

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski

**Entwicklung eines Systems zur Untersuchung der  
antimikrobiellen Eigenschaften von Implantatmaterialien zur  
Prävention von Implantat-assoziierten  
Staphylokokkeninfektionen**

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

2013

Vorgelegt von:

**Tobias Eggert**

Geboren am 02.12.1983 in Herford

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski; Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene; Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hubert Bahl; Institut für Biowissenschaften/Mikrobiologie; Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Ivo Steinmetz; Friedrich Loeffler Institut für Medizinische Mikrobiologie; Universität Greifswald

Datum der Einreichung: 20.09.2013

Datum der Verteidigung: 13.01.2015

**Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung .....	1
1.1. Implantat-assoziierte Infektionen .....	1
1.1.1. Definition und epidemiologische Bedeutung.....	1
1.1.2. Ätiologie und Pathogenese – Rolle der Staphylokokken.....	3
1.1.3. Bedeutung der Biofilme .....	6
1.1.4. Strategien zur Prävention der Implantat-assoziierten Infektion.....	9
1.2. Kupfer – Spurenelement und antibakterielles Agens .....	11
1.3. Fluorochrome – Anwendungsmöglichkeiten und Bedeutung .....	13
1.4. Ziele der Arbeit und zentrale Fragestellungen .....	15
2. Material und Methoden .....	16
2.1. Bakterienstämme .....	16
2.2. Plasmide.....	16
2.3. Primer .....	17
2.4. Nährmedien .....	17
2.5. Medienzusätze .....	18
2.5.1. Humanserum .....	18
2.5.2. Kupfersulfat-Lösung .....	18
2.5.3. Antibiotika .....	18
2.7. Testkörper.....	19
2.7.1. unbehandelte Testkörper .....	19
2.7.2. Beschichtungen und Oberflächenmodifizierungen.....	20
2.7.2.1. Plasma-Immersion-Ionenimplantation (nach Mändel und Rauschenbach, 2000).....	20
2.7.2.2. Niederdruckplasma-Polymerisation (nach Finke <i>et al.</i> , 2007; Schröder <i>et al.</i> , 2010).....	21
2.8. Chemikalien, Enzyme und Kits .....	21
2.9. Geräte und Software .....	23
2.10. Stammhaltung.....	24
2.11. Messung der optischen Dichte – Wachstumskurven.....	25
2.12. Bestimmung der MHK von CuSO <sub>4</sub> für <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> .....	25
2.12.1. Lebendkeimzahlbestimmung .....	25
2.13. Untersuchung der Implantatoberflächen .....	26

2.13.1. Protokoll zur Biofilmbildung auf Testkörpern .....	26
2.13.1.1. Bestimmung der planktonischen Bakterien.....	26
2.13.1.2. Bestimmung der adhärennten Bakterien .....	26
2.13.1.3. Mikroskopie der Testkörper .....	27
2.13.1.4. Untersuchung des Bakterienwachstums auf Testkörpern unter Zusatz von CuSO <sub>4</sub> .....	27
2.13.2. Methoden zur Untersuchung der Testkörper .....	27
2.13.2.1. Fluoreszenzmikroskopie.....	27
2.13.2.2. Rasterelektronenmikroskopie .....	28
2.14 Molekularbiologische Methoden .....	28
2.14.1. Isolierung von Plasmid-DNA .....	28
2.14.1.1. Plasmid-Minipräparation aus <i>E.coli</i> .....	28
2.14.1.2. Plasmid-Minipräparation aus <i>S.aureus</i> .....	28
2.14.2. PCR .....	29
2.14.3. Enzymatische Modifikation von DNA .....	30
2.14.3.1 Restriktion von DNA .....	30
2.14.3.2. Dephosphorylierung mit SAP .....	30
2.14.3.3. Ligation .....	30
2.14.4. Agarosegelelektrophorese .....	31
2.14.5. DNA – Transfer in <i>E. coli</i> .....	31
2.14.5.1. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> – Zellen.....	31
2.14.5.2. Hitzeschocktransformation kompetenter <i>E. coli</i> – Zellen .....	32
2.14.6. DNA – Transfer in Staphylokokken .....	33
2.14.6.1. Herstellung elektrokompetenter Staphylokokken .....	33
2.14.6.2. Elektroporation von elektrokompetenten Staphylokokken .....	34
2.14.6.3. Herstellung des Phagenlysates .....	35
2.14.6.4. Phagentransduktion mit dem <i>S. aureus</i> – Phagen 85 .....	36
2.14.7. Sequenzierung.....	37
3. Ergebnisse .....	38
3.1. Unbehandelte Titanplättchen als Referenz für <i>in vitro</i> Oberflächenuntersuchungen....	38
3.1.1. Untersuchungsstandard mit 10 <sup>6</sup> KBE/ml .....	38
3.1.2. Einfluss des Ausgangsinokulums auf die Biofilmbildung.....	42
3.1.3. Einfluss der initialen Kulturbedingungen auf das planktonische und Biofilmwachstum .....	44

3.2. Bakterizide Wirkung von Kupfer auf Staphylokokken .....	45
3.2.1. Minimale bakterizide und minimale Hemmkonzentration von CuSO <sub>4</sub> .....	46
3.2.2. Einfluss der MHK von CuSO <sub>4</sub> auf das Staphylokokkenwachstum .....	49
3.2.3. Einfluss der MBK von CuSO <sub>4</sub> auf planktonische Staphylokokken und etablierte Staphylokokkenbiofilme .....	51
3.3. Oberflächenbeschichtungen und Oberflächenmodifikationen .....	55
3.3.1. Plasma-polymerisiertes Allylamin und Acrylsäure auf Titanprobekörpern .....	55
3.3.2. Plasma-polymerisiertes Allylamin auf Kupferplättchen.....	57
3.3.2.1. Bakterizidie in Abhängigkeit von der Cu <sup>2+</sup> -Konzentration.....	60
3.3.3. Plasma-Immersionen-Ionen-Implantation.....	61
3.4. Herstellung Fluorochrom-exprimierender Staphylokokken .....	64
3.4.1. Plasmidtransformation pHOM10 (GFP-Expressionsplasmid).....	64
3.4.2 Konstruktion zweier Fluorochromexpressionsplasmide.....	65
3.4.3. Mikroskopie der Fluorochrom-produzierenden Staphylokokken auf Probekörpern .....	71
4. Diskussion .....	74
4.1. Charakterisierung des Wachstums von Staphylokokken auf Implantatoberflächen <i>in vitro</i> – Modell zur Testung antibakterieller Oberflächen .....	74
4.2. Einfluss von Kupfer auf die planktonische und Biofilmfraktion typischer Erreger periprothetischer Infektionen.....	77
4.3. Kombination von PIII und Plasmapolymerisation zur Prävention der Implantat-assoziierten Infektion.....	80
4.4. Optimierung der Fluoreszenzmikroskopie mittels Fluorochrom-produzierenden Staphylokokken .....	85
5. Zusammenfassung .....	89
6. Thesen .....	90
7. Abkürzungsverzeichnis .....	91
8. Abbildungsverzeichnis .....	94
9. Tabellenverzeichnis.....	98
10. Literaturverzeichnis.....	99
11. Danksagung.....	110
12. Lebenslauf.....	111
13. Selbstständigkeitserklärung.....	113

## 1. Einleitung

### 1.1. Implantat-assoziierte Infektionen

#### 1.1.1. Definition und epidemiologische Bedeutung

Zur Infektion eines Fremdkörpers im menschlichen Körper kommt es nach Ansiedlung von Bakterien auf der Fremdkörperoberfläche und deren Organisation in einem Biofilm, d.h. der Ausbildung von Mikrokolonien in einer selbstproduzierten Matrix (Gristina, 2004/1987).

Generell kann bei diesen Infektionen unterschieden werden zwischen Fremdkörpern, die nur intermittierend in den Körper eingebracht werden, wie z.B. Venenverweil- oder Blasenkathetern, und denen, die dauerhaft eine Funktion im menschlichen Körper übernehmen sollen, wie z.B. den orthopädischen Implantaten. In der vorliegenden Arbeit wird sich mit den Infektionen unfallchirurgischer/orthopädischer Implantate befasst und in diesem Zusammenhang der Begriff Implantat-assoziierte Infektion oder periprothetische Infektion verwendet.

Dabei hat die Infektion 1. den Entzündungsprozess, lokal oder systemisch, und 2. den Funktionsverlust der Prothese zur Folge. Die Symptomatik der Fremdkörperinfektion orthopädischer Implantate reicht von beschwerdefrei, über nur leichte lokale Symptomatik, wie etwa Rötung und Überwärmung, bis hin zu schwerem lokalem Erscheinungsbild, wie Wunddehiszenz mit Fistelbildung und septischem generalisiertem Krankheitsbild (Zimmerli *et al.*, 2004; Militz und Bühren, 2010). Für den Patienten bedeutet dies Schmerzen unterschiedlicher Stärke, teilweisen oder sogar vollständigen Funktionsverlust des betroffenen Abschnittes des Bewegungsapparates und natürlich eine intensive medizinische Behandlung mit daraus resultierender Einschränkung der Lebensqualität.

Bei diesen Infektionen können die intermittierend eingebrachten Materialien, und damit der Infektionsherd, in der Regel auf Dauer entfernt werden. Die Infektion der orthopädischen Implantate, bedingt durch die Notwendigkeit des Verbleibes im Körper und die schlechte Therapierbarkeit (siehe 1.1.3.), erfordert meist einen Wechsel des Implantats durch einen operativen Eingriff. In dieser Reimplantationsoperation kommt zu den generellen Risiken einer Operation die Tatsache hinzu, dass das Einsetzen einer neuen Endoprothese mit einem deutlich höheren Risiko einer Infektion - i.d.R. einer Reinfektion - von über 15 % gegenüber ca. 1 % bei der initialen Implantation einhergeht (Lehner *et al.*, 2009; Militz und Bühren, 2010). Deshalb zeigt die zweizeitige Revision, also das Entfernen der infizierten Prothese und

das Einsetzen einer Neuen in zwei zeitlich getrennten Operationen, unter allen möglichen chirurgischen Optionen die besten Heilungsraten (Darouiche, 2004). Bei Diagnose einer Implantat-assoziierten Infektion ist eine schnelle und zielgerichtete Therapie einzuleiten, um die Ultima Ratio der therapeutischen Optionen, die Amputation des betreffenden Gelenkes als lebensrettende Maßnahme (Zimmerli *et al.*, 2004; Militz und Bühren, 2010), zu umgehen.

Der Nutzen aller dieser medizinischen Implantate liegt unbestritten in der Versorgung von Patienten mit Störungen und Erkrankungen des Bewegungsapparates. In den USA werden jährlich über 500.000 Hüft- und Kniegelenke ersetzt (Brady *et al.*, 2009). Im Jahre 2006 waren es sogar annähernd 800.000 (Del Pozo und Patel, 2009). In Deutschland wurden im Jahr 2007 über 150.000 Hüft- und über 130.000 Knieendoprothesen implantiert (Militz und Bühren, 2010). Die Infektionsinzidenz liegt je nach Studie zwischen 0,5 und 1,5 %, wobei die Rate bei Reimplantation nach periprothetischer Infektion auf 20 % bis 40% steigen kann (Militz und Bühren, 2010; Trampuz und Zimmerli, 2005). „Bei einer Anzahl von jährlich etwa 180.000 Hüft- und 125.000 Knieprothesen in Deutschland muss daher bei einer angenommenen durchschnittlichen Infektionsrate von 1,5 % mit 4500 periprothetischen Infektionen im Jahr gerechnet werden“ (Lehner *et al.*, 2009). Mit aktuell zur Verfügung stehenden Mitteln ist die Behandlung dieser Infektionen äußerst schwierig. Schätzungen aus dem Jahre 1996 bemessen die Kosten pro Patient mit Implantat-assoziiierter Infektion auf über \$ 50.000 (Hebert *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wurde außer den Kosten für die Klinik unter anderem auch der Mehrarbeitsaufwand für den Chirurgen kalkuliert. So ergab die Untersuchung, dass „die Behandlung eines infizierten Knies 3 bis 4 mal die Arbeit, das Risiko und die Ressourcen gegenüber einer primären Kniearthroplastie“ erfordert. Haenle *et al.* (2012a und 2012b) haben in zwei kürzlich erschienenen Studien die Kosten für die Therapie der infizierten Knie- und Hüfttotalendoprothese an einer deutschen Universitätsklinik berechnet. Sie beliefen sich auf über 25.000 € pro Patient. Außerdem wurde das durchschnittliche Defizit errechnet, das entsteht, weil die anfallenden Kosten durch das System der Diagnosis-related Groups (DRG) nicht vollständig gedeckt werden. So belief sich das Defizit für die Knieendoprothesen auf 6.356 € pro Patient und für die Hüfttotalendoprothese auf 12.685,60 € pro Patient.

Periprothetische Infektionen durch Antibiotika-resistente Bakterien, wie z.B. MRSA oder MRSE, stellen noch höhere Anforderungen an die Therapie als die Infektionen durch Antibiotika-sensible Keime dar (siehe 1.1.2.) und sind verbunden mit einer deutlichen Kostensteigerung von im Mittel ca. \$ 68.000 auf \$ 107.000 pro Infektion (Parvizi *et al.*,

2010). Darouiche (2004) gibt 1,8 Mrd. Dollar für die Kosten an, die durch infizierte Osteosynthesematerialien und Endoprothesen in den USA pro Jahr entstehen.

Zusammenfassend steht die Implantat-assoziierte Infektion also unmittelbar in Zusammenhang mit einer erheblicher Einschränkung der Lebensqualität für den einzelnen Patienten, die im Extremfall die Amputation der betroffenen Extremität beinhaltet und mit einem erheblichem Arbeitsmehraufwand für das behandelnde Personal sowie einem zusätzlichem Ressourcenaufwand mit daraus resultierenden enormen zusätzlichen Kosten für die Volkswirtschaft.

Die Bekämpfung dieser schweren Infektion durch Prävention oder Therapie ist deshalb sowohl für das Individuum als auch für die Gesellschaft von großer Bedeutung.

### **1.1.2. Ätiologie und Pathogenese – Rolle der Staphylokokken**

Eine Implantat-assoziierte Infektion kann entstehen, wenn es an den Implantatoberflächen, an denen die Gewebeintegration stattfinden soll, zur Ansiedlung von mikrobiellen Infektionserregern (siehe 1.1.3.) anstatt von Osteo- oder Fibroblasten kommt. Auf diesen Oberflächen gelingt den Infektionserregern schneller die Ausbildung eines Biofilmes als den körpereigenen Zellen die Ausbildung einer Zellschicht, weshalb dieser entscheidende „Wettlauf“ von Anthony G. Gristina als sogenannter „race for the surface“ beschrieben wurde (Gristina, 2004/1987). Dabei kommen drei möglich Wege der Implantatbesiedlung in Frage: die direkte Inokulation auf das Implantat während der Operation, die Ausbreitung per continuitatem von einem umliegenden entzündlichem Herd, oder die hämatogene Absiedelung nach Einsetzen des Implantates (Geipel und Herrmann, 2004). Die sich daraus entwickelnden Implantat-assoziierte Infektion lässt sich einteilen in die akute fulminante (Früh-) Infektion (Beginn bis 3 Monate postoperativ), die verzögerte Infektion (bis 24 Monate postoperativ) und die späte hämatogene Infektion (später als 24 Monate postoperativ) (Coventry, 1975; Fitzgerald *et al.*, 1977) (siehe Abb. 1).

Classification	Onset of infection after implantation		Pathogenesis	Typical microorganisms
	prosthetic joint infections	infections associated with fracture fixation devices		
Early infection	<3mo	<2wk	During implant surgery or the following 2–4d	Highly virulent organisms such as <i>Staphylococcus aureus</i> or Gram-negative bacilli
Delayed infection	3–24mo	2–10wk	During implant surgery with delayed manifestation	Less virulent organisms such as coagulase-negative staphylococci or <i>Propionibacterium acnes</i>
Late infection	>24mo	>10wk	Predominantly caused by haematogenous seeding from remote infections	Typically caused by virulent microorganisms such as <i>S. aureus</i> , $\beta$ -haemolytic streptococci or Gram-negative bacilli

**Abb. 1: Klassifikation der Implantat-assoziierten Infektionen anhand des Beginns der Symptome nach Implantation (aus Trampuz und Zimmerli, 2006)**

Die Dauer von der Besiedlung des Implantates bis zur Manifestation ist dabei abhängig von der Virulenz des Erregers. Die akuten fulminanten Infektionen werden häufiger von virulenten Staphylokokken, nämlich *Staphylococcus aureus*, verursacht, während die verzögerten von den weniger virulenten Koagulase-negativen Staphylokokken, z.B. *Staphylococcus epidermidis*, verursacht werden (Zimmerli *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2006; Trampuz und Zimmerli 2006).

Die Symptomatik der einzelnen Infekttypen ist dabei sehr unterschiedlich. Während bei der akuten fulminanten Infektion alle klassischen Zeichen einer Entzündung (*Rubor, Calor, Tumor, Dolor, functio laesa*) angetroffen werden können, zeigen die späten Infektionen häufiger keine typischen Infektionszeichen, sondern fallen vielmehr durch Implantatversagen auf (Zimmerli *et al.*, 2004). Wenn zusätzlich zur fehlenden Entzündungssymptomatik keine Erreger isoliert werden können, spricht man von einer „aseptischen Lockerung“. Sicher ist, dass Implantatversagen auch ohne mikrobiologisches Agens auftritt, jedoch wird in der Wissenschaft gerade darüber diskutiert, ob nicht zumindest ein Teil der bisher unter aseptischer Lockerung zusammengefassten Erkrankungen doch den Protheseninfektionen zuzuschreiben ist und in Zukunft durch neue diagnostische Methoden erfasst werden könnte (Smeltzer *et al.*, 2009). Damit würden die Inzidenz und damit die Bedeutung der Implantat-assoziierten Infektion zunehmen.

Die häufigsten Erreger, die für die Implantat-assoziierte Infektion verantwortlich sind, sind mit 75 % die Gruppe der Staphylokokken (Segawa *et al.*, 1999). Unter den Staphylokokken sind die Koagulase-negativen Staphylokokken, insbesondere *S. epidermidis*, mit 30 bis 43 % vor *S. aureus* mit 12 bis 23 % die wichtigsten Erreger dieser Infektion (Zimmerli *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2006). Die früher als apathogener Kommensale der Haut angesehene Spezies *S. epidermidis* wird durch die Anwesenheit eines Fremdkörpers zu einem potenten Pathogen „transformiert“ (Gristina, 2004/1987). Ihre Fähigkeit hochentwickelte Biofilme auf

künstlichen Oberflächen zu bilden, macht sie zu einer der erfolgreichsten Verursacher der Fremdkörper-assoziierten Infektion (McCann *et al.*, 2008). Während sich *S. epidermidis* auf der Haut jedes Menschen befindet, besiedelt *S. aureus* die Nasenvorhöfe, teilweise permanent, teilweise intermittierend, von ca. 20 bis zu 40 % der Bevölkerung (Williams, 1963; Bode *et al.*, 2010). Von dort aus kann es zu einer endogenen Bakteriämie kommen (von Eiff *et al.*, 2001), die Grundlage für eine späte hämatogene Implantat-Infektion sein kann, wenn das Implantat nicht vollständig von Wirtszellen besetzt ist und eine freie Oberfläche die Ausbildung eines Biofilms ermöglicht.

Weitere mögliche Erreger der periprothetischen Infektion sind *Enterococcus* sp. (3 bis 7 %), *Streptococcus* sp. (9 bis 10 %), *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter* sp. (3 bis 6 %), *Mycobacterium* sp., Anaerobier und unter den Pilzen vor allem *Candida* sp. (Zimmerli *et al.*, 2004).

Ein immer wichtiger werdender Erreger im Krankenhausalltag ist der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Diese gegen Oxacillin und im unterschiedlichem Ausmaß gegen andere Antibiotika resistenten Bakterien sind die am häufigsten nosokomial erworbenen bakteriellen Pathogene (Grundmann *et al.*, 2006). In den USA gewinnen MRSA auch im ambulanten Bereich an Bedeutung. Dort sind sie am häufigsten verantwortlich für ambulant erworbene Haut- und Weichteilinfektionen, sogenannte „community-associated“ MRSA (CA-MRSA) (Moran *et al.*, 2006). In Europa hat ihre Prävalenz ein Nord-Süd-Gefälle, wobei im Norden teilweise die Verbreitung bei unter 1 % gegenüber 40 % im Süden liegt. In Deutschland lag die Prävalenz des MRSA unter *S. aureus*-Blutisolaten zwischen 1999 und 2002 bei ca. 14 % (Tiemersma *et al.*, 2004). Sehr selten gibt es MRSA-Isolate, die auch gegen Vancomycin, einem Glykopeptidantibiotikum, das bisher als Reserveantibiotikum bei MRSA-Infektionen eingesetzt wurde, resistent sind (Chang *et al.*, 2003; Grundmann *et al.*, 2006). Staphylokokkenbiofilme besitzen gegen Antibiotika ohnehin eine hohe Resistenz (siehe 1.1.3.), aber mehrere Studien konnten zeigen, dass Implantat-assoziierte Infektionen durch MRSA oder MRSE (Methicillin-resistente *Staphylococcus epidermidis*), im Vergleich zu Antibiotika-sensiblen Stämmen, zu einer hohen Rate an therapeutischem Versagen führen (Kilgus *et al.*, 2002; Salgado *et al.*, 2007). Das gilt selbst bei radikalem Vorgehen mit zweizeitigem Implantatwechsel (Parvizi *et al.*, 2009).

Auch gibt es Studien, die besagen, dass MRSA gegenüber MSSA (Methicillin sensible *S. aureus*) häufiger fähig sind, Biofilme zu bilden und so chronische Infektionen wie die periprothetische Infektion eher auslösen (Brady *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2008). In der Folge

ist das Outcome einer orthopädischen Implantatinfektion mit MRSA gegenüber MSSA und Coagulase negativen Staphylokokken deutlich schlechter (Tetrycz *et al.*, 2010).

Weitere schwierig zu therapierende phänotypische Varianten von *S. aureus* sind die sogenannten small colony variants (SCVs), die unter anderem aufgrund ihrer Antibiotikaresistenz zu persistierenden und rekurrierenden Infektionen führen (Proctor *et al.*, 2006). Sie konnten auch als Auslöser der periprothetischen Infektion identifiziert werden (Sendi *et al.*, 2006) und ihr tatsächlicher Anteil an rekurrierenden orthopädischen Infektionen könnte aufgrund der Schwierigkeit sie zu diagnostizieren unterschätzt werden.

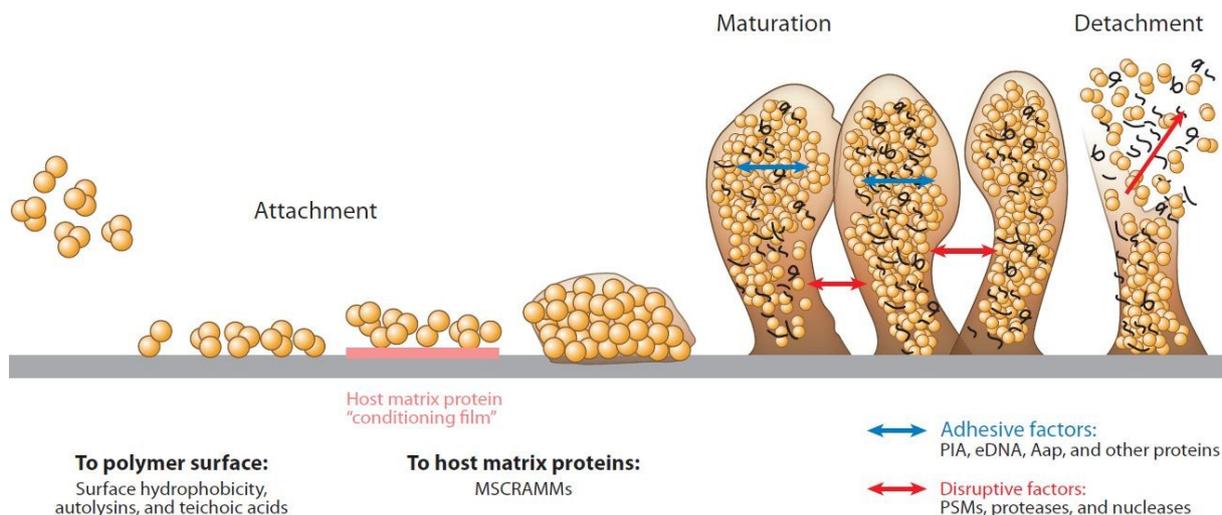
Insgesamt kommt den Staphylokokken damit eine herausragende Bedeutung als Ursache dieser Infektion zu.

### **1.1.3. Bedeutung der Biofilme**

Der Begriff Biofilm wurde von J. William Costerton im Jahre 1978 eingeführt als Bezeichnung für die Anordnung von Bakterien auf Oberflächen. Dort bilden sie mehrschichtige Zellgemeinschaften aus, die eingebettet in eine selbstproduzierte Matrix an die Oberfläche von Geweben oder Biomaterialien anheften (Costerton *et al.*, 1978).

Intensive Forschung auf diesem Gebiet zeigte, dass Biofilme eine ubiquitär vorkommende Lebensform von Mikroorganismen sind, die ihnen eine Reihe von Überlebensvorteilen gegenüber ihrer frei flotierendem (planktonischen) Lebensform sichert und die die Biofilmbildner zur Ursache von einer Vielzahl an Infektionen des Menschen werden lässt (Costerton *et al.*, 1999).

Der Ablauf der Entstehung eines Biofilms wird üblicherweise dargestellt als 2-stufiger Prozess: 1. initiale Adhäsion und 2. Reifung. Als 3. Phase kann noch die Ablösung/Verbreitung angesehen werden, bei der einzelne Zellen oder ganze zusammenhängende Zellhaufen losgelöst werden und zur Ausbreitung der Infektion beitragen (Otto, 2008) (siehe Abb. 2).



**Abb. 2: Phasen der Biofilmbildung (aus Otto, 2013)** Abkürzungen: Aap, accumulation-associated protein; eDNA, extracellular DNA; MSCRAMMs, microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules; PIA, polysaccharide intercellular adhesion; PSMs, phenol-soluble modulins.

Die initiale Adhäsion wird über Oberflächenbestandteile der Bakterien, den sogenannten MSCRAMM („microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“) vermittelt. Diese binden entweder direkt an die zu kolonisierende Oberfläche oder aber stellen den Kontakt über humane Matrixproteine wie Fibrinogen oder Fibronectin her (Otto, 2008). Diese werden auf dem im Menschen befindlichen Fremdkörper sofort nach Kontakt mit Blut abgelagert und bilden den „conditioning film“ (Gristina, 2004/1987). Für die Reifung sind von den Staphylokokken sezernierte Stoffe, unter anderem das sogenannte PIA („polysaccharide intercellular adhesion“), wichtig, die die Matrix des Biofilmes bilden und für die Aggregation und Akkumulation der Zellen sorgen (Mack *et al.*, 1996).

Die Organisation in Biofilmen bietet für die Bakterien mehrere lebenswichtige Vorteile. Die extrazelluläre Matrix kann Nährstoffe wie Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphat binden und konzentrieren (Beveridge *et al.*, 1997). Das Wachstum im Biofilm vermittelt Resistenz gegenüber der Immunabwehr des Wirtes (Leid *et al.*, 2002), welche in *S. epidermidis*-Biofilmen durch PIA vermittelt wird (Vuong *et al.*, 2004). Der Biofilm schützt nicht nur vor der Immunabwehr sondern auch vor Antibiotika. Ceri *et al.* (1999) haben für *S. aureus* eine 100- bis 1000-fach geringere Empfindlichkeit der Biofilm- gegenüber der planktonischen Population gegenüber gängigen Antibiotika wie Penicillin, Oxacillin, Cefazolin, Ciprofloxacin, Clindamycin und Vancomycin zeigen können. Ähnliche Untersuchungen mit *S. epidermidis* von Hajdu *et al.* (2009) zeigten, dass übliche Dosierungen von Vancomycin, Daptomycin, Fosfomycin, Tigecycline, und Ceftriaxon auf die Biofilme nicht ausreichend wirksam sind.

Es gibt drei mögliche Erklärungen für diese verminderte Empfindlichkeit von Biofilmbakterien gegenüber Antibiotika (Stewart und Costerton, 2001):

- Die erste Möglichkeit ist die Fähigkeit des Biofilms als Diffusionsbarriere zu fungieren und die Infiltration einiger Antibiotika zu reduzieren (Xu *et al.*, 2000), während andere Antibiotika in der Penetration nicht beeinträchtigt werden (Singh *et al.*, 2010). Für Biofilme von *S. epidermidis* seien letztgenannte Mechanismen nach Rani *et al.* (2005) und Stewart *et al.* (2009) allerdings nicht anwendbar, da sie nachweisen konnten, dass Antibiotika bzw. Partikel mit der Größe von Antibiotika schnell alle Schichten des Biofilmes penetrieren.
- Eine weitere Erklärung liegt in den unterschiedlichen Micromilieus, die innerhalb eines Biofilmes herrschen (Rani *et al.*, 2007) und so z.B. die Wirkung von Antibiotika, die von der Anwesenheit von Sauerstoff abhängig sind, antagonisieren.
- Die dritte mögliche Ursache der Resistenz liegt an der Heterogenität der Zellen im Biofilm, wobei z.B. die tief im Biofilm sitzenden Bakterien eine sehr niedrige metabolische Aktivität und verlangsamte Zellteilung besitzen (Brown *et al.*, 1988). Diese Heterogenität bedingt auch die Theorie der sogenannten „Persister Cells“. Diese bakterielle Subpopulation im Biofilm lassen sich auch durch sehr hohe Antibiotikakonzentrationen nicht eradizieren und können der Ausgangspunkt einer neuerlichen Vermehrung nach Konzentrationsabfall des Antibiotikums sein (Lewis, 2007). Eine neuerliches Wachstum des Biofilmes führt zur Ablösung von einzelnen Zellen oder Zellhaufen, die an einer anderen Stelle des Implantates adhären, einen neuen Biofilm ausbilden und so zur Ausbreitung der Infektion und Übergang in einen chronischen Zustand beitragen (Brady *et al.*, 2009).

Diese Eigenschaften des Biofilms erschweren eine medikamentöse Therapie erheblich und sind Ursache dafür, warum die Implantat-assoziierte Infektion trotz konservativer Therapie in einen chronischen Zustand mit intermittierendem Aufflammen übergeht. Deshalb verlangt ein kurativer Therapieansatz häufig ein aggressiveres Vorgehen mit der Kombination aus antibiotischer Langzeit- und operativer Therapie (Trampuz und Zimmerli, 2006).

Die Tatsache, dass der Biofilm der entscheidende pathogenetische Faktor in der Entstehung und Aufrechterhaltung der Implantat-assoziierten Infektion ist, gilt in der Literatur als gesichert (Gristina 2004/1987; Costerton *et al.*, 1999; Zimmerli *et al.*, 2004). Angemerkt sei an dieser Stelle, dass Broekhuizen *et al.* (2007 und 2008) nach *in vivo* Untersuchungen an Mäusen hingegen zu dem Schluss kamen, dass in ihrem Modell der Fremdkörper-assoziierten Infektion das den Fremdkörper umgebende Gewebe eine wichtigere Rolle als der Biofilm für

die Persistenz von *S. epidermidis* spielt. Es handelte sich hierbei jedoch um ein Modell, bei dem infizierte subkutane Katheter untersucht wurden, so dass diese Schlussfolgerung nicht ohne weiterführende Untersuchungen auf die Infektion von orthopädischen Implantaten im Knochen angewendet werden kann.

#### **1.1.4. Strategien zur Prävention der Implantat-assoziierten Infektion**

Durch die hohe Resistenz der Bakterien gegenüber zurzeit zur Verfügung stehenden Medikamenten, die ihnen durch die Organisation im Biofilm ermöglicht wird (siehe 1.1.3.), und der daraus resultierenden schlechten Therapierbarkeit mit der hohen Wahrscheinlichkeit von Rezidiven wird die Notwendigkeit einer wirksamen Prävention ersichtlich.

Bei der Prävention der Implantat-assoziierten Infektion muss man zwei Schritte unterscheiden. Mit der primären Prävention wird versucht, die Exposition des Operationsfeldes und damit des Implantates gegenüber potentiellen Erregern zu vermeiden. Dazu gehört unter anderem die strikte Einhaltung der Hygiene, Arbeiten unter sterilen Kautelen, die Reduktion von Partikelbelastungen in der Raumluft („laminar flow“ Belüftung über dem OP-Feld) und die perioperative Antibiotikaprophylaxe. Alle diese Maßnahmen haben dazu beigetragen die Infektionsrate auf ca. 1 % (siehe 1.1.1.) zu senken, können Infektionen jedoch nicht vollständig verhindern (Evans, 2011). Mit der sekundären Prävention wird versucht die Kolonisation des Implantates mit bis zu diesem vorgedrungenen Erregern zu vermeiden.

