, 4 h, Überstand) erkennbar.

Diese Ergebnisse belegen eine starke Überexpression von IsaA unter den gewählten Kulturbedingungen, wobei die stärkste Expression bei 37°C nach 3 h Wachstum bei Induktion mit 100 μ M IPTG im Pellet erfolgte. Daraus ergab sich die Vermutung, dass IsaA meist als unlöslicher Bestandteil in der Zelle vorliegt und wahrscheinlich so genannte Einschlusskörper („inclusion bodies“) bildet. Nachfolgend wurden Methoden angewendet, um das IsaA-Protein aus diesen Einschlusskörpern in reiner Form zu gewinnen.

1.3. Reinigung von IsaA aus Einschlusskörpern („inclusion bodies“)

Inclusion bodies IsaA

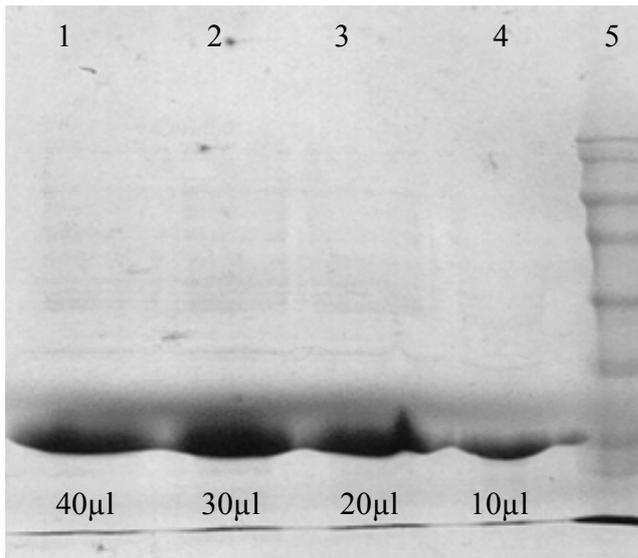


Abbildung 9: SDS-PAGE zur Überprüfung der Konzentration von IsaA nach Aufreinigung aus „inclusion bodies“. Aufgetragen wurden: Spur 1 40 µl; Spur 2 30 µl; Spur 3 20 µl; Spur 4 10 µl; Spur 5 Marker.

Abbildung 9 zeigt IsaA nach spezieller Aufreinigung aus dem Pellet. Die „inclusion bodies“ wurden wie im Material und Methodenteil beschrieben behandelt und unterschiedliche Mengen auf ein Proteingel aufgetragen. Es wurden Proben in einer Menge von 10 bis 40 µl aufgetragen: Die stärkste Bande und damit die größte Menge des Proteins zeigt Spur 1 (40 µl). Mit diesen Versuchen gelang es, IsaA in größeren Konzentrationen zu gewinnen. Damit wurde die Annahme, dass sich IsaA überwiegend im Pellet als „inclusion bodies“ befunden hat, bestätigt. Anschließend wurden die aufgeschlossenen „inclusion bodies“ über eine Ni-NTA-Agarosesäule weiter gereinigt.

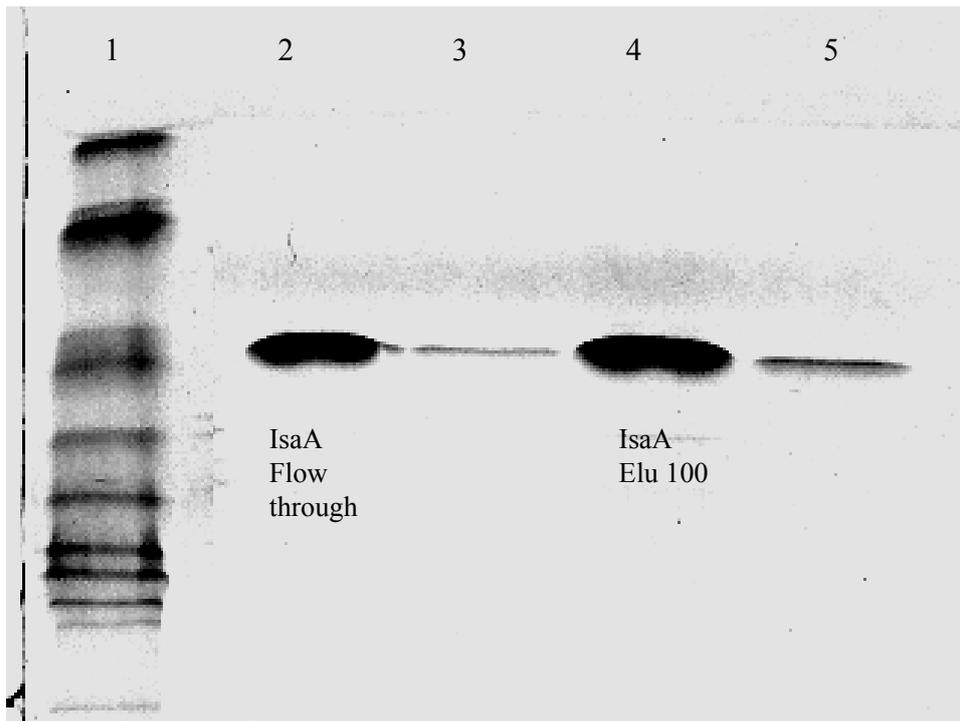


Abbildung 10: SDS-PAGE zur Überprüfung der Konzentration von IsaA nach Aufreinigung aus „inclusion bodies“ und anschließender Konzentration mittels Ni-NTA-Agarose mit den Wasch/Elutionsschritten. Pro Spur wurden 10 µl aufgetragen:
 Spur 1 Marker; Spur 2 IsaA Flow through; Spur 3 IsaA Wash; Spur 4 IsaA nach Aufreinigung mit Elutionspuffer mit 100 mM Imidazol; Spur 5 IsaA nach Aufreinigung mit Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol.

Wie in Abbildung 10 zu erkennen ergab diese Aufreinigung eine hoch reine IsaA-spezifische Bande nach Elution entsprechend der Herstellerangaben (Qiagen, Expressionist) im Flow through (Spur 2) und mit 100 µM Imidazol im Elutionspuffer (Spur 4). Nachdem die Methoden optimiert wurden, konnte ausreichend IsaA-Protein in einem Ansatz im großen Maßstab aus 1,5 l Kultur aufgereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Das so gereinigte IsaA diente zur Immunisierung der Kaninchen (siehe Abschnitt III. 2.) und als Kontrollprotein für alle nachfolgenden Westernblot-Experimente. Das hier in dieser Arbeit erarbeitete Protokoll und das gereinigte Protein bildeten für die weiteren Arbeiten zur Herstellung IsaA-spezifischer Kaninchenantikörper und monoklonaler Mausantikörper die Grundlage. Beide Antikörperfraktionen (IsaA und IsaB) liegen inzwischen für die weiteren Studien vor (Arbeitsgruppe von K. Ohlsen).

Tabelle 7: Wachstumstabelle für den IsaA-produzierenden Klon bei 37°C

OD>0,5 bei 600 nm						
IPTG (μM)	t0	t 1h	t 2h	t 3h	t 4h	t 5h
1	0,63	0,84	1,09	1,46	1,68	1,76
10	0,63	0,79	0,98	1,48	1,70	1,74
100	0,59	0,86	1,03	1,32	1,55	1,66
1000	0,51	0,85	1,06	1,48	1,69	1,74
0	0,63	0,71	0,80	1,03	1,15	1,23

Tabelle 7 zeigt die für die IsaA-Produktion gemessenen Dichtewerte des *E. coli*-Expressionsklons bei 600 nm zu den Zeitpunkten t0 (festgelegt als Startzeitpunkt sobald die optische Dichte > 0,5) bis t5 (t1-5 mit je einer Stunde Abstand) bei den Konzentrationen von 0 (Negativkontrolle), 1, 10, 100 und 1000 μM IPTG zur Überexpression.

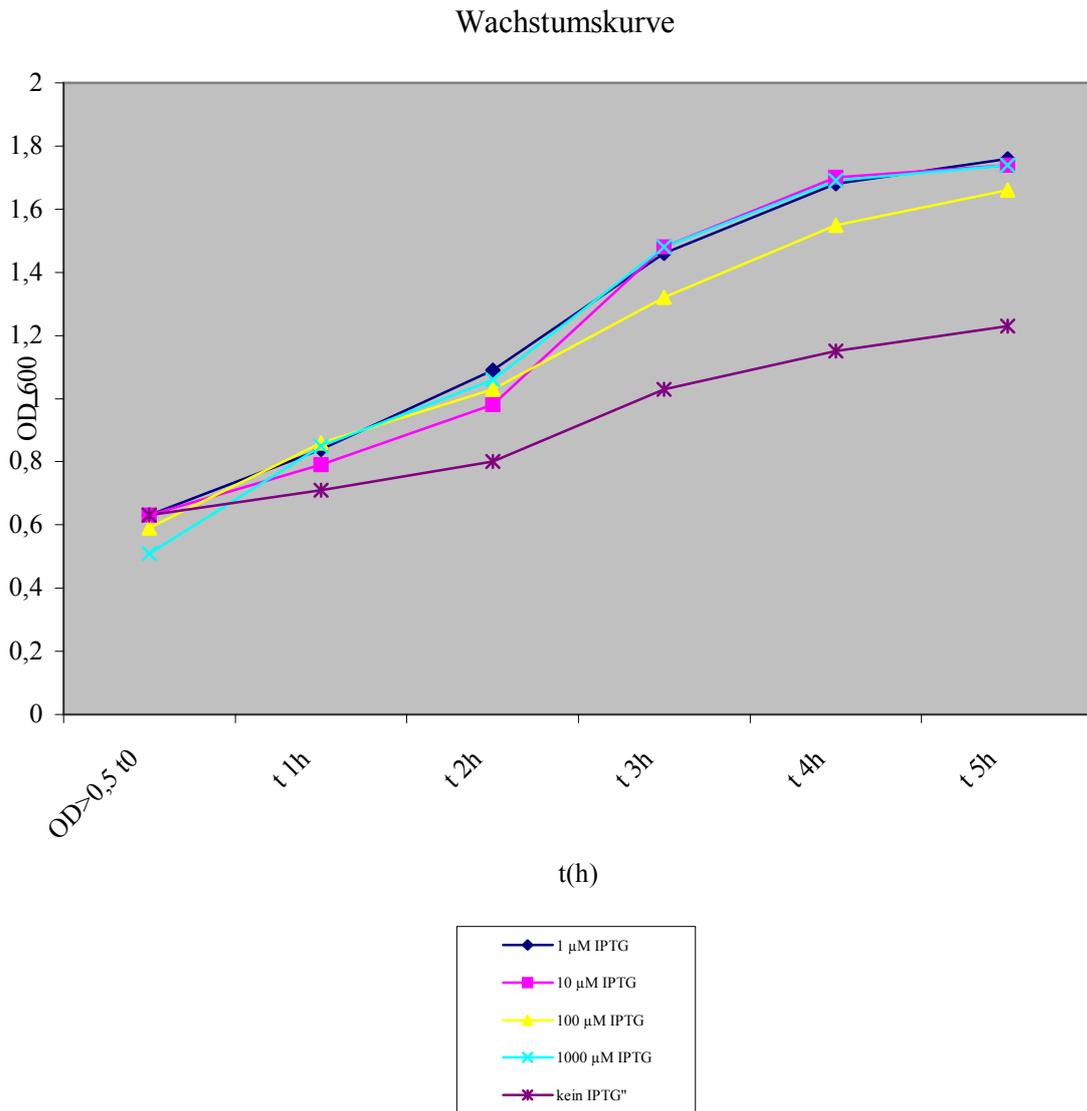


Abbildung 11: Wachstumskurve Small Scale IsaA bei 37°C:
Die Messdaten aus Tabelle 7 graphisch dargestellt.

Wie zu erwarten, war aus der Wachstumskurve von IsaA unter verschiedenen IPTG-Konzentrationen kein direkter Rückschluss auf die besten Bedingungen zur Proteinexpression der Zellen möglich. Die Wachstumsergebnisse verdeutlichen, dass unter optimalen Induktionsbedingungen (100 μM IPTG) das geringste Wachstum beobachtet wurde. Es ist zu vermuten, dass eine Produktion großer

Mengen von IsaA das Wachstum der Zellen negativ beeinflusst, da hierfür ein Großteil der Zellressourcen beansprucht wird.

1.4. Überexpression und Reinigung von IsaB

Nachdem geeignete Bedingungen für die IsaA-Expression und Produktion gefunden worden waren, erfolgte im Weiteren die Überexpression und Aufreinigung von IsaB. Dafür wurden zunächst die Expressionsbedingungen optimiert. Dazu wurden analog zum Vorgehen bei IsaA verschiedene Induktionszeiten, IPTG-Konzentrationen und Kulturtemperaturen getestet. Abbildung 12 zeigt die Expression von IsaB unter verschiedenen Kultur- und Induktionsbedingungen. Getestet wurden Wachstum bei 30°C und 37°C sowie Induktion mit 100 µM und 1 mM IPTG. Aufgetragen wurden jeweils Gesamtzelllysate nach 4 h Induktionszeit. Es ist zu erkennen, dass die stärkste IsaB-spezifische Bande nach 4 h Induktion mit 100 µM IPTG bei 37°C nachweisbar war. Die Expressionsstärke von IsaB war bei einer Temperatur von 37°C höher als bei 30°C. Außerdem zeigte sich für IsaB, ebenso wie für IsaA, dass die Induktion der Überexpression mit einer Konzentration von 100 µM IPTG am effektivsten war und eine Wachstumszeit von 4 h (3 h bei IsaA) die höchste Konzentration an IsaB lieferte.

Testansatz IsaB

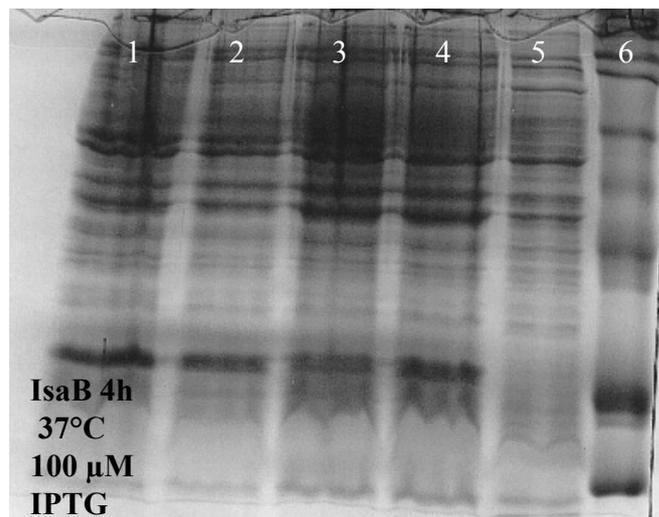


Abbildung 12: SDS-PAGE der Gesamtzelllysate zur IsaB-Expression nach Kultivierung bei 30°C und 37°C, induziert mit 100 µM und 1 mM IPTG nach 4 h Induktionszeit. Pro Spur wurden jeweils 10 µl aufgetragen:

Spur 1 IsaB nach 4 h Wachstum bei 37°C und Induktion mit 100 µM IPTG; Spur 2 IsaB nach 4 h Wachstum bei 37°C und Induktion mit 1 mM IPTG; Spur 3 IsaB nach 4 h Wachstum bei 30°C und Induktion mit 100 µM IPTG; Spur 4 IsaB nach 4 h Wachstum bei 30°C und Induktion mit 1 mM IPTG; Spur 5 IsaB uninduziert (Negativkontrolle); Spur 6 Marker.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass IsaB in ausreichenden Mengen unter den beschriebenen Bedingungen gebildet wird, erfolgte die Aufreinigung des Proteins. Dazu wurden wiederum Ni-NTA-Säulen entsprechend der Herstellervorschrift verwendet.

IsaB nach Elution über eine Ni-NTA-Agarose-Säule

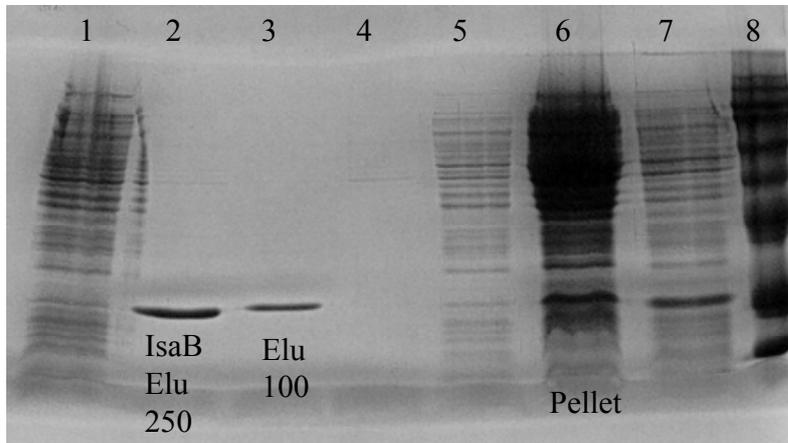


Abbildung 13: SDS-PAGE zur Überprüfung der Konzentration von IsaB aus den Wasch/Elutionsschritten Überstand, Pellet, Flow through, Wash und Aufreinigung mit Elutionspuffer mit 100 sowie 250 mM Imidazol nach Induktion mit 100 μ M IPTG und nach einer Wachstumszeit von 4 h bei 37°C. Aufgetragen wurden pro Spur 10 μ l:

Spur 1 IsaB uninduziert (Negativkontrolle); Spur 2 IsaB gereinigt mit Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol; Spur 3 IsaB gereinigt mit Elutionspuffer mit 100 mM Imidazol; Spur 4 IsaB Wash; Spur 5 IsaB Flow through; Spur 6 IsaB Pellet; Spur 7 IsaB Überstand; Spur 8 Marker.

Abbildung 13 zeigt einen Ansatz nach IsaB-Induktion bei 37°C nach 4 h Wachstum mit 100 μ M IPTG. Die IsaB-Konzentration aus den verschiedenen Schritten der Reinigung und Elution sind in der Abbildung erkennbar. Nach Elution mit 250 mM Imidazol im Elutionspuffer konnte IsaB sehr rein isoliert werden. Es sind kaum unspezifische Proteine zu sehen. Auch die Elution mit 100 mM Imidazol ergab eine hochspezifische IsaB-Bande, jedoch war die Konzentration deutlich geringer. Somit konnte begonnen werden, ausreichende Mengen von IsaB für die Immunisierung zu generieren. Generell waren dafür mindestens 500 μ g IsaB (Konzentration mindestens 1 μ g/ μ l) erforderlich.

Um ausreichend konzentrierte IsaB-Proteinlösung zu erhalten, wurden die Elutionsfraktionen über Centricon®-10 Röhrchen aus mehreren small-scale-Ansätzen, die jeweils bei 37°C durchgeführt wurden, konzentriert.

IsaB nach Konzentrierung über Centricon®-10 Röhren

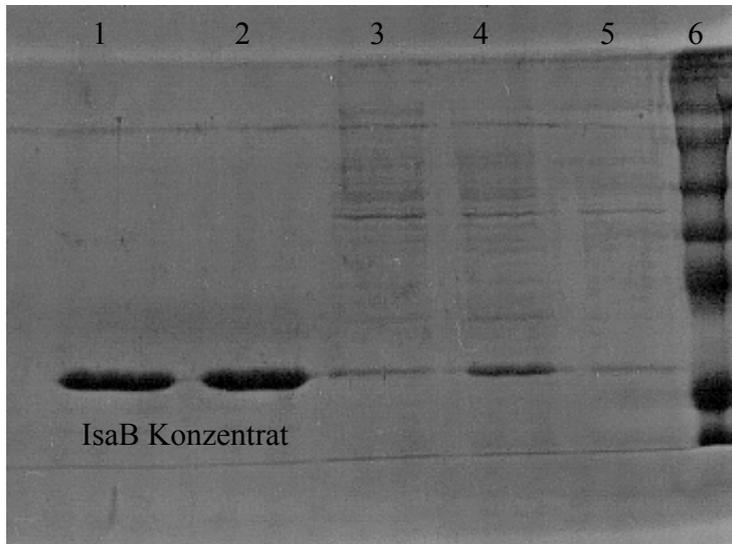


Abbildung 14: SDS-PAGE zur Kontrolle von IsaB nach Ni-NTA-Agarose-Elution und anschließender Centricon®-10-Konzentrierung aus jeweils 3 ml der Fraktionen Wash, Elutionspuffer mit 100 sowie 250 mM Imidazol. Aufgetragen wurden 10 µl pro Spur:
Spur 1 IsaB der Fraktion Elution 250 mM Imidazol; Spur 2 IsaB der Fraktion Elution 250 mM Imidazol; Spur 3 IsaB der Fraktion Elution 100 mM Imidazol; Spur 4 IsaB der Fraktion Elution 100 mM Imidazol; Spur 5 IsaB der Fraktion Wash; Spur 6 Marker.

Abbildung 14 zeigt Proben von IsaB nach Ni-NTA-Agarose-Elution und anschließender Konzentrierung. Es wurde wiederum ein 4-stündiges Wachstum der Zellen mit 100 µM IPTG zur Überexpression von IsaB angewendet. In der Abbildung ist zu erkennen, dass eine Zentrifugation mit Centricon-Röhren eine deutliche Konzentrierung der IsaB-Proteinlösung bewirkte (Spur 1 und 2).

Diese Ergebnisse belegen, dass es eine geeignet hohe Konzentration von IsaB hergestellt werden konnte. Nach Kultivierung im großen Maßstab (1,5 l) unter den optimierten Bedingungen konnten über Ni-NTA-Aufreinigung und Centricon-Zentrifugation ca. 10 mg IsaB mit einer Konzentration von 2 mg/ml gewonnen werden. Diese Proteinlösung wurde für die Immunisierung der Kaninchen zur Antikörperproduktion verwendet.

Die Gewinnung und Testung der IsaB-spezifischen Antikörper ist nicht Teil dieser Arbeit und wurde in der Arbeitsgruppe von K. Ohlsen fortgeführt. Das hier in dieser Arbeit erarbeitete Protokoll und das gereinigte Protein bildeten für die weiteren Arbeiten zur Herstellung IsaB-spezifischer Kaninchenantikörper und monoklonaler Mausantikörper die Grundlage. Beide Antikörperfraktionen (IsaA und IsaB) liegen inzwischen für die weiteren Studien vor.

1.5. Zusammenfassung

Sowohl für IsaA als auch für IsaB wurde eine optimale Proteinexpression bei Ansätzen im kleinen Maßstab (10 ml) bei 37°C und nach 3 Stunden (IsaA) bzw. 4 Stunden (IsaB) Wachstumszeit erzielt. Außerdem stellte sich die Konzentration von 100 µM IPTG für die Induktion der Überexpression für beide Proteine als die geeignetste heraus. Es konnte festgestellt werden, dass das Wachstum der Expressionszellen unter diesen Bedingungen eingeschränkt war (exemplarisch für IsaA bei 37°C in Abb. 11 und Tab. 7, S.59f). Es ist zu vermuten, dass eine optimale Proteinexpression einen großen Anteil der Zellressourcen verbraucht, sodass gleichzeitig kein maximales Wachstum erfolgt.

Die Klonierung der DNA-Sequenzen der beiden Proteine IsaA und IsaB in einen Expressionsvektor und anschließend in kompetente Zellen gelang nach Standardverfahren und etablierten Methoden. Die nachfolgende Überexpression war nach Optimierung der Wachstumsbedingungen ebenfalls für beide Proteine erfolgreich. Dabei zeigte sich beim Aufreinigen, dass IsaA zu großen Anteilen im Pellet vorlag. Mit einem weiteren Reinigungsschritt konnte IsaA in ausreichender Menge aus den Zelltrümmern gelöst werden und anschließend nach erneuter Filterung über Ni-NTA-Agarose und Konzentrierung in hoher Konzentration gewonnen werden. IsaB ließ sich nach Optimierung der Wachstumsbedingungen ebenfalls gut überexprimieren und nach Aufreinigung gelang wie bei IsaA eine Konzentrierung des Proteins. So konnten beide Proteine in großem Maßstab

überexprimiert, gereinigt und konzentriert werden. Die so erfolgreich hergestellten großen Proteinmengen bildeten die Voraussetzung für die Immunisierung des Kaninchens und für weitere Arbeiten in der Arbeitsgruppe von K. Ohlsen.

Die optimierten Bedingungen für Wachstum und Überexpression:

IsaA: Induktion der Überexpression mit **100 μ M IPTG, 3 h Wachstum bei 37°C.**

IsaB: Induktion der Überexpression mit **100 μ M IPTG, 4 h Wachstum bei 37°C.**

2. Immunisierung eines Kaninchens mit IsaA

Nach erfolgreicher Herstellung der Proteine IsaA und IsaB wurde im nächsten Schritt ein polyklonales Antiserum, zunächst gegen IsaA, hergestellt. Dazu wurde das aufgereinigte und konzentrierte Protein durch die Firma ImmunoGlobe zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Die entnommenen Testseren des Kaninchens wurden anschließend im Westernblot getestet. Zunächst wurden die Kaninchenserum mittels IgG-Filterung mit Vectron-SA-Cellulose[®] aufgereinigt. Die nachfolgend verwendeten Seren haben die Bezeichnung: 1. Regular: entspricht Kaninchenserum 4 Wochen nach Immunisierung, 2. Regular: Kaninchenserum 8 Wochen nach Immunisierung. Das Präimmunserum wurde dem Kaninchen vor Immunisierung entnommen, entspricht somit der Kontrolle vor Versuchsbeginn.

2.1. Westernblot mit polyklonalem Kaninchenantikörper

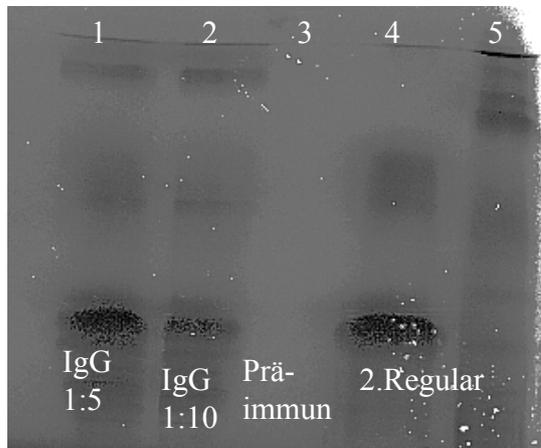


Abbildung 15: Westernblot, in dem das Präimmunserum des Kaninchens 1:10 verdünnt, das 2. Regular 1:2 verdünnt sowie Kaninchen-IgG (isoliert aus 2. Regular) in den Verdünnungen 1:5 und 1:10 getestet wurden. Es wurden 10 µl pro Spur aufgetragen:
Spur 1 IgG 1:5 verdünnt; Spur 2 IgG 1:10 verdünnt; Spur 3 Präimmunserum 1:10 verdünnt; Spur 4 2. Regular 1:2 verdünnt; Spur 5 Marker.

Abbildung 15 zeigt einen Westernblot mit der Testung des Kaninchenserums. Die stärkste Bande ist in Spur 4 erkennbar. Sie entspricht dem so genannten 2. Regular, Testserum, das dem Kaninchen 8 Wochen nach Immunisierung entnommen wurde. Es zeigt die ausgeprägte Immunantwort des Tieres. Etwas schwächer zeigen sich die Banden in Spur 1 und 2, die dem zuvor aus dem Serum angereicherten IgG (isoliert aus 2. Regular) in 1:5 und 1:10 Verdünnung entsprechen. Auch hier zeigte sich die gute Immunantwort des Kaninchens und damit die gute Qualität des Antikörpers IsaA. Das Präimmunserum in 1:10 Verdünnung zeigt keine nennenswerte Reaktion und dient somit als aussagekräftige Kontrolle für den Zeitpunkt vor der Immunisierung. Diese Ergebnisse belegen eine spezifische Reaktion der Immunseren mit IsaA und können somit für die Versuche der passiven Immunisierung verwendet werden.

3. Tierversuch

Mit dem vom Kaninchen stammenden Serum, welches nachgewiesener Maßen spezifische IsaA-Antikörper enthält, sollte im Folgenden durch einen ersten Tierversuch die Wirksamkeit einer Immuntherapie mit anti-IsaA-spezifischem Serum untersucht werden. Dazu wurden 24 Ratten (siehe auch Abschnitt 2.5., S. 46) in vier Gruppen (A-D) mit jeweils sechs Tieren zu einem Sepsis-Peritonitis-Modell herangezogen. Es wurden zwei verschiedene Mengen Bakterien (10^8 und 10^9) getestet, wobei der Infektionszugang intraperitoneal mittels einer Kapsel erfolgte. Es gab jeweils eine Serum- und eine Placebo- bzw. Kontrollgruppe (PBS-Puffer). Fünf Tage nach der erfolgten Infektion wurden die Tiere euthanasiert, gewogen und sezziert. Dabei wurden Infektionszeichen erfasst und die Gruppen miteinander verglichen. Neben der Bakterienzahl und der Zugehörigkeit zu Serum- oder Placebogruppe wurden folgende Kriterien bei jedem Tier erfasst:

- Startgewicht
- Endgewicht
- → Differenzgewicht (Startgewicht minus Endgewicht)
- Makroskopische Beurteilung der Infektion im Abdomen, wobei jeder pathologische Befund einen Punkt erhält (Punktwert)
- Milzgewicht
- Bakterienkolonien pro Gramm Milz

Bei der Sektion wurde in dieser als Vorversuch zu sehenden Versuchsanordnung neben der makroskopischen Beurteilung (siehe Abschnitt 2.5.3., S. 47) das Hauptaugenmerk auf die Milz gelegt, da sie ein zentrales Organ der Immunantwort darstellt und mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen hier am deutlichsten zu erwarten waren.

In Tabelle 16 (3.4., S. 84) sind alle erhobenen Daten dieses Tierversuches

zusammengefasst. Sie zeigt die experimentell erhobenen und nachfolgend statistisch analysierten Parameter aller Versuchstiere. Die Tiere wurden von 1 bis 24 nummeriert; jeweils 6 Tiere umfassen eine Gruppe:

- (1) Gruppe A erhielt 10^9 Bakterien und Serum (mit anti-IsaA Serum)
- (2) Gruppe B erhielt 10^9 Bakterien und PBS (Kontrolle)
- (3) Gruppe C erhielt 10^8 Bakterien und Serum (mit anti-IsaA Serum)
- (4) Gruppe D erhielt 10^8 Bakterien und PBS (Kontrolle)

Zum Zwecke der statistischen Analyse wurden zusätzlich die Gruppen A und C sowie die Gruppen B und D zu einem Behandlungs- und einem Kontroll-Gesamtkollektiv zusammengefasst. Die Versuchsgruppen werden nachfolgend zur Vereinfachung lediglich mit Ihren einzelnen Kennbuchstaben A, B, C, D bzw. A+C und B+D bezeichnet.

Die Unterschiede in den erhobenen Parametern innerhalb der Gruppen (A vs. B; C vs. D; A+C vs. B+D) wurden auf statistische Signifikanz untersucht. Signifikant unterschiedliche Testergebnisse wurden im folgenden Ergebnisteil gekennzeichnet.

Eine vollständige Übersicht der Inferenzstatistik ist unter III. 3.2. „Tabellen der prüfstatistischen Testungen / Signifikanztests“ dargelegt.

3.1. Statistische Auswertung der untersuchten Parameter

3.1.1. Gewichtsverhalten der Versuchstiere

Tabelle 8 und Abbildung 16a-c zeigen die deskriptive Statistik der Parameter Start- und Endgewicht sowie des Differenzgewichts innerhalb der Versuchsgruppen.

Die Mittelwerte (M) variieren innerhalb der vier Versuchsgruppen beim Startgewicht zwischen 418,3 g (B, C) und 433,3 g (A) sowie beim Endgewicht zwischen 397 g (B) und 416,8 g (C). Die Standardabweichungen (SD) liegen beim Startgewicht zwischen 19,4 g (A) und 37,5 g (C) sowie beim Endgewicht zwischen 17,1 g (A) und 31,1 g (C).