Nachfolgend werden nur Ansätze zur sekundären Prävention dargestellt.

Seit der Identifikation des Biofilms als entscheidenden pathogenetischen Faktor der Fremdkörper-assoziierten Infektion sind Anstrengungen unternommen worden die Entstehung dieser mikrobiellen Lebensform auf Fremdkörperoberflächen zu verhindern. Um dieses Ziel zu erreichen, sind einige Verfahren zur Oberflächenbeschichtung und -modifikation entwickelt worden. Dabei kann man generell zwischen zwei Mechanismen unterscheiden: 1. antiadhäsive Oberflächen zur Verhinderung der initialen Adhärenz und 2. antibakterielle Oberflächen zur Reduzierung des mikrobiellen Wachstums (Francolini *et al.*, 2003; Gollwitzer und Gerdesmeyer, 2006).

Antiadhäsive Oberflächen sind in ihrer Wirkung sowohl auf humane als auch auf mikrobielle Zellen für passagere Implantate in Blutgefäßen oder Harnwegen von Nutzen sind. Ein Beispiel sind Venenverweilkatheter, bei denen Infektionsprävention und Verhinderung der Thrombusbildung erforderlich ist. Im Gegensatz dazu bedürfen orthopädische Implantate

zumindest auf einem Teil ihrer Oberflächen einer Adhärenzeigenschaft. Die totale Endoprothese (TEP) beispielsweise besitzt Flächen, die mit dem Körper in Verbindung stehen und eine möglichst feste Verbindung mit demselben durch Osteoblastenadhäsion eingehen müssen, um eine dem ersetzten Gelenk entsprechende optimale mechanische Beanspruchung zu gewährleisten. Außerdem verhindert ein voll integriertes Implantat durch die anliegende Osteoblastenschicht, nach der Theorie des „race for the surface“, eine Biofilmbildung und damit eine Infektion (Gristina, 2004 / 1987; Gollwitzer und Gerdesmeyer, 2006). Diese Tatsache ist von herausragender Bedeutung für die Prävention der Implantat-assoziierten Infektion, da neu entwickelte Oberflächen keine generellen antiadhäsiven oder zelltoxischen Eigenschaften besitzen dürfen. Darüber hinaus wird dieser mögliche Mechanismus der Infektionsprävention durch die Tatsache erschwert, dass alle Fremdkörperoberflächen im Körper sofort mit einem sogenannten „conditioning film“ überzogen werden (Gristina, 2004/1987), an dessen Proteine MSCRAMM (siehe 1.1.3.) –bildende Bakterien binden können.

Die Strategie der antibakteriellen Oberfläche, die die Adhärenz nicht unterbindet, jedoch adhärierende Bakterien am Wachstum hindert, oder im besten Fall abtötet, scheint für das Ziel der Implantatintegration vielversprechender zu sein. Mit verschiedenen auf oder in die Oberfläche integrierten antibakteriellen Agenzien, wie z.B. Antibiotika, Antiseptika oder antibakteriellen Metallen wird versucht dieses Ziel zu erreichen.

Die Beschichtung mit Antibiotika wurde mit unterschiedlichen Antibiotikaklassen und -kombinationen auf orthopädischen Implantaten untersucht: Darouiche *et al.* (2007) *in vivo* mit einer Kombination aus Minocyclin und Rifampicin, Fei *et al.* (2011) *in vitro* mit Vancomycin, De Giglio *et al.* (2011) *in vitro* mit Ciprofloxacin, Li *et al.* (2010) *in vitro* mit Cefazolin, Aviv *et al.* (2007) *in vitro* mit Gentamicin. In allen genannten Studien wurden die antibakteriellen Eigenschaften mit *S. aureus*-Stämmen untersucht. Bei der Mehrzahl der *in vitro* Untersuchungen wurde zusätzlich mittels Kontakt zu Osteoblasten auch die Cytokompatibilität beschrieben.

Im Vergleich zu Studien der antiinfektiösen Eigenschaft von Antiseptikabeschichtungen auf Kathetern sind Studien zu diesen Beschichtungen auf Implantaten selten. Källicke *et al.* (2006) haben *in vivo* und *in vitro* zeigen können, dass eine Antiseptikabeschichtung mit Octenidin und Irgasan gleiche Ergebnisse im Hinblick auf die Infektionsprävention wie eine Beschichtung mit Rifampicin und Fusidinsäure hat.

Unter den möglichen Metallen zur Freisetzung aus Oberflächen zur Infektionsabwehr wurde von Heidenau *et al.* (2005) Kupfer als das Vielversprechendste durch seine Bakterizidie bei

gleichzeitiger relativer Cytokompatibilität identifiziert. Dies konnte *in vivo* von Shirai *et al.* (2009) bestätigt werden. Dabei handelte es sich jedoch um ein Modell mit einem Fixateur externe. Auch Silber wurde zum Zweck der Infektionsprävention untersucht. Vasilev *et al.* (2010) haben dazu Silber über Allylamin mittels Plasma-polymerisation an die Oberfläche gebunden und die antibakterielle Wirkung auf *S. epidermidis in vitro* gezeigt.

Neue Stoffe, die zur Verhinderung der Biofilmbildung eingesetzt werden könnten, sind bisher nur *in vitro* untersucht worden. Berberin, das in die bakterielle DNA interkaliert und die DNA und Proteinsynthese unterdrückt, und RIP (RNAlII-inhibiting-peptide), das in die Quorum-Sensing-Regulation eingreift, haben die Biofilmbildung von *S. epidermidis* (Berberin) und *S. aureus* und *S. epidermidis* (RIP) reduzieren können (Balaban *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). Für RIP konnten gleiche Ergebnisse auch schon *in vivo* dokumentiert werden (Anguita-Alonso *et al.*, 2007).

Insgesamt existieren eine Vielzahl an möglichen Herangehensweisen, um die Biofilmbildung bzw. die Implantat-assoziierte Infektion zu verhindern.

## 1.2. Kupfer – Spurenelement und antibakterielles Agens

Als essentielles Spurenelement gehört Kupfer zu den lebensnotwendigen Bestandteilen unserer Nahrung und muss deshalb exogen zugeführt werden. Das U.S. Department of Health and Human Services (2004) gibt eine empfohlene mittlere Tagesdosis (RDA) von 900 µg Kupfer/Tag für Erwachsene an, um den Bedarf zu decken. Andere Vorgaben liegen bei 2 bis 5 mg Kupfer/Tag. Die Zufuhr in dieser Höhe stellt in der Regel kein Problem dar, weshalb Mangelerscheinungen sehr selten sind. Kommt es dennoch dazu, so führt dies zu Erkrankungen wie normocytischer, hypochromer Anämie, Leukopenie und Osteoporose. Kupfer spielt eine wichtige Rolle bei einer Reihe von Enzymen, die für den Stoffwechsel von immenser Bedeutung sind: Cytochrome-c-Oxidase (Komplex IV der Atmungskette), Superoxid-dismutase (Beseitigung von O<sub>2</sub>-Radikalen), Caeruloplasmin (Ferrooxidase im Plasma), Hephaestin (Ferrooxidase), Monoaminoxidase (Katecholaminstoffwechsel), Tyrosinase (Produktion von Melanin), Dopamin-β-Hydroxylase (Katecholaminsynthese) und Peptidylglycin-α-amidierende Monooxygenase (PAM; Prozessierung von Neuropeptiden). Über die Ferrooxidase besitzt es eine enge Verbindung zum Eisenstoffwechsel. Außerdem spielt es als Bestandteil der Lysyloxidase eine wichtige Rolle in der Kollagen- und Elastinbiosynthese und damit im Bindegewebsstoffwechsel. (U.S. Department of Health and Human Services, 2004; Löffler und Petrides, 2007).

Der Gesamtbestand des Kupfers im Körper liegt zwischen 40 und 80 mg für eine 70 kg schwere Person. Ca. 10 % davon (6 mg) sind im Vollblut und ca. 44 % (26 mg) im Muskel enthalten. Der normale Plasmaspiegel des Kupfers beträgt zwischen 13 und 23 mmol/l. (Löffler und Petrides, 2007).

Das Wissen um die Bedeutung des Kupfers als Spurenelement für den menschlichen Organismus existiert im Vergleich zur Nutzung seiner antimikrobiellen Eigenschaft sehr viel kürzer. Schon seit Jahrhunderten wird Kupfer wegen letzterer Eigenschaft zur Desinfektion von Flüssigkeiten, Feststoffen und Gewebe verwendet. Bereits 400 v. Chr. nutzten die Griechen Kupfer zur Behandlung von Lungenerkrankungen und um Trinkwasser zu reinigen. Mittlerweile sind die aus medizinischer Sicht günstigen Eigenschaften zur Bakterienbekämpfung weiter untersucht worden. Vor allem in der Lebensmittelindustrie zur Verhinderung von Lebensmittelvergiftungen (Faúndez *et al.*, 2004), in Warmwasserleitungen zur Verhinderung der Legionellenkolonisation (Leoni *et al.*, 2005), sowie beim Zusetzen von Kupfer zu Textilien. Durch letztere soll beispielsweise als Bettwäsche in der Krankenhausumgebung die Übertragung nosokomialer Infektionen verhindert oder mit Kupfer imprägnierte Socken beim diabetischen Fußsyndrom die Infektion von Ulcera, und damit die Gangrän, verhindert werden (Borkow und Gabbay, 2004; Borkow und Gabbay, 2009). Auch konnte eine starke Wirkung auf die Sporen von *Clostridium difficile* mittels kupferhaltigen Wirkstoffen gezeigt werden (Gant *et al.*, 2007). Neben seinen bakteriziden Fähigkeiten besitzt Kupfer auch fungizide und antivirale Eigenschaften gegenüber Krankheitserregern mit humanpathogener Relevanz. (Borkow und Gabbay, 2005; Grass *et al.*, 2011).

Die Art und Weise mit der Kupfer seine antimikrobiellen Eigenschaften entfaltet ist Gegenstand aktueller Forschung und noch nicht endgültig geklärt. Borkow und Gabbay (2005) stellen heraus, dass sich die mikrobielle Kupfertoxizität auf drei Ebenen abspielt: 1. Störung der Zellmembran, 2. Interaktionen mit Nukleinsäuren und 3. Störung von Proteinen. Der Einfluss des Kupfers auf das Redox-Gleichgewicht mit dem Entstehen von freien Radikalen kann wiederum auf allen drei Ebenen zu Störungen führen.

Einige dieser Erkenntnisse stammen jedoch aus Untersuchungen ohne Bakterien und wurden auf diese abgeleitet. Neue bakteriologische Studien bestätigen die angenommenen Wirkungsweisen in Teilen. Weaver *et al.* (2010) schreiben den antibakteriellen Effekt des Kupfers auf MRSA der Störung der Atmungskette und dem Verlust der DNA-Integrität zu, und nicht auf einen Einfluss auf die Membranintegrität. Dem gegenüber stehen die

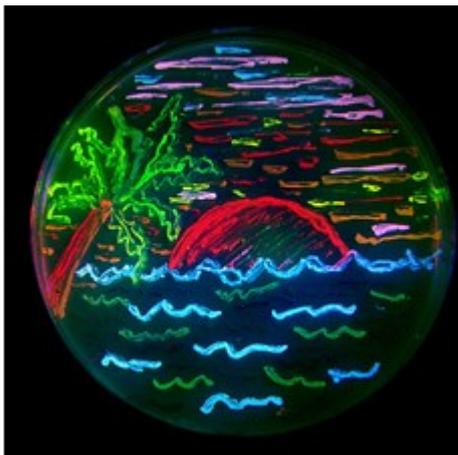
Untersuchungen von Espírito Santo *et al.* (2008 und 20011), die die Toxizität auf *E. coli*, *Bacillus cereus* und *Deinococcus radiodurans* auf Störungen der Zellhülle und nicht auf Effekte auf die DNA zurückführen. Es bleibt also die tatsächliche Relevanz der einzelnen Mechanismen für die bakterizide Wirkung des Kupfers zu klären.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Kupfer ein hochpotentes antibakterielles Agens und gleichzeitig als Spurenelement für den menschlichen Organismus essentiell ist.

### 1.3. Fluorochrome – Anwendungsmöglichkeiten und Bedeutung

Fluorochrome sind Proteine, die bei Anregung mit Fluoreszenzlicht einer bestimmten Wellenlänge ein Licht anderer Wellenlänge emittieren. Auf diese Weise werden diese Proteine im Fluoreszenzmikroskop in verschiedenen Farben, abhängig von der Wellenlänge des emittierten Lichtes, sichtbar. Das erstmals in den 1960er Jahren beschriebene green fluorescent protein (Shimomura *et al.* 1962), welches aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde, findet heute vielfältige Anwendung in der mikrobiologischen Forschung. Dies wurde unter anderem durch Shimomura, Chalfie und Tsien ermöglicht, denen die Isolation, die Klonierung und die Optimierung der Anwendungsmöglichkeiten gelangen. 2008 wurden ihre Arbeiten deshalb mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt (Nobelprize.org).

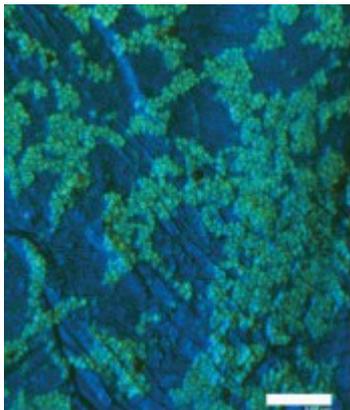
Zur Verfügung stehen heute vor allem durch die Arbeiten von R. Tsien die Farben dunkel-rot, rot, orange, gelb-grün, grün und cyan (Shaner *et al.*, 2005; siehe Abb. 3).



**Abb. 3: Eine Strandszene in San Diego, gezeichnet mit einer achtfarbigen Palette bakterieller Kolonien, die fluoreszierende Proteine, abstammend vom GFP und dem rot fluoreszierendem Korallenprotein dsRed, exprimieren. Die dargestellten Farben sind BFP, mTFP1, Emerald, Citrine, mOrange, mApple, mCherry und mGrape. Gezeichnet von Nathan Shaner, fotografiert von Paul Steinbach, hergestellt im Labor von Roger Tsien im Jahr 2006. (<http://en.wikipedia.org/wiki/File:FPbeachTsien.jpg>)**

Durch das Klonieren des Fluorochromgens in ein Plasmid oder in die chromosomale DNA einer eukaryoten oder prokaryotischen Zelle kann das fluoreszierende Protein nach Transkription und Translation mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Auf diese Weise können ganze Zellen oder einzelne Proteine im räumlichen und zeitlichen Zusammenhang beobachtet werden. Durch die verschiedenen Farben der heute erhältlichen Fluorochrome ist es möglich, gleichzeitig unterschiedliche Zellen oder Proteine zu beobachten.

Leid *et al.* (2002) konnten beispielsweise mit Hilfe des GFP-exprimierenden *S. aureus* Stammes Seattle 1945, dem Stamm, der in dieser Arbeit auch als Testkeim dient, zeigen, dass Leukozyten entgegen der ursprünglichen Annahme doch Staphylokokken-Biofilme penetrieren und dass die Biofilm-assoziierte Immunabwehr mit Phagozytosehemmung auf anderem Wege vonstatten gehen muss. Stoodley und Kollegen (2005) haben bakterielle Biofilme auf orthopädischen Implantaten unter anderem mittels GFP dargestellt (siehe Abb. 4).



**Abb. 4: Auf orthopädischen Schrauben wachsende Staphylokokkenbiofilme sind gezeigt. Ein *S. aureus* 1945GFP<sup>uvr</sup> Biofilm auf einer 316L SS Schraube ist gezeigt.** Einzelne Kokken erschienen grün und die Oberfläche der Schraube (blaue Fälschfarbendarstellung) wurde betrachtet mittels reflektierenden Laserlichts. Maßstabsleiste = 8  $\mu\text{m}$ . (aus Stoodley, 2005).

Fluorochrome sind daher heute ein unschätzbare Werkzeug in der Visualisierung und Beobachtung von biologischen Lebensformen und –vorgängen aller Art und haben erheblich am Gewinn vieler Erkenntnisse in sämtlichen biologischen Disziplinen beigetragen.

#### 1.4. Ziele der Arbeit und zentrale Fragestellungen

Die Intention dieser Arbeit war Verfahren zur Oberflächenfunktionalisierung auf ihre durch Kupferfreisetzung vermittelte antibakterielle Potenz zu untersuchen. Mit der Möglichkeit ihres Einsatzes zur Prävention der Implantat-assoziierten Infektion wurde sich anschließend kritisch auseinandergesetzt.

Zunächst galt es den Einfluss von Kupfer auf das Wachstum der häufigsten Erreger dieser Infektionen auf typischen Implantatoberflächen zu untersuchen.

Um das Wachstumsverhalten besser charakterisieren zu können, sollte außerdem die Fluoreszenzmikroskopie mittels Fluorochrom exprimierender Staphylokokken optimiert werden.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen in den Fokus gestellt:

1. Wie ist das Wachstum der Staphylokokken auf typischen Implantatoberflächen ohne Kupfer charakterisiert?
2. Welchen Einfluss hat Kupfer auf das Bakterienwachstum auf typischen Implantatoberflächen?
3. Welche Parameter sind für eine Kupferfreisetzung aus einem Implantat wichtig, um einen suffizienten antibakteriellen Effekt zu erzielen?
4. Wie ist das Wachstumsverhalten der Bakterien auf Oberflächen, die entweder mittels Plasmapolymersation oder der Plasma Immersions Ionen Implantation, zweier Verfahren zur Oberflächenfunktionalisierung, behandelt wurden?
5. Eignen sich diese Verfahren anhand der Erkenntnis aus den *in vitro* Untersuchungen potentiell zur Prävention der Implantat-assoziierten Infektion?
6. Welche Vorteile bietet die Verwendung von Fluorochrom exprimierenden Staphylokokken in diesem Modell?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind Bestandteil der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock (IMIKRO).

Tab. 1: Bakterienstämme

Bakterienstamm	relevante Charakteristika	Herkunft/ Referenz
<i>S. aureus</i> (Seattle 1945)		ATCC 25923
<i>S. epidermidis</i> strain RP62A		ATCC 35984
<i>S. aureus</i> RN4220	restriktionsdefizient	NCTC8325
<i>S. aureus</i> RN4220	pHOM10, GFP-Expressionsplasmid;	PD Dr. Bischoff Universität Homburg/Saar
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	GFP-Expressionsplasmid; pAT18-P <sub>blaZ</sub> - <i>gfpmut2</i> -TT <sub>BOB</sub>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$		Invitrogen 18263-012
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	pAT18	Stammsammlung, IMIKRO

### 2.2. Plasmide

Tab.2: Plasmide

Bezeichnung	Relevante Charakteristika	Herkunft/ Referenz
pHOM10	<i>Tet</i> <sup>R</sup> , GFP-Expressionsplasmid; $\beta$ -lactamase-Promotor, <i>gfpmut2</i>	PD Dr. Bischoff Universität Homburg/Saar
pAT18	Erm <sup>R</sup> , oriR pUC und oriR pAM $\beta$ 1 für gram +/- Bakterien	Stammsammlung, IMIKRO (Trieu-Cuot <i>et al.</i> , 1991)
pAT18_DsRM	DsRed-Monomer	Stammsammlung, IMIKRO
pAT18_P <sub>blaZ</sub>	$\beta$ -lactamase-Promotor aus pHOM10	diese Arbeit

Bezeichnung	Relevante Charakteristika	Herkunft/ Referenz
pAT18_P <sub>blaZ</sub> _TT <sub>BOB</sub>	Terminator TT <sub>BOB</sub> aus dem Labor der IMIKRO	Stammsammlung, IMIKRO (Redanz <i>et al.</i> , 2012)
pAT18_P <sub>blaZ</sub> _DsRM		diese Arbeit
pAT18_P <sub>blaZ</sub> _gfpmut2	<i>gfpmut2</i> aus pHOM10	diese Arbeit
pAT18_P <sub>blaZ</sub> _gfpmut2_TT <sub>BOB</sub>		diese Arbeit
pAT18_P <sub>blaZ</sub> _DsRM_TT <sub>BOB</sub>		diese Arbeit

### 2.3. Primer

Tab.3: Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3' Richtung)
gfpmut2_up_seq__	TGT-GCC-CAT-TAA-CAT-CAC
PromIBOT2for_Eco	AAG-AAT-TCG-CAA-TTA-ATG-TGA-GTT-AGC-TCA-C
PromIBOT2rev_Bam	AAG-GAT-CCT-TTT-TCA-TAA-TAA-ACC-CTC-CGA-TAT-TAC-AGT-TG
PromTOBIfor_Xba	ATT-ATC-TAG-ACC-TTT-GAG-TGAG-CTG-ATA-CCG
PromHOMrev_Pst	ATT-ACT-GCA-GGT-CTG-GAC-ATT-TAT-TTG-TAT-AGT-TCA-TCC-ATG-C
DsRM_for/Bam	AAG-GAT-CCC-ACC-ATG-GAC-AAC-ACC-GAG-GAC-G
DsRM_rev/Sph	AAT-TAA-GCA-TGC-CTA-CTG-GGA-GCC-GGA-GTG
M13_forward	TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT
M13_reverse	CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC

### 2.4. Nährmedien

Die Zusammensetzung der Medien bezieht sich auf ein Gesamtvolumen von einem Liter.

Für die Versuche mit *S. aureus* und *S. epidermidis* wurde CB-Medium oder TSB-Medium verwendet. Beide Medien haben die gleiche Zusammensetzung.

*E. coli* – Stämme wurden in LB-Medium angezüchtet.

Für feste Medien wurden jeweils 15 g Agar (Oxoid) pro Liter zugegeben. Die Medien wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

**Caso-Bouillon Medium (CB):**

Pepton aus Casein (Pankreashydrolysat)	17,0 g
Pepton aus Soja (Papainhydrolysat)	3,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
di-Kaliumhydrogenphosphat	2,5 g
Glucose-Monohydrat	2,5 g
pH-Wert	7,3 ± 0,2

**Lennox L Broth Base (LB) Medium:**

LB-Broth-Base	20,0 g
NaCl	4,5 g
pH-Wert	7,5

**2.5. Medienzusätze****2.5.1. Humanserum**

Humanserum aus dem Vollblut eines männlichen Spenders mit der Blutgruppe AB (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), sterilfiltriert und immunologisch getestet. Das Humanserum wurde dem CB-Medium im Verhältnis 1:1 zugesetzt.

**2.5.2. Kupfersulfat-Lösung**

Es wurde eine Stammlösung (100 mM) Kupfersulfatpulver (Merck KGaA, Darmstadt) hergestellt.

**2.5.3. Antibiotika**

Tab.4: Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	eingesetzte Endkonzentration
Erythromycin	100 mg/ml 96 % Ethanol	10 µg/ml für <i>S. aureus</i> 100 µg/ml für <i>E. coli</i>
Tetrazyklin	10 mg/ml 96 % Ethanol	10 µg/ml für <i>S. aureus</i> 10 µg/ml für <i>E. coli</i>

Antibiotikum	Stammlösung	eingesetzte Endkonzentration
Oxacillin	100 mg/ml dH <sub>2</sub> O	0,25 µg/ml für <i>S. aureus</i> (Herstellung elektrokompetenter Zellen)

Alle Antibiotikastammlösungen wurden sterilfiltriert.

## 2.6. Puffer und Lösungen

### **10x PBS (phosphate buffered saline):**

KCl	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
NaCl	80,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	14,2 g
pH	7,4

Der Puffer wurde bei 121 °C für 20 min mit 2 bar autoklaviert.

## 2.7. Testkörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Probekörper hatten einen Durchmesser von 11 mm und wurden ggf. ein- oder zweiseitig behandelt (Details s.u.). Die beschichteten und modifizierten Probekörper (Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP Greifswald)) wurden Gamma-sterilisiert geliefert. Für eine wiederholte Nutzung wurden die Referenzkörper mit 70 %igem Alkohol über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen mit Aqua dest. wurden sie bei 121 °C mit 2 bar autoklaviert.

### 2.7.1. unbehandelte Testkörper

#### **Titan rau (Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V):**

Einseitig Korund-gestrahelter Probekörper einer Titanlegierung (Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V) mit einer Rauigkeit von  $R_a = 0,725 \mu\text{m}$  ( $R_{rms} = 90 \mu\text{m}$ ) (DOT GmbH, Rostock). Die Titanlegierung wird in dieser Arbeit als Titan bezeichnet.

#### **Titan poliert (Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V):**

Einseitig polierter Probekörper einer Titanlegierung (Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V) mit einer Rauigkeit von  $R_a = 0,19 \mu\text{m}$  (DOT GmbH, Rostock). Die Titanlegierung wird in dieser Arbeit als Titan bezeichnet.

## 2.7.2. Beschichtungen und Oberflächenmodifizierungen

### 2.7.2.1. Plasma-Immersionen-Ionenimplantation (nach Mändel und Rauschenbach, 2000)

Mit der Plasma-Immersionen-Ionenimplantation (PIII) lassen sich unterschiedliche Ionen (O, N, Cu, etc.) in verschiedene, auch komplex geformte Materialien (Metalle, Keramik oder auch Kunststoff) bis zu einer Tiefe von 1  $\mu\text{m}$  einbringen. Daher handelt es sich bei diesem Verfahren um eine Oberflächenmodifizierung und nicht um eine Beschichtung.

In einer Vakuumkammer wird ein Arbeitsgas, welches die zu implantierenden Ionen enthält, bei 0,01 bis 1 Pa durch Mikrowelleneinstrahlung ionisiert. Dieses Plasma umgibt vollständig das zu implantierende Objekt, welches sich in der Mitte der Kammer befindet. Es können sowohl Edelgas-Plasmen als auch Metall-Plasmen generiert werden. Durch Anlegen negativer rechteckiger Spannungspulse an das Objekt werden dessen Elektronen in Richtung der Kammer verdrängt und gleichzeitig die positiv geladenen Ionen des Plasmas in Richtung des Objektes beschleunigt. Mit der Frequenz der angelegten Spannungspulse ist eine Temperaturregulation möglich, während die Dicke der modifizierten Schicht durch die Höhe der angelegten Spannung festgelegt wird.

Um das Einheilen in den Knochen zu fördern und das Entstehen von Fremdkörperpartikeln zu vermeiden, soll mit der PIII-Behandlung des Implantats dessen Biokompatibilität erhöht und die Korrosionsstabilität und Verschleißresistenz verbessert werden. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob die mit PIII-behandelten Titanprobekörper fähig sind, Kupfer als antibakterielles Mittel freizusetzen und die Biofilmbildung, welche als entscheidend für die Entstehung von Implantat-assoziierten Infektion angesehen wird, zu verhindern.

Die in dieser Arbeit verwendeten PIII-Probekörper sind nachfolgend aufgeführt.

#### **Ti-PIII (Cu-0,2DC):**

Frequenz	50 Hz
Druck des Arbeitsgases	2 Pa
Pulsdauer	0,1 ms (0,2% duty cycle(DC))

#### **Ti-PIII (Cu-90DC):**

Frequenz	50 Hz
Druck des Arbeitsgases	2 Pa
Pulsdauer	18 ms (20% duty cycle(DC))

### 2.7.2.2. Niederdruckplasma-Polymerisation (nach Finke *et al.*, 2007; Schröder *et al.*, 2010)

Bei dieser Methode handelt es sich um ein Beschichtungsverfahren, bei dem mittels eines Plasmas ein Vorläufer-Monomer, in diesem Falle Allylamin ( $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ) oder Acrylsäure ( $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{COOH}$ ), zur Polymerisation gebracht wird und so eine dünne gleichmäßige positiv-geladene Oberflächenschicht entsteht.

In einem ersten Schritt wurden die Objekte mit Sauerstoff-Plasma dekontaminiert und aktiviert (500 W, 50 Pa, 100 sccm  $\text{O}_2/2$  sscm Ar, 60 s). Im zweiten Schritt wurde das Plasma (50 Pa) durch Mikrowellen (2,45 GHz, 500 W) angeregt und die Allylamin- und Acrylsäure-Monomere polymerisiert. Die Oberflächenbeschichtung fand in einem Niederdruck-Plasma-Reaktor V55G (Plasma finish, Deutschland, V = 60 l) statt.

Die in dieser Arbeit verwendeten beschichteten Probekörper sind nachfolgend aufgeführt.

#### **TiP - PPAAm:**

Titan poliert mit polymerisiertem Allylamin (duty cycle: DC = 0,15; 2 s Pulsdauer)

#### **TiP - PPAAc:**

Titan poliert mit polymerisierter Acrylsäure (duty cycle: DC = 0,5; 100 ms Pulsdauer)

#### **Cu PPAAm:**

Kupferplättchen mit unterschiedlicher Allylamin-Schichtdicke, die beidseits aufgetragen wurde:

PI ~62 60 s $\text{O}_2$ +PPAAm: 300/1700 ms, 5760 s Br.	Schichtdicke: 270 nm
PI ~65 60 s $\text{O}_2$ +PPAAm: 300/1700 ms, 960 s Br.	Schichtdicke: 42 nm
PI ~68 60 s $\text{O}_2$ +PPAAm: 300/1700 ms, 480 s Br.	Schichtdicke: 22 nm
PI ~72 60 s $\text{O}_2$ +PPAAm: 300/1700 ms, 240 s Br.	Schichtdicke: 9 nm
PI ~78 unbehandelt (reines Kupferplättchen)	

## 2.8. Chemikalien, Enzyme und Kits

Acrylamid-Bis (Fertiglösung 40 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Agar (Agar technical No. 3)	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Caso-Bouillon (CB)	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Eisen(III)chlorid-Heptahydrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Erythromycin	Serva, Heidelberg
Ethanol (96 %, 70 %)	Zentralapotheke der Uniklinik Rostock
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fruktose	Merck KGaA, Darmstadt
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Glutardialdehydlösung (25 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Hefeextrakt	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Humanserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Lab Lemco Powder	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
LB Broth Base	Invitrogen, Paisley, Schottland
Lysostaphin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lysozym	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnesiumchlorid-Heptahydrat ( $\text{MgCl}_2 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mannose	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat $\times \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat $\times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NADH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren

NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit	Macherey-Nagel, Düren
Oxacillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Saccharose	Serva, Heidelberg
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris (Trisma® Base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-Hydrochlorid (Pufferan®)	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Tween® 20	Serva, Heidelberg
Todd-Hewitt Broth-Fertignährmedium	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Tryptone Soya Broth (TSB)	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Yeast Extract	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England

## 2.9. Geräte und Software

Agarose-Gelelektrophoreseapparatur	Bio-Rad-Laboratories, Hercules, USA
Analysenwaage Typ BP 4100S	Sartorius, Göttingen
Biofuge pico	Heraeus, Hamburg
Biofuge fresco	Heraeus, Hamburg
Brutschrank Typ B6060	Heraeus, Hamburg
Brutschrank, HeraCell	Heraeus, Hamburg
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Eddy Jet Spiral Plater	IUL Instruments GmbH, Königswinter
Elektronenmikroskop DSM 960A	Carl Zeiss, Oberkochen
Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 1 mm)	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 2 mm)	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Easyject Plus® Elektroporator	Equibio/PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Fluoreszenzmikroskop BX60	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop BZ 8000	Keyence, Neu-Isenburg
Gefrierschrank -80 °C Typ Hera freeze	Heraeus, Hamburg

Geldokumentation	Intas Science Imaging, Göttingen
Heizblock Typ Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Inkubator, wasserummantelt, geregelte CO <sub>2</sub> -Atmosphäre	Heraeus, Hamburg
Kühlzentrifuge Typ 5417R	Eppendorf, Hamburg
Mini-Vakuum-Pumpe Typ E1	Axon Lab AG, Baden-Dättwil
pH-Meter MP220	Denver Instrument GmbH, Göttingen
pH-Meter inoLab®pH720	WTW GmbH, Weilheim
Picodrop Microlitre Spectrophotometer	Biozyme, Oldendorf
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Sonorex Digital 10P Bandelin	Allpax, Papenburg
Sorvall®-Zentrifuge RC5C	Sorvall Dtl. GmbH, Bad Homburg
Sorvall® SS34 Rotor	Sorvall Dtl. GmbH, Bad Homburg
Sorvall® GS-3 Rotor	Sorvall Dtl. GmbH, Bad Homburg
Sorvall-Ultrazentrifuge Ultra Pro80	Sorvall Dtl. GmbH, Bad Homburg
Spannungsgeräte, Power Pac 3000	Bio-Rad-Laboratories, Hercules CA, USA
Sterilbank Typ antair BSK	Telstar, USA
Sterilbank Arone Typ FC-640	Safelab Systems LTD, England
Tpersonal Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermoblock PCR T3	Biometra, Göttingen
Vortex-Genie Touch Mixer	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge Varifuge 3.OR	Heraeus, Hamburg

### **Genutzte Software:**

NebCutter

NCBI Blast

Microsoft Office 2003 und 2010

BioMath Calculators T<sub>m</sub> (Melting Temperature) Calculations for Oligos:  
<http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm>

### **2.10. Stammhaltung**

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Bakterien bei -80 °C wurde das Microbank™ System (Pro-Lab Diagnostics, Neston, England) genutzt.

Für die Kultivierung wurden *S. aureus* und *S. epidermidis* auf Blutagarplatten (Columbia Agar mit 5 % Schafsblut, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) und *E. coli* auf LB-Agarplatten ausgestrichen und für 18 bis maximal 21 Tage bei 4 °C gelagert. Mit einer sterilen Impföse erfolgte das Beimpfen von flüssigen Über-Nacht-Kulturen (ÜNK) in CB- bzw. LB-Medium, die dann bei 37 °C, 21 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> für 12 bis 16 h inkubiert wurden.

### **2.11. Messung der optischen Dichte – Wachstumskurven**

Die ÜNK einer Bakterienkultur wurde 1:20 mit frischem Medium verdünnt und die Zunahme der Biomasse wurde stündlich über die photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) im Spektralphotometer (Bio-Rad-Laboratories, Hercules CA, USA) verfolgt.

### **2.12. Bestimmung der MHK von CuSO<sub>4</sub> für *S. aureus* und *S. epidermidis***

Von den zu analysierenden Stämmen wurden 20 ml-ÜNKs zentrifugiert, die Bakterien 3 mal mit 1x PBS gewaschen und dann in CB-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,25 eingestellt. Dies entspricht einer Bakterienzahl von ca. 5x10<sup>7</sup>/ml. Zur Bestimmung der MHK wurden ausgehend von der eingestellten Suspension 1x10<sup>6</sup> oder 1x10<sup>3</sup> Bakterien in einem 40 ml Gesamtvolumenansatz mit unterschiedlichen CuSO<sub>4</sub> Endkonzentrationen (0 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM) versetzt und im Raumlufinkubator bei 37 °C und 180 rpm bebrütet. Es erfolgte eine stündliche Bestimmung der Lebendkeimzahl.

#### **2.12.1. Lebendkeimzahlbestimmung**

Die Lebendkeimzahl oder die koloniebildenden Einheiten (KBE) ist die Anzahl aller kultivierbaren Bakterien in einer Probe, angegeben in KBE/ml. Von einer sukzessiven Verdünnungsreihe mit 1:10 Verdünnungsschritten wurden jeweils 100 µl Aliquots auf CB-Agar ausplattieren und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet.

#### **Lebendkeimzahlbestimmung mit manueller Verdünnungsreihe**

Dazu wurde eine serielle Verdünnung mit jeweils 1:10 pro Schritt (bis maximal 10<sup>-8</sup>, je nach Versuchsansatz) mit 1x PBS durchgeführt. Einzelne Verdünnungsstufen wurden auf CB-Agar ausplattiert und inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kolonien von drei

aufeinanderfolgenden Platten, beginnend mit der höchsten Verdünnungsstufe, ausgezählt und die KBE/ml ermittelt.

### **Lebendkeimzahlbestimmung mit dem EDDY-Jet**

Der Spiralplattierer EDDY-Jet wurde entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt. Für die Lebendkeimzahlbestimmung wurde das Programm Log und CB-Agarplatten verwendet. Die Zahl der KBE pro ml wurde durch Zählen der Kolonien nach der Inkubation anhand der mitgelieferten Schablone bestimmt und die entsprechenden Verdünnungsfaktoren miteingerechnet.

## **2.13. Untersuchung der Implantatoberflächen**

### **2.13.1. Protokoll zur Biofilmbildung auf Testkörpern**

Die sterilen Testkörper wurden in einer 24-Well-Platte mit  $5 \times 10^6$  oder  $5 \times 10^3$  Bakterien pro ml CB-Medium/Humanserum bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für definierte Zeiträume (0 d, 1 d, 2 d, 4 d, 7 d, 10 d) inkubiert. Die Einstellung der Bakterienzahl erfolgte wie in 2.12. beschrieben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die planktonischen und adhärenen Bakterien mittels KBE-Bestimmung quantifiziert und adhärenen Bakterien zusätzlich mikroskopisch untersucht. An Tag 0 wurden die Untersuchungen 30 min nach dem Beimpfen durchgeführt.

#### **2.13.1.1. Bestimmung der planktonischen Bakterien**

Der Überstand wurde abgenommen und der Testkörper vorsichtig mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Der Überstand und die Spülflüssigkeit wurden anschließend vereinigt und zentrifugiert für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C. Das Sediment wurde in 1 ml 1x PBS aufgenommen und die Lebendkeimzahl aus der Suspension bestimmt.

#### **2.13.1.2. Bestimmung der adhärenen Bakterien**

Der gewaschene Testkörper (siehe 2.13.1.1.) wurde in ein Reagenzglas mit 1 ml 1x PBS gegeben und im Ultraschallbad (Allpax, Papenburg) zur Ablösung der adhärenen Bakterien behandelt (*S. aureus* 5 min bei 80 %, *S. epidermidis* 4 min bei 100 %). Die nachfolgende Verdünnungsreihe der Suspension lieferte den KBE/ml – Wert für die Biofilmbakterien.

### **2.13.1.3. Mikroskopie der Testkörper**

Für die mikroskopische Analyse wurde der Testkörper an den jeweiligen Testtagen in eine neue 24-Well-Platte überführt. Es erfolgte entweder eine 15-minütige Inkubation in Live/Dead-Fluoreszenzfarbstoff (Syto9/Propidiumiodid (1:1; Invitrogen, Darmstadt) 1:1000 in 1x PBS verdünnt) oder eine 24-stündige Inkubation in 2,5 %iger Glutardialdehydlösung (25 %-ige Glutardialdehydlösung (Merck, Darmstadt) mit Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) 1:10 verdünnt) zum Fixieren der Biofilme.

### **2.13.1.4. Untersuchung des Bakterienwachstums auf Testkörpern unter Zusatz von $\text{CuSO}_4$**

Die Biofilmbildung wurde nach dem Standardprotokoll (siehe 2.13.1.) durchgeführt. Am Tag 1 wurde eine  $\text{CuSO}_4$ -Endkonzentration von 10 oder 20 mM eingestellt. Dabei wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der  $\text{CuSO}_4$ -Lösung geachtet. Anschließend wurde der mit  $\text{CuSO}_4$  versetzte Biofilm bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die Bestimmung der KBE und die Fluoreszenzmikroskopie wurden an den Tagen 1, 2, 4, 7 und 10 entsprechend durchgeführt.

## **2.13.2. Methoden zur Untersuchung der Testkörper**

### **2.13.2.1. Fluoreszenzmikroskopie**

In dieser Arbeit wurde das Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit von Invitrogen (Darmstadt) verwendet. Es beinhaltet zwei Farbstoffe, wodurch das Abbilden toter Bakterien (Farbstoff: Propidiumiodid, rot fluoreszierend) und lebendiger Bakterien (Syto9, grün fluoreszierend) gleichzeitig möglich ist.

Die zu untersuchenden Probekörper wurden nach in 2.13.1.1. geschilderter Prozedur anschließend zur Färbung mit 1  $\mu\text{l}$  des Farbstoffgemisches und 1 ml 1x PBS zusammen bei 4 °C für 20 min. inkubiert.

Im Verhältnis 1:1 gemischt, wie auch einzeln wurden die Farbstoffe bei -20 °C aufbewahrt.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Dokumentation der Bakterien wurde entweder das Fluoreszenzmikroskop BZ 8000 (Keyence, Neu-Isenburg) oder das Fluoreszenzmikroskop BX60 mit den Filtern U-MWB (Ex 470-490 nm, Em 520 nm), U-MWU (Ex 330-385 nm, Em

420 nm) und U-MWG (Ex 510-550 nm, Em 590 nm) (Olympus, Hamburg) sowie die angeschlossene Digitalkamera (Leica, Solms) verwendet.

### **2.13.2.2. Rasterelektronenmikroskopie**

Mit dieser Methode ist es möglich eine hochaufgelöste scharfe Abbildung der Probekörperoberfläche bis in den Nanometerbereich zu erhalten (Auflösung 4 nm; Vergrößerung max. 100.000x). Sie eignet sich zur Darstellung der Oberflächenbeschaffenheit der Probekörper sowie der Morphologie der Bakterien und ihrer extrazellulären Matrix.

Nach der Behandlung der Probekörper entsprechend des obigen Protokolls (siehe 2.13.1.1.) wurden alle weiteren Schritte im Elektronenmikroskopischen Zentrum der Uniklinik Rostock durchgeführt:

Nach dem Waschen der Plättchen mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) folgte eine Ethanolreihe mit ansteigender Konzentration (5 min 30 %, 5 min 50 %, 10 min 70 %, 15 min 90 % und 2 mal 10 min 100 %) und mit anschließender „Kritischer-Punkt-Trocknung“ (Kritischer-Punkt-Trockner, Emitech, Ashford, UK; Befolgung der Herstellerangaben). Nach der Trocknung wurden die Probekörper mit Gold überzogen (Sputter Coater, Baltec) und mittels Elektronenmikroskopie untersucht.

## **2.14 Molekularbiologische Methoden**

### **2.14.1. Isolierung von Plasmid-DNA**

#### **2.14.1.1. Plasmid-Minipräparation aus *E.coli***

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurde mittels des NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kits von Macherey-Nagel (Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

#### **2.14.1.2. Plasmid-Minipräparation aus *S.aureus***

Plasmide aus *S. aureus* wurden mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kits (Macherey-Nagel, Düren) isoliert. Folgender Schritt wurde dabei verändert: Die Lyse der Bakterienzellen erfolgte durch Zugabe von Lysozym (Endkonzentration: 20 mg/ml) und

Lysostaphin (Endkonzentration: 20 µg/ml) mit anschließender 30 minütiger Inkubation (bei 37 °C).

Die Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.14.2. PCR

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: PCR) dient der Vermehrung (Amplifikation) eines durch die verwendeten Primer festgelegten Abschnittes innerhalb einer DNA-Sequenz.

In dieser Arbeit wurde die Phusion-Polymerase (New England Biolabs® Inc.) verwendet, wenn das Amplifikat zur Klonierung verwendet werden sollte, und die herkömmliche Taq-Polymerase, wenn lediglich eine PCR zur Kontrolle der Klonierung durchgeführt wurde.

Ein Standard-PCR-Protokoll sah wie folgt aus:

	Endkonzentration
Template	10 ng
Primer	0,5 µM
dNTP Mix, 2 mM each	5 µl
HF-Puffer (5x)	10 µl
Phusion DNA Polymerase	1 U
A.bidest.	ad. 50 µl

Die Reaktionszyklen fanden im Thermocycler statt:

Denaturierung	98 °C	2 min	1x
Denaturierung	98 °C	30 s	} 30 – 40x
Anlagerung	T <sub>M</sub>	30 – 60 s	
Amplifikation	72 °C	20 s/kbp	
Amplifikation	72 °C	2 min	1x

(Nach dem letzten Schritt wurden die Proben im Thermocycler auf 4 °C gekühlt.)

Die Temperatur für die Anlagerung der Primer an den Matrizenstrang (T<sub>M</sub>) wurde mit Hilfe des BioMath Calculators T<sub>m</sub> (Melting Temperature) Calculations for Oligos (<http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm>) berechnet.

### **2.14.3. Enzymatische Modifikation von DNA**

#### **2.14.3.1 Restriktion von DNA**

In dieser Arbeit wurden 1 bis 30 µg DNA, 10 bis 20 U Restriktionsendonuklease und Puffer in einer einfachen Arbeitskonzentration in einem Gesamtvolumenansatz von 50 µl eingesetzt. Die Restriktion erfolgte in der Regel 3 h bis über Nacht. Folgende Enzyme/Enzymkombinationen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurden in dieser Arbeit verwendet:

EcoRI und BamHI (Puffer B), XbaI und PstI (Puffer H), PstI und BamHI (Puffer B) oder BamHI und SphI (Puffer B). Schloss sich an die Restriktion nicht unmittelbar die Dephosphorylierung als nächsten Schritt an, wurde das NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel, Düren) verwendet, um die DNA zu reinigen.

Zur Kontrolle der Restriktion wurde eine Agarosegelelektrophorese (siehe 2.14.4.) durchgeführt.

#### **2.14.3.2. Dephosphorylierung mit SAP**

Zur Vermeidung der Religation der Plasmide nach der Restriktion wurden diese mit der rAPID Alkaline Phosphatase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben dephosphoryliert.

#### **2.14.3.3. Ligation**

Die Ligation wurde unter Berücksichtigung der molekularen Verhältnisse durchgeführt. Die Massen des zu klonierenden Fragments und des Vektors wurden mit Hilfe der Mass Ruler Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach elektrophoretischer Auftrennung (siehe 2.14.4.) abgeschätzt. In der Regel wurden Vektor und Fragment im molekularen Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Das Volumen der Ligationsansätze betrug 20 µl. Die T4-DNA-Ligase (Rapid DNA Ligation Kit, Fermentas) wurde mit einer Konzentration von 20 U/µl im entsprechenden Ligationspuffer eingesetzt. Die Ligationen erfolgten für 5 min bei 22 °C. Die Ligationsansätze wurden anschließend direkt für die Hitzeschock-Transformation in kompetente *E. coli* - Zellen eingesetzt oder bis zur Transformation bei 4 °C gelagert.

#### 2.14.4. Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse der Größe einzelner DNA-Fragmente wurden diese mit 6x Loading Dye versetzt, mittels Elektrophorese in einem Agarosegel (1 % [w/v] in 1x TAE-Puffer) aufgetrennt und anschließend mittels Ethidiumbromid visualisiert.

##### **6x Loading Dye**

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)
Glycerin	30 % (v/v)
EDTA-Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O (0,5 M, pH 8,0)	50 mM

##### **50x TAE-Puffer Stammlösung (Sambrook *et al.*, 1989)**

Tris-HCl	2 M
Eisessig	1 M
EDTA-Na <sub>2</sub> -2 H <sub>2</sub> O	50 mM
pH	7,5

#### 2.14.5. DNA – Transfer in *E. coli*

##### 2.14.5.1. Herstellung kompetenter *E. coli* – Zellen

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA wurde künstliche Kompetenz in *E. coli* DH5α durch entsprechende Anzucht und Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> induziert. Das Protokoll nach Hanahan *et al.* (1983) wurde in dieser Arbeit verwendet:

1. Beimpfen von 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie und Inkubation bei 37 °C und 180 rpm bei Raumluft über Nacht
2. Zugabe von 1 ml der ÜNK zu 100 ml frischem LB-Medium
3. Inkubation bei 37 °C, Raumluft und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5
4. 5 min auf Eis
5. Überführung in zwei 50 ml Greinerröhrchen, Zentrifugation bei 4000 rpm, 4 °C für 5 min
6. Resuspension des Sediments in jeweils 15 ml Puffer TFB1; Überführung in ein 50 ml Greinerröhrchen

7. Inkubation für 90 min auf Eis
8. Zentrifugation bei 4000 rpm, 4 °C für 10 min
9. Resuspension des Sediments in 4 ml eiskaltem Puffer TFB2
10. Lagerung von 100 µl Aliquots im -80 °C Tiefkühlschrank

#### **Puffer-TFB1**

RbCl	100 mM
MnCl	50 mM
Kaliumacetat	30 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
pH	5,8

sterilfiltriert, Lagerung bei 4 °C

#### **Puffer-TFB2**

MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	75 mM
Glycerin	15 %
pH	8,0

sterilfiltriert, Lagerung bei 4 °C

#### **2.14.5.2. Hitzeschocktransformation kompetenter *E. coli* – Zellen**

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden diese in die kompetenten *E. coli* DH5α– Zellen (siehe 2.14.5.1.) mittels Hitzeschocktransformation überführt. Durchführung wie folgt:

1. Auftauen der kompetenten Zellen auf Eis
2. Zugabe von 5 µl Ligationsansatz (siehe 2.14.3.3.)
3. Inkubation für 30 min auf Eis
4. 45 s bei 42 °C im Wasserbad (Hitzeschock)
5. Inkubation für 3 min auf Eis
6. Zugabe von 1 ml LB-Medium
7. Inkubation für 60 min bei 37 °C und 400 rpm im Thermomixer
8. Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm; Raumtemperatur

9. Verwerfen von 800 µl des Überstandes; Resuspension des Sediments im restlichen Medium
10. Ausplattieren der Suspension zu 50 µl und 250 µl auf Antibiotikahaltigen Agarplatten; Inkubation über Nacht bei 37 °C und Raumluft

## **2.14.6. DNA – Transfer in Staphylokokken**

### **2.14.6.1. Herstellung elektrokompetenter Staphylokokken**

Um *S. aureus* und *S. epidermidis* mit rekombinanten Plasmiden zu transformieren, wurde eine Elektroporation durchgeführt. Hierzu mussten die Zellen durch gründliches Waschen von Medium und Salz befreit werden. Der Ablauf im Einzelnen:

1. ÜNK des Staphylococcus-Stammes über Nacht bei 37 °C, 180 rpm und Raumluft
2. Einstellung von 200 ml TSB-Medium mit dieser ÜNK auf eine OD<sub>540</sub> von 0,05 → Wachstum bei 37 °C bis zu einer OD<sub>540</sub> von 0,5 bis 0,6
3. Zentrifugation bei 4000 rpm bei 4 °C für 10 min
4. Resuspension des Sediments in 0,5 M Saccharoselösung (85,575 g Saccharose (342,3 g/mol) in 0,5 l Auqadest gelöst und steril filtriert) (4 °C) im ½ fachen des vorherigen Volumens; erneute Zentrifugation (4000 rpm, 4 °C, 5 min); viermalige Wiederholung dieses Schrittes (Abfolge der Volumina: 100 ml, 50 ml, 25 ml und 12,5 ml)
5. Resuspension des Pellets in 800 µl sterilem 20 % (v/v) Glycerin und Lagerung in 50 µl Aliquots bei -80 °C

### **Herstellung kompetenter *S. aureus* - Zellen nach Trieu-Cuot *et al.* (1993)**

Bei dieser Methode werden zusätzlich zur Elektroporation (siehe 2.14.6.2.) β-Laktamase Antibiotika verwendet, um die Zellwand der Staphylokokken für den Plasmid-Transfer permeabel zu machen, da dieser eine wichtige Barrierefunktion bei der Transformation zugeschrieben wird.

1. ÜNK von *S. aureus* ATCC 25923 über Nacht bei 37 °C, Raumluft und 180 rpm

2. Einstellung von 100 ml TSB-Medium (Oxacillin; Endkonzentration: 0,25 µg/ml) mit 1 ml dieser ÜNK auf eine OD<sub>600</sub> von 0,6
3. Zentrifugation mit 4000 rpm bei 4 °C für 10 min
4. Resuspension des Sediments in 15 ml 0,5 M Saccharoselösung (4 °C); anschließende erneute Zentrifugation (4000 rpm, 4 °C, 5 min); zweimalige Wiederholung dieses Schrittes
5. Resuspension des Sediments in 400 µl sterilem Elektroporationspuffer (s.u.)
6. 50 µl Aliquots dieser Suspension bei -80 °C gelagert

### Elektroporationspuffer

Hepes	1 mM
Saccharose	0,5 M
Glycerin	10%
pH	7,5

#### **2.14.6.2. Elektroporation von elektrokompetenten Staphylokokken**

Protokoll des Institutes für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald:

Mit der Elektroporation wird die Membran des Rezipientenbakteriums durch einen (beim single pulse) oder zwei (twin pulse) kurzen Stromstößen unterschiedlicher Länge und Intensität permeabel gemacht, um das Eindringen von Plasmid-DNA zu erleichtern:

1. Auftauen der kompetenten Zellen (siehe 2.14.6.1.) auf Eis
2. Zugabe von 2 µl Plasmid-DNA und Transfer in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette
3. (1 mm Elektrodenabstand, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
4. Inkubation für 30 min auf Eis
5. Elektroporation mit Twin Pulse:
  1. Puls (high voltage pulse)
 

1500 V
25 µF
99 Ohm
2,47 ms

- |                             |             |
|-----------------------------|-------------|
| 2. Puls (low voltage pulse) | 120 V       |
|                             | 150 $\mu$ F |
|                             | 99 Ohm      |
|                             | 14,8 ms     |
6. umgehende Aufnahme in 900  $\mu$ l eiskaltem TSB-Medium
  7. Inkubation für 90 min bei 37 °C und 400 rpm im Thermomixer
  8. Zentrifugation bei 4000 rpm und Raumtemperatur für 10 min
  9. Verwerfen von 700  $\mu$ l des Überstandes; Resuspension des Sediments im restlichem Medium
  10. Ausplattieren der Suspension zu 50  $\mu$ l und 200  $\mu$ l auf Antibiotikahaltigen Agarplatten; Inkubation für 24 bis 48 h bei 37 °C und Raumluft

#### **Elektroporation nach Trieu-Cuot *et al.* (1993, mod.)**

1. Auftauen der kompetenten Zellen auf Eis
2. Zugabe von 2  $\mu$ l Plasmid-DNA und Überführen der Suspension in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 2 mm; PeqLab Biotechnologie GmbH, Königswinter)
3. Elektroporation mit single pulse:

2500 V
25 $\mu$ F
100 Ohm
4. umgehende Aufnahme in 1 ml TSB-Medium
5. Inkubation bei 37 °C und 400 rpm für 60 min im Thermomixer
6. Zentrifugation bei 4000 rpm und Raumtemperatur für 10 min
7. Verwerfen von 800  $\mu$ l des Überstandes; Resuspension des Sediments im restlichen Medium
8. Ausplattieren der Suspension zu 50  $\mu$ l und 200  $\mu$ l auf Antibiotikahaltigen Agarplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C und Raumluft

#### **2.14.6.3. Herstellung des Phagenlysates**

Mit dem *S. aureus* - Phagen 85 wurden Plasmide aus *S. aureus* RN 4220 (Donorstamm) in *S. aureus* ATCC 25923 transduziert.

Zur Herstellung des Phagenlysates wurde wie folgt vorgegangen:

1. Inkubation von 20 ml LB-Medium mit einer Kolonie *S. aureus* RN 4220 bei 37 °C, Raumluft und 180 rpm über Nacht
2. Zugabe von 100 µl 1 M CaCl<sub>2</sub> (Arbeitskonzentration: 5 mM); anschließende weitere Inkubation für 20 min (37 °C, Raumluft, 180 rpm)
3. Verdünnung des Phagen in Phagenpuffer (LB-Medium mit 5 mM CaCl<sub>2</sub>) auf 1:10, 1:100 und 1:1000
4. Inkubation von je 0,3 ml der ÜNK 2 min bei 52 °C
5. Zugabe von 100 µl des verdünnten Phagenlysates und Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur
6. Zugabe von 4 ml Weichagar (LB-Medium mit 0,6 % (w/v) Agar) mit 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 52 °C zu der Suspension; Ausplattieren auf Blut-Agar-Platten und Inkubation über Nacht bei 37 °C
7. Auswahl einer Platte mit konfluenter Lyse und Zugabe von 2 ml Phagenpuffer auf die Oberfläche des Agar. Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur
8. Abnahme des Lysates und Zentrifugation für 10 min bei 6600 g
9. Sterilfiltrieren des Überstand (Porengröße: 0,45 µm)
10. Lagerung des nun gereinigten Phagenlysates bei 4 °C

#### 2.14.6.4. Phagentransduktion mit dem *S. aureus* – Phagen 85

Zur Transduktion des Plasmides aus *S. aureus* RN 4220 in den Zielstamm (*S. aureus* ATCC 25923) wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Inkubation von 10 ml LB-Medium mit einer Kolonie *S. aureus* ATCC 25923 über Nacht bei 37 °C, Raumluft und 180 rpm
2. Zugabe von 50 µl 1 M CaCl<sub>2</sub> (Arbeitskonzentration: 5 mM); anschließende weitere Inkubation für ca. 20 min, Raumluft und 180 rpm
3. Verdünnung des Phagenlysates (siehe 2.14.6.4.) mit Phagenpuffer (LB-Medium mit 5 mM CaCl<sub>2</sub>) auf 1:10, 1:100 und 1:1000
4. Inkubation von je 0,3 ml der Bakterienkultur für 2 min bei 52 °C
5. Zugabe von 100 µl des unverdünnten und verdünnten Phagenlysates mit anschließender Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur

6. Zugabe von 3 ml Weichagar mit 20 mM Na<sub>3</sub>-Citrat und 52 °C zu der Suspension; anschließend Ausplattieren auf LB-Agar mit dem der Plasmid-Resistenz entsprechendem Antibiotikum
7. Inkubation bei 37 °C und Raumluft für 24 bis 48 h

#### **2.14.7. Sequenzierung**

Die Sequenzierung der rekombinaten Plasmide wurde von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

Die Firmenangaben bezüglich der Zustellung der zu sequenzierenden Proben und Primern wurden befolgt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Unbehandelte Titanplättchen als Referenz für *in vitro* Oberflächenuntersuchungen

Zur *in vitro* Testung von Oberflächenbeschichtungen und –modifikationen auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften benötigt man eine Versuchsanordnung mit der sich das Wachstum von Bakterien auf den Probekörpern reproduzierbar untersuchen lässt.

Titan (TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub>) mit zwei unterschiedlichen Oberflächenrauigkeiten wurde als das Referenzmaterial verwendet. Korund-gestrahlt (hier: Ti HA-gestrahlt), mit einer Rauigkeit von  $R_a = 0,725 \mu\text{m}$ , ist Titan das Standardmaterial für den orthopädischen Gelenkersatz. Die polierte Titanoberfläche (hier: Ti poliert) mit einer Rauigkeit von  $R_a = 0,19 \mu\text{m}$  wurde hingegen in der Forschung schon zur Untersuchung von Oberflächenbeschichtungen und der Fibroblasten-Adhäsion (Finke *et al.*, 2007; Schröder *et al.*, 2010) genutzt.

##### 3.1.1. Untersuchungsstandard mit $10^6$ KBE/ml

Da Staphylokokken die häufigsten Erreger der Implantat-assoziierten Infektion sind (siehe 1.1.2.), wurden für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Bakterien auf den Probekörpern zwei Staphylokokkenstämme verwendet, während einer 10-tägigen Inkubation beobachtet und die Biofilmbildung mit planktonischem Wachstum verglichen.

Abbildung 5a)

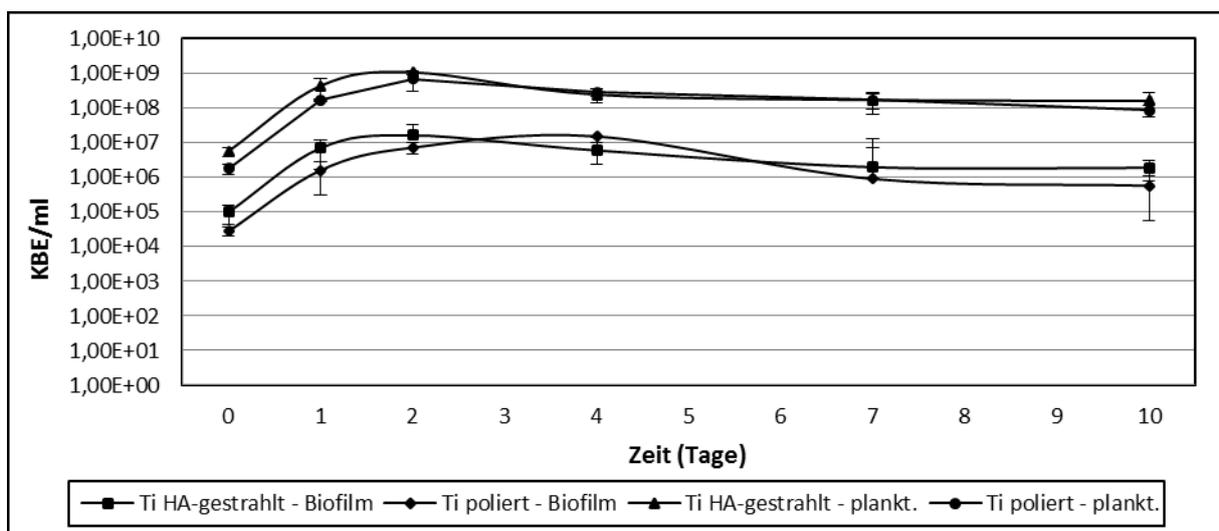


Abbildung 5b)

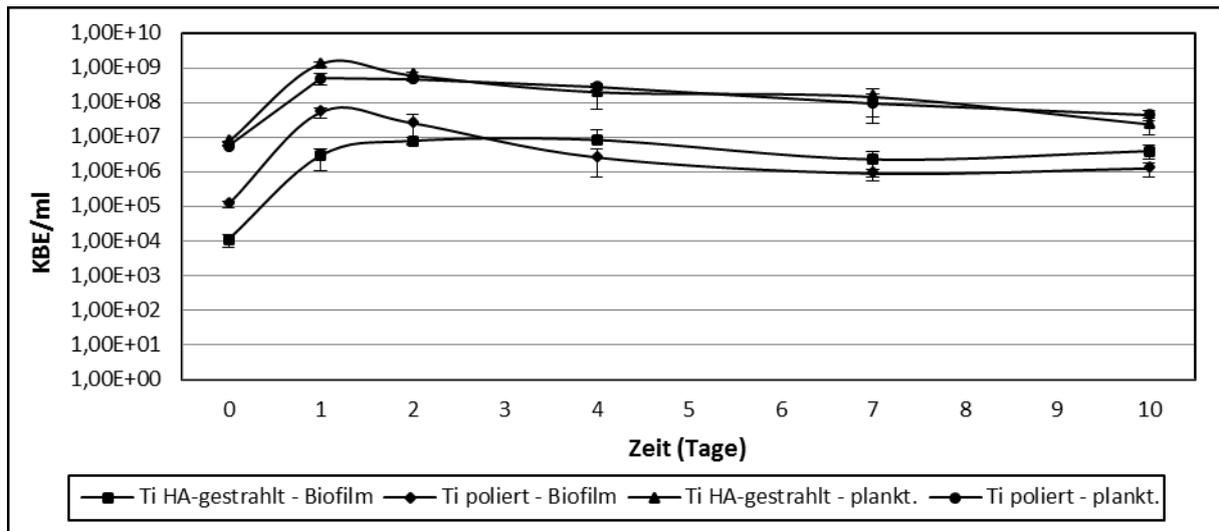


Abb. 5: Wachstumsverlauf von *S.aureus* ATCC 25923 (Abb. 5a)) und *S.epidermidis* RP62A (Abb. 5b)) über 10 Tage auf HA-gestrahnten und polierten Titan-Probekörpern. Quantifizierung mittels KBE/ml.

Bei einer Ausgangskeimkonzentration von  $10^6$  KBE/ml kam es innerhalb der ersten 24 Stunden zum steilsten Anstieg der Zellzahl für Biofilm- als auch planktonische Bakterien im gesamten Versuchszeitraum. Dabei war die Menge der planktonischen gegenüber den adhärenen Staphylokokken an jedem Messpunkt zwischen 10x und 100x größer. Den Höchstwert erreichte *S. aureus* an Tag 2 und *S. epidermidis* an Tag 1 mit je ca.  $1 \times 10^9$  KBE/ml. An den weiteren Versuchstagen kam es zur langsamen Abnahme der planktonischen Zellzahl bis auf ca.  $1 \times 10^8$  KBE/ml (*S. aureus*) bzw. ca.  $5 \times 10^7$  KBE/ml (*S. epidermidis*) an Tag 10.

Die höchste Zellzahl für die adhärenen Bakterien lag für *S. aureus* an Tag 2 (Ti HA-gestrahlt) und Tag 4 (Ti poliert). Für *S. epidermidis* an Tag 1 (Ti poliert) und an Tag 4 (Ti HA-gestrahlt), wobei *S. epidermidis* auf Ti poliert den Höchstwert mit ca.  $5 \times 10^7$  KBE/ml unter beiden Stämmen erreichte. Im Gegensatz zu den planktonischen Bakterien kam es nach Tag 7 zu keiner weiteren Abnahme der Menge der adhärenen Bakterien. Die Kurvenverläufe für die adhärenen Bakterien beider Stämme auf beiden Referenzprobekörpern ähnelten sich trotz der unterschiedlichen Oberflächenrauigkeit.

Zusammenfassend ermöglichte die Oberfläche des polierten Titans *S. epidermidis* die größte Proliferation der Biofilmbakterien beider Testkeime. Die höchste Zellzahl für die Biofilmbakterien sowohl für *S. aureus* als auch *S. epidermidis* wurde innerhalb der ersten 4 Versuchstage beobachtet. Anschließend blieben die Zellzahlen nach geringer Abnahme bis zum Versuchsende weitestgehend gleich.