Tabelle 8: Deskriptive Statistik der Parameter Start-, End- und Differenzgewicht innerhalb der Versuchsgruppen

		Versuchsgruppe					
		A	B	C	D	A+C	B+D
Start- gewicht [g]	Mittelwert	433,33	422,33	418,33	418,33	425,83	420,33
	Standardabw.	19,45	26,79	37,49	32,15	29,54	28,29
	Median	443,50	421,00	411,00	422,50	430,50	421,00
	Spannweite	42	69	90	80	90	82
	Minimum	408	394	381	381	381	381
	Maximum	450	463	471	461	471	463
End- gewicht [g]	Mittelwert	404,67	397,00	416,83	404,33	410,75	400,67
	Standardabw.	17,11	23,51	31,12	26,59	24,77	24,23
	Median	403,50	392,50	414,50	402,00	407,00	397,50
	Spannweite	47	63	75	77	75	77
	Minimum	385	374	382	364	382	364
	Maximum	432	437	457	441	457	441
Differenz- gewicht [g]	Mittelwert	28,67	25,33	1,50	14,00	15,08	19,67
	Standardabw.	14,65	7,15	11,78	19,46	19,02	15,18
	Median	26,00	24,50	-2,00	17,50	15,50	23,50
	Spannweite	41	22	31	52	60	52
	Minimum	13	16	-6	-14	-6	-14
	Maximum	54	38	25	38	54	38

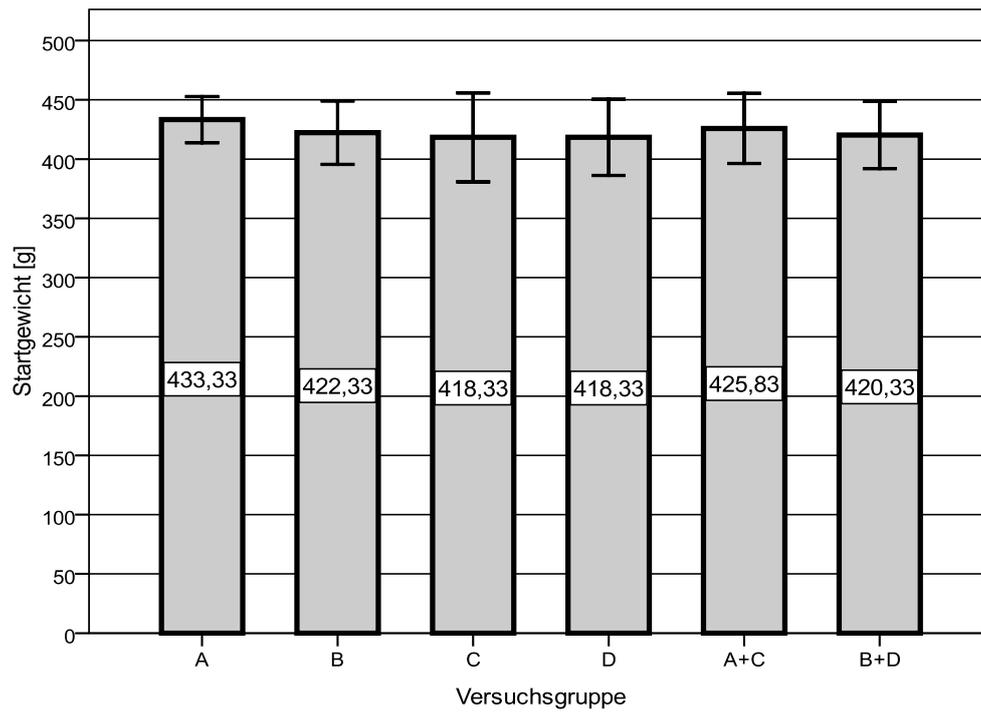


Abbildung 16a: Mittelwerte und Streuungen des Startgewichts der Tiere bei den Versuchsgruppen

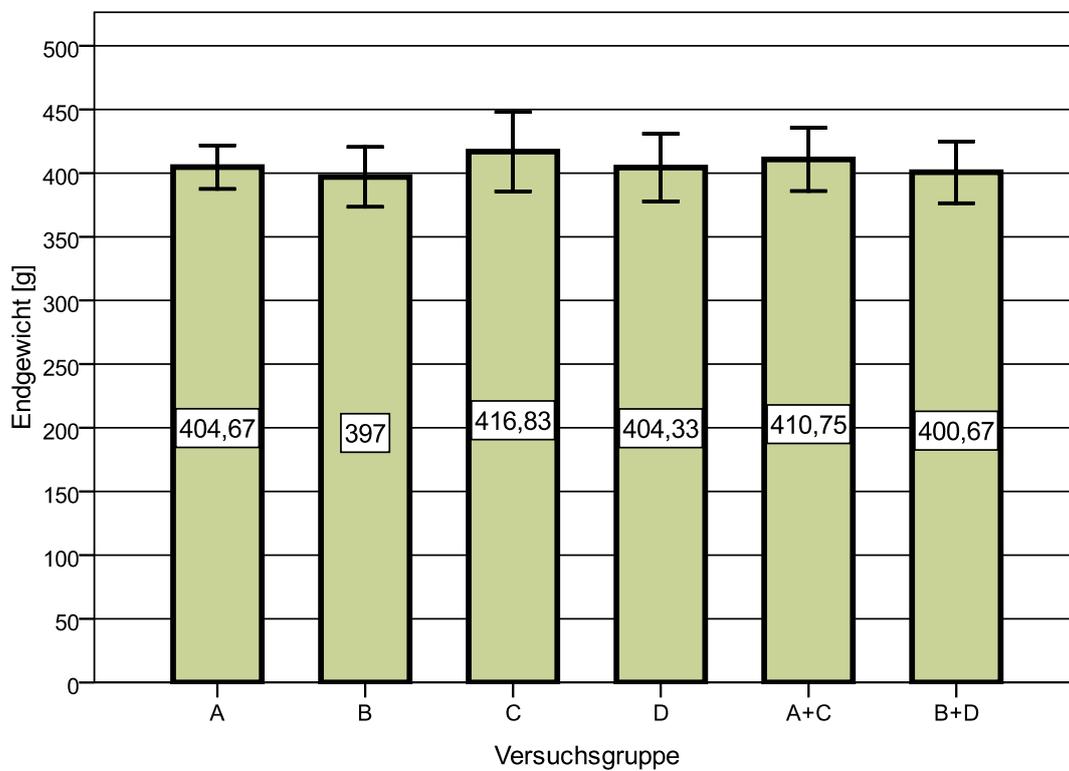


Abbildung 16b: Mittelwerte und Streuungen des Endgewichts der Tiere bei den Versuchsgruppen

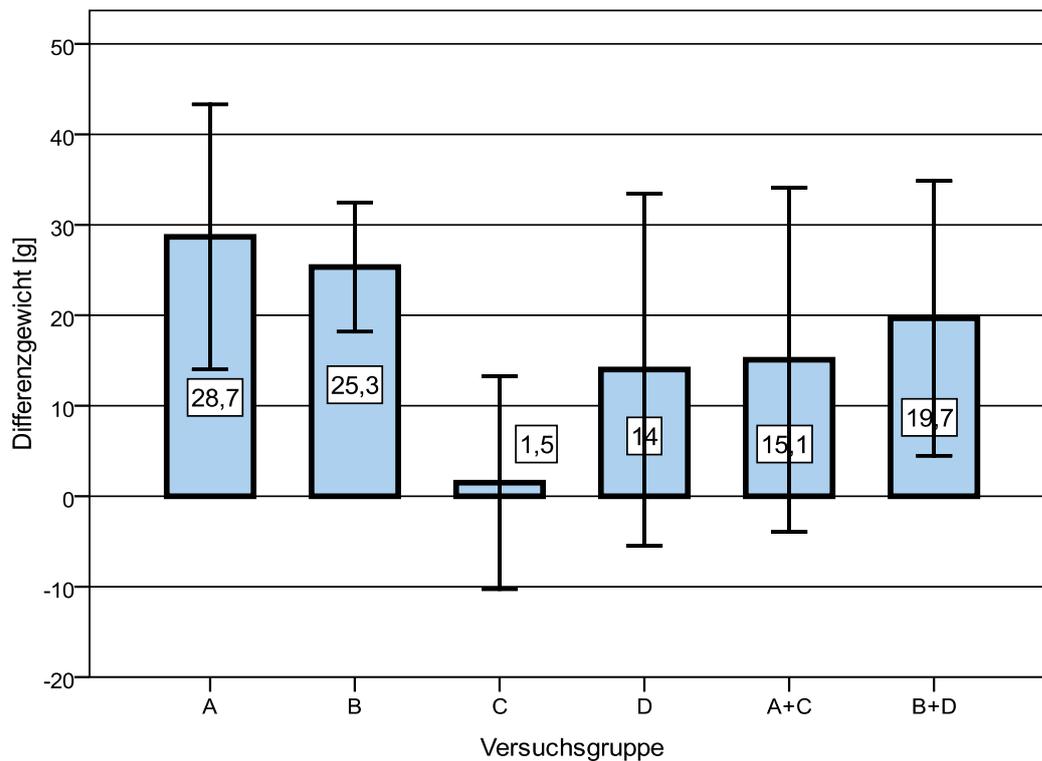


Abbildung 16c: Mittelwerte und Streuungen des Differenzgewichts der Tiere bei den Versuchsgruppen

Die mittleren Startgewichte (\pm SD) betragen im Gesamtkollektiv A+C 425,8 (\pm 29,5)g und im Kontrollkollektiv B+D 420,3 (\pm 28,3)g. Das mittlere Endgewicht beträgt jeweils 410,8 (\pm 24,8)g gegenüber 400,7 (\pm 24,2)g. Das Differenzgewicht beträgt jeweils 15,1 (\pm 19,0)g gegenüber 19,7 (\pm 15,2).

Das mittlere Differenzgewicht (\pm SD) (a) und das prozentuelle Verhältnis zum Ausgangsgewicht (b) betragen in den Gruppen:

A vs. B: (a) -28,7 (\pm 14,7)g vs. -25,3 (\pm 7,1)g; (b) -6,6% vs. -6%

C vs. D: (a) -1,5 (\pm 11,8)g vs. -14,0 (\pm 19,5)g; (b) -0,4% vs. -3,3%

A+C vs. B+D: (a) -15,1 (\pm 19,0)g vs. -19,7 (\pm 15,2)g; (b) -3,5% vs. -4,7%.

Somit erscheint bei der kombinierten Serumgruppe A+C gegenüber der kombinierten Kontrollgruppe B+D, wie bei den Einzelgruppen C und D, eine Tendenz zu einem relativ höheren Endgewicht bzw. einer geringeren

Gewichtsdifferenz zu bestehen. (Diese Tendenz ist bei A im Vergleich zu B gegenläufig.)

Wie bereits erwähnt, wurden innerhalb der drei Gruppenkollektive (A vs. B, C vs. D, A+C vs. B+D) die Unterschiede des Gewichtsverhaltens der Versuchstiere auf Signifikanz getestet.

Der Vergleich des Start- und Endgewichts der Versuchstiere zwischen Serum- und Kontrollgruppen kann ein Marker für die therapeutische Wirksamkeit des Immunerums, unter der Annahme dass die Höhe der Gewichtsabnahme die Infektionsschwere widerspiegelt, sein. Ein Unterschied im Gewichtsverlauf war statistisch jedoch nicht nachzuweisen (A vs. B: $p=0,336$; $p=0,378$; $p=0,936$; Tab. 13; C vs. D: $p=0,936$; $p=0,522$; $p=0,296$; Tab. 14; A+C vs. B+D: $p=0,525$; $p=0,312$; $p=0,435$; Tab. 15). Es gab zwar einen Hinweis auf eine geringere Gewichtsabnahme bei den Tieren in der Gruppe C im Vergleich zur Gruppe D, aber nur bei Weglassen von Extremwerten.

3.1.2. Makroskopische Beurteilung des intraabdominellen Infektes

Im Abdomen wurde das Stadium der Infektion an Hand einer Punkteskala quantitativ beurteilt. Dabei fanden folgende Punkte Beachtung:

1. Infektiöses Aszites
2. Leberabszesse
3. subhepatische Abszesse
4. Abszesse am großen Netz/Netz verklumpt
5. Abszesse an der Milz
6. Abszesse am Peritoneum
7. Abszesse an Dick- und Dünndarm
8. Abszesse an den Nieren
9. Abszesse an der Leberpforte

Je nach Ausmaß der Infektion wurden jeweils 0 bis 3 Punkte vergeben.

Die Tabelle 9 zeigt die deskriptiven Statistiken der makroskopischen Beurteilung des Bauchsitus (Punktzahl) in den Versuchsgruppen. Die Einzelbeurteilungen sind in Tabelle 16 aufgeführt. Die Tiere der Serumgruppen A und C haben einen geringeren mittleren Punktwert (\pm SD) mit jeweils 2,67 (\pm 2,42) und 1,5 (\pm 1,23) im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppen B mit 4,67 (\pm 2,25) und D mit 2,83 (\pm 0,93), wobei der Unterschied zwischen C und D signifikant ist ($p = 0,049$; Mann-Whitney-U-Test; siehe Tab. 13).

Tabelle 9: Deskriptive Statistiken des intraabdominellen Infektes makroskopisch (Punkte) bei den Versuchstieren

	Versuchsgruppe					
	A	B	C	D	A+C	B+D
Mittelwert	2,67	4,67	1,50	2,83	2,08	3,75
Standardabweichung	2,42	2,25	1,22	0,93	1,93	1,90
Median	1,50	5,50	1,00	3,00	1,00	3,25
Spannweite	6,00	6,00	3,00	2,50	7,00	6,00
Minimum	1,00	1,00	0,00	1,50	0,00	1,00
Maximum	7,00	7,00	3,00	4,00	7,00	7,00

Die Differenz zwischen kombinierter Serum- und Kontrollgruppe A+C und B+D beträgt im Durchschnitt 1,7 Punkte, bei einem mittleren Punktwert (\pm SD) in der Serumgruppe A+C von 2,08 (\pm 1,93) und von 3,75 (\pm 1,90) in der Kontrollgruppe B+D. Die Differenz ist statistisch signifikant ($p = 0,024$; Mann-Whitney-U-Test; siehe Tab. 14).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Serumgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen generell ein geringeres intraabdominelles Infektionsausmaß bei makroskopisch weniger pathologischen Befunden aufwiesen. Die Unterschiede

waren statistisch signifikant. Relativierend sollte bei einer Bewertung dieser statistischen Befunde angemerkt werden, dass die makroskopische Auswertung des Bauchsitus nur ein möglicher Parameter, der die Infektionsschwere zeigt, sein kann und auch eine Anfälligkeit gegenüber Störeffekten (Subjektivität bei der Auswertung des Infektionsausmaßes) aufweist. Die Abbildung 17 gibt die Versuchsgruppenunterschiede des Bauchsitus wieder.

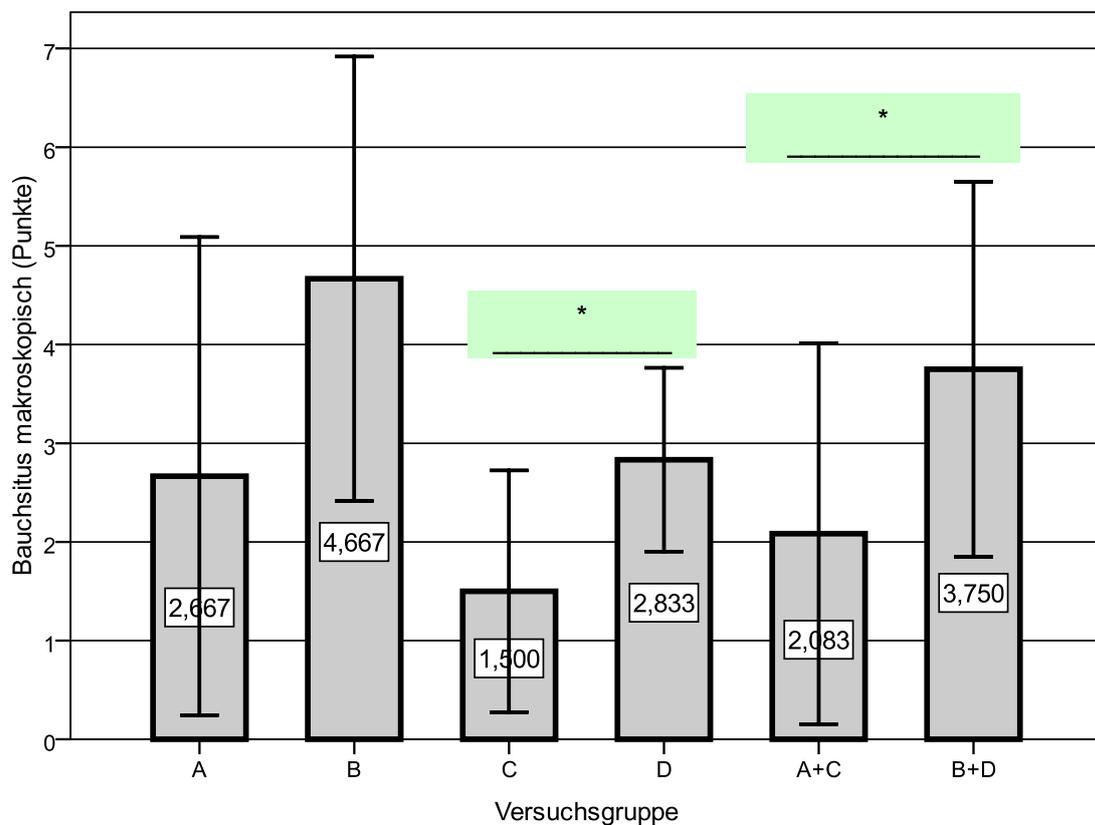


Abbildung 17: Mittelwerte und Streuungen des Bauchsitus makroskopisch bei den Versuchstieren. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind angegeben: * $p \leq 0.05$).

3.1.3. Milzgewicht

Die Tabelle 10 enthält die deskriptiv-statistischen Werte des Milzgewichtes (g) der Tiere in den Versuchsgruppen am Ende des Experimentes. Bei der Auswertung zeigte sich, dass das mittlere Milzgewicht innerhalb der Serumgruppen A (M=1,24; $\pm 0,10$ g) und C (M=0,90; $\pm 0,12$ g) jeweils ca. 10% bzw. 12% geringer ausfällt als in den Kontrollgruppen B (M=1,37; $\pm 0,05$ g) und D (M=1,01; $\pm 0,07$ g). Entsprechend ist auch das Milzgewicht innerhalb des Serumgesamtkollektivs A+C (M=1,07; $\pm 1,19$ g) ca. 11% unterhalb des Kontrollgesamtkollektivs (M=1,19; $\pm 1,07$ g) lokalisiert.