Tag 0                      Tag 1                      Tag 4                      Tag 10

Abbildung 6a)

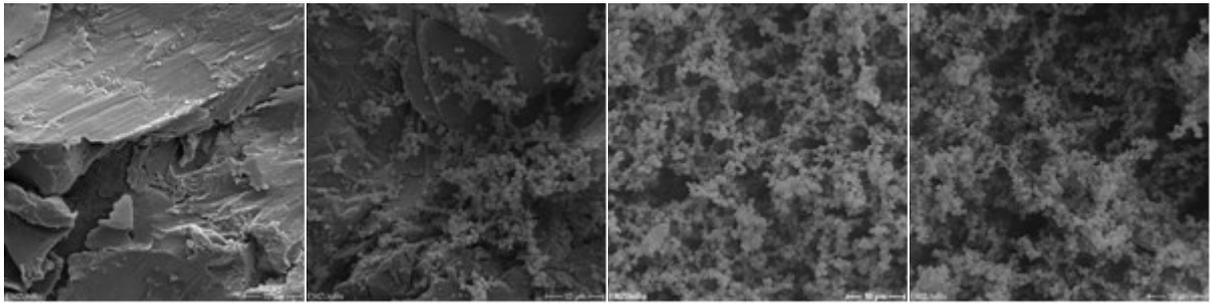


Abbildung 6b)

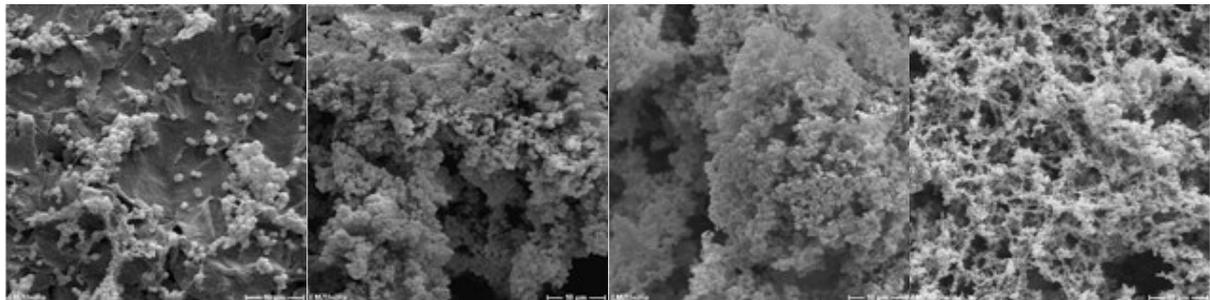


Abbildung 6c)

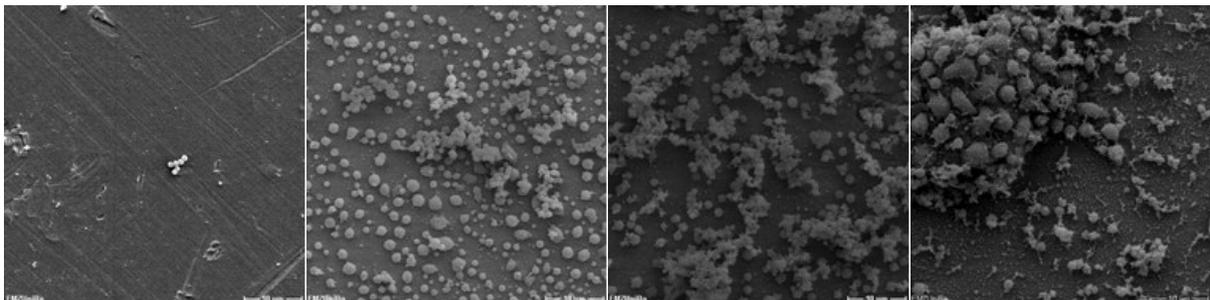
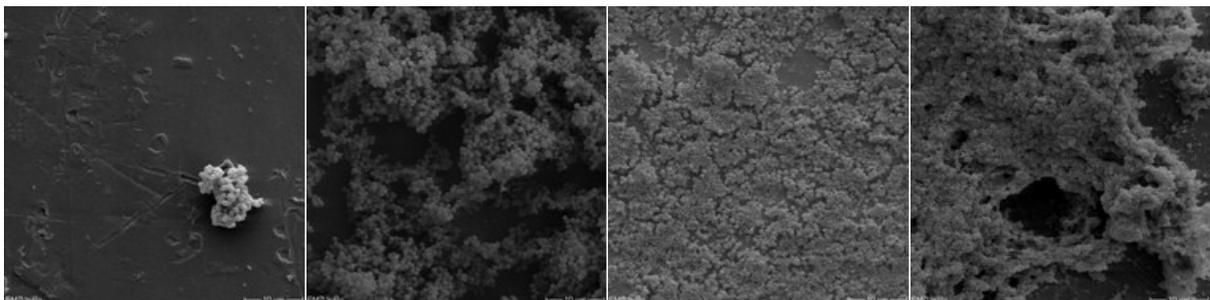


Abbildung 6d)



**Abb. 6:** Rasterelektronenmikroskopische Bilder (2000x Vergrößerung) von *S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 6a) und c) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 6b) und d) auf Ti HA-gestrahlt (Abb. 6a) und b) und Ti poliert (Abb. 6c) und d)

Die mittels Rasterelektronenmikroskop angefertigten Aufnahmen zeigen, dass sowohl *S. aureus* als auch *S. epidermidis* auf HA-gestrahlt Titan nach 24 h einen Biofilm

ausgebildet hatten (Abb. 6a) und b)). Gleiches galt für *S. epidermidis* auf poliertem Titan (Abb. 6d)), während der Biofilm von *S. aureus* auf poliertem Titan zwischen Tag 1 und 4 entstand (Abb. 6c)). Auf diesem Referenzkörper konnte jedoch an keinem der Versuchstage ein so dichter Biofilm wie auf rauem Titan dokumentiert werden.

Die im Wachstumsversuch ermittelten Lebendkeimzahlen für die adhärennten Bakterien ab Tag 1 auf rauem Titan für beide Keime und auf glattem Titan für *S. epidermidis* entsprechen in etwa der Biofilmmasse auf den jeweiligen rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Tag 1                      Tag 4                      Tag 7                      Tag 10  
Abbildung 7a)

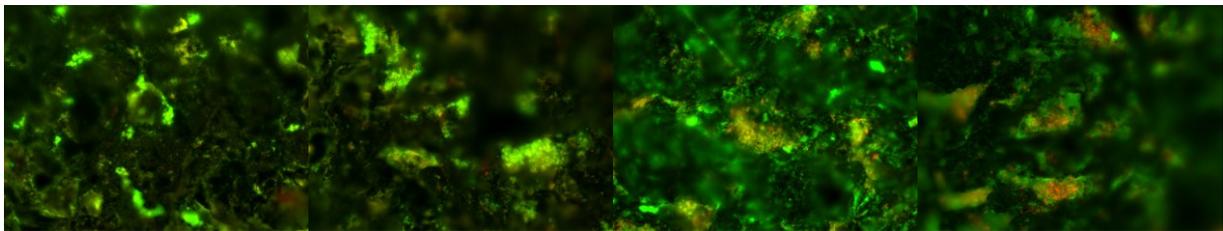


Abbildung 7b)

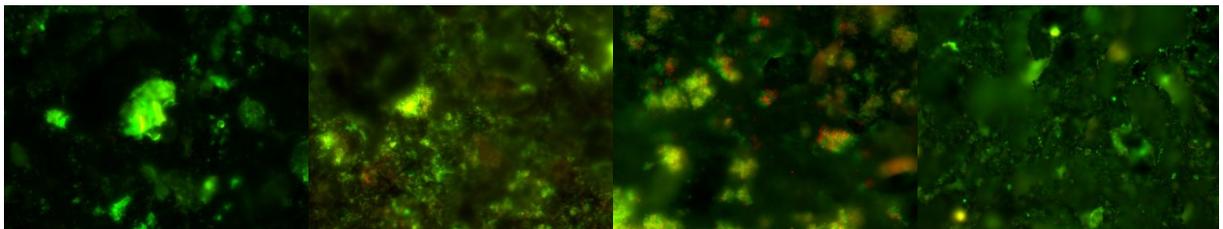


Abbildung 7c)

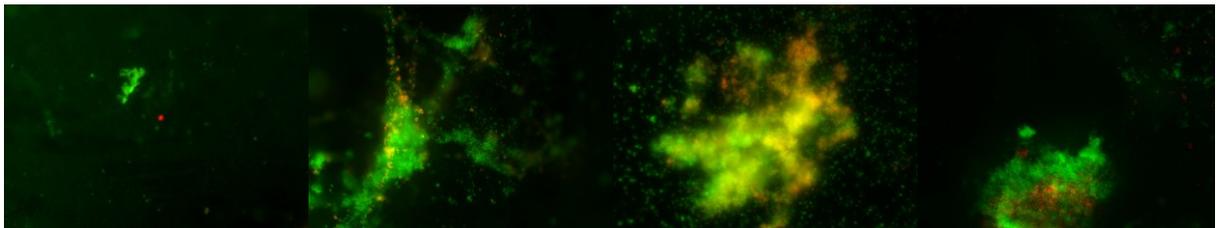
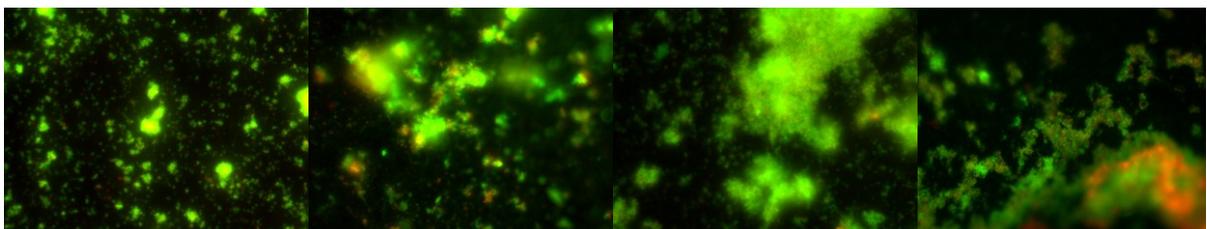


Abbildung 7d)



**Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (40x Vergrößerung) von *S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 7a) und c)) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 7b) und d)) auf Ti HA-gestrahlt (Abb. 7a) und b)) und Ti poliert (Abb. 7c) und d))**

Eine stärkere Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop war auf den Probekörpern technisch nicht realisierbar, da die verwendeten Deckgläschen nur an vereinzelt Stellen den unebenen Probekörpern direkt auflagen.

Auf dem HA-gestrahltem Titan saßen die Staphylokokken vornehmlich in den Nischen und Konkavitäten der Oberfläche, während die Kanten und Konvexitäten nicht von den Keimen besiedelt wurden. Vereinzelt waren größere Bakterienaggregate, also Biofilme, anzutreffen, die sich dreidimensional sowohl nach oben als auch seitlich gleichermaßen ausdehnten. Im Verlauf über 10 Tage überwucherten diese Biofilme die Oberflächen nicht vollständig.

Auf den polierten Titankörpern fand diese Ausdehnung mehr in zusammenhängenden Zellverbänden statt. Dieses mehr flächige Wachstum ließ im Zeitverlauf über 10 Tage sowohl für *S. aureus* als auch *S. epidermidis* eine zunehmende Größe der Biofilme mit einem Maximum an Tag 10 erkennen.

Mit dem hier verwendeten Live/Dead-Fluoreszenzfarbstoff, mit dem lebende Bakterien grün und tote Bakterien rot dargestellt werden, wurde der Gehalt des Biofilmes an lebenden Staphylokokken untersucht. Über den gesamten untersuchten Zeitraum war die grüne Fluoreszenz gegenüber der roten dominant. An Tag 1 waren kaum Bakterien rot gefärbt. Im Verlauf war die Zahl der rot fluoreszierenden Bakterien jedoch zunehmend. Mit einem Maximum am letzten Versuchstag, Tag 10. Am deutlichsten war die rote Fluoreszenz im Zentrum der Biofilme zu erkennen. Dies war vor allem auf den polierten Titankörpern gut zu erkennen.

Insgesamt ließ sich im Gegensatz zu den ermittelten Lebendkeimzahlen mittels der Fluoreszenzmikroskopie ein von der Oberflächenrauigkeit abhängiges Wachstumsverhalten beobachten. Außerdem zeigte sich das Auftreten und die Zunahme toter Biofilmbakterien im Versuchsverlauf, die vor allem im Inneren der Biofilme anzutreffen waren.

Es lässt sich schlussfolgern, dass beide Staphylokokkenstämme Biofilme auf den Probekörpern ausbildeten, in denen die Keimzahl mit einem unterschiedlich steilen Anstieg innerhalb der ersten 4 Tage einen dynamischen Verlauf nahm, während es im Anschluss zu einer stationären Phase mit vergleichsweise geringfügiger Änderung der Keimzahl und Zunahme toter Zellen insbesondere im Zentrum der Biofilmmasse kam.

### **3.1.2. Einfluss des Ausgangsinokulums auf die Biofilmbildung**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *S. aureus* ATCC 25923 und *S. epidermidis* RP62A auf Titanoberflächen einen Biofilm bilden, und der Verlauf der Zellzahl sowohl der Biofilm- als

auch planktonischen Bakterien untersucht wurde (siehe 3.1.1.), galt es den Einfluss der Ausgangsmenge der Keime auf das Wachstumsverhalten der Bakterien in Relation zu den Probekörpern Ti HA-gestrahlt und Ti poliert zu beobachten. Hierzu wurde die Keimausgangskonzentration auf  $10^3$  KBE/ml verändert. Diese Ergebnisse wurden zum Vergleich mit den Ergebnissen des Wachstumsverlaufes einer Einsaat von  $10^6$  KBE/ml in Abbildung 8 für die Biofilm-Bakterien graphisch zusammengefasst:

Abbildung 8a)

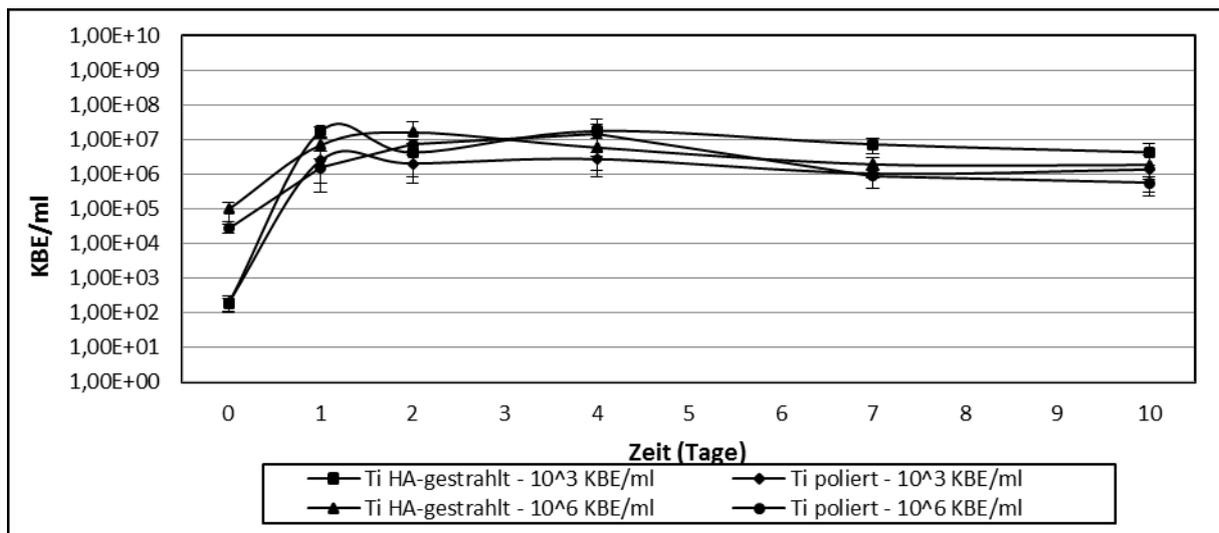
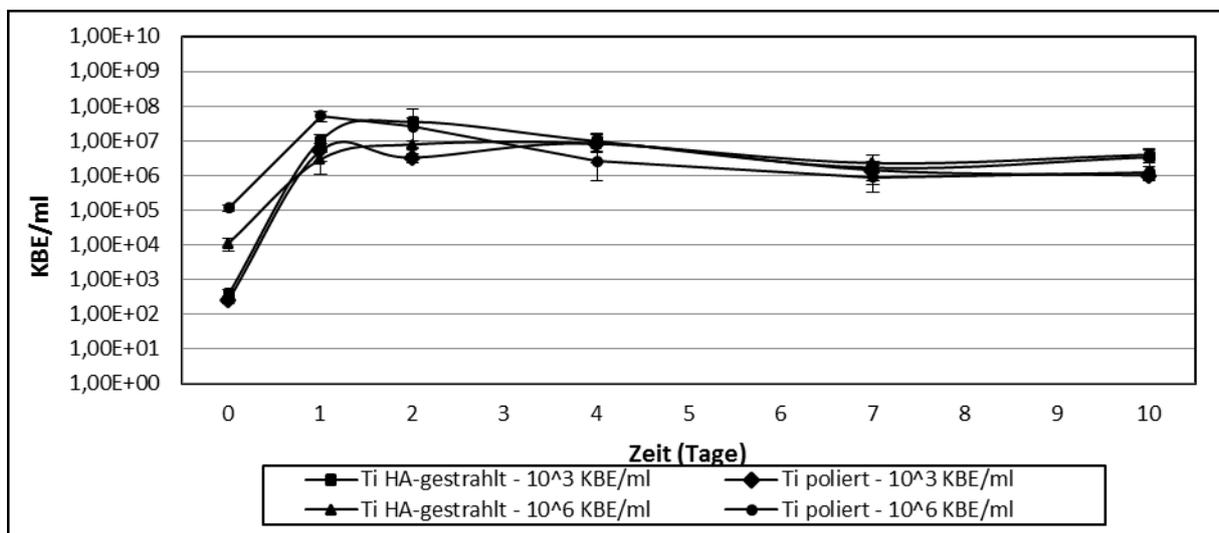


Abbildung 8b)



**Abb. 8: Wachstumsverlauf von *S.aureus* ATCC 25923 (Abb. 8a)) und *S.epidermidis* RP62A (Abb. 8b)) Biofilm-Bakterien über 10 Tage auf HA-gestrahnten und polierten Titan-Probekörpern. Ausgangskeimkonzentration  $10^3$  KBE/ml und  $10^6$  KBE/ml. Quantifizierung mittels KBE/ml.**

Die Ergebnisse zeigen, dass nach 24 Stunden das Wachstumsverhalten unabhängig von der Bakterienausgangskonzentration war, denn zu diesem Zeitpunkt waren die Werte für die

Biofilm-Bakterien bei einer geringeren Einsaat annähernd gleich mit denen der höheren Ausgangskonzentration. An Tag 0 war jedoch die Zahl der adhärennten Bakterien für die größere Einsaat etwa um den Faktor 100 höher.

Die Variation des Untersuchungsstandards von  $10^6$  auf  $10^3$  KBE/ml Ausgangs-keimkonzentration hatte somit nur einen Einfluss auf das Wachstum der ersten 24 Stunden, unter der Bedingung, dass keine das Wachstum inhibierenden Faktoren anwesend waren.

### 3.1.3. Einfluss der initialen Kulturbedingungen auf das planktonische und Biofilmwachstum

Für *S. aureus* wurde untersucht, wie sich die Ausgangskeimzahl und das Erneuern des Mediums nach 2 h Bebrütung, also während der initialen Phase der Biofilmbildung auf die Keimzahl der planktonischen und Biofilmbakterien auf HA-gestrahlem Titan auswirkt. Dazu wurde nach 2-stündiger Inkubation der Überstand abgenommen und der Testkörper vorsichtig mit 1ml 1 x CB-Medium gewaschen. Der Überstand und die Spülflüssigkeit wurden entsorgt und der Probekörper wurde erneut in CB-Medium/Humanserum (1:1) inkubiert.

Abbildung 9a)

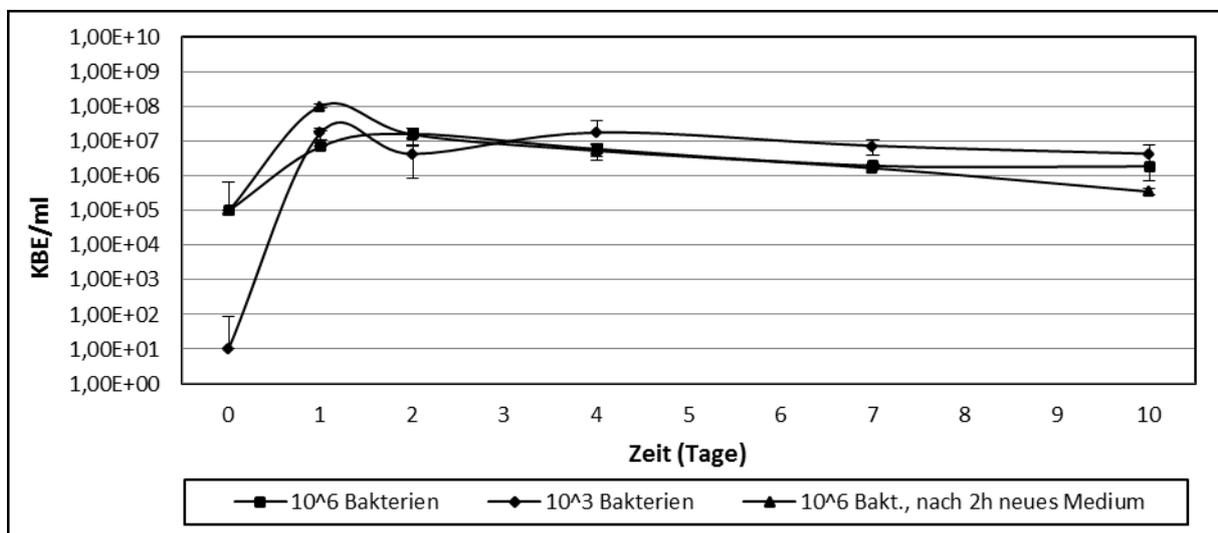


Abbildung 9b)

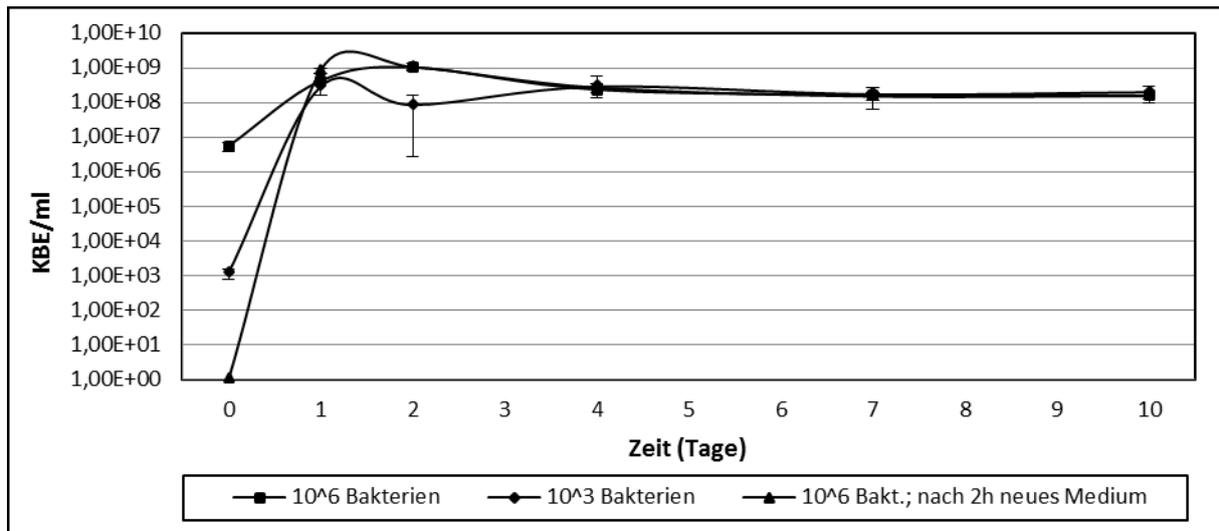


Abb. 9: Wachstumsverlauf von *S. aureus* ATCC 25923 Biofilmbakterien (Abb. 9a)) und planktonischer Bakterien (Abb. 9b)) über 10 Tage auf HA-gestrahlten Titan-Probekörpern mit unterschiedlichen initialen Kulturbedingungen. Quantifizierung mittels KBE/ml.

Auch Abbildung 9 zeigt, dass die Bakterienkonzentration beim Animpfen keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der planktonischen und Biofilmbakterien hatte. Nach Wechseln des Mediums und dem damit verbundenem Entfernen der planktonischen Population, war der Verlauf der Keimzahlen planktonischer und adhärenter Bakterien nach 24 Stunden annähernd gleich mit den Versuchen, in denen das Medium nicht entfernt wurde.

### 3.2. Bakterizide Wirkung von Kupfer auf Staphylokokken

In dieser Arbeit wurde Kupfer als ein Mittel zur Verhinderung der Biofilmbildung von Staphylokokken auf modifizierten Implantatoberflächen untersucht. Um die grundsätzliche Bakterizidie des Kupfers auf die verwendeten Staphylokokkenstämme zu prüfen und eine Orientierung bezüglich der hierfür notwendigen Kupferkonzentration zu erhalten, wurde im Wachstumsversuch die Minimale bakterizide Konzentration (MBK) sowie die Minimale Hemmkonzentration (MHK) auf den jeweiligen Bakterienstamm mit Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) bestimmt. Kupfersulfat als Salz des Kupfers wurde gewählt, weil es auf seine antimikrobielle Eigenschaften schon intensiv, z. B. auf *Pseudomonas aeruginosa* (Harrison *et al.*, 2005; Harrison *et al.*, 2008), untersucht wurde. Dort wurde auch beschrieben, dass die Bakterien im Biofilm bei kurzer Expositionszeit resistenter gegenüber Metallen als die planktonische Population sind (Harrison *et al.*, 2005). Deshalb wurde nach der Bestimmung der MBK für

die planktonischen Bakterien, dieser Wert angewendet auf die Biofilmbakterien im Referenzkörperversuch über 10 Tage.

### 3.2.1. Minimale bakterizide und minimale Hemmkonzentration von $\text{CuSO}_4$

Vorgegangen wurde hierfür nach dem Protokoll unter Punkt 2.12. und das Wachstum der Bakterien über 8 Stunden bei unterschiedlichen Kupferkonzentrationen und unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen dokumentiert.

Abbildung 10a)

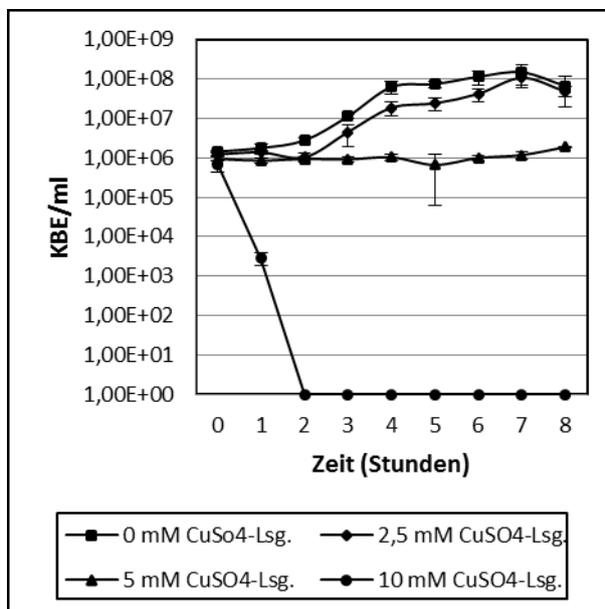
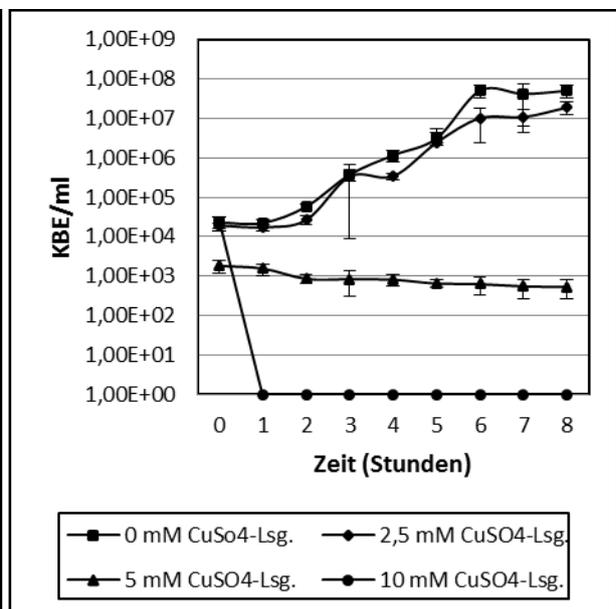


Abbildung 10b)



**Abb. 10: Wachstumsverlauf von *S. aureus* ATCC 25923 in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an  $\text{CuSO}_4$ -Lösung.** Quantifizierung mittels Bestimmung der KBE/ml. Ausgangskonzentration des Keimes mit  $10^6$  KBE/ml (Abb. 10a) und  $10^3$  KBE/ml (Abb.10b)).

Aus der Abbildung 10 wird deutlich, dass sich das Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923 bei einer Kupferkonzentration von 2,5 mM genauso verhielt, wie das Wachstum ohne Kupfer, unabhängig von der Keimzahl. Bei 5 mM  $\text{CuSO}_4$ -Lösung kam es zur Stagnation des Wachstums, ohne dass die Bakterien abgetötet wurden. Die KBE/ml zu Beginn und nach 8 Stunden waren nahezu identisch mit der jeweils eingesetzten Keimzahl. Dies entspricht der MHK für *S. aureus* ATCC 25923. Bei einer weiteren Verdopplung der Konzentration der  $\text{CuSO}_4$ -Lösung auf 10 mM war die MBK erreicht, da im Versuch bei einer Ausgangskonzentration von  $10^6$  Bakterien/ml nach zwei Stunden und bei  $10^3$  Bakterien/ml nach einer Stunde kein Wachstum mehr zu detektieren war.

Sowohl auf die MHK als auch auf die MBK hatte die Größe des Inokulums keinen Einfluss. Die Eradikation aller Bakterien erfolgte bei einer geringeren Einsaat lediglich schneller, nämlich bereits nach einer Stunde. Somit ist die MHK von  $\text{CuSO}_4$  auf *S. aureus* 5 mM und die MBK 10 mM  $\text{CuSO}_4$ , da diese Werte die niedrigsten Konzentrationen angeben, bei denen das Wachstum gehemmt oder die Bakterien abgetötet wurden.

Abbildung 11a)

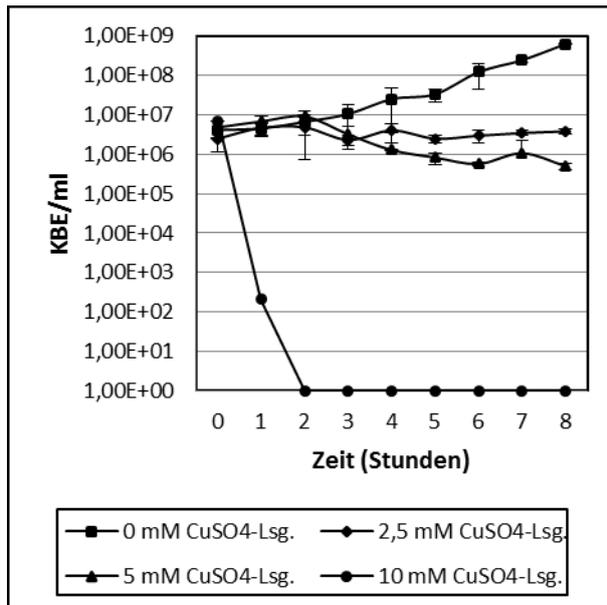
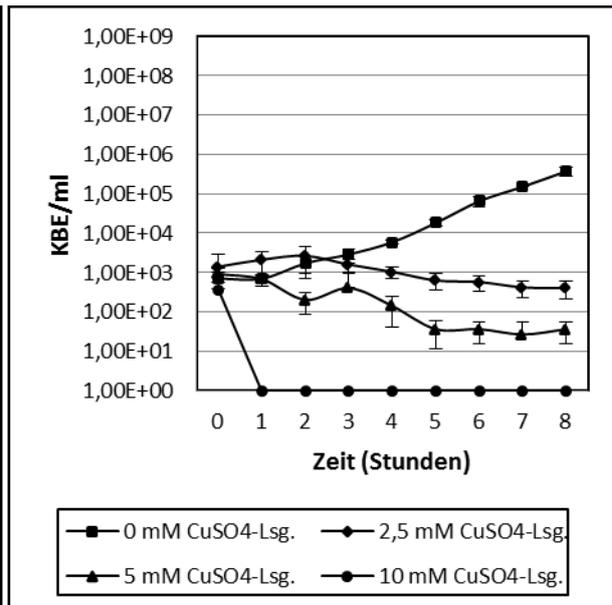


Abbildung 11b)



**Abb. 11: Wachstumsverlauf von *S. epidermidis* RP62A in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an  $\text{CuSO}_4$ -Lösung.** Quantifizierung mittels Bestimmung der KBE/ml. Ausgangskonzentration des Keimes mit  $10^6$  KBE/ml (Abb. 11a) und  $10^3$  KBE/ml (Abb. 11b).

Die Abbildung 11 zeigt, dass eine Konzentration von 2,5 mM  $\text{CuSO}_4$  das Wachstum von *S. epidermidis* RP62A im Vergleich zum Wachstum ohne  $\text{CuSO}_4$  hemmte, unabhängig von der Bakterienausgangskonzentration. Die MHK wurde erreicht, da es nicht zu einem wesentlichen Absterben der Bakterien kam und die ermittelten KBE/ml über 8 Stunden nahezu keine Veränderung zeigten. Auch mit 5 mM  $\text{CuSO}_4$  wurde das Wachstum gehemmt, jedoch lag der Wert für die KBE/ml nach 8 Stunden um eine 10er Potenz niedriger als zu Beginn, wobei der Abfall der Bakterienzahl in dem Versuch mit  $10^3$  Bakterien/ml eingesäten Bakterien deutlicher ausfiel. Mit 10 mM  $\text{CuSO}_4$  waren nach zwei ( $10^6$  Bakterien/ml Ausgangskonzentration) bzw. einer Stunde ( $10^3$  Bakterien/ml) keine KBE mehr nachzuweisen. Die MBK von  $\text{CuSO}_4$  für *S. epidermidis* RP62A ist dementsprechend 10 mM. Auch für diesen Keim galt, dass die Ausgangskonzentration der Bakterien keinen Einfluss auf

die MHK und MBK hatte, die Zeit bis zur vollständigen Abtötung bei der geringeren Einsaat jedoch kürzer war.

Zusammenfassend ist die MHK von  $\text{CuSO}_4$  für *S. epidermidis* 2,5 mM und die MBK 10 mM. Letzterer Wert entspricht dem, der auch für *S. aureus* ermittelt wurde.

Die Ergebnisse aus den Wachstumskurven wurden in den folgenden Abbildungen (siehe Abb. 12 und 13) so dargestellt (nach Harrison *et al.*, 2005), dass die Bakterienkonzentration mit der Kupferkonzentration verglichen wurde. Zunächst wurden die Werte abhängig von der Expositionsdauer und anschließend abhängig von der Bakterienausgangskonzentration dargestellt.

Abbildung 12 a)

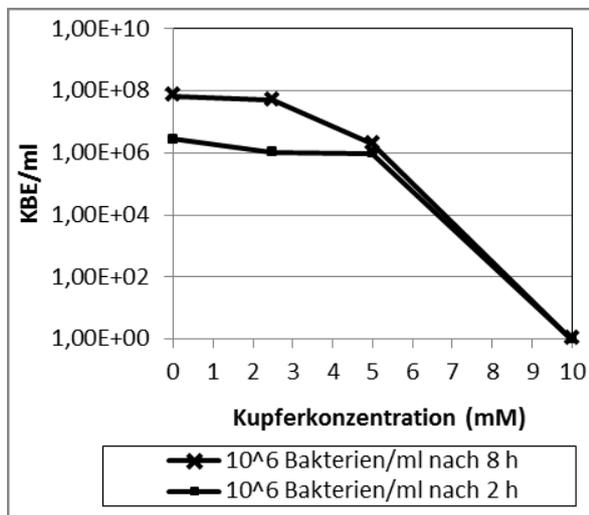


Abbildung 12b)

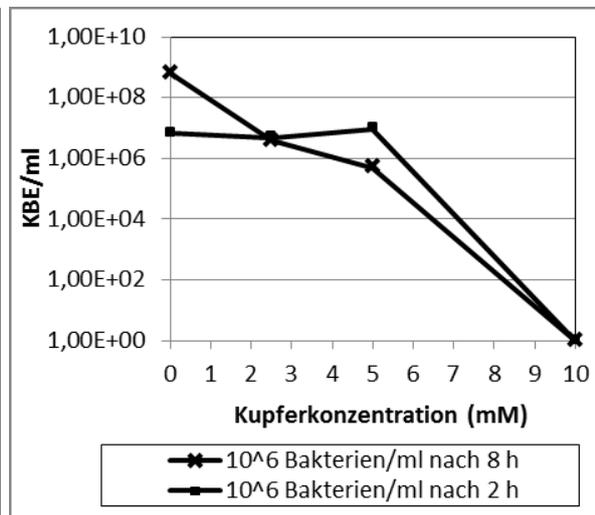


Abb. 12: Einfluss von Kupfer auf das Bakterienwachstum (*S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 12a)) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 12b)) in Abhängigkeit von der Expositionsdauer. Bakterienquantifizierung nach 2 und 8 Stunden aus Abb. 10 und 11 auf die eingesetzte Kupferkonzentration aufgetragen.

Kupfer hatte auf das Wachstum von *S. aureus* bei 8 Stunden Expositionszeit ab 2,5 mM einen Effekt auf das Wachstum, während dieser bei 2 Stunden Expositionszeit erst ab 5 mM zu beobachten war (siehe Abb. 12a)). *S. epidermidis* zeigte ein ähnliches Verhalten, mit dem Unterschied, dass bei 2,5 mM  $\text{CuSO}_4$  mit 8 Stunden Expositionszeit das Wachstum bereits gehemmt wurde (siehe Abb. 12b)).

Somit tolerierten die Staphylokokken bei kurzer Expositionszeit größere Kupferkonzentrationen als bei längerer Expositionszeit.

Abbildung 13a)

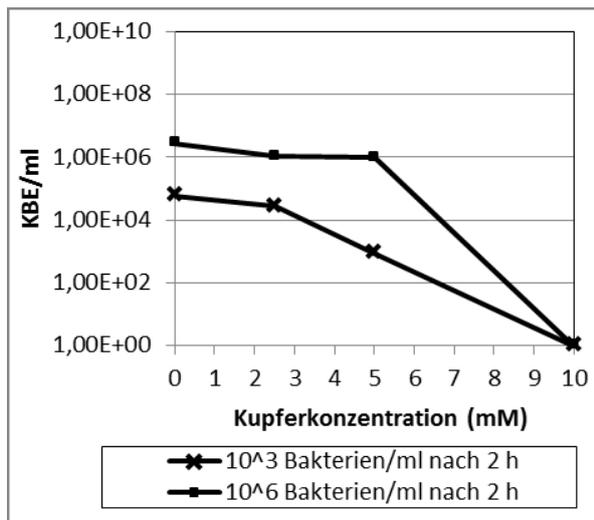
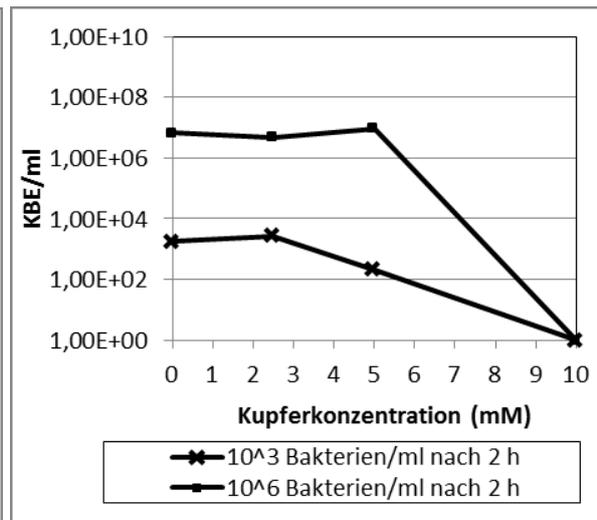


Abbildung 13b)



**Abb. 13: Einfluss von Kupfer auf das Bakterienwachstum (*S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 13a) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 13b)) in Abhängigkeit von der Bakterienkonzentration.** Bakterienquantifizierung 2 Stunden nachdem Einsetzen von 10<sup>3</sup> und 10<sup>6</sup> Bakterien/ml aus Abb. 10 und 11 auf die eingesetzte Kupferkonzentration aufgetragen.

Bei beiden Keimen war mit kurzer Expositionszeit (2 h) gegenüber CuSO<sub>4</sub> zu erkennen, dass bei einer Ausgangskonzentration von 10<sup>6</sup> Bakterien ein Effekt erst über 5 mM stattgefunden hatte. Bei einer Bakterienkonzentration von 10<sup>3</sup> war bereits ein Effekt ab 2,5 mM zu verzeichnen (siehe Abb. 13a) und b)).

Somit tolerierte bei kurzer Expositionszeit ein größeres Bakterieninokulum eine größere CuSO<sub>4</sub>-Konzentration als ein kleineres Inokulum.

### 3.2.2. Einfluss der MHK von CuSO<sub>4</sub> auf das Staphylokokkenwachstum

Unter Punkt 3.2.1. konnte die MHK für *S. aureus* mit 5 mM CuSO<sub>4</sub> und für *S. epidermidis* mit 2,5 mM CuSO<sub>4</sub> bestimmt werden. Es sollte nun untersucht werden, ob die Zugabe der MHK von CuSO<sub>4</sub> zu Staphylokokken, die Adhärenz der Bakterien bzw. die Ausbildung eines Biofilms beeinflusst. Dazu wurden 5 mM bzw. 2,5 mM CuSO<sub>4</sub> zur Einsaat hinzugegeben:

Abbildung 14a)

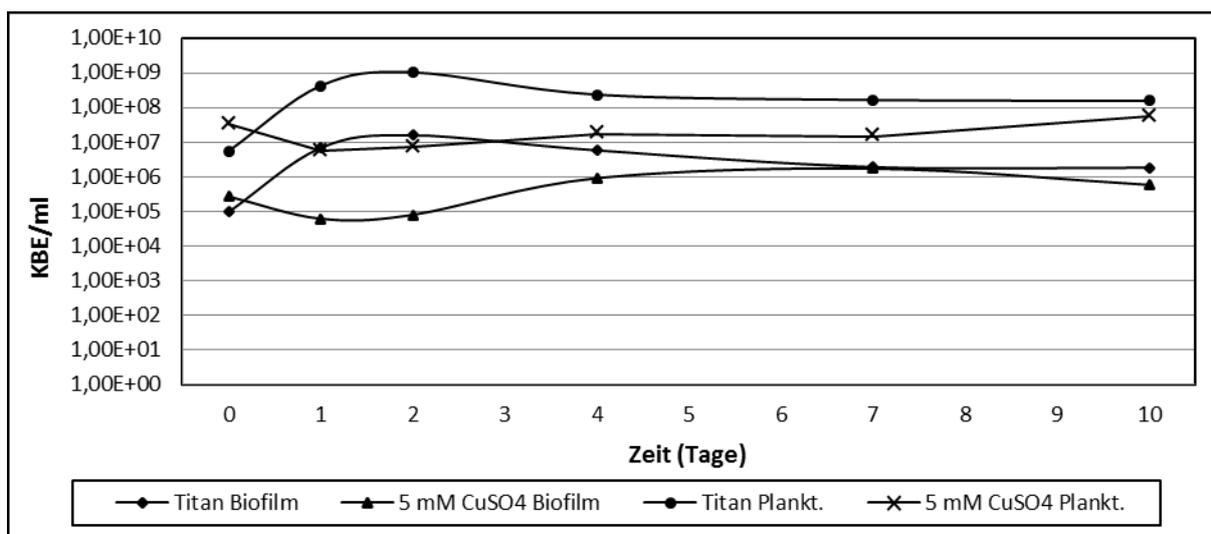
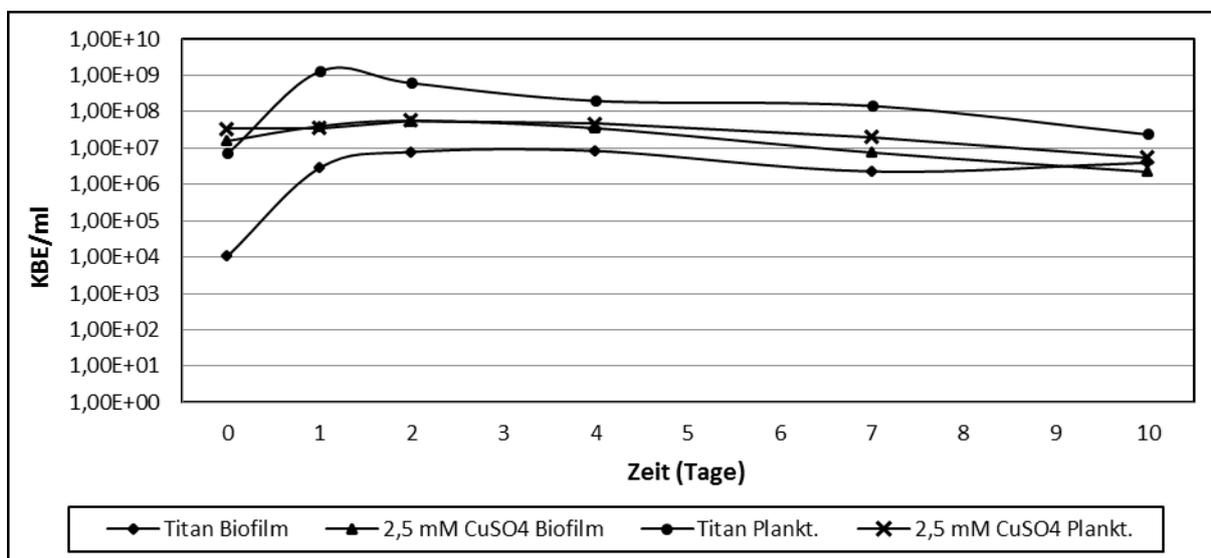


Abbildung 14b)



**Abb. 14:** Wachstumsverlauf von Staphylokokkenbiofilmen und der planktonischen Fraktion (*S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 14a)) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 14b)) mit und ohne CuSO<sub>4</sub>-Zugabe auf HA-gestrahltem Titan. Quantifizierung mittels Bestimmung der KBE/ml. Ausgangskonzentration der Keime mit 10<sup>6</sup> KBE/ml.

Analog dem Ergebnis von Punkt 3.2.1. zeigte sich auch hier dass bei Einsatz von CuSO<sub>4</sub> in der MHK planktonische Bakterien beider Spezies nicht wuchsen, sondern in ihrer Zahl über 10 Tage gleich blieben, während es in Abwesenheit von CuSO<sub>4</sub> zunächst zu einer Zunahme der planktonischen Zellzahl kam.

Für die adhärennten Bakterien von *S. aureus* zeigte sich ein quantitativ ähnlicher Verlauf wie für die planktonische Fraktion. Für die adhärennten Bakterien von *S. epidermidis* war dies wegen anderer Einsaatgrößen nicht genau ablesbar. Es lässt sich aber zusammenfassend

sagen, dass sich die auf HA-gestrahltm Titan adhärenen Fraktionen beider Spezies in Gegenwart oder Abwesenheit von  $\text{CuSO}_4$  in der speziesspezifischen MHK unter den hier verwendeten Kultivierungsbedingungen im Verlauf über 10 Tage nicht wesentlich unterschied.

Angemerkt sei, dass sich nach der Zugabe des Kupfersulfates zum Gemisch aus Medium und Humanserum ein graues Sediment zu beobachten war, das etwa 1/3 der Höhe des Wells einnahm. Bei einer daraufhin steril angesetzten Inkubation mit einerseits CB-Medium und Kupfersulfat (10 mM) und andererseits CB-Medium/Humanserum (1:1) und Kupfersulfat (10 mM) ergab sich dieser Niederschlag nur in dem Well, das zusätzlich Humanserum enthielt, so dass angenommen werden muss, dass das Kupfersulfat mit Bestandteilen des Humanserums ausfiel. Das Kupfer könnte an das im Humanserum enthaltende Albumin (Rózga *et al.*, 2007) oder andere Proteine gebunden haben und so möglicherweise das Löslichkeitsprodukt verändert haben. Die Aussagekraft der erhobenen Daten wird dadurch nicht beeinträchtigt, weil *in vivo* durch ein Implantat freigesetzte Kupferionen ebenfalls mit Humanserum reagieren würde. Die erhobenen Werte für die MHK, MBK und MBEC (s.u.) sind an die hier vorliegenden Bedingungen des Inkubationsmediums mit Humanserum gebunden.

### **3.2.3. Einfluss der MBK von $\text{CuSO}_4$ auf planktonische Staphylokokken und etablierte Staphylokokkenbiofilme**

Die Untersuchung der minimalen bakteriziden Konzentration von  $\text{CuSO}_4$  auf *S. aureus* ATCC 25923 und *S. epidermidis* RP62A ergab bei beiden Keimen bei planktonischen Wachstum einen Wert von 10 mM. Es wurde geprüft, ob die minimale bakterizide Konzentration von 10 mM  $\text{CuSO}_4$  ausreicht, um Staphylokokkenbiofilme zu eradizieren. Darüber hinaus wurde auch die doppelte MBK, 20 mM  $\text{CuSO}_4$ , eingesetzt. Im Kapitel 3.1. konnte anhand der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen und der Quantifizierung gezeigt werden, dass beide Staphylokokkenstämme nach 24 Stunden einen Biofilm auf HA-gestrahltm und poliertm Titan ausgebildet hatten und dass die Menge der Biofilmbakterien nach 24 Stunden, unabhängig von der Bakterienausgangskonzentration, vergleichbar war. Nachfolgend sind die Ergebnisse der Wirkung von  $\text{CuSO}_4$  auf *S. aureus*- und *S. epidermidis*-Biofilme, die zunächst 24 Stunden ohne Zugabe von Kupfer inkubiert wurden, auf einer Ti HA-gestrahlt Oberfläche (Protokoll siehe 2.13.1.1.) dargestellt.

Abbildung 15a)

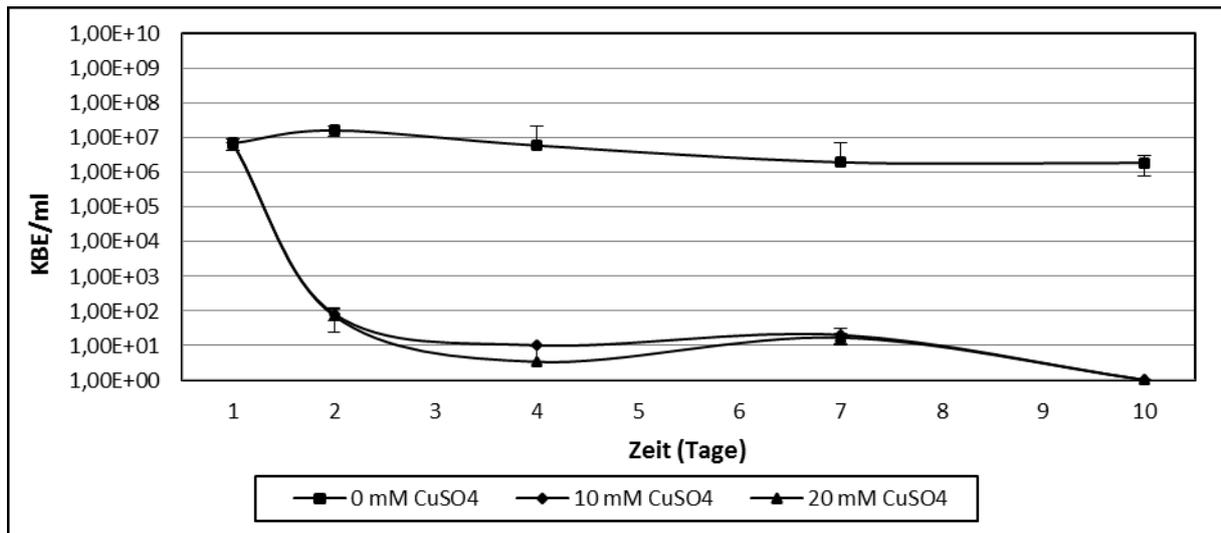


Abbildung 15b)

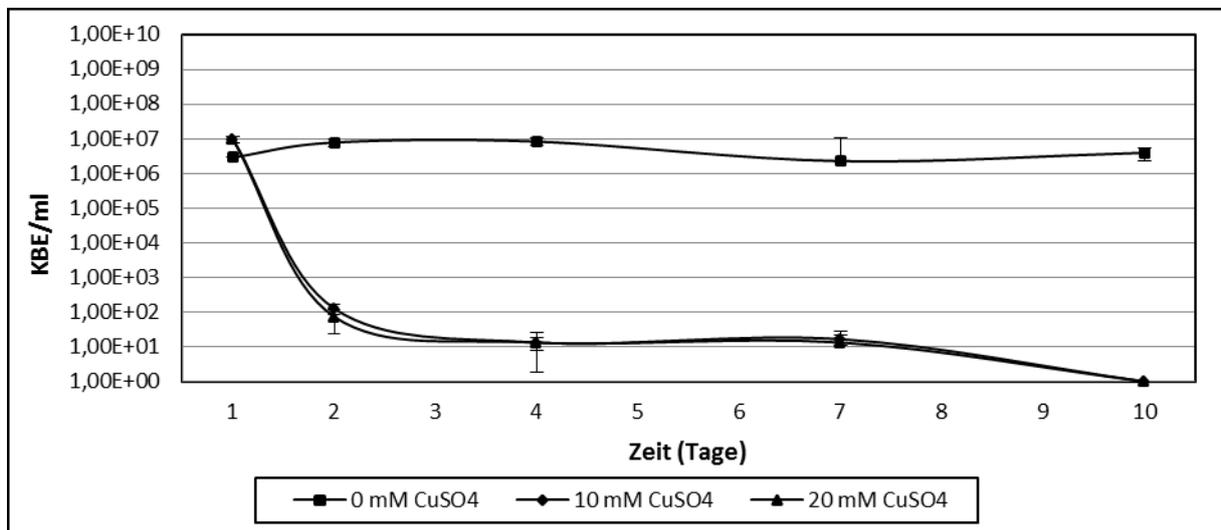


Abbildung 15c)

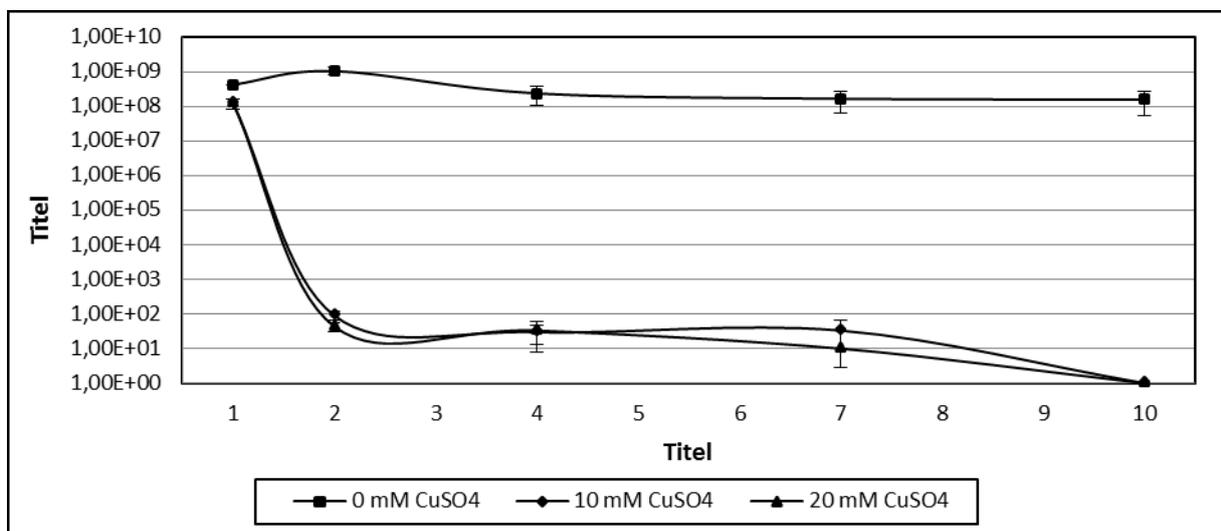


Abbildung 15d)

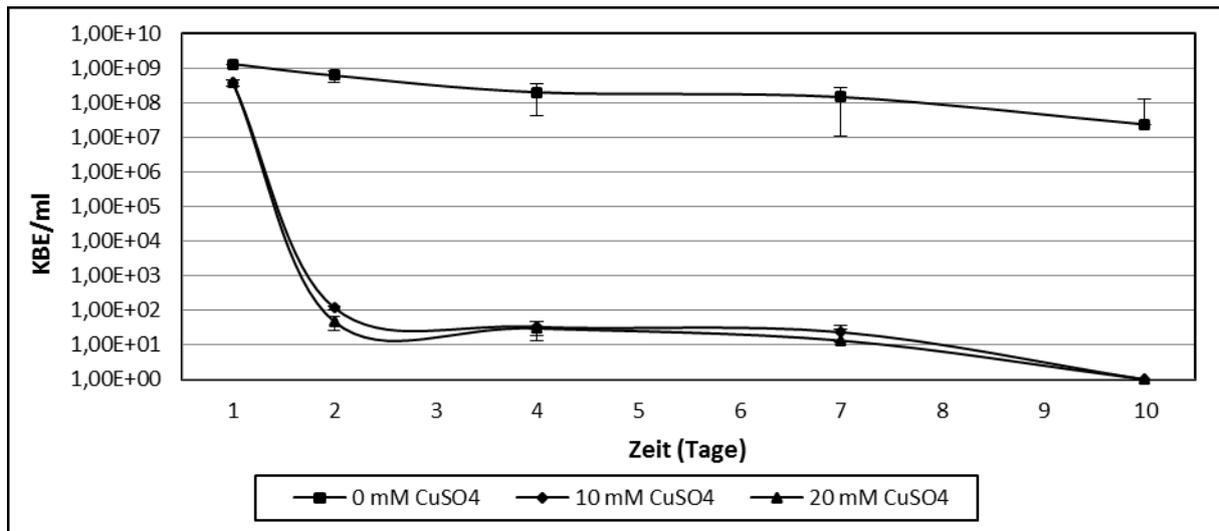


Abb. 15: Wachstumsverlauf von Staphylokokkenbiofilmen (Abb. 15a) und b)) und der planktonischen Fraktion (Abb. 15c) und d)) (*S. aureus* ATCC 25923 Abb. 15a) und c)) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 15b) und d)) mit und ohne CuSO<sub>4</sub>-Zugabe auf HA-gestrahltm Titan. Quantifizierung mittels Bestimmung der KBE/ml. Ausgangskonzentration der Keime mit 10<sup>6</sup> KBE/ml.

In den ersten 24 Stunden nach Einwirkung des Kupfers fiel die Bakterienmenge bei beiden Spezies von ca. 10<sup>7</sup> KBE/ml auf ca. 10<sup>2</sup> KBE/ml, was einem prozentualen Anteil von 0,001 % der Einsaat entspricht. Damit wirkte das Kupfer definitionsgemäß bakterizid, da sich die MBK durch eine Abtötung von mindestens 99,9 % einer Population erklärt (Harrison *et al.*, 2007). Also liegt die MBK auch für die Biofilmbakterien bei 10 mM CuSO<sub>4</sub>. Die planktonischen Bakterien zeigten gemessen am Verlauf der Wachstumskurve eine ähnliche Empfindlichkeit wie die Biofilmbakterien. Allerdings waren im Wachstumsversuch der planktonischen Population unter Punkt 3.2.1. nach spätestens 2 Stunden keine KBE mehr nachzuweisen, während aus dem Biofilm an Tag 7 der Inkubation noch einige wenige Kolonien kultivierbar waren. Erst an Tag 10 war kein Wachstum beider Staphylokokken mehr nachweisbar. Nach Harrison *et al.* (2005) wurde an Tag 10 die MBEC (minimum biofilm eradication concentration) bei 10 mM Kupfersulfat erreicht. Die Keimzahlen zwischen Tag 2 und Tag 7 waren gering. Aber beim Auszählen der KBE auf den Agarplatten waren in allen vier unabhängigen Versuchen KBE vorhanden, während an Tag 10 alle Platten auch nach 48 stündiger Inkubation keinerlei KBE detektiert werden konnten. Die Verdoppelung der Kupfersulfatkonzentration führte zu keinem schnelleren Abtöten aller Bakterien, da auch hier bis einschließlich Tag 7 Bakterienwachstum nachzuweisen war.

Die MBK von 10 mM CuSO<sub>4</sub> reichte auch aus, um etablierte Biofilme zu eradizieren. Somit entsprach dieser Wert der MBEC. Zur vollständigen Eradikation war jedoch eine lange Einwirkzeit mit 10 Tagen von Nöten.

Tag 1

10 x Vergr.

40 x Vergr.

Tag 7

10 x Vergr.

40 x Vergr.

Abbildung 16a)

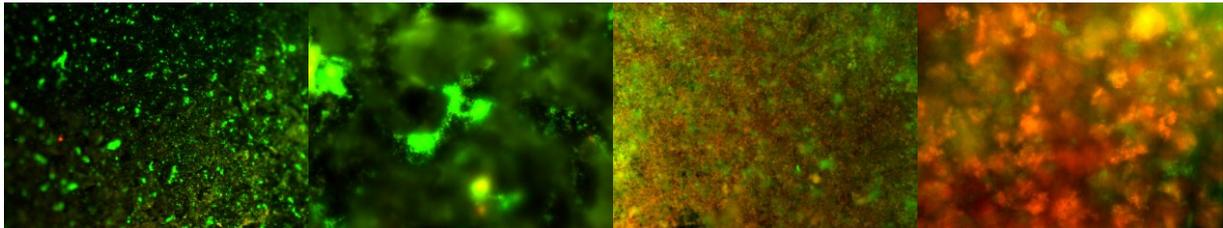
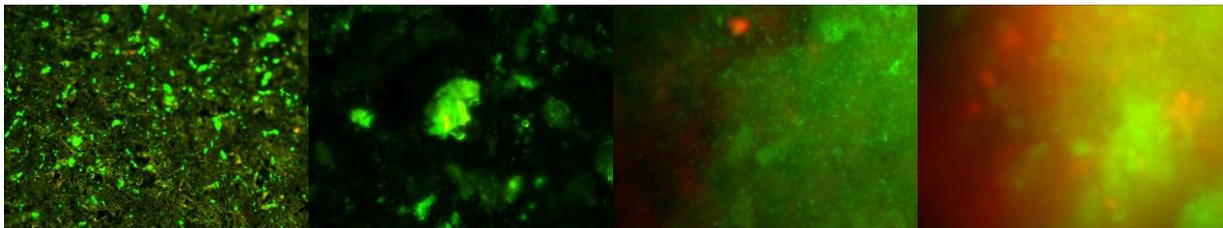


Abbildung 16b)



**Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (10x und 40x Vergrößerung) von *S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 16a) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 16b) auf Ti HA-gestrahlt mit 10 mM CuSO<sub>4</sub>.** Färbung mittels BacLight Viability Kit. Ausgangskonzentration der Keime mit 10<sup>6</sup> KBE/ml. Hinweis: Tag 1 zum Zeitpunkt vor Zugabe des CuSO<sub>4</sub>.

Um zusätzlich die Lebensfähigkeit der mit Kupfersulfat behandelten Biofilme zu untersuchen und einen möglichen „viable but non-culturable“ (VBNC) Zustand zu detektieren, wurde eine Färbung mittels BacLight Viability Kit durchgeführt (siehe Abb. 16). Zellen, die sich im VBNC-Zustand befinden, können aufgrund eines veränderten Metabolismus mittels herkömmlicher Methoden nicht kultiviert werden. Jedoch kann für diesen Zelle fluoreszenzmikroskopisch mittels live/dead Färbung eine intakte Membran nachgewiesen werden, weswegen sie als lebensfähig einzustufen sind.

Die Abbildung 16 zeigt, an Tag 1, vor Zugabe des Kupfersulfates, die Staphylokokken in den Nischen des HA-gestrahltens Titans, analog den fluoreszenzmikroskopischen Bildern unter 3.1.1. Die im weiteren Verlauf an Tag 2,4,7 und 10 gemachten Bilder konnten die Bakterien nicht adäquat darstellen, da sich ein trüber Film über die Oberfläche des Probekörpers gelegt hatte und angefärbte Staphylokokken von fluoreszierenden Bestandteilen des Mediums nicht unterscheidbar waren. Exemplarisch werden daher für *S. aureus* und *S. epidermidis* lediglich

die Abbildungen von Tag 7 gezeigt. An den anderen Versuchstagen sah das mikroskopische Bild ähnlich aus.