Tabelle 10: Deskriptive Statistiken des Milzgewichtes (g) bei den Versuchstieren

	Versuchsgruppe					
	A	B	C	D	A+C	B+D
Mittelwert	<i>1,24</i>	<i>1,36</i>	<i>,90</i>	<i>1,01</i>	<i>1,07</i>	<i>1,19</i>
Standardabweichung	<i>0,10</i>	<i>0,05</i>	<i>0,12</i>	<i>0,07</i>	<i>0,21</i>	<i>0,20</i>
Median	<i>1,23</i>	<i>1,38</i>	<i>0,92</i>	<i>1,02</i>	<i>1,07</i>	<i>1,19</i>
Spannweite	<i>0,28</i>	<i>0,14</i>	<i>0,30</i>	<i>0,21</i>	<i>0,62</i>	<i>0,51</i>
Minimum	<i>1,09</i>	<i>1,27</i>	<i>0,75</i>	<i>0,90</i>	<i>0,75</i>	<i>0,90</i>
Maximum	<i>1,37</i>	<i>1,41</i>	<i>1,05</i>	<i>1,11</i>	<i>1,37</i>	<i>1,41</i>

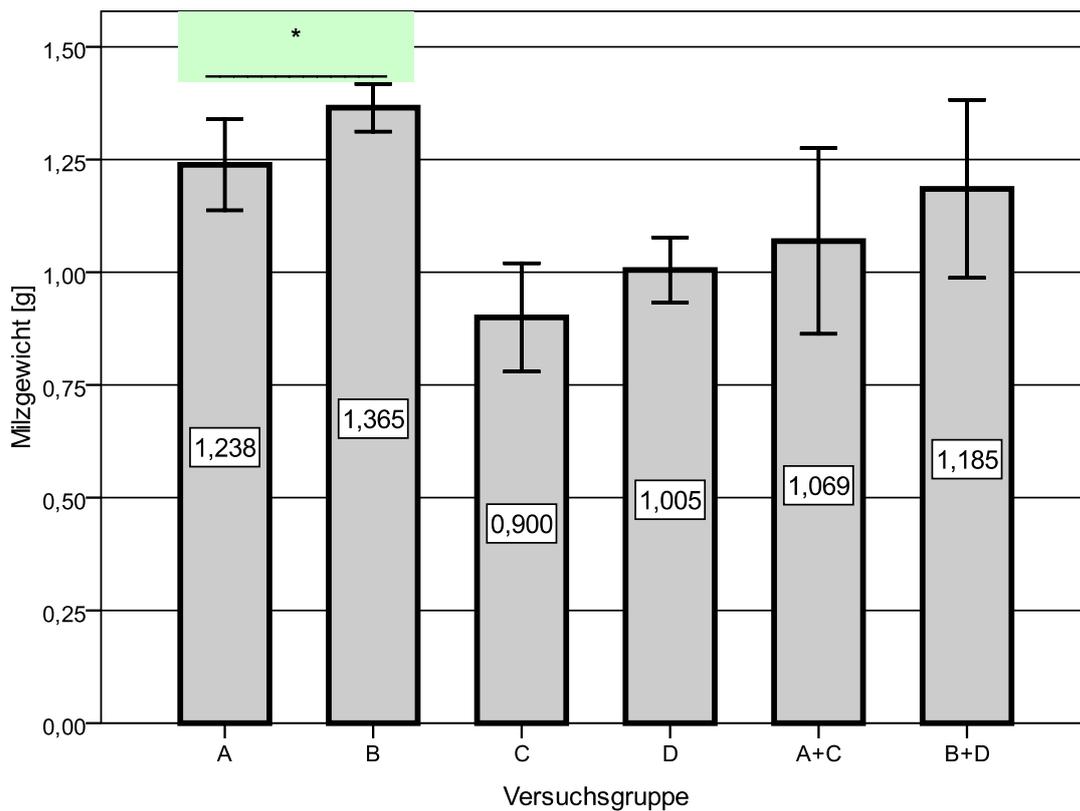


Abbildung 18: Mittelwerte und Streuungen des Milzgewichtes bei den Versuchstieren. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind angegeben: * $p \leq 0.05$).

Der Mann-Whitney-Test ($p=0.025^*$) weist die Milzgewichtsdifferenz der Versuchsgruppen A versus B als signifikant aus (siehe Tab. 12).

Abbildung 18 (siehe oben) visualisiert insgesamt die Situation der Versuchsgruppen beim Milzgewicht-Parameter. Dabei sieht man, dass das nicht signifikante Ergebnis A+C versus B+D ($p=0,174$; Tab. 15) an den stark unterschiedlichen Werten der Gruppen A, B und C, D im Verhältnis zueinander liegt. Eine Zusammenfassung der Gruppen zu A+C versus B+D ist in diesem Fall nicht sinnvoll.

Tabelle 11: Deskriptive Statistiken der Bakterienlast in der Milz (Milzkolonien) bei den Versuchstieren

	Versuchsgruppe					
	A	B	C	D	A+C	B+D
Mittelwert	<i>42352,83</i>	<i>13622,67</i>	<i>6425,33</i>	<i>2709,50</i>	<i>24389,08</i>	<i>8166,08</i>
Standardabw.	<i>29252,99</i>	<i>7385,97</i>	<i>6622,03</i>	<i>1362,36</i>	<i>27585,07</i>	<i>7623,74</i>
Median	<i>38825,50</i>	<i>12887,00</i>	<i>4049,50</i>	<i>2649,00</i>	<i>11636,00</i>	<i>5739,50</i>
Spannweite	<i>68969</i>	<i>20227</i>	<i>16821</i>	<i>3561</i>	<i>75572</i>	<i>25713</i>
Minimum	<i>9677</i>	<i>6702</i>	<i>3074</i>	<i>1216</i>	<i>3074</i>	<i>1216</i>
Maximum	<i>78646</i>	<i>26929</i>	<i>19895</i>	<i>4777</i>	<i>78646</i>	<i>26929</i>

3.1.4. Bakterienlast in der Milz (Milzkolonien)

Die Bakterienlast in der Milz als Hauptorgan der Immunabwehr wurde bestimmt. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die deskriptiven Statistiken der ausgezählten Milzkolonien pro g Organ bzw. pro g Milz bei allen Versuchsgruppen. Als primäres optisch-deskriptives Befundmuster (siehe auch Abbildung 19) scheint sich insbesondere bei den Gruppenkontrasten A versus B sowie A+C versus B+D eine markant höhere Kolonienanzahl der Serumkollektive gegenüber den Kontrollkollektiven zu zeigen. So beträgt das Verhältnis der arithmetischen Mittel der Kolonienzahlen bei den Serumgruppen A und A+C gegenüber den Kontrollgruppen B und B+D ziemlich genau das Dreifache (pro g Organ: 42.352,8 vs. 13.622,7 bzw. 24.389,1 vs. 8.166,1).

Der A-versus-B-Kontrast bei den Milzkolonien pro g Milz ist nicht signifikant (U-Test: $p=0.078$). Der A+C-versus-B+D-Kontrast sowie der Unterschied zwischen den Kollektiven B und D zeigen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Trotz der nicht nachweisbaren Signifikanz ist der Unterschied jedoch so markant, dass vermutet werden kann, dass es sich um einen Effekt des IsaA-enthaltenden Serums handelte (höhere Immunkompetenz der Serumgruppen). Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass jene Tiere, die mit 10^9 Bakterien infiziert worden waren, markant stärkere Infektionszeichen aufwiesen als diejenigen, welche mit 10^8 Bakterien behandelt wurden. Des Weiteren zeigte sich bei jenen Tieren, die IsaA als Antikörper erhalten hatten gegenüber den Vergleichstieren mit Kontrolle ein erheblicher, des Öfteren statistisch substantieller Vorteil hinsichtlich Infektionsindikatoren und Immunantwort.

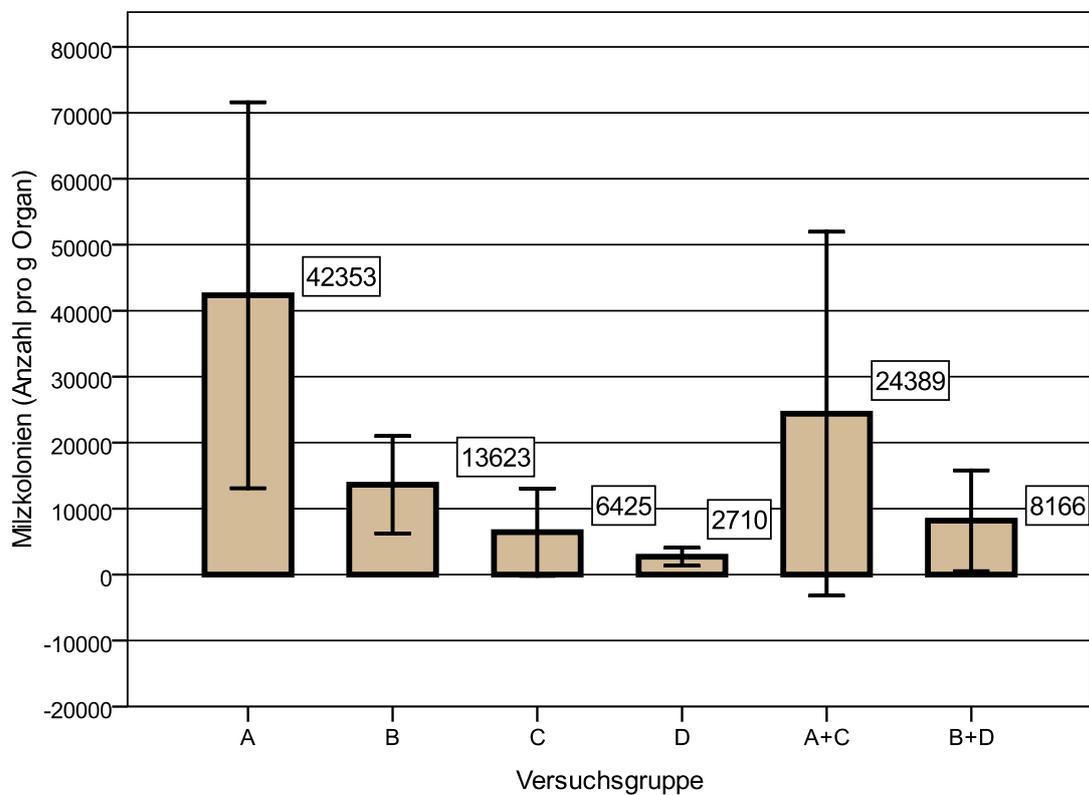


Abbildung 19: Mittelwerte und Streuungen der Milzkolonien pro g Organ bei den Versuchsgruppen

3.2. Tabellen der prüfstatistischen Testungen / Signifikanztests

Die folgenden Tabellen 11 bis 14 enthalten die zentralen Prüfgrößen der bei dem Tierversuch dieser Studie durchgeführten Signifikanztests (Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 12: Mann-Whitney-U-Test auf Unterschied zwischen Gruppe A und B bei Versuchsparametern / Outcome-Variablen, * = signifikant ($p \leq 0.05$)

	U	Z	Signifi- kanz
Startgewicht [g]	12,00	-0,96	0,336
Endgewicht [g]	12,50	-0,88	0,378
Differenzgewicht [g]	17,50	-0,08	0,936
Bauchsitus makroskopisch (Punkte)	10,00	-1,31	0,191
Milzgewicht [g]	4,00	-2,25	0,025*
Milz-Kolonien (Anzahl pro g Organ)	7,00	-1,76	0,078

Tabelle 13: Mann-Whitney-U-Test auf Unterschied zwischen Gruppe C und D bei Versuchsparametern / Outcome-Variablen, * = signifikant ($p \leq 0.05$)

	U	Z	Signifi- kanz
Startgewicht [g]	17,50	-0,08	0,936
Endgewicht [g]	14,00	-0,64	0,522
Differenzgewicht [g]	11,50	-1,04	0,296
Bauchsitus makroskopisch (Punkte)	6,00	-1,97	0,049*
Milzgewicht [g]	9,00	-1,44	0,149
Milz-Kolonien (Anzahl pro g Organ)	9,00	-1,44	0,150

Tabelle 14: Mann-Whitney-U-Test auf Unterschied zwischen Gruppe (A+C) und (B+D) bei Versuchsparametern / Outcome-Variablen, * = signifikant ($p \leq 0.05$)

	U	Z	Signifi- kanz
Startgewicht [g]	61,00	-0,64	0,525
Endgewicht [g]	54,50	-1,01	0,312
Differenzgewicht [g]	58,50	-0,78	0,435
Bauchsitus makroskopisch (Punkte)	33,50	-2,26	0,024*
Milzgewicht [g]	48,00	-1,39	0,166
Milz-Kolonien (Anzahl pro g Organ)	47,00	-1,44	0,149

3.3. Interkorrelationen

Die Tabelle 15 (siehe unten) gibt sämtliche Interkorrelationen wieder, die zwischen den Prüfparametern des Tierversuchs existieren.

Es wird deutlich, dass die Milzkolonien als zentrale Infektionsindikatoren, insbesondere mit der Differenz zwischen Start- und Endgewicht der Tiere ($r=0,42$; $p=0,042^*$) sowie mit dem Milzgewicht signifikant korrelieren ($r=0,53$; $p=0,008^{**}$). Auch der Bauchsitus korreliert signifikant mit diesen beiden Parametern ($r=0,46$; $p=0,024^*$ sowie $r=0,50$; $p=0,014^*$). Ebenso korreliert das Milzgewicht seinerseits signifikant mit dem Differenzgewicht ($r=0,61$; $p=0,02^{**}$).

Tabelle 15: Spearman-Interkorrelationen innerhalb der Menge der Parameter des Tierversuchs

		Startgewicht [g]	Endgewicht [g]	Differenzgewicht [g]	Bauchsitus makroskopisch (Pkte.)	Milzgewicht [g]	Milz-Kolonien (Anzahl pro g Organ)
Startgewicht [g]	Korr.	1,00	0,80	0,57	0,11	0,33	0,24
	Sig.		0,000***	0,004**	0,604	0,117	0,263
Endgewicht [g]	Korr.	0,80	1,00	0,05	-0,06	-0,06	-0,09
	Sig.	0,000***		0,819	0,781	0,790	0,689
Differenzgewicht [g]	Korr.	0,57	0,05	1,00	0,46	0,61	0,42
	Sig.	0,004**	,819		0,024*	0,002**	0,042*
Bauchsitus makroskopisch (Punkte)	Korr.	0,11	-0,06	0,46	1,00	0,50	0,14
	Sig.	0,604	0,781	0,024*		0,014*	0,503
Milzgewicht [g]	Korr.	0,33	-0,06	0,61	0,50	1,00	0,53
	Sig.	0,117	0,790	0,002**	0,014*		0,008**
Milz-Kolonien (Anzahl pro g Organ)	Korr.	0,24	-0,09	0,42	0,14	0,53	1,00
	Sig.	0,263	0,689	0,042*	0,503	0,008**	

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass dieser erste Tierversuch bereits wichtige Erkenntnisse zeigt. Einerseits lässt sich mit den gewählten Bakterienzahlen 10^8 und 10^9 eine relevante Infektion erzeugen, ohne dass die Versuchstiere vor Ablauf des Versuches versterben. Gleichzeitig kann man beispielsweise an den Ergebnissen des Milzgewichts (Tab. 10 und Abb. 18) ablesen, dass die verschiedenen Konzentrationen an Bakterien zu deutlich unterschiedlichen Ausprägungen der Infektion führen. Hieraus lässt sich gleichzeitig folgern, dass der gewählte Zugangsweg (transperitoneal s. Kap. II) geeignet ist, jedoch gilt es herauszufinden ob es andere geeignete Zugangswege gibt.

Andererseits schneiden die Tiere aus den Serumgruppen hinsichtlich Krankheits- und Infektionszeichen insgesamt deutlich besser ab als diejenigen aus den

Kontrollgruppen. Zwischen den Gruppen A und B (Tab.13) ergibt sich beim Parameter Milzgewicht ein signifikanter Unterschied ($p=0,025^*$). Zwischen den Gruppen C und D (Tab. 14) ergibt der Bauchsitus signifikanten Unterschied ($p=0,049^*$). Zwischen den Gruppen A+C versus B+D (Tab. 15) ergibt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied beim Bauchsitus ($p=0,024^*$). Zum Parameter Milzgewicht gelten die im entsprechenden Abschnitt (3.1.3.) gemachten Anmerkungen.