Um genauer zu unterscheiden, welche möglichen Bestandteile des Mediums für diese unspezifische Färbung verantwortlich waren, wurde in selben Versuchsansatz ohne Bakterien für 24 Stunden 10 mM CuSO<sub>4</sub> mit Humanserum und CB-Medium (1:1), sowie 10 mM CuSO<sub>4</sub> mit CB-Medium inkubiert und anschließend mit dem live/dead viability kit angefärbt:

Abbildung 17

HS + CB-Medium

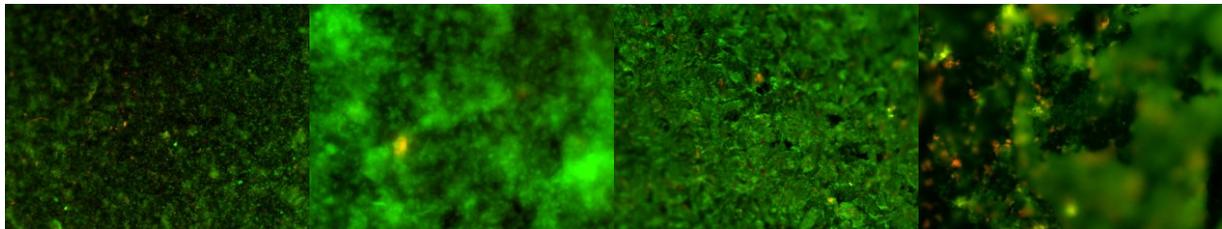
CB-Medium

10 x Vergr.

40 x Vergr.

10 x Vergr.

40 x Vergr.



**Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (10x und 40x Vergrößerung) von HA-gestrahltm Titan mit 10 mM CuSO<sub>4</sub>. Nach 24 h Inkubation mit CB-Medium +/- Humanserum.**

Vor allem in der 40-fachen Vergrößerung wird deutlich, dass der beschriebene trübe Film nur in Verbindung mit dem im Inkubationsmedium befindlichen Humanserum auftrat.

### 3.3. Oberflächenbeschichtungen und Oberflächenmodifikationen

Zur Prävention der Implantat-assoziierten Infektion gibt es verschiedene Strategien. In dieser Arbeit wurde die Kombination aus Oberflächenbeschichtung und –modifikation auf ihre antibakterielle Potenz untersucht. Dabei dient die Oberflächenbeschichtung der Integration des Implantates in den Knochen und der Freisetzungskinetik der mittels Oberflächenmodifikation eingebrachten Kupferionen. Nachfolgend wird der Effekt durch die Beschichtung bzw. die Modifikation auf das Bakterienwachstum über 10 Tage *in vitro* dargestellt.

#### 3.3.1. Plasma-polymerisiertes Allylamin und Acrylsäure auf Titanprobekörpern

Zunächst wurde der Einfluss der Oberflächenbeschichtung untersucht. Poliertes Titan wurde bei diesem Verfahren mit Allylamin bzw. Acrylsäure beschichtet, wobei die Monomere

mittels eines Plasmas auf der Oberfläche polymerisiert wurden. Es galt herauszufinden, wie die Allylamin- bzw. die Acrylsäureschicht ohne antibakterielles Kupfer das Wachstum der Staphylokokken beeinflusst. Als Referenz diente der unbehandelte polierte Titanprobekörper.

Abbildung 18a)

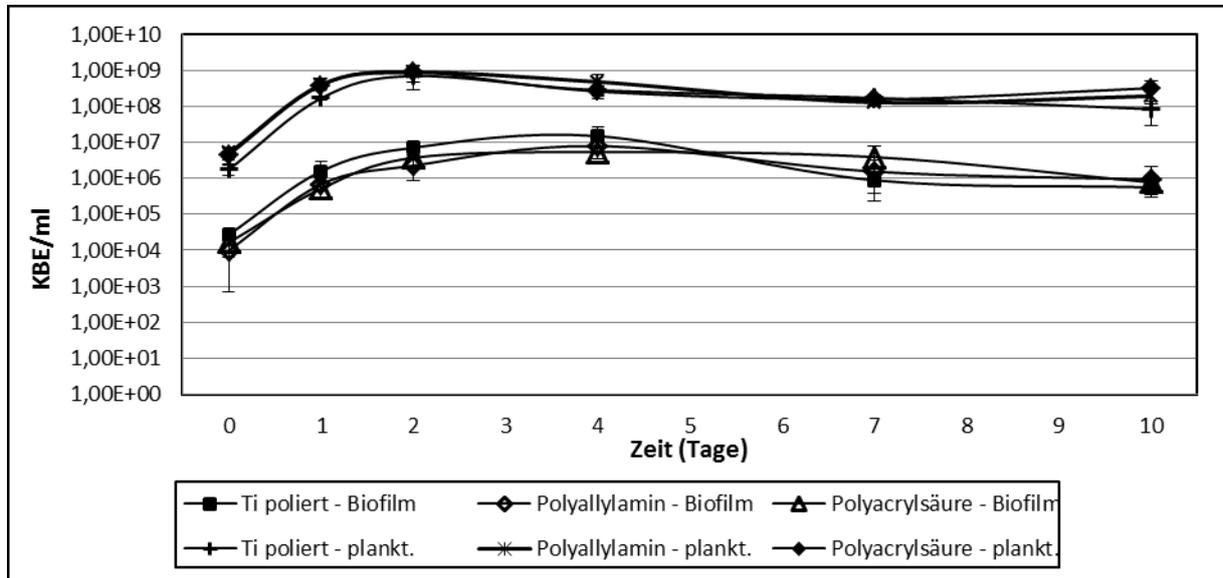
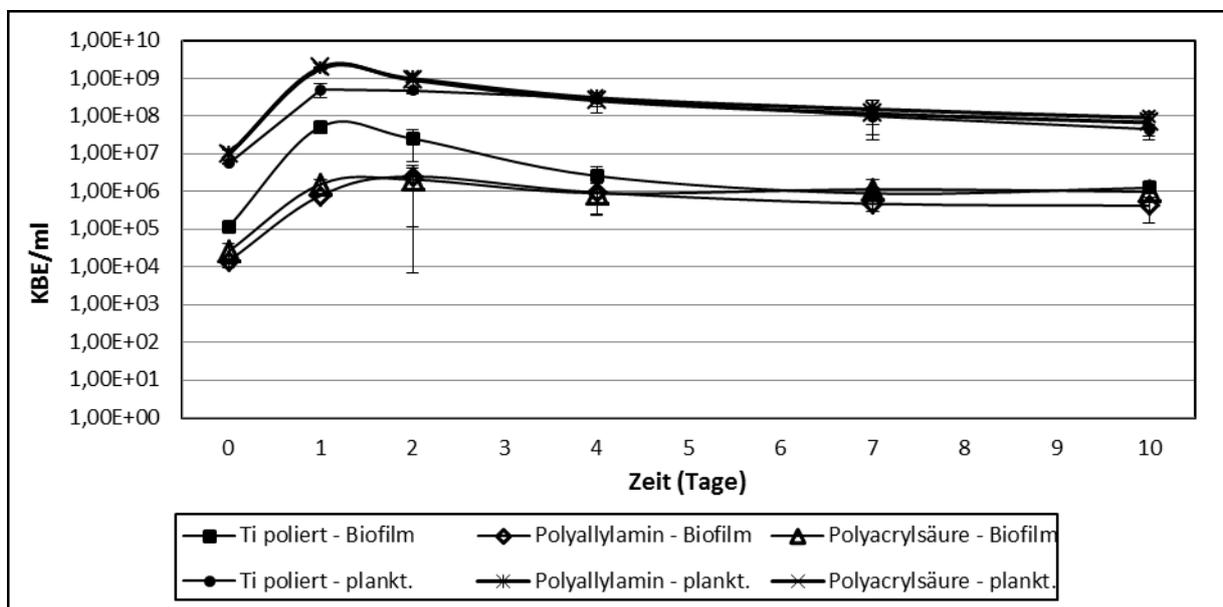


Abbildung 18b)



**Abb. 18: Wachstumsverlauf von *S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 18a)) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 18b)) auf Allylamin und Acrylsäure beschichteten Titan-Probekörpern. Referenz: polierte Titan-Probekörper. Quantifizierung mittels KBE/ml.**

Die polierten Titanlegierungen, die mit Allylamin und Acrylsäure beschichtet wurden, wurden mit einem Referenzprobekörper aus unbehandelter polierter Titanlegierung

verglichen. Sowohl die Biofilmbakterien als auch ihre planktonische Population zeigte einen nahezu identischen Wachstumsverlauf auf beiden Oberflächen.

Somit wäre ein wachstumshemmender Effekt einer Implantatoberfläche, die mit Allylamin oder Acrylsäure beschichtet und mit Kupferionen modifiziert wurde, allein auf die Modifizierung mit Kupferionen zurückzuführen.

### 3.3.2. Plasma-polymerisiertes Allylamin auf Kupferplättchen

Nachdem gezeigt wurde, dass die Oberflächenbeschichtung keinen Effekt auf das Bakterienwachstum hat, wurde untersucht, ob die Beschichtung das Wachstum auf Kupferplättchen beeinflusst. Die Allylaminbeschichtung wurde hier auf reinem Kupfer angewandt. Als Referenz diente das unbehandelte Kupfer. Da nur eine begrenzte Anzahl an entsprechenden Probekörpern verfügbar waren, wurden die Versuche mit *S. epidermidis* RP62A, dem häufigsten Erreger der Implantat-assoziierten Infektion (Zimmerli *et al.*, 2004; Brady *et al.*, 2009) durchgeführt, um mindestens 3 unabhängige Versuchsserien zu erhalten.

Abbildung 19a)

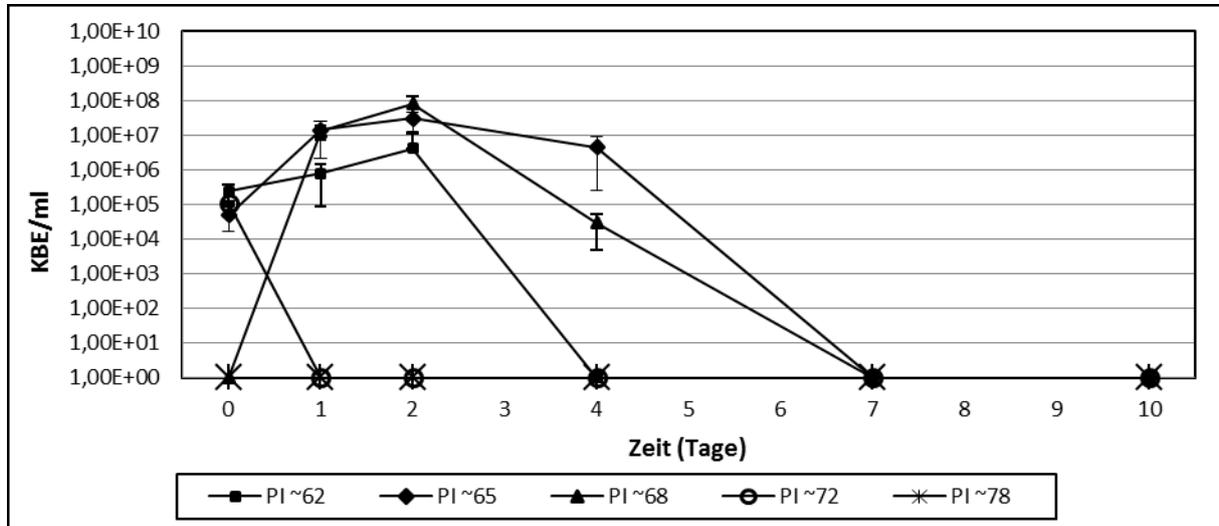
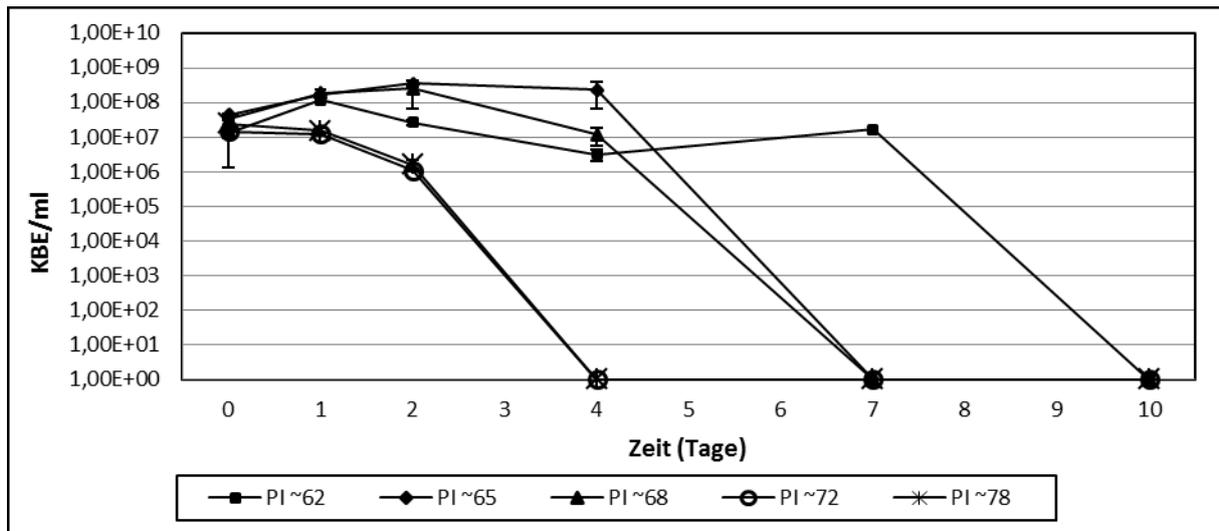


Abbildung 19b)



**Abb. 19: Wachstumsverlauf von *S. epidermidis* RP62A auf Titan HA-gestrahlt und reinem Kupfer ohne und mit Polyallylaminbeschichtung unterschiedlicher Dicke.** Quantifizierung mittels Bestimmung der KBE/ml der Biofilm- (Abb. 19a)) und planktonischen Bakterien (Abb. 19b))

Die planktonischen Bakterien waren nach Inkubation mit allen Kupferprobekörpern, unabhängig ob mit oder ohne Beschichtung, nach spätestens 10 Tagen vollständig abgetötet. Der Zeitpunkt zu dem diese Eradikation stattfand, korrelierte mit der Schichtdicke (Angabe in Klammern) des Allylamin auf dem Kupfer: PI ~62 (270 nm) an Tag 10, PI ~65 (42 nm) und PI ~68 (22 nm) an Tag 7 und PI ~72 (9 nm) und PI ~78 (unbeschichtetes Kupfer) an Tag 4. Darüber hinaus fand bei den Probekörpern mit keiner oder der dünnsten Allylaminbeschichtung (PI ~72 und PI ~78), die die planktonischen Staphylokokken am schnellsten töteten, initial kein Anstieg in der Wachstumskurve und damit eine Wachstumshemmung statt, während alle anderen Kupferplättchen zu Beginn ein planktonisches Wachstum nicht inhibierten.

Dieser Trend fand sich ebenso bei den Biofilmbakterien, wenn auch nicht mit dieser Eindeutigkeit. Hier waren keinerlei Biofilmbakterien an Tag 7 (PI ~65 und PI ~68), Tag 4 (PI ~62) oder Tag 1 (PI ~72) nachweisbar. Auf unbeschichteten Kupferplättchen wuchsen die Staphylokokken von vorneherein nicht. Der Zeitpunkt an dem alle Bakterien auf dem Probekörper mit der dicksten Beschichtung (PI ~62 an Tag 4) abgetötet waren, lag jedoch vor zwei Probekörpern mit dünnerer Beschichtung (PI ~65 und PI ~68 an Tag 7). Parallel zu der Beobachtung für die planktonischen Bakterien wurde das Biofilmwachstum durch die Probekörper mit den dicksten Beschichtungen (PI ~62, PI ~65 und PI ~68) an den ersten 2 Tagen nicht unterdrückt, sondern es fand sich ein Anstieg der Zellzahl.

Zusammenfassend hatte das Allylamin über dem bakteriziden Kupfer in Abhängigkeit von seiner Schichtdicke eine verzögernde Wirkung auf die Abtötung sowohl von Biofilm- als

auch von planktonischen Bakterien. Eine gewisse Ausnahme hiervon stellte das Biofilmwachstum auf PI ~62 dar.

Tag 1

10 x Vergr.

40 x Vergr.

Tag 7

10 x Vergr.

40 x Vergr.

Abbildung 20a)

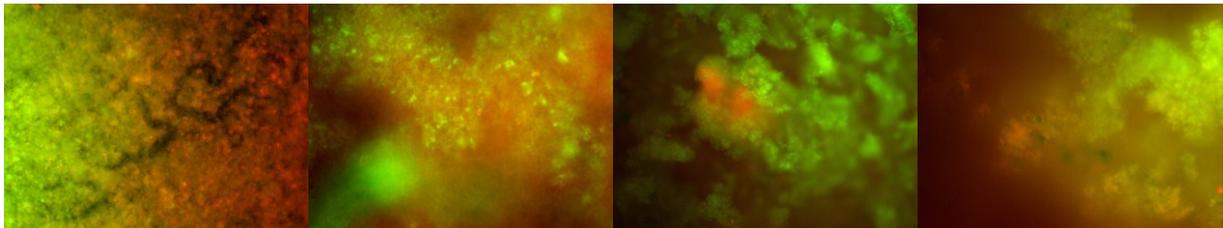
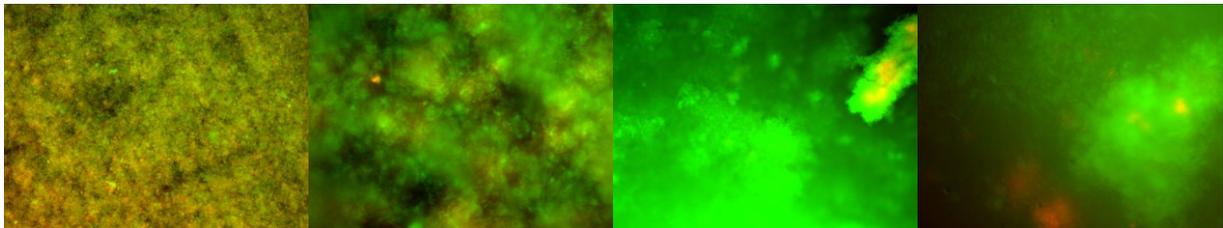


Abbildung 20b)



**Abb. 20:** Fluoreszenzmikroskopische Bilder (10x und 40x Vergrößerung) von *S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 20a) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 20b) auf reinen Kupferplättchen (PI~78). Färbung mittels BacLight Viability Kit. Ausgangskonzentration der Keime mit  $10^6$  KBE/ml.

Wie bereits in Abbildung 17 für Titanplättchen mit Kupfersulfat im Inkubationsmedium gezeigt, war fluoreszenzmikroskopisch nach live/dead Färbung auf reinen Kupferplättchen ein trüber Film nachzuweisen, der eine Beurteilung der Lebensfähigkeit der Bakterien unmöglich machte.

Zur Beantwortung der Frage, ob das Humanserum diesen Film verursachte, wurden wiederum jeweils ein Kupferplättchen für 24 Stunden mit Humanserum und CB-Medium (1:1) oder CB-Medium inkubiert und anschließend mit dem live/dead kit angefärbt und mikroskopiert:

HS + CB-Medium

CB-Medium

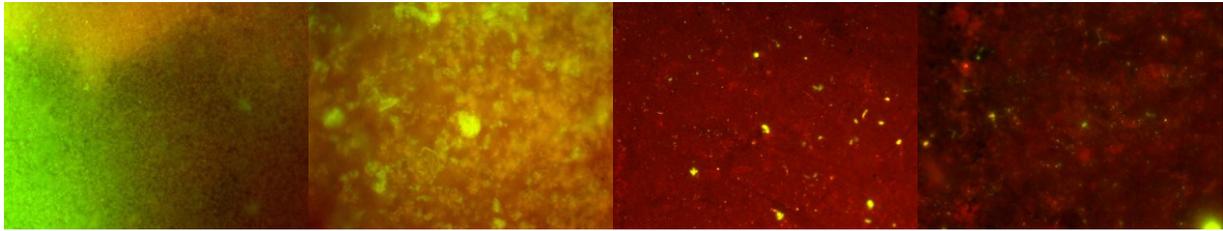
10 x Vergr.

40 x Vergr.

10 x Vergr.

40 x Vergr.

Abbildung 21



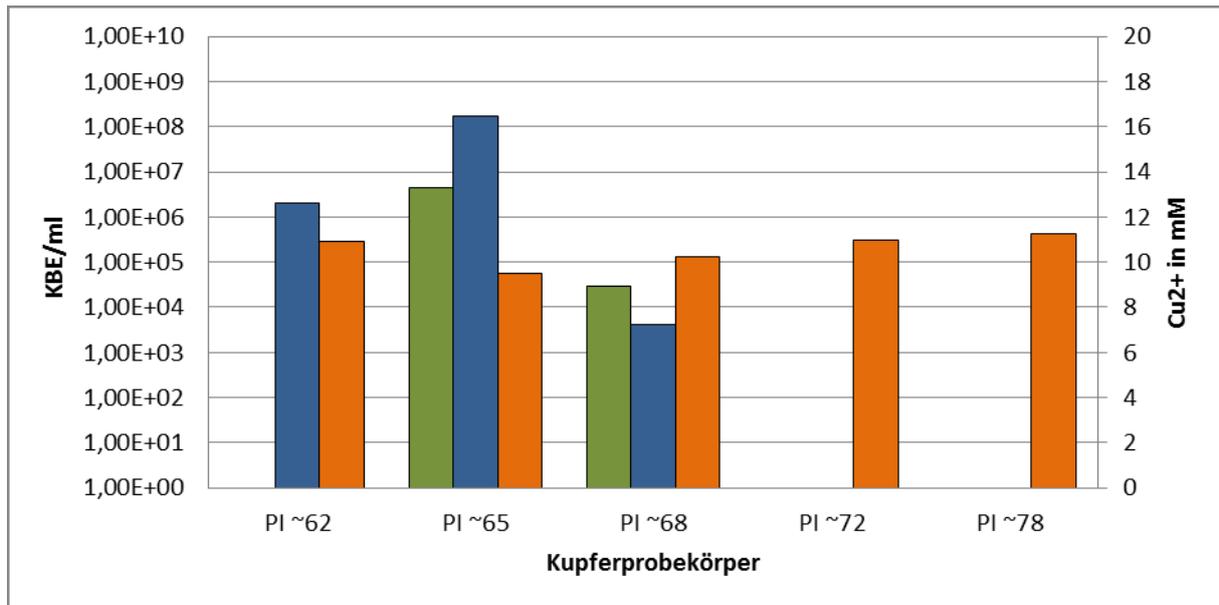
**Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (10x und 40x Vergrößerung) von reinen Kupferplättchen (PI~78). Nach 24 h Inkubation mit CB-Medium +/- Humanserum.**

Auch hier zeigte sich der trübe Film im Versuchsansatz mit dem Humanserum. Ohne Humanserum hingegen wurde kein Film sichtbar. Allerdings stellte sich die Kupferoberfläche rötlich fluoreszierend dar.

Somit war bei verwendetem Versuchsaufbau mit Humanserum im Inkubationsmedium eine Differenzierung und Charakterisierung des Bakterienwachstums bzw. -morphologie mit dem BacLight Viability Kit nicht möglich.

### 3.3.2.1. Bakterizidie in Abhängigkeit von der $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration

Mittels eines Atomabsorptionsspektrometers wurde nach 4-tägiger Inkubation (37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ ) der Plasma-polymerisierten und nicht beschichteten Kupferplättchen in 1 ml CB-Medium/Humanserum (1:1) die Konzentration des Kupfers im Medium gemessen (Messung durch das Forschungslabor für Biomechanik und Implantattechnologie der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universität Rostock). Diese Werte wurden gegen die am Tag 4 gemessenen KBE/ml der Versuche unter Punkt 3.3.2. aufgetragen.



**Abb. 22: Wachstum von *S. epidermidis* RP62A auf reinem Kupfer ohne und mit Polyallylaminbeschichtung unterschiedlicher Dicke an Versuchstag 4.** Bakterienquantifizierung mittels Bestimmung der KBE/ml der Biofilm- und planktonischen Bakterien; Kupferkonzentrationsbestimmung mittels Atomabsorptionsspektrometer. (Biofilmbakterien grün, planktonische Bakterien blau, Kupferkonzentration orange)

Nach 4-tägiger Inkubation war die Kupferkonzentration im Medium am höchsten bei dem reinem Kupferplättchen (PI~78). Die Kupferkonzentration nahm ab, je dicker die Schicht des Polyallylamin wurde (PI~72 → PI~65). Umgekehrt verhielt es sich mit der Bakterienmenge. Je dünner die Polyallylaminschicht und damit je höher die Kupferkonzentration, desto geringer war die Bakterienmenge. Bei der dünnsten Polyallylaminschicht (PI~72) und dem reinen Kupferplättchen waren keine Bakterien, sowohl planktonische als auch Biofilmbakterien, mittels KBE-Bestimmung mehr nachweisbar.

### 3.3.3. Plasma-Immersionen-Ionen-Implantation

Mittels der PIII soll die Titanoberfläche modifiziert werden und Kupferionen unter der Oberfläche eingelagert werden, die dem Titan antibakterielle Eigenschaften verleihen. Als Referenz diente das unbehandelte HA-gestrahlte Titan.

Abbildung 23a)

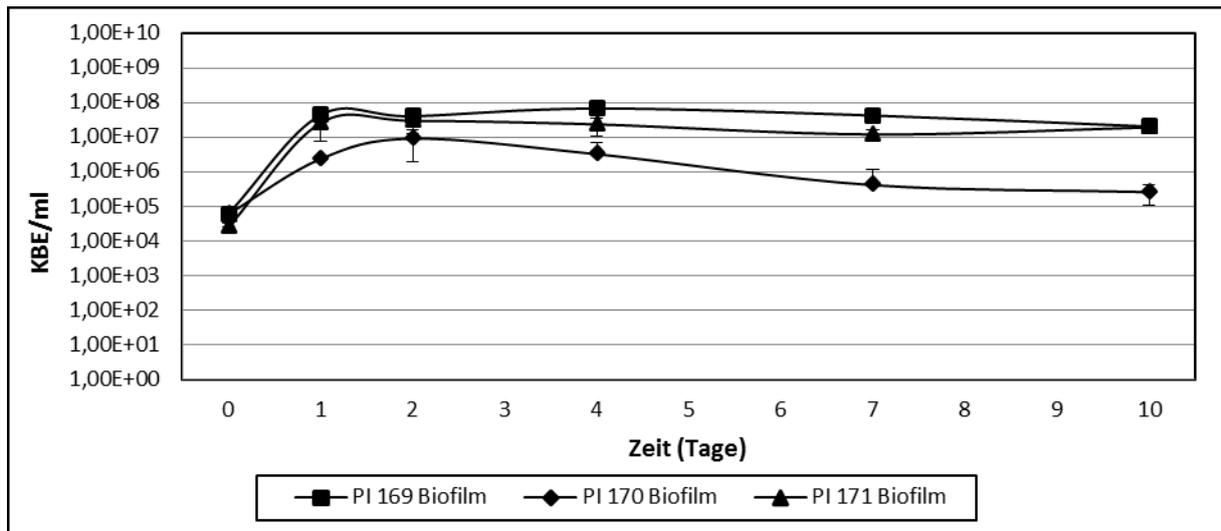


Abbildung 23b)

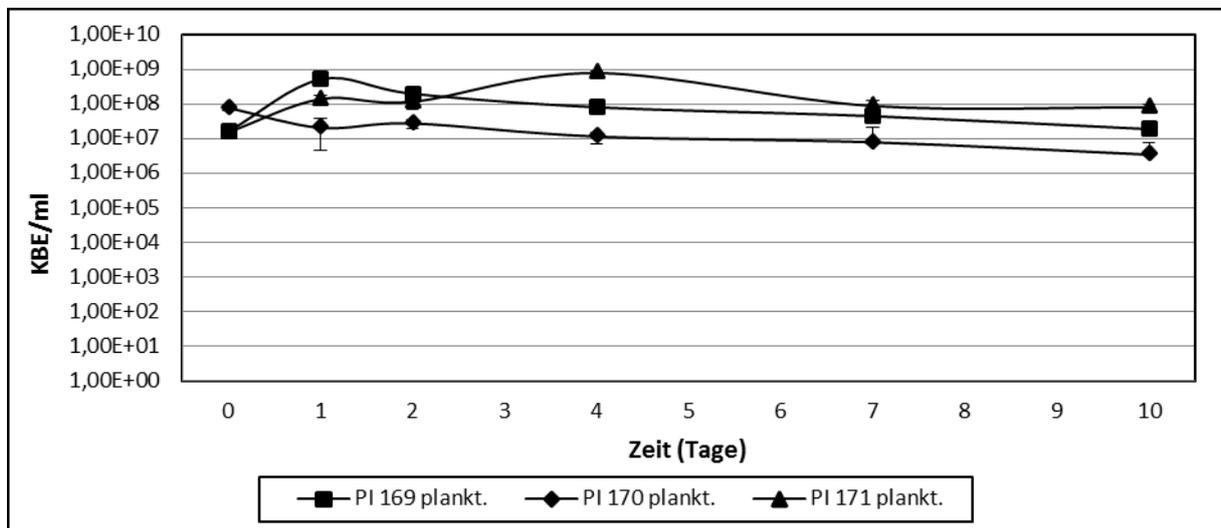


Abbildung 23c)

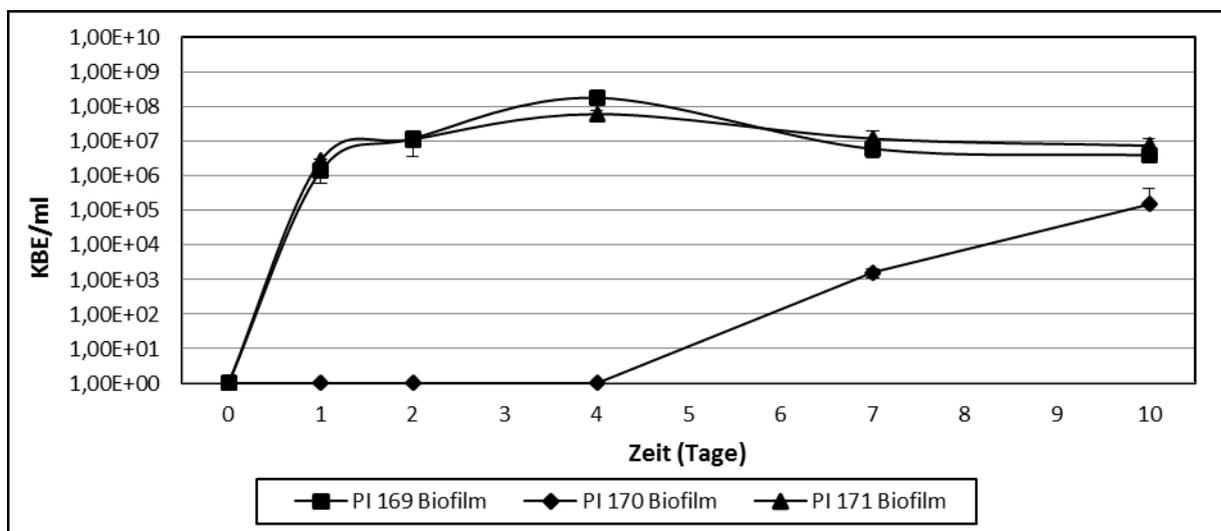


Abbildung 23d)

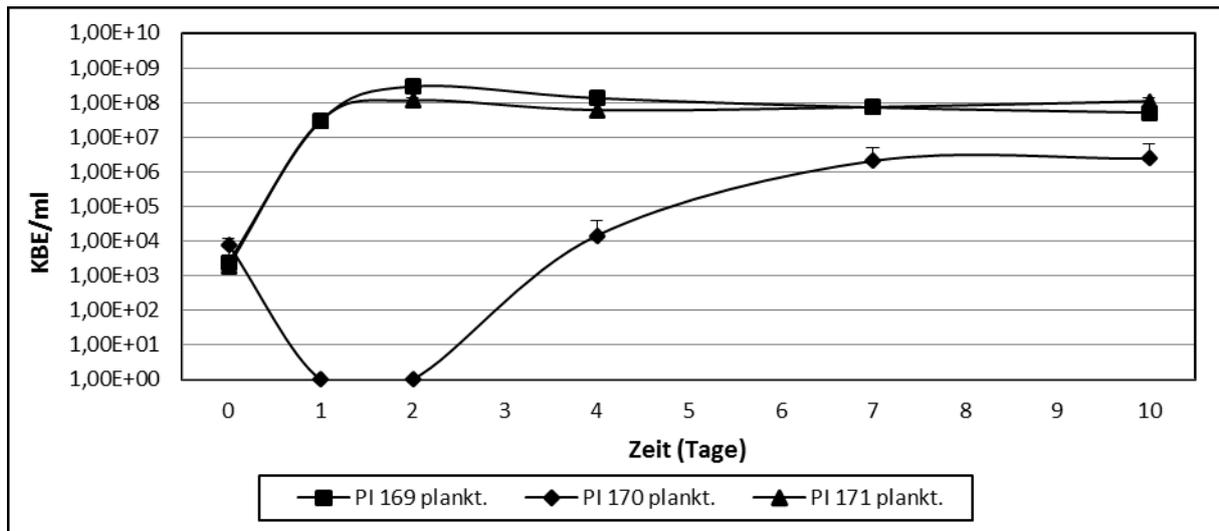


Abb. 23: Wachstumsverlauf von *S. epidermidis* RP62A auf HA-gestrahelter Titanlegierung ohne PIII-Behandlung (PI 169) und mit Kupfer modifizierter Oberfläche mittels PIII (PI 170, DC = 90; PI 171, DC = 0,2). Inokulation von 10<sup>6</sup> Bakterien/ml (Abb. 23a) und b)) und 10<sup>3</sup> Bakterien/ml (Abb. 23c) und d)). Quantifizierung mittels Bestimmung der KBE/ml der Biofilm- (Abb. 23a) und c)) und planktonischen Bakterien (Abb. 23b) und d)).