Somit scheint IsaA bereits als polyklonaler Antikörper eine therapeutische Wirkung im Tierversuch zu entfalten. Es bleibt weiteren Versuchen vorbehalten, dieses erste Ergebnis zu bestätigen, insbesondere in größer angelegten Versuchsreihen und mit monoklonalem Antikörper.

3.4. Rohdaten: Experimentell erhobene Parameter aller Versuchstiere (siehe folgende Seite)

Tabelle 16: Rohdaten: Experimentell erhobene Parameter aller Versuchstiere

Nr.	Startgewicht [g]	Endgewicht [g]	Bakterienzahl	Serum/PBS 0,5 ml	Makroskopie	Punktzahl	Milz: Gewicht [g]	Kolonien /100 µl	Kolonien /100 µl 1:10	Kolonien /g Organ
1	432	408	10 ⁹	PBS	infektiöses Aszites 3; Lebersabszesse 2; subhep. Abszess 1	6	1,41	270	50	13.652
2	438	400	10 ⁹	PBS	Leberabszesse 2; subhep. 1	3	1,35	212	17	7.074
3	410	385	10 ⁹	PBS	Abszess gr. Netz 1	1	1,36	430	40	15.257
4	463	437	10 ⁹	PBS	infektiöses Aszites 3; Lebersabszess 1; Abszess gr. Netz + Milz 1+1	6	1,39	314	36	12.122
5	397	374	10 ⁹	PBS	Aszites 2; Leberabszesse 2; Abszess gr. Netz 1	5	1,27	608	76	26.929
6	394	378	10 ⁹	PBS	Aszites 2; mult. Leberabszesse 3; subhep. Abszess 1 Abszess gr. Netz 1	7	1,41	138	24	6.702
7	446	392	10 ⁹	Serum	Abszess gr. Netz 1; Leberabszess 1	2	1,33	1346	262	74.548
8	446	411	10 ⁹	Serum	Aszites 2; Leberabszess 1; Abszess gr. Netz 1	4	1,37	1008	103	37.189
9	441	412	10 ⁹	Serum	Aszites 2; Leberabszesse 2; Abszess gr. Netz 1; peritoneale Abszesse 2	7	1,19	976	95	40.462
10	450	432	10 ⁹	Serum	Abszess gr. Netz 1	1	1,21	428	23	13.595
11	408	385	10 ⁹	Serum	minimaler Abszess Dünndarm 1	1	1,24	210	27	9.677
12	409	396	10 ⁹	Serum	Abszess gr. Netz 1	1	1,09	1.359	207	78.646
13	408	394	10 ⁸	PBS	Kleinste Abszesse Leberpforte 1; Abszess li. Niere 1	2	1,02	54	8	3.284
14	381	395	10 ⁸	PBS	Kleinste Abszesse gr. Netz 1,5	1,5	0,90	72	10	4.777
15	437	409	10 ⁸	PBS	Abszesse gr. Netz 2; kleinste Abszesse Leberpforte 1,5	3,5	1,11	34	2	1.216
16	385	364	10 ⁸	PBS	gr. Netz verklumpt 1; Abszesse vor der Milz 2; kleinster Leberabszess 1	4	0,95	51	8	3.447
17	461	423	10 ⁸	PBS	Abszess Leberpforte 1; mult. Kleine Abszesse und Verklebungen gr. Netz 2	3	1,03	33	5	2.014
18	438	441	10 ⁸	PBS	Abszesse gr. Netz 2; zwei kleinste Abszesse Leberpforte 1	3	1,02	22	4	1.519
19	420	426	10 ⁸	Serum	Ohne Befund 0	0	0,87	17	9	3.074
20	402	403	10 ⁸	Serum	Abszess Leberpforte 1	1	0,75	68	5	3.933
21	471	446	10 ⁸	Serum	Abszesse und Verklebungen gr. Netz 3	3	0,96	44	72	19.895
22	454	457	10 ⁸	Serum	Gr. Netz an Spitze verklebt 1	1	1,05	105	8	4.404
23	381	387	10 ⁸	Serum	Gr. Netz verklebt 1; Abszesse vor der Milz 2	3	0,99	62	6	3.080
24	382	382	10 ⁸	Serum	Gr. Netz an Spitze verklebt 1, keine Infektion	1	0,78	90	4	4.166

IV. Diskussion

Nosokomiale Infektionen verursacht durch multiresistente Bakterien stellen unter medizinischen und ökonomischen Aspekten ein ernstzunehmendes Problem für jedes Krankenhaus dar. Die Neuentwicklung von Antibiotika stößt aufgrund der raschen Entwicklung von Resistenzen immer öfter an ihre Grenzen. Die Immuntherapie ist eine neue, hoffnungsvolle Therapieoption.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte dieser Ansatz verfolgt werden. Basierend auf den Ergebnissen von Lorenz et al.⁴⁹ wurden zwei immundominante Antigene (IsaA und IsaB), gegen die Patienten, die eine MRSA Sepsis hatten, Antikörper bildeten, ausgewählt. Diese wurden exprimiert, aufgereinigt und konzentriert. Anschließend wurde ein Kaninchen mit IsaA immunisiert und mit dem so gewonnenen polyklonalen Antikörper eine erste Reihe an Tierversuchen durchgeführt. Ziel war es herauszufinden ob das beim MRSA-Sepsispatienten als immundominant identifizierte Antigen IsaA als Target für eine Immuntherapie geeignet ist. Aus den Vorarbeiten von Lorenz und Geis (siehe unten) konnte dies vermutet werden, sollte nun aber in einem Sepsis-Peritonitis-Modell an Ratten bestätigt werden. Dies ist einer der ersten Versuche, Antigene, die bei Patienten als immundominant identifiziert worden sind, zur Immuntherapie gegen *S. aureus* einzusetzen.

Nosokomiale Infektionen sind ein seit langer Zeit bekanntes Problem. Bereits Semmelweis⁵⁰ gelang in den 1840er Jahren der Nachweis von nosokomialen Infektionen, indem er feststellte, dass von Medizinstudenten, die auch bei Sektionen anwesend waren, Infektionen auf Frauen im Kreißsaal übertragen wurden. Nachdem sich diese mit Chlorkalk die Hände waschen mussten, bevor sie den Kreißsaal betraten, verringerte sich die Sterblichkeitsrate der Frauen von 12,3% auf 1,3%. Im Jahre 1858 berichtete Rudolph Virchow über 83 Todesfälle von Puerperalfieber in 18 Monaten in den Wochensälen der Charité, woraufhin er ein häufigeres Lüften empfahl.

Nach NIDEP 1⁵¹, einer Studie zur Erfassung nosokomialer Infektionen in Deutschland von 1994, waren die drei häufigsten Erreger *E. coli* (22,4%), *Enterococcus* sp. (14,8%) und *Staphylococcus aureus* (11,7%). Die wichtigsten Erreger von nosokomialen Infektionen sind jeweils von der Infektionsart abhängig. Bei nosokomialen Pneumonien auf Intensivstationen dominieren aktuell *Staphylococcus aureus* (21,3%/ davon MRSA 34,7%), *Pseudomonas aeruginosa* (18,1%) und *Klebsiella* spp. (12,6%), bei den Fällen von Katheter-assoziiierter Sepsis sind es koagulasenegative Staphylokokken (33,5%), *S. aureus* (13,8%/MRSA 37,4%) und Enterokokken (13,7%), und nosokomiale Harnwegsinfektionen werden vor allem durch *Escherichia coli* (27,0%), Enterokokken (26,2%) und *P. aeruginosa* (14,1%)⁵² hervorgerufen. Bei den Wundinfektionen gibt es Unterschiede je nach Operationsgebiet. Insgesamt findet man vor allem *S. aureus* (25,3%/MRSA 19,6%), *E. coli* (13,4%) und Enterokokken (13,0%)⁵³.

Die in den Jahren 1995 bis 1998 durchgeführte NIDEP-2-Studie⁵⁴ konnte nachweisen, dass durch geeignete Maßnahmen des Qualitätsmanagements in deutschen Krankenhäusern eine Reduktion um ca. ein Drittel der nosokomialen Infektionen erreicht werden kann. Der aktuellste Bericht des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS)⁵⁵ bestätigt diese Studie.

1. Immuntherapie – neue Wege in der Behandlung von Infektionskrankheiten

Vor mehr als einhundert Jahren wurde bereits entdeckt, dass Mäuse bestimmte Antikörper entwickeln, wenn man ihnen ein infektiöses Agens injiziert. Man hoffte, mit diesen Antikörpern auch Menschen, die an der gleichen Infektion litten, helfen zu können. Dies führte aber zu immensen Immunreaktionen bei den Betroffenen. Die Struktur der Mausantikörper war zu verschieden von menschlichen und wurde bis auf eine Ausnahme vom menschlichen Immunsystem als fremd erkannt und eliminiert - in einigen Fällen kam es sogar zu fatalen allergischen Reaktionen, bevor er seine Wirkung entfalten konnte. Die Ausnahme bildet der 1986 zugelassene

monoklonale Mausantikörper OKT3, der seither zur Immunsuppression nach Organtransplantation eingesetzt wird. Er bindet ein Glykoprotein auf T-Zellen und blockiert somit die zelluläre Immunantwort, weshalb er Abstoßungsreaktionen gegen transplantierte Organe stark reduziert.

Da die Herstellung humaner monoklonaler Antikörper auf Grund nicht vorhandener geeigneter humaner Myelomzellreihen zu dieser Zeit noch nicht praktikabel war, setzten Wissenschaftler Maus- und Menschenantikörper im Verhältnis von circa 30 zu 70 zusammen, was aber immer noch keinen zufriedenstellenden Erfolg erbrachte. Der Durchbruch gelang der Arbeitsgruppe von Greg Winter⁵⁶ vom UK Medical Research Council's Laboratory of Molecular Biology (LMB) 1986 durch eine Reduzierung der Mauskomponente chimärer Antikörper auf 5-10%. Drei Aminosäureschleifen in der sogenannten variablen Region in jedem Arm des Antikörpers waren die eigentliche Antigen-Antikörper-Bindungsstelle. Deshalb ersetzte Winter alles außer diesen drei Schleifen durch menschliche Sequenzen. Der resultierende „humanisierte“ monoklonale Mausantikörper schien dem menschlichen Immunsystem zu entkommen.

Winters Technik, bekannt als „chimaeric-antibody technology“, wurde von der Biotechnik-Industrie aufgenommen und führte 1994 zur ersten Marktzulassung eines auf diese Weise hergestellten Antikörpers, ReoPro[®], der das Risiko von Blutgerinnseln bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen verringert, indem er ein Rezeptorprotein auf der Oberfläche von Thrombozyten blockiert. 1997 dann brachte die Firma Roche aus Basel den ersten rein humanen Antikörper, Zenapax, auf den Markt, der Organabstoßungen unterdrückt, indem er einen Rezeptor auf aktivierten Leukozyten bindet und inhibiert, die die Abstoßungsreaktion stimulieren.

Die Vielfalt möglicher Targets, die von Firmen aus der Genom- und Proteomforschung bisher identifiziert wurden, ist zwar enorm, jedoch lag das Hauptaugenmerk der Forschung bislang noch im Bereich der Onkologie.^{57,58,59,60}

Durch die ansteigende Zahl an Patienten, die an bakteriellen Infektionen versterben, benötigen Ärzte dringend bessere Behandlungsmethoden, und Krankenkassen werden wahrscheinlich bereit sein, Mehrkosten für Therapien aufzuwenden, die nachgewiesenermaßen Leben retten und die Liegedauer im Krankenhaus verkürzen.

Aktive und passive Immunisierung:

Eine auf Antikörpern-basierende Therapie gegen Bakterien kann sowohl aktiv als auch passiv erfolgen. Bei der aktiven Immunisierung wirken traditionelle Impfstoffe, indem Patienten abgeschwächten Immunogenen von pathogenen Bakterien oder Viren oder rekombinant hergestellten Antigenen ausgesetzt werden. Diese bewirken im Immunsystem die Produktion einer Reihe von antipathogenen (polyklonalen) Antikörpern. Dieser Ansatz ist ideal für Gesunde, funktioniert bei Immunsupprimierten oder bei Patienten, die bereits eine Infektion haben, jedoch weniger gut.

Bei der passiven Immunisierung werden polyklonale oder monoklonale Antikörper direkt appliziert. Die Antikörper binden an ein pathogenspezifisches Antigen und lösen anschließend immunologische Effektormechanismen wie die Aktivierung des Komplementsystems und/ oder die Anregung zur Phagozytose aus. Antikörper können beispielsweise sowohl exponiertem Krankenhauspersonal zur Prophylaxe als auch Patienten mit bereits aktiver Infektion appliziert werden.

Paul Ehrlich berichtete bereits im Jahre 1900⁶¹ darüber, dass bei einer Serumtherapie Komplement benötigt werde. In seiner Croonian-Lecture⁶² vermutete er überdies, dass das Immunsystem bei der Therapie von Tumoren eingesetzt werden könnte. Erst nach der Entschlüsselung des molekularen Aufbaus von Immunglobulinen durch Porter⁶³ und Edelman⁶⁴ begann die Forschung auf diesem Gebiet intensiv. Immunglobuline gehören der spezifischen bzw. humoralen Immunantwort des Organismus an. Ein Pathogen wird nach dem Eindringen in den Organismus zunächst von der unspezifischen bzw. zellulären Immunantwort getroffen (Granulozyten, Makrophagen, zytotoxische Immunzellen). Erkannt wird ein Pathogen immer von

einer antigenpräsentierenden Zelle (Dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten), die es der zellulären wie auch der humoralen Immunantwort (Aktivierung von B-Lymphozyten) zuführt. Durch klonale Selektion⁶⁵ kann die Plasmazelle einen Antikörper exprimieren, der spezifisch dem Pathogen zuzuordnen ist.

Technisch bereitet die Entwicklung einer Immuntherapie einige Probleme. 1975 stellten Köhler⁶⁶ und Milstein mit ihrer Vorstellung der Hybridomtechnik die entscheidende Weiche in Richtung Immuntherapie. Durch die Immunisierung von Mäusen mit humanen Antigenen gewann man murine Antikörper (Endung: -omab). Die so genannte „Mauskomponente“ führte jedoch zu zum Teil massiven immunologischen Reaktionen im Menschen durch Bildung von Anti-Antikörpern (HAMAs = human anti mouse antibody⁶⁷) bis hin zum anaphylaktischen Schock. In der Folge begann man, diese tierischen Antikörper zu humanisieren. Durch aufwändige gentechnische Verfahren kann einerseits der konstante Teil des murinen Antikörpers durch humane Anteile ersetzt werden. Das Fab-Fragment bleibt dabei bestehen (chimäre AK, Endung: ximab). Veihoeven und Winter^{50,68} hatten 1988 mit diesem Verfahren erste Erfolge. Werden weitere Sequenzen der variablen Domäne durch humane Anteile ersetzt, entstehen „humanisierte“ Antikörper (Endung: -zumab). Ziel der Forschung ist es, vollständig „humane“ Antikörper (Endung: -umab) zu gewinnen, um die Begleit-Immunreaktionen so gering wie möglich zu halten.

Tabelle 17: Bisher von der FDA (US Food and Drug Administration) bzw. in Deutschland, Australien und Venezuela zugelassene Antikörper (Stand 2004).^{69,70}

Antikörper	Handelsname/ Firma/ Zulassung	Ziel- antigen	Indikation	Art des Antikör- pers
Muromab	OKT3®/ Johnson&Johnson/ Juni 1986	CD 3	Transplantat- abstoßung	Murin IgG2a
Abciximab	ReoPro®/ EliLilly/ Dezember 1994	GPIIa/IIIb	Koronare Revaskularisation	Chimär fab
Edrecol- omab	Panorex®/ Centcor/ 1995 (nur Dtl.)	EpCam	Colon-Ca Stadium Dukes C	Murin
Rituximab	Mabthera®/ Genentech/ November 1997	CD 20	Rezidiviertes follikuläres B-Non- Hodgkin-Lymphom	Chimär IgG1
Daclizumab	Zenapex®/ Roche/ Dezember 1997	CD 25	Transplantat- abstoßung	Huma- nisiert IgG1
Basilii- ximab	Simulect®/ Novartis/ Mai 1998	CD 25	Transplantat- abstoßung	Chimär IgG1
Pavili- zumab	Synagis®/ MedImmune/ Juni 1998	RSV	Prophylaxe gegen RSV-Infektion	Huma- nisiert IgG1
Infiliximab	Remicade®/ Johnson&Johnson/ August 1998	TNF- α	Rheumatoide Arthritis, M. crohn	Chimär IgG1
Trastu- zumab	Herceptin®/ Genentech/ September 1998	Her2/neu	Metastasiertes Mamma-Ca	Huma- nisiert IgG1
Gemtu- zumab- Zogamicin	Mylotarg®/ American Home Products/ Mai 2000	CD 33	Rezidivierende akute myeloische Leukämie	Huma- nisiert (IgG4- Toxin gekoppelt)
Alemtu- zumab	Campath®/ Millenium Pharmaceuticals/ Mai 2001	CD 52	Chronisch lymphatische Leukämie	Huma- nisiert IgG1
Ibritum- omab- Tiuxetan	Zevalin®/ IDEC Pharmaceuticals/ Februar 2002	CD 20	Non-Hodgkin- Lymphom	Chimär (IgG1- Radionu- kleotidge- koppelt)

Omali- zumab	Xolair™/ Tanox/ Genentech/Novartis/ 2002 (Australien und Venezuela)	IgE-Fc- Fragment	Allergien	Huma- nisiert
Adalim- umab	Humira™/ Abbott/CAT/ 2003	TNF- α	Rheumatoide Arthritis	Humanes IgG1
¹³¹ I- tositumoma b	Bexxar®/ GlaxoSmithKline/Corix a/ 2003	CD 20	B-Zell-Lymphom	Murin (Radionu- kleotidege- koppelt)
Efalizumab	Raptiva®/ Serono Pharma/ 2003	CD 11a	Psoriasis	Huma- nisiert
Bevac- zumab	Avastin®/ Roche/ 2004	VEGFR	Colon-Ca	Huma- nisiert
Cetuximab	Erbitux®/ Merck/ 2004	EGFR	Colon-Ca	Chimär

In Tabelle 17 sind die bis 2004 zugelassenen Immuntherapeutika aufgeführt. Der überwiegende Anteil wird in der Onkologie eingesetzt. Einige Präparate werden zur Therapie von Autoimmunkrankheiten und Transplantatabstoßung, ein Präparat zur Revaskularisation bei koronarer Herzerkrankung eingesetzt. Dabei kommen sowohl murine, chimäre als auch humanisierte Antikörper zum klinischen Einsatz. Gegen Infektionskrankheiten findet sich hierunter bislang kein Präparat.