Mit einem Inokulum von 10<sup>6</sup> Bakterien/ml zeigten sich über 10 Tage nur geringe Unterschiede im Bakterienwachstum auf den Probekörpern und Referenzkörpern. Dabei wurden für die planktonischen und die Biofilmbakterien auf dem Probekörper mit DC = 90 niedrigere Werte detektiert als mit den anderen beiden untersuchten Probekörpern. Am deutlichsten war dieser Effekt an Tag 7 und Tag 10 für die Biofilmbakterien. Die Werte für den Referenzkörper und den Probekörper mit DC = 0,2 waren dann zwischen 30 x an Tag 7 und 80 x an Tag 10 größer als für den Probekörper mit DC = 90.

Noch deutlichere Unterschiede zeigten sich bei einem Inokulum von 10<sup>3</sup> Bakterien/ml. Während der Wachstumsverlauf für den Probekörper mit DC = 0,2 und den Referenzkörper fast identisch war, fand in Gegenwart des DC = 90 -Probekörper in den ersten beiden Tagen kein planktonisches Wachstum und in den ersten 4 Tagen kein Biofilmwachstum statt. Erst danach nahm die Bakterienzahl stetig zu. Das Wachstum erreichte am letzten (Biofilm) bzw. vorletzten (planktonische Bakterien) Messzeitpunkt den Höchstwert, der jedoch für beide Populationen (Biofilm und planktonisch) des DC = 90 Probekörpers ca. 50 mal niedriger war als die Werte für den Referenzkörper und den DC = 0,2-Probekörper. Hervorzuheben ist, dass, bevor die Werte stetig anstiegen, die zunächst eingesäten Bakterien an Tag 0 noch kultivierbar (PI 170 plankt. an Tag 0), aber an den Tagen 1 und 2 nicht mehr nachweisbar waren.

Mittels PIII in eine Titanoberfläche eingebrachte Kupferionen konnten somit in Abhängigkeit von der exponierten Bakterienmenge das Bakterienwachstum verzögern.

### 3.4. Herstellung Fluorochrom-exprimierender Staphylokokken

Unter Punkt 3.2.3. wurde gezeigt, dass eine fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Bakterien mittels live/dead Färbung im mit Kupfer versehenem Medium als auch auf reinen Kupferplättchen unmöglich war, da ein trüber Film abgebildet wurde. Daher sollten zur Optimierung der Fluoreszenzmikroskopie in dieser Arbeit Fluorochrom-exprimierende Staphylokokken hergestellt werden. Hierzu wurde ein Plasmid verwendet, pHOM10, das für ein fluoreszierendes Protein in *S. aureus* RN4220 codiert.

#### 3.4.1. Plasmidtransformation pHOM10 (GFP-Expressionsplasmid)

Die Transformation von *S. aureus* ATCC 25923 und *S. epidermidis* RP62A mit dem GFP-Expressionsplasmid pHOM10 mittels Elektroporation nach dem Protokoll des Institutes für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Greifswald führte auf dem antibiotikaversetzten Agar nicht zum Wachstum von Kolonien. Auch der Plasmidtransfer nach Trieu-Cuot *et al.* (1993) nach *S. aureus* ATCC 25923 lieferte keine Transformanten.

Bei letzterem Protokoll soll die Transformationsfrequenz erhöht werden, indem die Zellwandstruktur durch subinhibitorische Konzentrationen von Oxacillin verändert wird. Bei der Transformation nach Trieu-Cout *et al.* (1993) wird das Plasmid zunächst in *S. aureus* RN4220 vermehrt. Dieser Staphylokokkenstamm verfügt im Gegensatz zu anderen Staphylokokkenstämmen nicht über Restriktionssysteme, die Fremd-DNA schnell degradieren. Allerdings ist der Stamm zu einer staphylokokkenspezifische Methylierung der Fremd-DNA fähig, welche das Plasmid vor dem Restriktionsverdau durch Staphylokokkenendonukleasen schützt. Das so bearbeitete Plasmid kann nach seiner Isolierung aus dem Stamm *S. aureus* RN4220 in Restriktionssystem-positive *S. aureus*-Stämme transformiert werden. Durch die Hinzugabe des  $\beta$ -Lactam-Antibiotikums Oxacillin wird - theoretisch - die Ausbeute der Elektroporation erhöht.

Die Transformation von *S. epidermidis* RP62A konnte nicht analog durchgeführt werden, da dieser Keim resistent gegen Oxacillin (MRSE) ist, und somit Kompetenz durch Zugabe dieses Antibiotikums nicht induziert werden konnte. Es wurde stattdessen versucht durch die Zugabe von Lysozym (2,5  $\mu\text{g/ml}$  und 25  $\mu\text{g/ml}$ ) eine ähnliche Zellwandbeeinflussung bei der

Herstellung der elektrokompetenten Zellen zu erreichen. Allerdings führte auch diese Modifikation nicht zum Transformationserfolg.

Der Versuch einer Transduktion mit dem *S. aureus* Phagen 85 vom Donorstamm *S. aureus* RN4220 mit pHOM10 in den Rezipientenstamm *S. aureus* ATCC25923 blieb ebenfalls erfolglos.

### 3.4.2 Konstruktion zweier Fluorochromexpressionsplasmide

Da das GFP-codierende Plasmid pHOM10 nicht in die beiden Testkeime *S. aureus* ATCC 25923 und *S. epidermidis* RP62A transferiert werden konnte, sollten zwei verschiedenfarbige Fluorochrome in pAT18 kloniert werden, weil dieser Vektor relativ problemlos in Staphylokokken etabliert werden kann (Trieu-Cuot *et al.*, 1991; 1993). Außerdem könnten durch Verwendung zweier Fluorochrome beide Staphylokokkenstämme fluoreszenzmikroskopisch unterschieden werden.

#### pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_DsRM

Zunächst wurde zur Identifizierung des *gfpmut2* Promotors in pHOM10 und dessen genetischer „upstream“ Region ein Primer entworfen (*gfpmut2\_up\_seq*) und dieser zusammen mit dem isolierten Plasmid an die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) zur Sequenzierung geschickt. Die Sequenz wurde mittels BLAST-Analyse identifiziert (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Es handelt sich um den Promotor des  $\beta$ -Lactamase2-Gens (P<sub>blaZ</sub>), welcher nun in pAT18\_DsRM vor *DsRM* kloniert werden sollte. Dieser Vektor enthält bereits das Gen für das DsRed-Monomer, ein rot leuchtendes Fluorochrom (Shaner *et al.*, 2005).

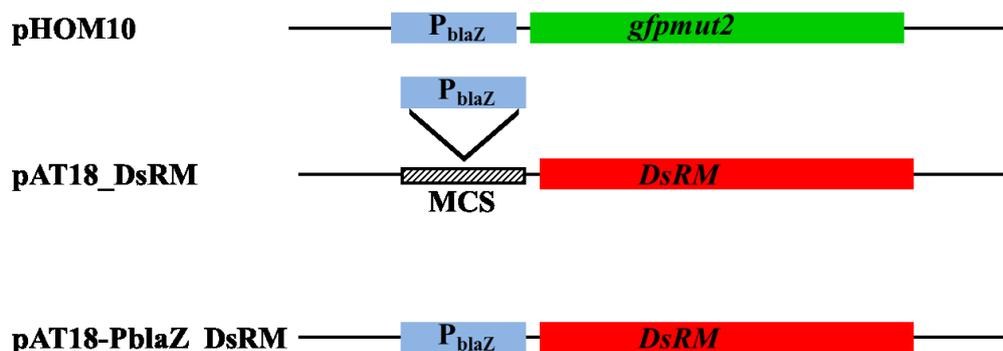
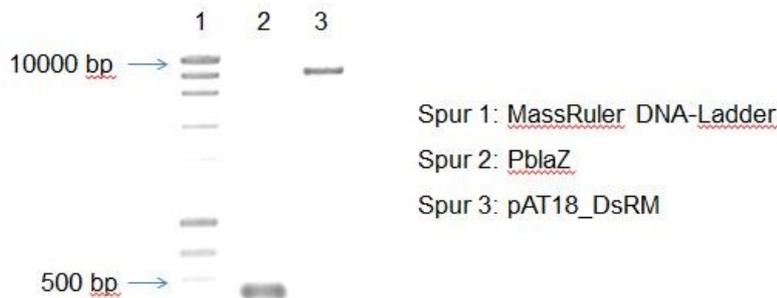


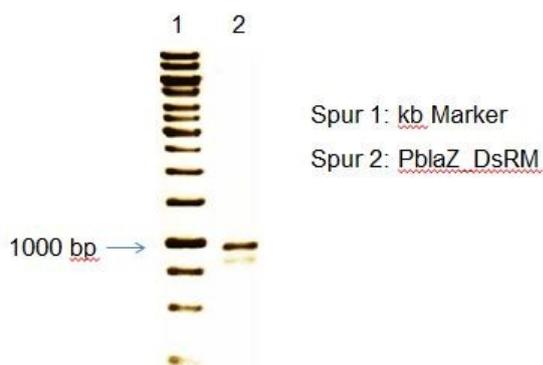
Abb. 24: Klonierung von pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_DsRM

Mit der PCR (siehe 2.14.2.) wurde ein Fragment aus pHOM10, welches den Promotor  $P_{blaZ}$  enthielt, mit den Primern PromIBOT2for\_Eco und PromIBOT2rev\_Bam amplifiziert. PCR-Produkte und Vektor wurden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten (siehe 2.14.3.1.) und anschließend ligiert. Die Konzentration der DNA-Fragmente wurde durch Agarosegelelektrophorese (siehe 2.14.4.) und optische Schätzung ermittelt (siehe Abb. 25).



**Abb. 25:  $P_{blaZ}$  und pAT18\_DsRM.** Dargestellt ist ein 1 %iges (w/v) Agarosegel.

Nach Transformation kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$  (siehe 2.14.5.1. und 2.14.5.2.) mit dem Ligationsansatz wurden die transformierten Zellen auf LB-Agarplatten, die Erythromycin (100  $\mu$ g/ml) enthielten, ausplattiert. Mit Hilfe der „Colony-PCR“ mit M13 Forward- und M13 Reverse-Primern konnte ein 1100 bp Produkt nachgewiesen werden. Das entspricht der Länge des Konstruktes nach Einführung des Promotor  $P_{blaZ}$  (ca. 340 bp) vor das DsRM-Gen (ca. 730 bp).



**Abb. 26: Amplifikation von  $P_{blaZ}$ \_DsRM.** Dargestellt ist ein 1 %iges (w/v) Agarosegel.

Das somit konstruierte Plasmid pAT18- $P_{blaZ}$ \_DsRM wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  vervielfältigt. Nach der Isolation (siehe 2.14.1.1.) wurde *S. aureus* RN4220 mit diesem Plasmid transformiert und auf TSB-Agarplatten mit Erythromycin in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml selektiert. Dieser Schritt vor der Transformation in die eigentlichen Zielstämme

*S. aureus* ATCC 25923 und *S. epidermidis* RP62A diente der Spezies-spezifischen Methylierung des Plasmids.

Im Gegensatz zu *E. coli* DH5 $\alpha$ , die unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich rot leuchteten (siehe Abb. 27), ergab die mikroskopische Untersuchung der transformierten *S. aureus* RN4220 Kolonien keine Fluoreszenz:

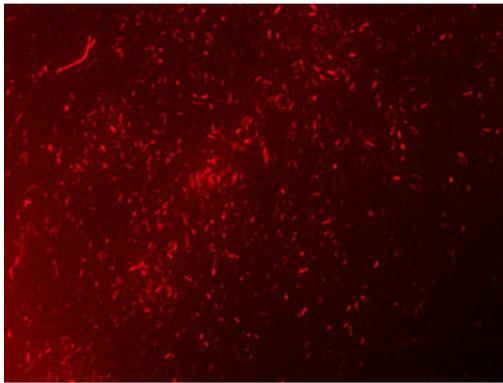


Abb. 27: *E. coli* DH5 $\alpha$ \_pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_DsRM

### pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_gfpmut2

Nachdem pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_DsRM in *S. aureus* RN4220 keine Fluoreszenz erkennen ließ, wurde eine andere Strategie verfolgt. Ziel war es sowohl den Promotor P<sub>blaZ</sub> als auch *gfpmut2* in toto als ca. 1300 Nukleotide großes Fragment aus pHOM10 zu amplifizieren und in pAT18 einzufügen. Bei Detektion einer grünen Fluoreszenz wäre die spezifische Gensequenz oder die posttranskriptionale Modifizierung des DsRM-Fluorochroms als Ursache für die fehlende Fluoreszenz anzusehen. Hierfür wurden neue Primer entworfen (PromTOBIfor\_Xba und PromHOMrev\_Pst), die Schnittstellen für XbaI und PstI aufwiesen.

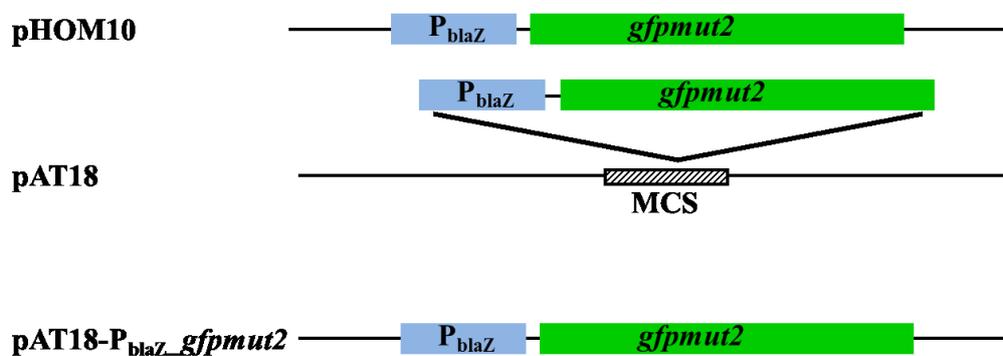


Abb. 28: Klonierung von pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_gfpmut2

Nach dem Restriktionsverdau, der Dephosphorylierung und der Gelelektrophorese wurden PCR-Produkt und Plasmid ligiert. Nach Transformation von *E.coli* DH5 $\alpha$  mit dem Ligationsansatz, konnten grünlich leuchtende Stäbchenbakterien nachgewiesen werden (siehe Abb. 29).

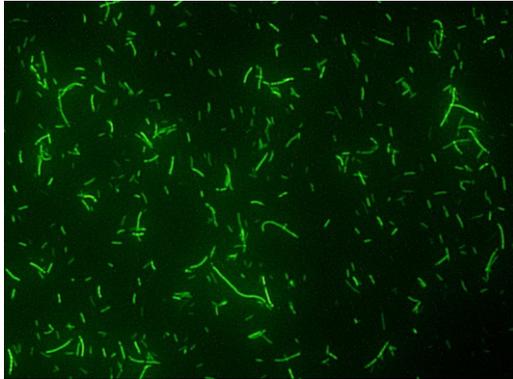


Abb. 29: *E. coli* DH5 $\alpha$ \_pAT18- P<sub>blaZ</sub>\_gfpmut2

*S. aureus* RN4220 wurde mit pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_gfpmut2 transformiert. Hier zeigte sich eine Fluoreszenz, die im Vergleich zu pHOM10 jedoch schwächer ausgeprägt war.

#### pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_gfpmut2\_TT<sub>BOB</sub> und pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_DsRM\_TT<sub>BOB</sub>

Sowohl die Klonierung des Promtors P<sub>blaZ</sub> in pAT18\_DsRM als auch des gesamten Promotor-Fluorochrom - Komplexes in pAT18 ergab keine befriedigende Fluoreszenz des transformierten *S. aureus* RN4220.

Nun sollte untersucht werden, ob das Einfügen eines Terminators an das Ende des Fluorochromgenes die Genexpression steigern würde. Dazu wurde ein Terminator verwendet, der bereits in dem gewünschten Vektor pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_TT<sub>BOB</sub> vorlag (Redanz *et al.*, 2012):

GCATGCaatcaataaaataaaattggcacggacgctacttacagtagcgtccgtgccattattgtattattattACATGC

Dabei bilden die mittleren zwei umrahmten, komplementären Sequenzen die Terminationsrelevante Haarnadelstruktur. Die zwei äußeren umrahmten Sequenzen sind die Zielsequenzen für die Restriktionsenzyme SphI und NspI, über welche auch die Klonierung in den Vektor pAT18-P<sub>blaZ</sub>, welcher nach analog der oben beschriebenen Vorgehensweise hergestellt worden war, erfolgte. Anschließend wurden die Fluorochromgene *gfpmut2* und *DsRM* in pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_TT<sub>BOB</sub> zwischen den Promotor und den Terminator eingefügt.

Zunächst wurde  $P_{blaZ\_gfpmut2}$  aus pHOM10 amplifiziert (siehe oben). Die anschließende Restriktion des Inserts und Vektors wurde dann jedoch mit BamHI und PstI durchgeführt, da BamHI im inserierten Fragment zwischen  $P_{blaZ}$  und  $gfpmut2$  schneidet und nur das Fluorochromgen in  $pAT18-P_{blaZ\_TT_{BOB}}$  kloniert werden sollte.

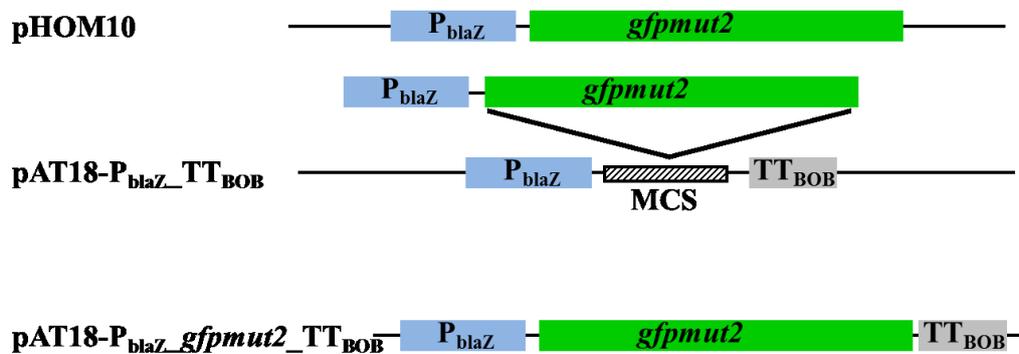


Abb. 30: Klonierung von  $pAT18-P_{blaZ\_gfpmut2\_TT_{BOB}}$

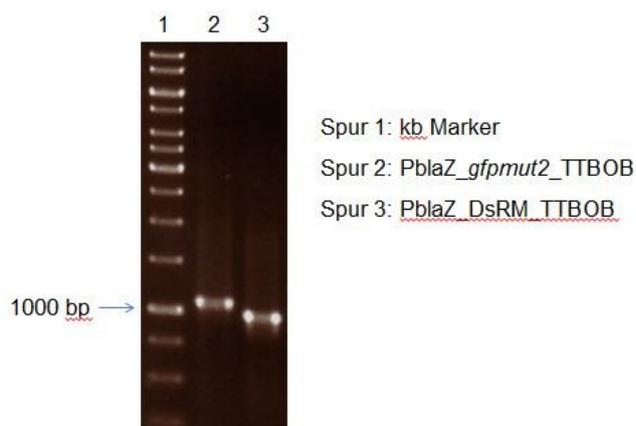


Abb. 31:  $P_{blaZ\_gfpmut2\_TT_{BOB}}$  und  $P_{blaZ\_DsRM\_TT_{BOB}}$ . Dargestellt ist ein 1 %iges (w/v) Agarosegel.

Nach Ligation, Transformation und Vermehrung in *E.coli* DH5a erfolgte die Plasmidisolierung und wiederum die Elektroporation in *S.aureus* RN4220:

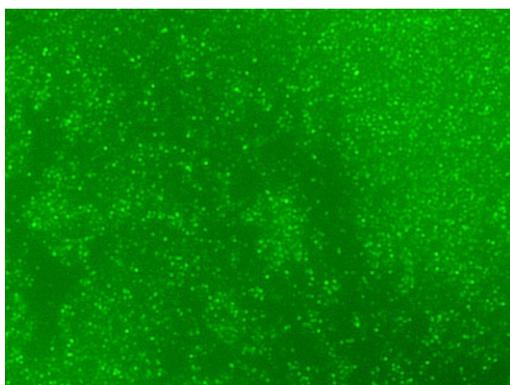


Abb. 32: *S. aureus* RN 4220\_  $pAT18-P_{blaZ\_gfpmut2\_TT_{BOB}}$

Die Sequenzierung des aus *S. aureus* RN4220 isolierten Plasmides pAT18-P<sub>blaZ\_gfpmut2</sub>\_TT<sub>BOB</sub> bestätigte den korrekten Einbau des Fragments hinter den Promotor.

Es erfolgte die Transformation von *S. aureus* ATCC 25923 mit pAT18-P<sub>blaZ\_gfpmut2</sub>\_TT<sub>BOB</sub> aus *S. aureus* RN4220. Dazu wurde sowohl das Protokoll aus Greifswald und das Protokoll von Trieu-Cuot *et al.* (1993), als auch eine Kombination der beiden, bei dem die elektrokompenten Zellen nach Trieu-Cuot *et al.* nach dem Protokoll aus Greifswald elektroporiert wurden, verwendet. Durch das letztgenannte Verfahren wurde schließlich auch eine Transformation von *S. aureus* ATCC 25923 erreicht und es konnte eine grün-leuchtende Kolonie isoliert werden:

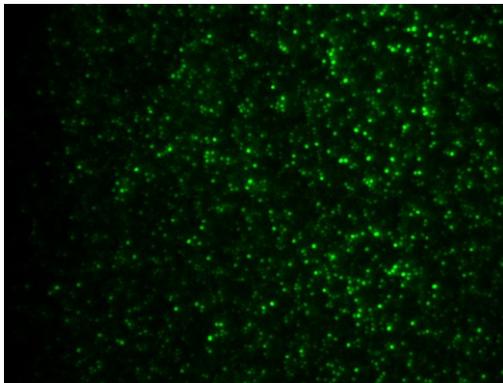


Abb. 33: *S. aureus* ATCC 25923\_pAT18-P<sub>blaZ\_gfpmut2</sub>\_TT<sub>BOB</sub>

Nachdem das Einfügen eines Terminators hinter *gfpmut2* zu einer Verstärkung der Fluoreszenz führte, die auch in *S. aureus* RN4220 und anschließend auch in *S. aureus* ATCC 25923 detektierbar war, wurde geprüft ob dieses Vorgehen auch den gewünschten Effekt bei dem rot leuchtendem Fluorochrom DsRM hätte.

DsRM wurde aus pAT18-DsRM mit den Primern DsRM\_for/Bam und DsRM\_rev/Sph amplifiziert und genauso wie pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_TT<sub>BOB</sub> mit BamHI und SphI einem Restriktionsverdau unterzogen. Nach der sich anschließenden Ligation wurde das Produkt in *E. coli* DH5 $\alpha$  vervielfältigt, isoliert und in *S. aureus* RN4220 elektroporiert.

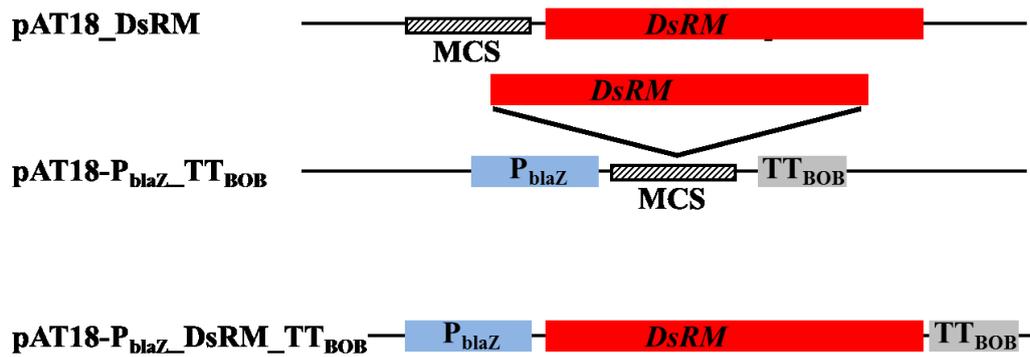


Abb. 34: Klonierung von pAT18-P<sub>blaZ</sub>-DsRM-TT<sub>BOB</sub>

Es ließen sich schwach rot leuchtende Staphylokokken unter dem Fluoreszenzmikroskop darstellen:

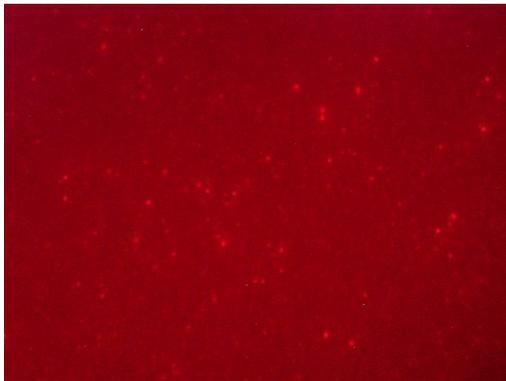
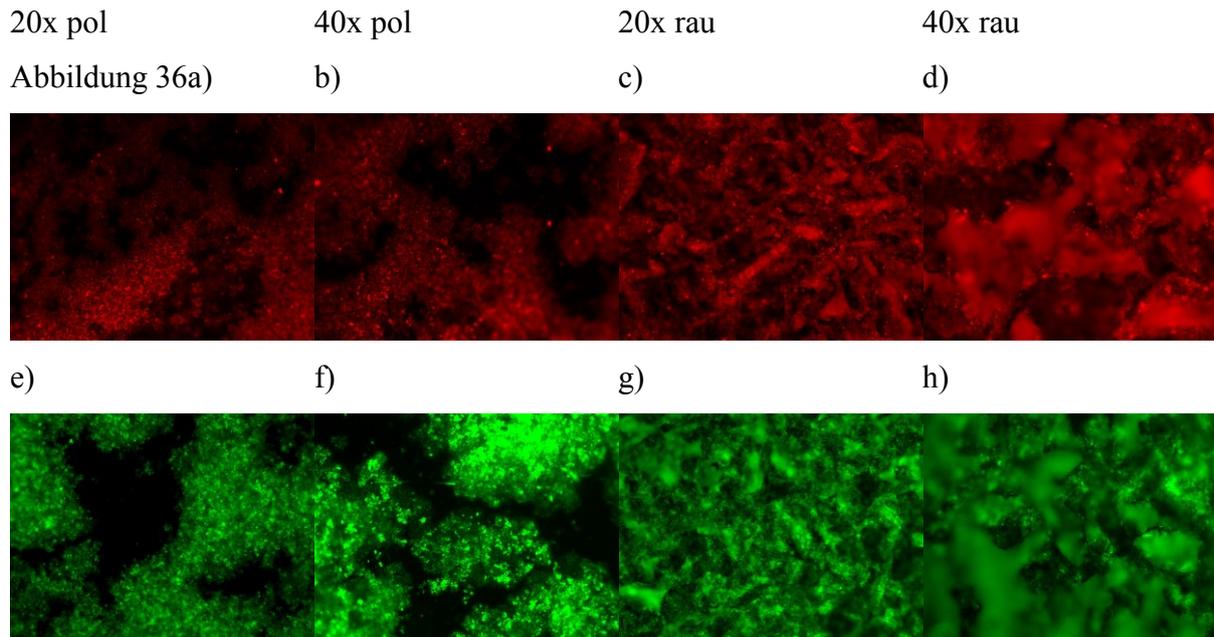


Abb. 35: *S. aureus* RN 4220\_pAT18-P<sub>blaZ</sub>-DsRM-TT<sub>BOB</sub>

Auch hier wurde das Plasmid isoliert und versucht mittels Elektroporation wie oben erwähnt in *S. aureus* ATCC25923 einzuschleusen. Es konnten jedoch trotz wiederholter Versuche keine Transformanten gewonnen werden.

### 3.4.3. Mikroskopie der Fluorochrom-produzierenden Staphylokokken auf Probekörpern

Um die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Fluorochrom-exprimierenden Staphylokokken mit der Darstellung mittels Live/Dead Färbung zu vergleichen, wurde *S. aureus* RN4220 mit den entsprechenden Plasmiden für 24 h analog den Wachstumsversuchen unter 3.4.1. und 3.4.2. inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch detektiert:

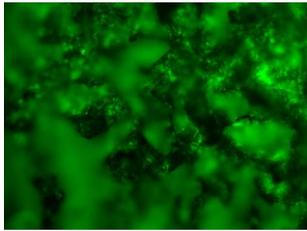


**Abb. 36: Fluoreszenzmikroskopie von Fluorochrom-produzierenden *S. aureus* RN4220.** Expression von DsRM (Abb. 36a) bis d)) und GFP (Abb. 36e) bis h)). Auf Ti-pol (Abb. 36a),b),e),f)) und Ti-HA gestrahlt (Abb. 36c),d),g),h)). Vergrößerung 20x (Abb. 36a),c),e),g)) und 40x (Abb. 36b),d),f),h)).

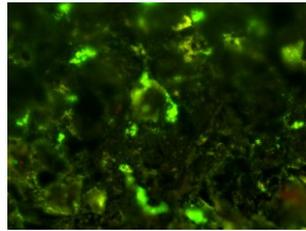
*S. aureus* RN4220 bildete Biofilme auf Titanoberflächen und sowohl mit DsRM, als auch mit GFP ließ sich sein Wachstum darstellen. Abhängig von der Oberflächenrauigkeit konnte ein unterschiedliches Wachstumsmuster dokumentiert werden. Auf den polierten Oberflächen kam es zu einem flächigem Wachstum mit größeren zusammenhängenden Bakterienmassen. Auf HA-gestrahlt Titan war das Wachstum wiederum hauptsächlich auf die Nischen und Konkaviäten beschränkt, so dass kleinere Zellverbände gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt zur Darstellung kamen.

Abschließend wurde zum Vergleich der beiden fluoreszenzmikroskopischen Methoden exemplarisch die Färbung der Staphylokokken mittels BacLight Viability Kit und die Darstellung ohne Farbstoff, durch GFP-Expression gegenübergestellt:

Abbildung 37a)

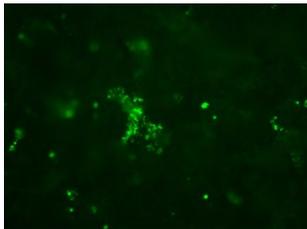


RN4220

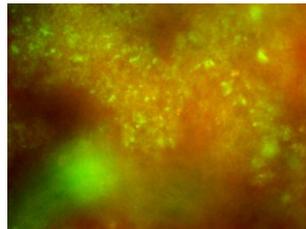


ATCC 25923

Abbildung 37b)

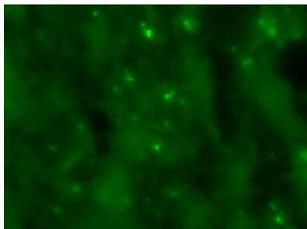


RN4220

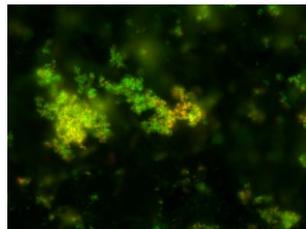


ATCC 25923

Abbildung 37c)



RN4220



ATCC25923

**Abb. 37: Fluoreszenzmikroskopie von GFP-exprimierenden *S. aureus* RN4220 und *S. aureus* ATCC 25923 angefärbt mit dem BacLight Viability Kit. Wachstum auf Titan rau an Tag 1 (Abb. 37a)), Kupferplättchen an Tag 1 (Abb. 37b)) und 10 mM CuSO<sub>4</sub> an Tag 2 (Abb. 37c)). Vergrößerung 40x.**

Mit dem GFP-exprimierenden *S. aureus* ließen sich die Bakterien sowohl ohne Kupfer, als auch auf Kupferplättchen und nach Zugabe von Kupfersulfat darstellen. Dabei ließen sich an Tag 1 auf Kupferplättchen und nach Kupfersulfatzugabe nur vereinzelt Staphylokokken nachweisen. Dagegen war die Differenzierung von *S. aureus* ATCC 25923 nach Färbung mit dem BacLight Viability Kit nur in Abwesenheit des Kupfers auf rauem Titan sicher möglich. Vor allem auf dem Kupferplättchen wurde die unspezifische Färbung von Bestandteilen des Mediums auf der Oberfläche sowie die rote Hintergrundfluoreszenz des Kupferplättchens deutlich (vergleiche mit Abb. 16, 17, 20 und 21).