Bei der Behandlung von Infektionskrankheiten richtet sich der Fokus der Forschung und Entwicklung neuer Behandlungsmethoden zum überwiegenden Teil auf die Weiterentwicklung der Antibiotikatherapie. Viele Pharmafirmen vertreiben aber lediglich neue Versionen bereits existierender Antibiotikaklassen. Dieser Ansatz kann die Problematik der Resistenzentwicklung jedoch nur aufschieben, nicht aber lösen.⁷¹ Kliniker haben hohe Erwartungen an Antikörper als Therapieoption bei Patienten mit lebensbedrohlichen Infektionen zusätzlich zu Antibiotika, jedoch muss man aus wissenschaftlicher Sicht nach dem unerwarteten „Aus“ zweier hoch

gehandelter Projekte einsehen, dass man sowohl das Pathogen als auch Antikörper sowie die Pathomechanismen immunsupprimierter Patienten noch besser verstehen lernen muss, damit solche Therapien in der Klinik funktionieren können. Das eine Projekt war das polyklonale Antikörper Produkt Veronate[®] der Firma Inhibitex, das entgegen früherer Ergebnisse in einer multizentrischen Phase-III-Studie keinen Vorteil gegenüber Placebo bei Frühgeborenen hinsichtlich Krankenhaus-assoziiertes *S. aureus*-Infektionen mehr nachweisen konnte. Das zweite Projekt war der Impfstoff StaphVax[®] der Firma Nabi, die ebenfalls unerwartet in einer Phase-III-Studie vorherige Ergebnisse nicht bestätigen konnte. Nierenkranke hatten demzufolge keinen Vorteil gegenüber Placebo hinsichtlich der Reduktion von Infektionen mit *S. aureus*.

2. Fokus Staphylococcus

Die meisten Entwicklungsprojekte zu Immuntherapeutika konzentrieren sich auf Staphylokokken, insbesondere deren gefährlichsten Vertreter, *Staphylococcus aureus*. Zahlen des US-amerikanischen Systems zur Überwachung nosokomialer Infektionen (NNIS)⁷² belegen, dass multiresistente *S. aureus* (MRSA) für mehr als die Hälfte der Infektionen auf amerikanischen Intensivstationen verantwortlich sind. Der erste berichtete MRSA Fall in den USA war 1968, bis 1974 wuchs die Anzahl von MRSA unter den Staphylokokken-Infektionen auf 2%, bis 2004 auf 63%. Auch nicht resistente Infektionen mit *S. aureus* können natürlich tödlich verlaufen.

Vor der Entdeckung der Antibiotika in den 30er und 40er Jahren des 20. Jahrhunderts waren eine der besten therapeutischen Möglichkeiten für Patienten mit systemischen Infektionen Infusionen, die aus dem Serum geimpfter Pferde hergestellt worden waren. Auch heutzutage werden gepoolte humane Immunglobuline zur Behandlung bestimmter Infektionen benutzt, vor allem bei Kindern mit HIV.

Die bereits oben erwähnten Pharmafirmen Nabi und Inhibitex griffen dieses Konzept auf und entwickelten es weiter, indem sie Blut von Patienten sammelten, die relevanten Antigenen exponiert waren. Anschließend wurden diejenigen polyklonalen Antikörper aufgereinigt, die am wahrscheinlichsten von therapeutischem Nutzen zu sein schienen. Nabi stoppte 2005 jedoch sowohl sein Antikörper-Produkt AltaStaph[®] (Phase-II)⁷³ als auch seine Impfstoffprogramme, nachdem Letztere in einer Phase-III-Studie keine hochaffinen Antikörper induzieren konnten. Vermutlich gab es Probleme bei der Herstellung des Impfstoffes. Veronate[®] der Firma Inhibitex, ein Produkt hoch konzentrierter polyklonaler Antikörper, die aus dem Serum Erwachsener isoliert worden waren, und gegen Zell-Adhäsionsmoleküle von *S. aureus* gerichtet waren, konnte in den Phase-II-Studien bei Neugeborenen mit Untergewicht die *S. aureus*-induzierte late-onset Sepsis noch um 63% und die Gesamtmortalität um 36% reduzieren. In der Phase-III-Studie konnte dies jedoch, wie oben erwähnt, nicht mehr gezeigt werden. Wahrscheinlich, so Joseph Patti⁷⁴, Mitgründer von Inhibitex, können Kinder den Antikörper nicht nutzen, um eine kompetente Immunantwort zu erzeugen, weil ihr Immunsystem unreif ist und die Neutrophilen nicht ausreichend in der Lage sind, eine Infektion effektiv zu bekämpfen. Den Antikörper mit einem Zytokin zu kombinieren, um die Aktivität der Neutrophilen zu erhöhen, könnte die Effizienz des Wirkstoffes erhöhen. Inhibitex wollte hiernach eine Erwachsenenversion von Veronate herstellen, scheiterte aber daran, entsprechende Mengen polyklonalen Antikörpers herzustellen. Der neueste Fokus des Unternehmens liegt auf dem monoklonalen Antikörper (mAb) Aurexis (tefibazumab), der bei Erwachsenen mit systemischer *S. aureus* Infektion zum Einsatz kommen soll. Hieraus werden die Schwierigkeiten ersichtlich, die bei der Entwicklung einer Immuntherapie auftreten können und zu bedenken sind. Besonders wichtig ist daher die sorgfältige Vorarbeit, die insbesondere die Wahl des bzw. der Targets betrifft.

Aus den Vorarbeiten zur hier vorliegenden Arbeit von Lorenz et al. und Geis (siehe Abschnitt 4.4. IsaA und IsaB) kann geschlossen werden, dass die ausgewählten

Targets IsaA und IsaB, insbesondere in Kombination, für eine Immuntherapie gegen *S. aureus* gut geeignet sind.

Tabelle 18: Ausgewählte Antikörper-Therapien in klinischer Entwicklung gegen Pathogene

Medikament	Firma	Pathogen (Target)
Aurograb ^a (Phase III)	Neu Tec, Teil von Novartis	<i>S. aureus</i> (ABC-Transporter)
Altastaph ^b	Nabi ^c	<i>S. aureus</i> (Kapsel-Polysaccharide)
Aurexis (tefibazumab) (Phase-II)	Inhibitex ^c	<i>S. aureus</i> (Clumping Faktor A)
Pagibaximab ^d BSYX-A110 (Phase-II)	Biosynexus und GlaxoSmithKline	<i>S. aureus</i> (Lipoteichonsäure)
ABthrax (raxibacumab) (Phase-II)	Human Genome Sciences (Rockville, Maryland)	<i>B. anthracis</i> (protektives Antigen)
Anthim (ETI-204) (Phase-I)	Elusys	<i>B. anthracis</i> (protektives Antigen)
Valortim (MDX-1303) (Phase-I)	Medarex (Princeton, New Jersey) und PharmAthene (Annapolis, Maryland)	<i>B. anthracis</i> (protektives Antigen)
MDX-066 (CDA-1)	Medarex und MBL	<i>C. difficile</i> (Toxine A und B)
MDX-1388 (Phase-II) ^e	(Worcester, Massachusetts)	
ShigamAb (Phase-I) ^e	Caprion (Montreal)	Diarrhoe auslösende <i>E. coli</i> (Shiga Toxine)
^a Antikörper Fragment	^b Polyklonaler Antikörper	^c Partner zur Weiterentwicklung gesucht
^d Ausstehender Rechtsstreit mit MedImmune	^e Kombination monoklonaler Antikörper	

Das neue gegen *S. aureus* gerichtete Produkt der Firma NeuTec, Aurograb[®], ist ein Antikörper-Fragment, das an einen ABC-Transporter, der Stoffe von intra- nach extrazellulär bringt, bindet. Dieses Target wurde ausgewählt, da Patienten, die eine *S. aureus* Infektion überstanden hatten, hohe Antikörpertiter gegen dieses Protein aufwiesen. In Mäusen reduziert Aurograb die Bakterienzahl einerseits selbst, andererseits weist es synergistische Effekte zusammen mit Vancomycin auf.

Vancomycin unterbricht die Zellwandsynthese, wodurch vermehrt ABC-Transporter (intrazelluläres Molekül) dem Antikörper präsentiert wird. Gleichzeitig blockiert Aurograb das Ausschleusen von Vancomycin aus der Zelle, wodurch dieses potenter wird. Ein Antikörper-Produkt der gleichen Firma, Mycograb, das gegen systemische Infektionen mit *Candida* Spezies eingesetzt werden soll, ist in Europa bislang wegen Sicherheitsbedenken nicht zugelassen worden.

Einen interessanten Ansatz verfolgt die Firma Elusys Therapeutics, New Jersey, die „heteropolymere“ Antikörper entwickelte, die an zwei verschiedene Epitope binden können. Einerseits an den Komplement-Rezeptor 1 (CR1) – ein Protein an der Oberfläche von Erythrozyten, Makrophagen, B-Zellen und Monozyten – andererseits an Protein A, ein Oberflächenprotein von *S. aureus*. Somit wird das Pathogen entweder mit dem Erythrozyten in der Leber eliminiert oder durch Opsonierung der Phagozytose zugeführt.

3. Suche nach geeigneten Zielmolekülen (Targets) für eine Immuntherapie

S. aureus ist, wie einige Fehlversuche zeigen, schwierig zu bekämpfen. Sein Genom hat etwa 2,8 Mio. Basenpaare⁷⁵ und damit deutlich mehr als beispielsweise sein weniger gefährlicher Verwandter, *Staphylococcus epidermidis*. Einige der zusätzlichen Informationen verschlüsseln zahlreiche Virulenzfaktoren, viele davon spielen eine Rolle im Entkommen von Verteidigungsstrategien des Immunsystems. Zusätzlich hat das Bakterium ein Oberflächenprotein, das an die konstante Region von Antikörpern bindet und so den Kontakt mit anderen Mechanismen des Immunsystems umgehen kann⁷⁶. *S. aureus* kennzeichnet zudem eine große Stammvariabilität (siehe auch I. 2.3. Epidemiologie von MRSA, Tab. 1 und Tab. 4), was die Auswahl an Targets zusätzlich erschwert.

Die Verantwortlichen von Nabi, Inhibitex und NeuTec haben Targets für ihre Projekte ausgewählt, die überwiegend an der Oberfläche von *S. aureus* lokalisiert

sind. Möglicherweise reicht aber das Wissen über die verschiedenen Stämme und ihre Virulenzfaktoren, die Krankheiten verursachen, nicht aus, um geeignete Targets sicher zu identifizieren. Die Entwicklung von Immuntherapien ist oft empirisch, während die zu Grunde liegende Wissenschaft vernachlässigt wird. Man sollte Antikörper mit mehreren Mechanismen nutzen und diese mit Antibiotika kombinieren. Außerdem könnte man mehrere Antikörper, poly- wie monoklonale, miteinander kombinieren, um die Erfolgsaussichten zu erhöhen.

Es stellt sich auch die Frage ob Therapien, die auf das Immunsystem angewiesen sind, bei *S. aureus* überhaupt funktionieren können, insbesondere weil die meisten Patienten bereits Antikörper gegen den Keim haben. Zwar ist ein Drittel der Bevölkerung mit *S. aureus* besiedelt, die wenigsten davon zeigen jemals Symptome, während einige unter chronischen Infektionen leiden. Es ist nicht eindeutig geklärt ob eine Antikörper-vermittelte Immunität gegen einige wenige Targets funktionieren kann, wenn Patienten, die schon der ganzen Bandbreite an Epitopen exponiert gewesen sind, den Keim nicht besiegen können. Andererseits lässt sich argumentieren, dass Antikörper eine Reihe von Möglichkeiten bieten, auch bei Immunsupprimierten: einige Mechanismen von Antikörpern wie das Neutralisieren von Toxinen und Bakterien, Komplementaktivierung und direkte antimikrobielle Funktionen sind nämlich unabhängig von anderen Komponenten des Immunsystems des Patienten.

Die Effektivität von Antikörpern setzt allerdings voraus, dass man sowohl die Erkrankung als auch den Patienten entsprechend gut versteht und man weiß was ein Antikörper bewirken soll. Das allerdings ist nicht einfach. Bei zwei Patienten, die an der gleichen Infektion leiden, könnte der Antikörper in einem das Pathogen angreifen, im anderen jedoch eine ungewollte inflammatorische Reaktion auslösen und ihm so schaden.⁷⁷ Der Vorteil, den Antikörper besitzen, ist, dass sie viele Möglichkeiten bieten. Einige schädigen den Keim direkt, einige verstärken die Phagozytose und andere verbessern oder modifizieren das Immunsystem. Mit Antibiotika hingegen kann man einzig den Keim töten.

4. Immundominante Antigene als neue Targets

Die Entdeckung von immundominanten Targetstrukturen durch Lorenz et al., welche während einer Sepsis mit MRSA exprimiert werden, ist Grundlage eines neuen Therapieansatzes zur Bekämpfung von MRSA-Infektionen. Es handelt sich dabei um vier staphylokokkenspezifische Antigene unterschiedlicher Strukturen. IsaA (immunodominant staphylococcal antigen A) ist ein Protein mit einer Größe von 29 kDa, IsaB (immunodominant staphylococcal antigen B) 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.⁷⁸ In der vorliegenden Arbeit sollte es um die rekombinante Herstellung zweier dieser vier Proteine gehen, IsaA und IsaB. Zusätzlich wurde von IsaA ein polyklonaler Antikörper hergestellt, mit dem eine erste Versuchsreihe an Tierversuchen gestartet wurde.

Die Experimente von Wehling⁷⁹ (phänotypische Charakterisierungsexperimente für IsaA) und die Ergebnisse der Arbeit von Geis⁸⁰ über IsaA und IsaB zeigen, dass diese beiden Targetstrukturen das Wachstum und die Virulenz des Erregers beeinflussen. Geis untersuchte die Spezifität des polyklonalen Antikörpers, der aus der hier vorliegenden Arbeit stammt, und das Vorkommen von IsaA bei verschiedenen *S. aureus*-Stämmen und anderen Bakterienspezies. Dazu wurde mittels Western-Blot die Expression von IsaA untersucht. IsaA wurde unabhängig von der Herkunft, vom Infektionstyp oder Resistenzeigenschaften von allen *S. aureus*-Isolaten exprimiert. 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*.

Außerdem wurde von Geis eine IsaB-Mutante nach Konstruktion eines Inaktivierungsplasmides (pTG1) hergestellt. Die Mutante wurde in verschiedenen

Experimenten mit dem Wildtyp verglichen, wobei es um die mögliche Funktion des Targetproteins IsaB im Hinblick auf Wachstum und Virulenz für *S. aureus* ging. Beim Wachstum zeigte sich, dass die Mutante deutlich schneller wuchs als der Wildtyp, daher scheint IsaB wichtig für das Wachstum von *S. aureus* zu sein. In vitro wurden mögliche in vivo-Umwelteinflüsse bzw. Stressfaktoren auf das Wachstum der Stämme mittels Zusetzung von Glucose und NaCl getestet. Hier zeigte sich ein deutlicher Wachstumsvorteil des Wildtyps gegenüber der IsaB-Mutante, so dass IsaB *S. aureus* unter extremen Umweltbedingungen möglicherweise ein besseres Wachsen ermöglicht. Bei Tests zum Hämolyse- und Proteolyseverhalten der Mutante schien IsaB Einfluss auf die Expression von Hämolysinen und Proteasen zu haben, die wichtige Virulenzfaktoren von *S. aureus* sind. Die Untersuchungen zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Wildtyp und Mutante ergaben ebenfalls Unterschiede für verschiedene Antibiotika, so dass 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. Die Tatsache, dass IsaA von allen bisher sequenzierten *S. aureus*-Stämmen exprimiert wird⁸¹ und von Geis mehr als 30 Stämme mit verschiedenen Krankheitshintergrund und Resistenz (Blutkultur, Osteomyelitis, Endokarditis, MRSA, MSSA) untersucht und jeweils IsaA nachgewiesen werden konnte, deutet ebenfalls auf eine Eignung als mögliches Target hin. Insbesondere eine Kombination dieser zwei Targets erscheint günstig, einerseits ein Oberflächenprotein, das ubiquitär vorkommt (IsaA), andererseits ein Protein, das sehr wahrscheinlich einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt (IsaB).

In der vorliegenden Arbeit gelang es, die beiden Proteine IsaA und IsaB herzustellen. Es zeigte sich, dass es sich bei IsaA um ein im Zytosol in hohen Konzentrationen unlösliches Protein handelt, das wahrscheinlich mit der Zellwand assoziiert vorliegt. Erst nach spezieller Behandlung der Proteinaggregate (sogenannte inclusion bodies) konnte das Zielprotein isoliert und aufgereinigt werden. Im Gegensatz dazu konnte IsaB in hohen Konzentrationen produziert

werden. Das aufgereinigte IsaA wurde für die Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Die gewonnenen polyklonalen Antikörper wurden dann für erste präklinische Studien im Ratteninfektionsmodell eingesetzt. Dieser passive Immunisierungsversuch war der erste einer weiteren Reihe noch folgender Tierversuche. Zu diesem Zeitpunkt war die Auswahl von Zugangsweg der Infektion, Menge der Bakterien zur Induktion der Infektion, Dauer der Infektion bis zur Auswertung sowie Menge und Zugangsweg des Serums/Placebos noch experimentell zu bestimmen. Trotz dieser Einschränkungen hinsichtlich der möglichen Aussagekraft des Versuches und der relativ kleinen Stichprobengrößen – 4 Gruppen à 6 Tiere, $n = 24$ – sind die Ergebnisse doch bereits sehr aussagekräftig und viel versprechend.

Aus der statistischen Auswertung lässt sich ableiten, dass einerseits die Versuchstiere, die mit der höheren Bakterienzahl infiziert wurden, stärkere Infektionszeichen (Abschnitt III. 3.1.2., 3.1.3. und 3.1.4. Tab. 9-11, Abb. 17-19) aufwiesen als die Vergleichsgruppen, somit erscheint auch der intraperitoneale Zugangsweg geeignet; andererseits profitierten die Tiere aus den Serumgruppen – insbesondere hinsichtlich Bauchsitus, Milzgewicht und Kolonienanzahl – im Vergleich zu den Placebogruppen von der „Therapie“. Statistisch lässt sich dies am besten an dem Unterschied zwischen den Gruppen A und B (Infektion mit höherer Bakterienlast, 10^9) ablesen.

Die Serumgruppen hatten gegenüber den Kontrollgruppen einerseits ein niedrigeres Milzgewicht ($p=0,025^*$ bei A vs. B; 10^9 Bakterien; Tab. 13), andererseits aber eine deutlich höhere – bis zu Faktor 3 - Kolonienanzahl pro g Milz (keine Signifikanz; Tab 13-15). Gleichzeitig zeigte sich ein deutlicher Gewichtsunterschied beim Milzgewicht der Gruppen A und B (1,24 g bzw. 1,36 g) gegenüber den Gruppen C und D (0,90 g bzw. 1,01 g). Die Gruppen A und B wurden mit 10^9 Bakterien infiziert, die Gruppen C und D hingegen nur mit 10^8 . Das allein könnte bereits die Gewichtsunterschiede beim Milzgewicht zwischen den Gruppen erklären.

Die Milz spielt als wichtiges lymphatisches Organ bei der Immunabwehr – insbesondere beim Abbau von mit Antikörpern beladenen Erythrozyten und Thrombozyten sowie Immunkomplexen - eine wichtige Rolle. Der Unterschied im Milzgewicht kann also einerseits der Größenordnung der Infektion geschuldet sein, andererseits haben die Serumgruppen ein z.T. signifikant (s. oben) niedrigeres Milzgewicht als die Kontrollgruppen. Grund dieses Ergebnisses könnte die deutlicher ausgeprägte Sepsis in den Kontrollgruppen sein. Bei Sepsis steigt die Permeabilität von Zellmembranen stark an und Flüssigkeit wird in großen Mengen von intravasal nach extravasal verschoben. Es kann sich also bei dem höheren Gewicht der Milz in den Kontrollgruppen um Flüssigkeit handeln.

Bei Vergleich von Start-, End- und Differenzgewicht ergaben sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse (Abschnitt III. 3.1.1. Tab. 8, Abb. 16a-c). Möglicherweise war die Infektionsmenge nicht ausreichend, um hier einen statistischen Unterschied festmachen zu können. Eine zusätzliche Erklärung für einen nicht gefundenen Unterschied im Gewichtsverlauf könnte der zu kurze Beobachtungszeitraum im Tierversuch sein, um bei der kleinen Versuchsgruppengröße eine statistische Signifikanz nachweisen zu können.

Bei der Auswertung des abdominellen Infektes der Versuchstiere wurden zusätzlich Verdünnungen bei den Milzkolonien hergestellt und auf Signifikanz hin ausgewertet (siehe Tab. 16, Kapitel III. 3.4.). Wie in Abschnitt II. 2.5.4. bereits berichtet wurde zur Testung der Signifikanz ebenfalls der t-Test durchgeführt. Der t-Test ist für normalverteilte Stichproben geeignet. Alle Versuchsgruppen außer die Milzkolonien pro 100 μ l 1:10 verdünnt sowie die Mizkolonien pro g Organ waren laut Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest (K-S-Test) normalverteilt. Einschränkend muss allerdings bemerkt werden, dass der t-Test bei der kleinen Stichprobengröße nur bedingt geeignet ist. Zusätzlich wurde versuchsweise von der Signifikanzstufe „tendenziell signifikant“ ($p \leq 0,10$) Gebrauch gemacht, um in den Ergebnissen mögliche Tendenzen aufzuzeigen.

Zwischen den Gruppen A und B gab es im t-Test signifikante ($p \leq 0,05$) Ergebnisse, bei den Parametern Milzgewicht (0,021), Milzkolonien pro 100 μ l 1:1 (0,022) und bei den Milzkolonien pro g Organ (0,042). Zwischen den Gruppen C und D ergab der t-Test bei den Parametern Bauchsitus (0,06) und Milzgewicht (0,096) eine „tendenzielle“ Signifikanz. Beim Vergleich der Serum- mit den Kontrollgruppen (A+C vs. B+D) erzielten alle drei Parameter Milzkolonien „tendenzielle“ Signifikanz (0,091; 0,094; 0,062).

Wegen der oben bereits angemerkten Einschränkungen des t-Tests bei kleinen Stichprobengruppen wurde auf eine Darstellung im Ergebnisteil verzichtet. Ebenso wurde die Signifikanzstufe „tendenziell“ weggelassen, da $p \leq 0,10$ ein unüblich hoher p-Wert ist. Jedoch sei darauf hingewiesen, dass einige statistische Tests signifikant ausgefallen wären, wenn die Anzahl der Versuchstiere um ca. 50% größer gewesen wäre.

Somit scheint IsaA bereits als polyklonaler Antikörper eine therapeutische Wirkung im Tierversuch zu entfalten und scheint geeignet für einen Therapieansatz zu sein. Es bleibt weiteren Versuchen vorbehalten, dieses erste Ergebnis zu bestätigen und statistisch zu festigen, insbesondere in größer angelegten Versuchsreihen und mit monoklonalem Antikörper. Somit sind die Grundlagen für eine Weiterentwicklung der IsaA-spezifischen Antikörper gelegt. Im Weiteren wird die Humanisierung des Mausantikörpers angestrebt, um die Wirksamkeit eines humanisierten monoklonalen Antikörpers zunächst in geeigneten Tiermodellen zu bestätigen und dann in ersten klinischen Studien zu bewerten.

5. Aussichten

Auch wenn gezeigt werden kann, dass neue Antikörperprodukte Infektionen bekämpfen können, wird die Zukunft zeigen, ob sie sich auf dem Markt etablieren können. Denn obwohl ihre Nützlichkeit abnimmt, sind viele Antibiotika noch immer

preisgünstig und effektiv. Dahingegen ist der Preis für eine Antikörpertherapie hoch, weil der Markt dafür entsprechend klein ist. Obwohl einige Entwickler glauben, Targets gefunden zu haben, die gegen viele Pathogene einsetzbar sind, so werden Antikörper doch immer ein kleineres Spektrum abdecken als selbst Schmalspektrumantibiotika. Um ihre hohen Kosten zu rechtfertigen, müssen sie also dem Antibiotikum allein klar überlegen sein. Da dies bisher nicht der Fall gewesen ist und einige klinische Fehlschläge vorliegen, breitet sich Skepsis bei Forschern und Unternehmen aus.

Die Immuntherapie hat noch andere Hürden zu nehmen. Sollte ein Impfstoff für die Gesamtbevölkerung zugelassen werden, würde der Markt für einen Antikörper gegen diese Krankheit zusammenbrechen. Anders als bei chronischen Erkrankungen gibt es bei Infektionen die Möglichkeit der zeitnahen Heilung, wodurch sich die Antikörpertherapie selbst limitiert. Sollte ein Patient eine Infektion mit mehr als einem Pathogen aufweisen, besteht zudem Anlass zum Zweifel, ob eine Immuntherapie, die gegen einen spezifischen Erreger gerichtet ist, in Kombination mit Antibiotika überhaupt noch einen Vorteil bringen kann und ob man diesen wird nachweisen können. Befürworter entgegnen, dass Antikörper logistische Vorteile bieten. Spezialisten für Infektionskrankheiten hoffen auf einen Therapieansatz, der die Menge an Antibiotika reduzieren kann. Weil Antikörper weniger giftig sind als Antibiotika, könnten Ärzte sie ihren Risikopatienten eher prophylaktisch anordnen. Auf Grund der langen Halbwertszeit vollwertiger Antikörper müsste er zur Therapie deutlich seltener – einmal in 2 bis 4 Wochen – appliziert werden als Antibiotika. Diese müssen bei schweren Infektionen üblicherweise mehrmals täglich intravenös appliziert werden, wobei die Dosierung sowie die Wirkspiegel engmaschig und mit hohem logistischem Aufwand kontrolliert werden müssen. Richtig überzeugend aber können nur klinische Daten sein. Wenn gezeigt werden kann, dass ein Antikörper Leben rettet und die Liegedauer im Krankenhaus signifikant reduziert, lassen sich auch die enormen Preise der Therapie rechtfertigen. Nabi's Altastaph konnte in den Phase-I- und -II-Studien bei 40 Erwachsenen mit systemischer Infektion bei der Kombination von AK plus AB gegenüber Placebo plus AB die Liegedauer im

Median von 14 auf 9 Tage reduzieren. Nur konnten solche Ergebnisse bisher nicht in Phase-III-Studien wiederholt werden.

Zu erwarten ist im klinischen Alltag ein Gebrauch einer solchen Therapie zunächst als ultima ratio, wenn der Patient zu versterben droht. Auch dazu bedarf es aber einer Zulassung. Das hoffnungsvollste Projekt war zuletzt Aurograb der Firma NeuTec/Novartis, das jedoch Ende August 2008 nach enttäuschenden Phase-II-Studien beendet wurde. Casdevall⁸² bleibt trotzdem optimistisch. Eine Erfolgsgeschichte auf diesem Sektor, sprich Zulassung, könnte ein neues goldenes Zeitalter bedeuten sowie es in den 1940ern die Einführung der Antibiotika gewesen ist.

V. Zusammenfassung

Staphylococcus aureus ist einer der häufigsten Erreger von nosokomialen Infektionen. Diese grampositiven Bakterien verursachen neben harmlosen oberflächlichen Hautinfektionen auch lebensbedrohliche Systeminfektionen. Ein großes Problem in der Therapie von *S. aureus*-Infektionen stellen die zunehmenden Multiresistenzen dar. Die Entwicklung neuer Antibiotika wird zukünftig wahrscheinlich nicht ausreichen, 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*.

Ziel dieser Arbeit war es, zunächst zwei Proteine IsaA und IsaB herzustellen, um diese Proteine für Immunisierungsstudien zu nutzen. Zunächst wurde das gereinigte IsaA-Protein verwendet, um ein Kaninchen zu immunisieren. Mit den daraus gewonnenen Antikörpern wurden dann erste Tierversuche begonnen, um die Bedingungen für den therapeutischen Einsatz von gegen IsaA-gerichteten Antikörpern zu ermitteln und die Wirksamkeit einer Antikörper-Behandlung zu evaluieren.

Für die Herstellung der gewünschten Proteine wurden die Gensequenzen zunächst aus verschiedenen *S. aureus*-Stämmen mittels PCR amplifiziert und in den kommerziellen Expressionsvektor pQE30 kloniert. Die amplifizierte Gensequenz stammt aus den klinischen Stämmen 418 (IsaA) bzw. 134 (IsaB). Nach der Klonierung wurden geeignete Expressions- und Reinigungsstrategien entwickelt. Dabei wurden folgende Bedingungen als optimal für Wachstum und Überexpression herausgearbeitet:

IsaA: Induktion der Überexpression mit 100 μ M IPTG, 3 h Wachstum bei 37°C.

IsaB: Induktion der Überexpression mit 100 μ M IPTG, 4 h Wachstum bei 37°C.

Es stellte sich auch heraus, dass IsaA zunächst in nur unzureichender Quantität vorhanden bzw. exprimiert worden war. Die Vermutung, dass IsaA überwiegend im Pellet in sogenannten Einschlusskörpern (inclusion bodies) eingeschlossen war, erklärte dieses Phänomen. Das Protein konnte erfolgreich aus dem Pellet isoliert werden. Die Produktion und Aufreinigung beider Proteine IsaA und IsaB unter optimierten Bedingungen ergab, dass beide Proteine nun in ausreichender Menge und Konzentration für die folgende Immunisierung und die weiteren Arbeiten vorlagen. Aus Kaninchen, die mit IsaA immunisiert wurden, konnten polyklonale Antikörper gewonnen werden, die die Grundlage für einen ersten Tierversuch mit 24 Ratten bildeten. Hierbei zeigte sich, dass die Tiere, die mit 10^9 Bakterien infiziert worden waren deutlich stärkere Infektionszeichen aufwiesen als diejenigen, die mit 10^8 Bakterien infiziert worden waren. Weiterhin wurde deutlich, dass die Tiere, die Serum (mit Antikörper gegen IsaA) erhalten hatten, gegenüber den Vergleichstieren mit Placebo einen deutlichen Vorteil hinsichtlich Infektionszeichen und Immunantwort hatten. Somit belegen die tierexperimentiellen Ergebnisse in dieser Arbeit erstmalig den therapeutischen Nutzen von Antikörpern gegen IsaA. IsaA ist demnach ein geeignetes Target für eine Immuntherapie gegen *S. aureus*.

VI. Literaturverzeichnis

- ¹ **Lowy F D.** (1998). *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 339:520-532
- ² **Aksoy D Y, Unal S.** (2008). New antimicrobial agents for the treatment of Gram-positive bacterial infections. Clin. Microbiol. Infect. 14, 411-420.
- ³ **RKI.** (1996). Erste Resistenz von MRSA gegen Mupirocin in Deutschland. Epid Bull 49/96: 337–338.
- ⁴ **Götz F.** (2002). Staphylococcus and biofilms. Mol Microbiol. Mar;43(6):1367-78.
- ⁵ **Mermel LA.** (1996). Prevention of intravascular catheter-related infections. Am J Infect Control; 281:261-7.
- ⁶ **Veenstra DL, Saint S, Saha S, Lumley T, Sullivan SD.** (1999). Efficacy of antiseptic-impregnated central venous catheters in preventing catheter-related bloodstream infection: a meta-analysis. JAMA; 281:261-7.
- ⁷ **Rahib O, Darouiche RO, Berger DH, Khardori N et al.** (2005). Comparison of antimicrobial impregnation with tunneling of long-term central venous catheters. Ann Surg; 242: 193–200.
- ⁸ **Guidelins for the prevention of intravascular catheter-related infections;** http://www.sccm.org/professional_resources/guidelines/table_of_contents/Documents/preventionguidelines.pdf
- ⁹ **Lenz W, Blümel N, Bierbaum G, Herding-Sotzeck B, Shah P.M.** (2001). Resistenzentwicklung bei *S. aureus* und Typenwechsel bei MRSA-Stämmen. Chemotherapie Journal; 10. Jahrgang, Nr. 5.

¹⁰ **Kresken M, Hafner D und die Studiengruppe der PEG.** (2000). Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Chemotherapeutika in Mitteleuropa. *Chemotherapie Journal*; 9:51-86.

¹¹ **Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., Infektiologie Freiburg.** (2008). Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. GERMAP 2008.

¹² **Kipp F, Friedrich AW, Becker K, Eiff CV.** (2004). Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter Staph.-aureus Stämme: Strategien zur Kontrolle und Prävention in Deutschland. *Deutsches Ärzteblatt* Juli 12; 101(28-29): A2045-A2058.

¹³ **Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC.** (1997). Methicillin-resistant *S. aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* Jul;40(1):135-6.

¹⁴ **Cacia M, McDonald LC.** (2004). Vancomycin-resistant *S. aureus* – New York 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 53: 322–323.

¹⁵ **RKI.** (2007). *Epid. Bulletin*, Zur MRSA-Situation in Dtl. 2005 und 2006, Nr.6, 9. Feb.

¹⁶ **RKI.** (2007). *Epid. Bulletin*, Zur MRSA-Situation in Dtl. 2005 und 2006, Nr.6, 9. Feb.

¹⁷ **RKI.** (2007). *Epid. Bulletin*, Zur MRSA-Situation in Dtl. 2005 und 2006, Nr.6, 9. Feb.

¹⁸ **RKI.** (2007). *Epid. Bulletin*, Zur MRSA-Situation in Dtl. 2005 und 2006, Nr.6, 9. Feb.

¹⁹ **RKI.** (2007). *Epid. Bulletin*, Zur MRSA-Situation in Dtl. 2005 und 2006, Nr.6, 9. Feb.

²⁰ **Lode, H., Rybak, M., Zinner, S.H., Tillotson, G.S.** (2004). *New Compounds*, 2. Internationales Symposium "Resistant grampositive Infections", Berlin, 12. Dez.

²¹ **Lode, H., Rybak, M., Zinner, S.H., Tillotson, G.S.** (2004). *New Compounds*, 2. Internationales Symposium "Resistant grampositive Infections", Berlin, 12. Dez.

²² **Pelton S.I.** (2000). Acute otitis media in the era of effective pneumococcal conjugate vaccine: will new pathogens emerge? *Vaccine*; Dec 8; 19 Suppl 1:S96-9. Review.

²³ **Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani M.M, Arico B, Comanducci M, Jennings G.T, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B. et al.** (2000). Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*; 287, 1816-1820.

²⁴ **Wizemann TM, Heinrichs JH, Adamou JE, Erwin AL, Kunsch C, Choi GH, Barash SC, Rosen CA, Masure HR, Tuomanen E, Gayle A, Brewah YA, Walsh W, Barren P, Lathigra R, Hanson M, Langermann S, Johnson S, Koenig S.** (2001). Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* 69, 1593-1598.

²⁵ **Chakravarti DN, Fiske MJ, Fletcher LD, Zagursky RJ.** (2000). Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates. *Vaccine*. Nov 8; 19(6):601-12.

²⁶ **Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J, Halada P, Lamer S, Hagens K, Kaufmann SH.** (1999). Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol. Microbiol. Sep*;33(6):1103-17.

²⁷ **Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani M.M, Arico B, Comanducci M, Jennings G.T, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B. et al.** (2000). Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*; 287, 1816-1820.

²⁸ **Wizemann TM, Heinrichs JH, Adamou JE, Erwin AL, Kunsch C, Choi GH, Barash SC, Rosen CA, Masure HR, Tuomanen E, Gayle A, Brewah YA, Walsh W, Barren P, Lathigra R, Hanson M, Langermann S, Johnson S, Koenig S.** (2001). Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* 69, 1593-1598.

²⁹ **Chakravarti DN, Fiske MJ, Fletcher LD, Zagursky RJ.** (2000). Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates. *Vaccine.* Nov 8; 19(6):601-12.

³⁰ **Etz H, Minh DB, Henics T, Dryla A, Winkler B, Triska C, Boyd AP, Söllner J, Schmidt W, von Ahsen U, Buschle M, Gill SR, Kolonay J, Khalak H, Fraser CM, von Gabain A, Nagy E, Meinke A.** (2002). Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* May 14; 99(10): 6573-8. Epub May 7.

-
- ³¹ **Marchese A, Schito GC, Debbia EA.** (2000). Evolution of antibiotic resistance in gram-positive pathogens. *J Chemother.* Dec; 12(6):459-62.
- ³² **Lorenz U, Ohlsen K, Karch H, Hecker M, Thiede A, Hacker J.** (2000). Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Oct; 29(2):145-53.
- ³³ **Etz H, Minh DB, Henics T, Dryla A, Winkler B, Triska C, Boyd AP, Söllner J, Schmidt W, von Ahsen U, Buschle M, Gill SR, Kolonay J, Khalak H, Fraser CM, von Gabain A, Nagy E, Meinke A.** (2002). Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* May 14; 99(10): 6573-8. Epub May 7.
- ³⁴ **Rennermalm A, Li YH, Bohaufs L, Jarstrand C, Brauner A, Brennan FR, Flock JI.** (2001). Antibodies against a truncated *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein protect against dissemination of infection in the rat. *Vaccine.* May 14; 19(25-26): 3376-83.
- ³⁵ **Stiles BG, Garza AR, Ulrich RG, Boles JW.** (2001). Mucosal vaccination with recombinantly attenuated staphylococcal enterotoxin B and protection in a murine model. *Infect Immun.* Apr; 69(4): 2031-6.
- ³⁶ **Lang S, Livesley MA, Lambert PA, Littler WA, Elliott TS.** (2000). Identification of a novel antigen from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Nov; 29(3): 213-20.
- ³⁷ **Lorenz U, Ohlsen K, Karch H, Hecker M, Thiede A, Hacker J.** (2000). Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Oct; 29(2):145-53.

-
- ³⁸ **Leclerc C, Charbit A, Molla A, Hofnung M.** (1989). Antibody response to a foreign epitope expressed at the surface of recombinant bacteria: importance of the route of immunization. *Vaccine*. Jun; 7(3): 242-8.
- ³⁹ **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. Jan 29;239(4839):487-91.
- ⁴⁰ **Bujard H, Gentz R, Lanzer M, Stueber D, Mueller M, Ibrahimi I, Haeuptle MT, Dobberstein B.** (1987). A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods Enzymol.*; 155: 416-33.
- ⁴¹ **Stüber D, Matile H, Garotta G.** (1990). System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: Application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. In I Lefkovits, B Pernis, eds, *Immunological Methods*, Vol IV. Academic Press, New York, pp 121-152.
- ⁴² **Schwarz E, Scherer G, Hobom G, Kössel H.** (1978). Nucleotide sequence of *cro*, *cII* and part of the *O* gene in phage lambda DNA. *Nature*. Mar 30; 272(5652): 410-4.
- ⁴³ **Sutcliffe J G.** (1979). Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 43, 77-90.
- ⁴⁴ **The QIAexpressionist 06/2003™.** A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. © 2001–2003 QIAGEN.
- ⁴⁵ **Farabaugh P J.** (1978). Sequence of the *lac I* gene. *Nature* 274, 765.

-
- ⁴⁶ **The QIAexpressionist 06/2003™**. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. © 2001–2003 QIAGEN.
- ⁴⁷ **Zamenhof PJ, Villarejo M.** (1972). Construction and properties of Escherichia coli strains exhibiting -complementation of -galactosidase fragments in vivo. J Bacteriol. Apr; 110(1): 171-8.
- ⁴⁸ **Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. Aug 15; 227(5259): 680-5.
- ⁴⁹ **Lorenz U, Ohlsen K, Karch H, Hecker M, Thiede A, Hacker J.** (2000). Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant Staphylococcus aureus. FEMS Immunol Med Microbiol. Oct; 29(2):145-53.
- ⁵⁰ **Di Trocchio F.** (1998). Newtons Koffer - Geniale Außenseiter, die die Wissenschaft blamierten. Campus-Verlag, Frankfurt.
- ⁵¹ **Rüden H, Daschner F, Schumacher M.** (1995). Band 56, Schriftenreihe des Bundesministeriums für Gesundheit, Nomos Verlagsgesellschaft Baden-Baden.
- ⁵² **NRZ.** (2008). Modul ITS-KISS, Referenzdaten Jan 2003-Dez. 2007, erstellt: 21.05.2008.
- ⁵³ **NRZ.** (2008). Modul OP-KISS, Referenzdaten Jan. 2003-Dez. 2007, erstellt: 30.05.2008.
- ⁵⁴ **Rüden H, Daschner F.** (2000). Band 126 der Schriftenreihe des Bundesministeriums für Gesundheit bei, Nomos Verlagsgesellschaft, Baden-Baden.
- ⁵⁵ **RKI.** (2008). Epid. Bulletin, Surveillance nosok. Infektionen, Nr. 45, 7.Nov.

-
- ⁵⁶ **Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G.** (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*. May 29-Jun 4; 321(6069): 522-5.
- ⁵⁷ **Gura T.** (2002). Therapeutic antibodies: magic bullets hit the target. *Nature*. Jun 6; 417(6889): 584-6.
- ⁵⁸ **Lugeon C, Blanc DS, Wenger A, Francioli P.** (1995). Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *S. aureus* at a Low-Incidence Hospital over a 4-Year Period. *Infect. Control and Hosp. Epidemiol.* 16 : 260–267.
- ⁵⁹ **Sanford MD, Widmer AF et al.** (1994). Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *S. aureus*. *CID*; 19: 1123–28.
- ⁶⁰ **Ruef C.** (1995). Nosocomial Transmission of Methicillin-Resistant *S. aureus* : Possible Role of Environmental Contamination. *Med Microbiol Lett*; 4: 189–196.
- ⁶¹ **Ehrlich P.** (1900). Cellularbiologische Betrachtungen über Immunität. Bericht der Senckenbergischen Naturforschenden Gemeinde in Frankfurt am Main, 147-150.
- ⁶² **Ehrlich P.** (1900). On Immunity with Special Reference to Cell Life. *Proc. R. Soc.*; 66: 424 – 448.
- ⁶³ **Porter R R.** (1967). The structure of antibodies. *Sci. Am.*; 217: 81 – 87.
- ⁶⁴ **Edelmann G M, Gall W E, Waxdall M J, 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.

-
- ⁶⁵ **Burnet F M.** (1959). *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity.* Cambridge, University Press.
- ⁶⁶ **Köhler G, Milstein C.** (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*; 256: 495 – 497.
- ⁶⁷ **Hasholzner U, Stieber P, Meier W, Lamerz R.** (1997). Value of HAMA - determination in clinical practice – an overview. *Anticancer Res.*; 17(4B): 3055 – 3058.
- ⁶⁸ **Veihoeven M, Milstein C, Winter G.** (1988). Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science*; 239 (4847): 1534 – 1536.
- ⁶⁹ **Brekke OH, Løset GA.** (2003). New technologies in therapeutic antibody development. *Curr Opin Pharmacol.* Oct; 3(5): 544-50. Review.
- ⁷⁰ **Stern M, Herrmann R.** (2005). Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit Rev Oncol Hematol.* Apr; 54(1): 11-29.
- ⁷¹ **Eash S.** (2006). *Pharmacor. Infectious Disease. Study #2. 2006 Decision Resources, Waltham, MA in press.*
- ⁷² **Baker M.** (2006). Anti-infective antibodies: finding the path forward. *Nat Biotechnol.* Dec; 24(12): 1491-3.
- ⁷³ **Rupp ME, Holley HP Jr, Lutz J, Dicpinigaitis PV, Woods CW, Levine DP, Veney N, Fowler VG Jr.** (2007). Phase II, randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of a polyclonal anti-*Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide immune globulin in treatment of *S. aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* Dec; 51(12): 4249-54.

-
- ⁷⁴ **Baker M.** (2006). Anti-infective antibodies: finding the path forward. *Nat Biotechnol.* Dec; 24(12): 1491-3.
- ⁷⁵ **Projan SJ, Nesin M, Dunman PM.** (2006). Staphylococcal vaccines and immunotherapy: to dream the impossible dream? *Curr Opin Pharmacol.* Oct; 6(5): 473-9.
- ⁷⁶ **Projan SJ, Nesin M, Dunman PM.** (2006). Staphylococcal vaccines and immunotherapy: to dream the impossible dream? *Curr Opin Pharmacol.* Oct; 6(5): 473-9.
- ⁷⁷ **Pirofski LA, Casadevall A.** (2006). Immunomodulators as an antimicrobial tool. *Curr Opin Microbiol.* Oct; 9(5): 489-95.
- ⁷⁸ **Lorenz U, Ohlsen K, Karch H, Hecker M, Thiede A, Hacker J.** (2000). Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Oct; 29(2):145-53.
- ⁷⁹ **Wehling L.** Institut für molekulare Infektionsbiologie, Julius-Maximilian-Universität Würzburg, bisher unveröffentlichte Daten.
- ⁸⁰ **Geis T.** (2005). Molekularbiologische und immunologische Untersuchungen zu klinisch relevanten immunodominanten Antigenen von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Bakterien (MRSA) für eine Antikörpertherapie. urn:nbn:de:bvb:20-opus-18108.
- ⁸¹ www.genome.jp/kegg/

⁸² **Casadevall A.** (2006). The third age of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* May 15; 42(10): 1414-6.

VII. Anhang

1. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. med. C.-T. Germer und Herrn Professor Dr. Dr. h.c. mult. J. Hacker sowie Herrn Prof. Dr. med. M. Frosch bedanken, dass ich die vorliegende Arbeit unter Ihrer Leitung an der Klinik & Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Gefäß- und Kinderchirurgie und am Institut für Molekulare Infektionsbiologie anfertigen durfte.

Vielen Dank an und Prof. Dr. Dr. B. Sinha, dass sie sich als Gutachter dieser Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Knut Ohlsen, der mir als Betreuer diese Arbeit möglich gemacht hat und mich zu jeder Zeit mit vollstem Engagement unterstützte und ermutigte. Dafür verdient er große Anerkennung.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. Udo Lorenz für die tatkräftige Hilfe und vielen guten Ideen bei der Umsetzung der Arbeit. Insbesondere möchte ich der Arbeitsgruppe „Staphylokokken“ am Institut für Molekulare Infektionsbiologie sowie meinen Kollegen Tanja Geis und Lucas Wehling danken. Auch den gesamten Labormitarbeitern gilt mein Dank für die Hilfsbereitschaft und nette Atmosphäre während der Zeit im Labor.

Danke auch an Friederike Seckel für ihre aufmunternden und verständnisvollen Worte besonders während der letzten Wochen der Fertigstellung der Arbeit.

Zuletzt bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, die mir nicht nur mein Medizinstudium ermöglichten, sondern mich auch stets liebe- und verständnisvoll in meinem Leben unterstützten.

VIELEN DANK!

2. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Bourdet
Vorname	Patric
Geburtsdatum	03. Oktober 1975
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Adresse	

Telefon

E-Mail

Schule

1982-86	Grundschule Knaurstrasse Hamburg
1986-95	Gelehrtenschule des Johanneums Hamburg Sprachen: Latein, Englisch, Altgriechisch Leistungskurse: Mathematik, Altgriechisch Abitur Juni 1995

Zivildienst

1995-96	Rettungssanitäter beim ASB Hamburg
---------	------------------------------------

Studium

1996-97	Politik, Soziologie und BWL an der Hochschule für Wirtschaft und Politik Hamburg (1 Semester)
1997-2004	Humanmedizin an der Bayerischen Julius- Maximilians-Universität Würzburg Staatsexamen Juni 2004

Praktische Tätigkeiten

1995-2004

regelmäßiges Arbeiten als Rettungs-
sanitäter und Taxifahrer in Hamburg und
Würzburg

Famulaturen

Innere Medizin:

Israelitisches Krankenhaus, Hamburg

Chirurgie:

Israelitisches Krankenhaus, Hamburg

Anästhesie:

Tagesklinik Altona, Hamburg

Radiologie:

Praxis Dr. med. Keil, Würzburg

Praktisches Jahr

Innere Medizin:

Hämato-Onkologische Therapieambulanz
der Poliklinik der Universität Würzburg

Chirurgie:

Unfall- und Visceralchirurgie am
Juliuspital Würzburg

Anästhesie:

Spital Oberengadin, Samedan, Schweiz

Ärztliche Tätigkeit

Seit 1. Oktober 2004

Assistenzarzt in der Abteilung für
Anästhesie, Intensiv- und Notfallmedizin
am Klinikum Meiningen

April 2008

Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

Fremdsprachen

Englisch fließend, Französisch Grund-
kenntnisse, Latein und Altgriechisch

Persönliche Interessen

Ski- und Snowboard, Kitesurfen, Reisen

Meiningen, 3. Januar 2009

Patric Bourdet