## 4. Diskussion

In dieser Promotionsarbeit galt es in einem *in vitro*-Modell den Einfluss von möglichen antibakteriellen Implantatoberflächenbeschichtungen und -modifizierungen auf das Wachstumsverhalten von Staphylokokkenbiofilmen zu untersuchen. Diese Oberflächen sollen ihre Wirkung über die Freisetzung von Kupferionen erzielen.

### 4.1. Charakterisierung des Wachstums von Staphylokokken auf Implantatoberflächen *in vitro* – Modell zur Testung antibakterieller Oberflächen

Für die *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeit wurden statische Kulturbedingungen gewählt, da der Aufwand für Flussbedingungen, obwohl diese realistischer erscheinen, den Rahmen eines einfachen „Screenings“ neuer potentiell antimikrobieller Oberflächen sprengen würde. Um der Situation *in vivo* dennoch näher zu kommen, enthielt das Inkubationsmedium Humanserum.

Es gibt in der Literatur bislang nur wenige Angaben zur Bakterienzahl, die benötigt wird, um eine Implantat-assoziierte Infektion auszulösen. Deshalb wurde in dieser Arbeit außerdem der (mögliche) Einfluss des bakteriellen Inokulums auf das Wachstumsverhalten bestimmt.

Zur Untersuchung der Biofilme wurden die Testbakterien auf Titanprobekörpern angezüchtet, weil Titanlegierungen als eine der Standardmaterialien in der orthopädischen / unfallchirurgischen Chirurgie Verwendung finden (Schildhauer *et al.*, 2006) und sie sich somit als Referenz für antiinfektiöse Oberflächenbeschichtungen und -modifikationen hervorragend eignen. Im Vergleich zu Edelstahl, einem anderem Implantatmaterial, konnte *in vivo* gezeigt werden, dass es auf Titanimplantaten seltener zur Implantat-assoziierten Infektion kommt (Arens *et al.*, 1996) und Staphylokokken in geringerer Zahl an Titan adhären (Sheehan *et al.*, 2004).

*S. aureus* ATCC25923 und *S. epidermidis* RP62A bildeten auf den Probekörpern aus Titanlegierung (Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V) Biofilme innerhalb von 24 Stunden aus. Dabei zeigte sich, dass das Wachstumsverhalten im verwendeten Versuchsaufbau ohne Kupferzusatz nach 24 Stunden unabhängig von der Menge der eingesetzten Bakterien war (siehe Abb. 8). Daraus lässt sich ableiten, dass bei der Untersuchung antibakterieller oder zumindest wachstumshemmender Stoffe ein Unterschied des Wachstums mit dieser Versuchsanordnung über 10 Tage nur auf eine unterschiedliche Ausgangskeimkonzentration zurückzuführen ist, wenn der

wachstumshemmende Effekt innerhalb der ersten 24 Stunden einsetzt. In Versuchen, in denen Kupfer nach 24 Stunden Inkubation oder später dazugegeben wird, spielt die Menge der eingesäten Bakterien eine untergeordnete Rolle. Da das Kupfer von funktionalisierten Oberflächen aber unmittelbar nach Kontakt mit Flüssigkeit freigesetzt wird, ist die eingesäte Bakterienmenge zur Interpretation des wachstumshemmenden Effekts von großer Bedeutung. So konnte der hier untersuchte mittels PIII-behandelte Probekörper einen deutlichen wachstumshemmenden Effekt nur mit der geringeren Ausgangsbakterienkonzentration erzielen (siehe Abb. 23). Weiterhin zeigte sich für *S. aureus*, dass nach 24-stündiger Beobachtungsdauer die Menge an planktonischen Bakterien unabhängig davon ist, ob die initiale planktonische Population nach zweistündiger Inkubation entfernt wurde oder nicht (siehe Abb. 9). Dies lässt sich durch den Prozess des Detachment eines reifen Biofilms erklären (Otto, 2008). Dabei lösen sich Bakterienkonglomerate vom etablierten Biofilm und bilden so eine Fraktion der planktonischen Bakterien, die dann ihrerseits durch Teilung zur Zunahme der planktonischen Zellzahl beitragen können.

Auch hat in der vorliegenden Arbeit die Oberflächenrauigkeit der untersuchten Probekörper keinen Einfluss auf die Menge der Bakterien im Biofilm. So lieferte die Quantifizierung des Biofilmes, entweder auf polierter oder HA-gestrahelter Titanlegierung, nahezu identische Werte (siehe Abb. 5 und 8). Harris *et al.* haben 2004 aus ihren Versuchen geschlussfolgert, dass die Oberflächentopographie nur eine untergeordnete Rolle spielt und dass physikalische Faktoren, wie die Oberflächenenergie, entscheidenderen Einfluss auf die Adhärenz von *S. aureus* haben. Dagegen zeigten Verheyen *et al.* (1993) für *S. aureus* und *S. epidermidis*, dass mehr Bakterien an der Oberfläche adhäreren, je größer die Rauigkeit ist. Beiden Studien nutzten als beschreibenden Parameter der Rauigkeit den Mittenrauwert  $R_a$ . Dieser quantifiziere laut Barbour *et al.* (2007) die Rauigkeit jedoch lediglich in der Vertikalen. So können Titanoberflächen mit gleichen Mittenrauwerten aufgrund unterschiedlicher horizontaler Topographie unterschiedliche bakterielle Kolonisation aufweisen.

Die Ergebnisse von Wu *et al.* (2011) bestätigen diese Beobachtung. Denn in ihrer Arbeit zeigte *S. epidermidis* eine signifikant höhere Kolonisation auf  $Ti_6Al_4V$  mit einer Rauigkeit von  $R_a = 0,83 \mu m$  und  $R_a = 11 \mu m$  gegenüber einem glatteren ( $R_a = 0,006 \mu m$ ) und einem rauerem Probekörper ( $R_a = 33 \mu m$ ). Sie haben daher als wichtigeren Parameter der bakteriellen Adhäsion „roughness at lateral length scales“ beschrieben. Wenn diese leicht oberhalb der Größe des Bakteriums liege, würde die Kolonisation verstärkt, mikroskopisch erkennbar an der Bevorzugung von Konkavitäten aller Art (Absenkungen, Gruben und Furchen). So kommt es zu einer größeren Kontaktfläche des Bakteriums mit der Oberfläche.

Auch in den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit wachsen die Staphylokokken auf HA-gestrahltm Titan vorzugsweise in den Nischen, so dass die einzelnen Zellkonglomerate aufgrund der vorliegenden topographischen Gegebenheiten kleiner sind als beim Wachstum auf der polierten Titanoberfläche. Hier hingegen bilden sie größere zusammenhängende Haufen von Bakterien, hervorgehend aus einzelnen in der Umgebung liegenden Zellen (siehe Abb. 7 und 36).

Die Quantifizierung zeigte, dass an beiden Oberflächen annähernd gleich viel Bakterien adhären, obgleich der unterschiedlichen Mittenrauwerte  $R_a = 0,725 \mu\text{m}$  bei dem HA-gestrahltm Testkörper und  $R_a = 0,19 \mu\text{m}$  bei dem poliertem Probekörper. Dies bekräftigt die von Wu *et al.* (2011) aufgestellte Hypothese, dass der Mittenrauwert  $R_a$  eine begrenzte Aussagekraft bezüglich möglicher bakterieller Kolonisation hat, wenn auch in dieser Arbeit das Intervall zwischen den beiden  $R_a$ -Werten geringer war.

Ein Nachteil des hier genutzten *in vitro*-Modells ist die Tatsache, dass sich in der Population der planktonischen Bakterien auch immer ein kleiner Teil von Biofilmbakterien befinden kann. Diese werden beim Spülen der Oberflächen zur quantitativen Gewinnung der planktonischen Bakterien abgelöst. Das hat keinen Einfluss auf die Mengenummessung der Biofilmbakterien des Probekörpers, da dieser nach dem Spülen in ein neues Gefäß transferiert wurde. Auch bei Versuchen ohne antibakterielles Agens spielt die in die planktonische Population eingespülte Biofilmpopulation wegen ihres geringen relativen Anteils keine Rolle. Wenn jedoch ein antibakteriell wirkendes Agens wie hier Kupfer getestet wird, das insbesondere planktonische Bakterien abtötet, während Biofilmbakterien eher geschützt sind, kann der Wert für die planktonischen Bakterien verfälscht werden. Auch die typischen Ablösungseffekte von Biofilmbakterien über längere Inkubationszeiträume („Detachment“) tragen zur planktonischen Bakterienmenge bei. Diese beiden Effekte können das Ansteigen planktonischer Bakterienmengen nach initial deutlicher bis kompletter Eradikation dieser Fraktion erklären.

Da primäres Ziel unseres Modells jedoch die Untersuchung der Bakterien im Biofilm, dem Faktor in der Pathogenese der Implantat-assoziierten Infektion, ist, ermöglicht das gewählte Verfahren eine einfache, schnelle und sichere Möglichkeit zur Dokumentation dieser bakteriellen Lebensform. Da die planktonische Fraktion jederzeit den Gegenpart zu den Biofilm-organisierten Bakterien darstellt, wurden die dazu ermittelten Werte trotz der möglicherweise beschränkten Bedeutung der Vollständigkeit halber jederzeit mit ermittelt und als Ergebnis dargestellt.

#### 4.2. Einfluss von Kupfer auf die planktonische und Biofilmfraktion typischer Erreger periprothetischer Infektionen

Zentraler Bestandteil dieser mikrobiologischen Arbeit ist die Untersuchung antibakterieller kupferfreisetzender Oberflächen zur Prävention der Implantat-assoziierten Infektion. In einem ersten Schritt wurde zunächst als „proof of principle“ der Effekt des Kupfers auf die Testkeime *S. aureus* und *S. epidermidis* untersucht und unter anderem die Kupferkonzentration bestimmt, die nötig ist, um die hier verwendeten Bakterien abzutöten. Dieser Wert, die sogenannte MBK, ist allgemein definiert als die Konzentration eines antimikrobiellen Agens, das mindestens 99,9% der planktonischen Population eines Bakteriums tötet (Harisson *et al.*, 2007). Ein entsprechender Wert wurde hier auch für Biofilm-organisierte Bakterien gemessen, da diese in der in vivo Situation aufgrund ihrer pathogenetischen Bedeutung die maßgeblich zu attackierende Fraktion darstellen. Die MHK hingegen gibt die Konzentration eines Stoffes an, die ausreicht, um das Bakterienwachstum zu verhindern, die Bakterien aber nicht abtötet. Dieser Effekt könnte einen ersten Schritt in der Prävention der Implantat-assoziierten Infektion darstellen.

Kupfersulfat in der hier bestimmten MHK vermochte die Ausbildung eines Biofilms in der logarithmischen Wachstumsphase der eingesäten Bakterien nicht zu verhindern (siehe Abb. 14). Nach den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Baker (2010) werden schon ab einer Kupferkonzentration von nur 1  $\mu\text{M}$  in *S. aureus* wichtige Gene, die an der Biofilmbildung beteiligt sind, herunterreguliert, was Auswirkungen auf das Biofilmwachstum haben sollte. Unter den Bedingungen des hier verwendeten Modells vermochte aber eine mehr als 1000-fach höhere Konzentration das Wachstum auf der Titanoberfläche nicht zu beeinträchtigen. Kupfersulfat in der gemessenen MHK verhindert somit nicht die Ausbildung eines Staphykokokenbiofilms.

Es wurde eine  $\text{CuSO}_4$ -MBK von 10 mM in der logarithmischen Wachstumsphase für beide Testkeime ermittelt, unabhängig von der eingesetzten Bakterienmenge (siehe Abb. 10 und 11). Allerdings war mit größerem Inokulum bei gleichbleibender Kupferkonzentration eine längere Expositionsdauer von Nöten, um eine Eradikation herbeizuführen. Um den Effekt der MBK auf die Bakterien im Biofilm zu untersuchen, wurde nach 24 Stunden Inkubation Kupfersulfat in einfacher und doppelter MBK zum Ansatz gegeben. Zu diesem Zeitpunkt war unter den Versuchsbedingungen bereits ein reifer Biofilm ausgebildet.

Sowohl die planktonische als auch die Biofilmpopulation wurde so zunächst um mehr als 99,9% reduziert (siehe Abb. 15). Die Tatsache, dass erst nach 10 Tagen Inkubation keine Bakterien mehr kultiviert werden konnten, deutet auf die Präsenz von Zellen hin, die sich der antibakteriellen Wirkung des Kupfers zunächst entziehen. Harrison *et al.* (2005) stellten bei Untersuchungen mit *Pseudomonas aeruginosa* fest, dass der Biofilm und insbesondere die Biofilmmatrix einen Schutz für die Bakterien bieten, da die Zellen im Biofilm, die der Kupferexposition länger standhalten als ihre planktonische Fraktion, bei erneuter Anzucht keine höhere Toleranz gegenüber Kupfer haben. Deshalb definierten sie in ihrer Arbeit die  $MBC_{100}$  und die MBEC (minimum bactericidal concentration bzw. minimum biofilm eradication concentration), also die Konzentrationen, bei denen 100% der planktonischen bzw. Biofilmbakterien abgetötet werden.

Hier war in der logarithmischen Wachstumsphase für die suspendierten Fraktionen beider Staphylokokkenstämmen nach Zugabe von 10 mM  $CuSO_4$  bereits nach 2 Stunden kein Wachstum mehr nachzuweisen. Im Biofilm dagegen war nach 7 Tagen (168 Stunden) noch eine geringe Population (10 bis 100 KBE) von Bakterien auch bei 20 mM, also der doppelten  $MBC_{100}$ , kultivierbar. Bis zu diesem Zeitpunkt war die MBEC also noch nicht erreicht. Während die übrigen Bakterien des Biofilms bereits nach ca. 24 h Exposition (Tag 2) abgetötet waren, überlebte diese Subpopulation mit erhöhter Toleranz gegenüber dem Kupfersulfat mindestens weitere 5 Tage. Dass es sich nach der Zugabe des Kupfers um einen bakteriziden Effekt handeln musste und nicht um eine Ablösung des Biofilmes von der Oberfläche, zeigte die ebenfalls deutliche Minimierung der planktonischen Bakterien.

Analog den Beobachtungen von Harrison *et al.* (2004 und 2005) ermöglicht der Biofilm für einen Teil seiner Population also eine zeitlich womöglich begrenzte Toleranz gegenüber letalen Kupferkonzentrationen. Daraus ergibt sich für Metallionen eine zeitabhängige Bakterizidie, wohingegen die Konzentration im hier untersuchten Rahmen keine Rolle spielte.

Der Verlauf der Wachstumskurve für die planktonischen Bakterien war fast identisch mit dem der Biofilmbakterien. Hierfür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Entweder es handelt sich um Biofilmzellen von der Plastikoberfläche des Bebrütungsgefäßes (siehe 4.1.) oder um eine Subpopulation der planktonischen Bakterien, den sogenannten Persister-Zellen, die eine erhöhte Toleranz gegenüber Metallen und Antibiotika besitzen. Diese Persister, die auch im Biofilm vorkommen, stellen dort eine Subpopulation von 0,1 bis 10% der Bakterien. Da diese Population auch im planktonischen Zustand existiert, ist die antibakterielle Toleranz nicht durch Komponenten des Biofilms gegeben. Dieser Zustand wird im Biofilm und in der stationären Wachstumsphase, in welcher sich die meisten sowohl der planktonischen als auch

der adhärennten Bakterien bei Zugabe des Kupfersulfates (Tag 1) befinden, angetroffen (Harrison *et al.*, 2005 und 2007; Lewis, 2007). Das Persister-Phänomen wurde auch für *S. epidermidis* beschrieben (Shapiro *et al.*, 2011).

Darüber hinaus führten Harrison und Kollegen ein multifaktorielles Modell ein, mit dem sie die Multimetal resistance (MMR) und die Multimetal tolerance (MMT) von Biofilmen erklären (Harrison *et al.*, 2007). Dabei bedeutet Resistenz die Fähigkeit des Bakteriums in Anwesenheit toxischer Metalle weiterzuwachsen, während Toleranz lediglich ein Überleben ohne Wachstum darstellt. Dieses Modell beschreibt das Leben in einem Biofilm als komplexe und koordinierte Entwicklung einer Population von Mikroorganismen. Zur Metallresistenz bzw. -toleranz tragen dabei unter anderem die Metallsequestrierung durch die extrazelluläre Matrix, die Heterogenität des metabolischen Zustandes einzelner Zellen innerhalb des Biofilmes, die Variation von Phänotypen, interzelluläre Signale wie Quorum sensing und natürlich die bereits angesprochenen Persister-Zellen bei.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Fähigkeit von Kupfersulfat auch den reifen Biofilm des Testkeimes und MRSE-Stammes RP62A (Gill *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2006) zu eradizieren. Die Abtötung eines reifen Biofilmes durch Antibiotika erfordert, wenn überhaupt möglich, sehr hohe Dosen Antibiotika, verglichen mit der Dosis für ihre entsprechende planktonische Population (Ceri *et al.*, 1999). Die initial vorhandene Resistenz eines Keimes gegenüber Antibiotika erschwert die Eradikation seines Biofilmes zusätzlich. Im Falle antibiotikaresistenter Keime wie *S. epidermidis* erscheint die Prävention einer Implantat-assoziierten Infektion durch den Einsatz Kupfer-freisetzender Implantate erfolgversprechender.

Es wurden Staphylokokken aus nosokomiale Umfeld mit Resistenzen gegenüber Kupferkonzentrationen bis 1 mM beschrieben (Ugur und Ceylan, 2003). Ihr Stellenwert als Erreger einer Implantat-assoziierten Infektion ist jedoch nach der zurzeit vorliegenden Literatur unbekannt. Darüber hinaus wurden die Resistenzen gegenüber niedrigeren Kupferkonzentration beobachtet als die in dieser Arbeit bestimmte MBEC. Demgegenüber ist die Tatsache der zunehmenden medizinischen Bedeutung antibiotikaresistenter Staphylokokkenstämme in der Wissenschaft sicher etabliert (Parvizi *et al.*, 2009 und 2010).

Ob die neuerliche Popularität des Kupfers aufgrund der antibakteriellen Eigenschaften und dem damit verbundenen zunehmenden Einsatz in der Medizin (siehe 1.2.) in einigen Jahren aufgrund des Selektionsdruckes zu Keimen mit gesteigerter Resistenz führen wird bleibt abzuwarten. Eine vollständige Resistenz ist aufgrund des Wirkmechanismus (Espírito Santo

*et al.*, 2008 und 2011; Weaver *et al.*, 2010) und der Größe eines Kupferions wohl ausgeschlossen. Unterschiedlich ausgeprägte Resistenzen gegenüber Kupfer in verschiedenen Staphylokokkenstämmen sind beschrieben worden (Ugur und Ceylan, 2003). Es wäre daher vorstellbar, dass z.B. stammspezifische intrazelluläre Resistenzmechanismen (Harrison *et al.*, 2007) zwischen verschiedenen Stämmen oder Spezies ausgetauscht und somit weiter verbreitet werden. Dies könnte zur Erhöhung der  $MBC_{100}$  und der MBEC für Stämme führen, die eigentlich gegenüber niedrigen Kupferkonzentrationen empfindlich waren.

### **4.3. Kombination von PIII und Plasmopolymerisation zur Prävention der Implantat-assoziierten Infektion**

Die häufigste Ursache Implantat-assoziierten Infektionen sind Staphylokokkenbiofilme (Barth *et al.*, 1989; Brady *et al.*, 2009; Del Pozo und Patel 2009). Die wichtigsten Erregerspezies unter den Staphylokokken sind *S. aureus* und *S. epidermidis*. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Biofilme zweier potenter Biofilm-bildender Stämme, nämlich *S. aureus* ATCC25923 und *S. epidermidis* RP62A (Polonio *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2010), von Kupfer vollständig abgetötet werden können (siehe Abb. 15). Eine kupferfreisetzende Implantatoberfläche könnte daher einer Implantat-assoziierten Infektion vorbeugen.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Verfahren, nämlich zur Modifikation (Plasma-Immersionen-Ionen-Implantation) und zur Beschichtung (Plasma-Polymerisation) von Oberflächen, auf ihre Wirkung auf das Wachstumsverhalten von Staphylokokkenbiofilmen und ihrer planktonische Population untersucht. Die beiden angesprochenen Verfahren der Oberflächenfunktionalisierung haben unterschiedliche Aufgaben in der Vermeidung der Biofilmbildung, und damit der Implantat-assoziierten Infektion. Mit der Oberflächenmodifikation werden die antibakteriellen Kupferionen in das Implantat eingebracht. Die Beschichtung hingegen dient der Integration des Implantates in das umliegende Knochengewebe. Außerdem kann über die Dicke der Beschichtung die Freisetzungskinetik der Kupferionen gesteuert werden.

Bei der Plasma-Immersionen-Ionen-Implantation werden Kupferionen unter der Oberfläche des Implantates eingelagert, die bei Kontakt mit einer Flüssigkeit in Lösung gehen und so ihre antibakterielle Wirkung entfalten. Mit diesem Verfahren ist eine breite Palette an Anwendungsmöglichkeiten gegeben. So ist es auch möglich andere Moleküle in die

Oberfläche zu integrieren. Die Arbeitsgruppe um Mändl (2002) konnte zeigen, dass die Implantation von Sauerstoff die Osseointegration im Rattenfemur verstärkt. Yeung *et al.* (2007) haben durch das Aufbringen einer Titannitridschicht (TiN) die Korrosionseigenschaften und die Osteoblastenproliferation verbessern können.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit dem PIII-Verfahren in einen Titanprobekörper eingebrachte Kupferionen suffizient das Wachstum von *S. epidermidis* hemmen können (siehe Abb. 23). Dieser Effekt war bei einem Inokulum von  $10^3$  Bakterien sehr ausgeprägt und bei  $10^6$  Bakterien nur sehr gering zu verzeichnen. Zudem ist auf der Basis der oben geschilderten Voruntersuchungen zu folgern, dass der hemmende Effekt innerhalb von 24 Stunden einsetzte.

Dass es beim kleineren Inokulum an Tag 4 zu einem erneuten Wachstum der planktonischen Bakterien und an Tag 7 zum Biofilmwachstum kam, lässt sich in Zusammenschau mit den Ergebnissen aus den Kupfersulfatversuchen (siehe 4.2.) wie folgt erklären: Initial war die freigesetzte Kupfermenge groß genug um den Großteil der Bakterien abzutöten bzw. dauerhaft am Wachstum zu hindern. An Tag 4 fiel die Konzentration an freiem Kupfer dann unter die MHK ab, so dass wieder ein Wachstum der Bakterien möglich war. Allerdings war weiterhin ein hemmender Effekt zu verzeichnen, da ein geringeres Wachstum beobachtet wurde als in der Initialphase bei unbehandelten Referenzkörpern.

Eine Erklärung für die Abnahme der Konzentration an freiem Kupfer im Versuchsverlauf wäre die Sequestrierung der Kupferionen durch Bestandteile der abgestorbenen Bakterien, wie von Harrison und Kollegen postuliert (2005 und 2007). Diese würde auch erklären, warum der wachstumshemmende Effekt bei  $10^6$  Bakterien viel geringer ausgeprägt war, da die große initiale Bakterienmenge die zu Beginn freigesetzten Kupferionen durch die Sequestrierung „abpuffert“.

Die Integration von Kupferionen in eine Oberfläche mit der PIII-Methode und nachfolgende antibakterielle Effekte haben Zhang *et al.* (2007) bereits in einem Experiment mit *E. coli* zeigen können. Die in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen haben dies für Staphylokokkenbiofilme und deren planktonische Fraktion bestätigt.

Das zweite Verfahren, die Plasma-Polymerisierung, dient dagegen der Verbesserung der Cytokompatibilität des Implantates durch das Auftragen einer Schicht, die das Adhären und Differenzieren eukaryotischer Zellen fördern soll. Schröder *et al.* (2010) konnten zeigen, dass eine Beschichtung mit plasmapolymersiertem Polyallylamin (PPAAm) sich *in vivo* nicht negativ auf den Entzündungsprozess *post implantationem* auswirkt und es zusätzlich *in vitro*

zur vermehrten osteogenen mRNA-Expression kommt. Nach der Hypothese des „race for the surface“ würde eine Beschichtung, die die Osteoblastenadhäsion fördert, den Bakterien das Substrat zur Vermehrung nehmen und so eine Infektion verhindern. Somit ist Ziel dieses Verfahrens durch Osteoblastenadhäsion und konsekutiver Implantatintegration die Prävention der Bakterienadhäsion und konsekutiver Implantatinfektion.

Darüber hinaus soll über die Polymerschichtdicke die Freisetzungskinetik des mittels PIII implantierten Kupfers gesteuert werden. Aus den hier bestimmten Messwerten der Kupferfreisetzung aus mit Polyallylamin beschichteten Kupferplättchen ist zu erkennen, dass mit zunehmender Polyallylamin-Schichtdicke die Menge des freigesetzten Kupfers sinkt (siehe Abb. 19 und 22). Dabei bestätigte sich für die MBK bzw. MBEC der zuvor ermittelte Wert von ca. 10 mM (siehe 4.2.). Der antibakterielle Effekt war allein auf das Kupfer und nicht auf die Polyallylaminbeschichtung zurückzuführen, wie die Versuche mit Polyallylamin beschichtetem kupferfreiem Titan zeigen (siehe Abb. 18).

Innerhalb einer 4-tägiger Inkubation eines unbeschichteten Kupferplättchens (PI ~78) wurden ca. 11 mmol Kupfer freigesetzt. Im hier gewählten Versuchsaufbau entsprach dies dem Maximum an Kupferfreisetzung in genanntem Zeitraum. Folglich müsste diese Menge für min. 7 Tage einwirken, um eine Eradikation eines etablierten Biofilmes zu erreichen. Der Einsatz der PIII-Methode zur Prävention der periprothetischen Infektion wirkt in diesem Zusammenhang nicht limitierend, da die Eradikation des Biofilms durch Kupferionen zeitabhängig ist. Der errechnete Wirkspiegel muss nur so lange aufrecht erhalten werden, dass bereits auf der Oberfläche bestehende Biofilme und die darin eingeschlossenen Persister-Zellen sicher abgetötet werden, da diese der Ausgangspunkt einer Rekurrenz sein können (siehe 4.2.).

Zhang *et al.* (2007) haben in ihrer Arbeit die Kinetik der Kupferfreisetzung bei einer mit Cu-PIII imprägnierten Oberfläche über 4 Wochen bestimmt, jedoch sind diese Ergebnisse nicht auf die hier vorliegenden Untersuchungen anzuwenden. Sowohl das Oberflächenmaterial als auch die Präparation unterschieden sich vom gegenwärtigen Aufbau, zudem lag keine zusätzliche Beschichtung vor. Zietz *et al.* (2012) belegten, dass sowohl das Inkubationsmedium als auch die Oberflächenrauigkeit Einfluss auf die Freisetzungskinetik der mittels PIII implantierten Kupferionen (Cu-PIII) haben. In einem nächsten Schritt sollten daher Kupferkonzentrationsmessungen von PPAAM beschichteten und gleichzeitig mit Cu-PIII behandelten Titankörpern vorgenommen werden. So könnte die Kinetik der Kupferfreisetzung bestimmt und die hier verwendete Kombination der

Oberflächenfunktionalisierung für die erforderliche Kinetik der Kupferfreisetzung optimiert werden.

Es ist unklar, ob es zu einer Implantat-assoziierten Infektion durch „Fetzen“ eines reifen Biofilmes, der während der Operation auf die Oberfläche gelangt, oder durch einzelne Bakterien, die zunächst auf der Oberfläche adhären und anschließend einen Biofilm ausbilden, kommt. Im Fall der zweiten Option müsste für eine suffiziente Prävention nicht notwendigerweise die MBEC erreicht werden. In diesem Fall würde es ausreichen die Adhäsion und/oder das Auswachsen der Pionierzellen zu Mikrokolonien zu inhibieren. Dann könnten diese Bakterien ohne ihren „Biofilmschutz“ durch Faktoren der Wirtsabwehr abgetötet werden. Auch könnte die Wachstumshemmung die Ausbreitung der Erreger auf dem Implantat unterbinden und so bei vorhandener Cytokompatibilität der Oberfläche der Kolonisation durch humane Osteoblasten im „race for the surface“ einen Vorsprung verschaffen.

Nach diesen Überlegungen würde es ausreichen, wenn die Kupferfreisetzung mit suffizienten Konzentrationen nur vorübergehend *post implantationem* stattfände. Eine so bewirkte Prävention der akuten und der frühen verzögerten Infektion würde den Großteil der periprothetischen Infektionsereignisse verhindern (Trampuz und Zimmerli, 2006; Ong *et al.*, 2009). Zur Absicherung dieser Hypothese sind *in vivo* Versuche von herausragender Bedeutung, da die tatsächliche antibakterielle Wirkung auf der Implantatoberfläche durch Freisetzung und Abtransport der Kupferionen durch den Strom an Gewebeflüssigkeit, die Absorption durch das benachbarte Gewebe sowie der Einfluss des Immunsystems im *in vitro*-Modell nicht untersucht werden können.

Zur Prävention der Implantat-assoziierten Infektion gibt es verschiedene Ansätze (siehe 1.1.3.), wobei das Verfahren der Freisetzung von Kupferionen aus dem Implantat den Vorteil gegenüber z.B. Antibiotika-beschichtungen hat, dass Kupfer als Spurenelement für den menschlichen Körper essentiell und für den Stoffwechsel unverzichtbar ist (U.S. Department of Health and Human Services, 2004). Kupferionen sind für dieses Ziel anderen Spurenelementen wie Zink oder Kobalt aufgrund ihrer Zytokompatibilität einerseits und ihren antibakteriellen Eigenschaften andererseits überlegen (Heidenau *et al.*, 2005). Sen *et al.* (2002) konnten im Mausmodell sogar zeigen, dass topisch aufgetragenes Kupfersulfat die Wundheilung fördert und beschleunigt. Borkow *et al.* (2010) konnten dies mit kupferimprägnierten Verbänden *in vivo* bestätigen. Dieser Effekt des Kupfers ist von zusätzlichem Vorteil. Ein weiterer Vorteil von antibakteriell wirkenden Metallionen

gegenüber Antibiotika ist, dass in bakteriellen Biofilmen der letalen Metalleffekt lediglich verzögert wird, sich aber keine dauerhafte Toleranz wie gegenüber Antibiotika ausbildet (Harrison *et al.*, 2004 und 2005).

Der in dieser Arbeit verwendete *S. epidermidis*-Stamm RP62A ist ein MRSE, der gegen Ampicillin, Kanamycin und Erythromycin resistent ist (Gill *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2006). Eine Implantatbeschichtung zur Prävention der periprothetischen Infektion mit einem der genannten Antibiotika hätte bei diesem Keim aufgrund der breiten Antibiotikaresistenz in Kombination mit der biofilmvermittelten Toleranz mit hoher Wahrscheinlichkeit versagt. Kupfer dagegen war in der Lage diesen multiresistenten Erreger *in vitro* zu eradizieren. Neben seinen antibakteriellen besitzt Kupfer auch antifungale Eigenschaften, z.B. gegenüber *Candida* sp., einer selteneren Gruppe von Erregern der Implantat-assoziierten Infektion (Zimmerli *et al.*, 2004; Borkow und Gabbay, 2009). Kupfer besitzt also ein deutlich breiteres antiinfektiöses Spektrum als einzelne Antibiotika.

Alle Antibiotikabeschichtungen inkludieren das Risiko einer möglichen Resistenzentwicklung und –ausbreitung. Deshalb muss ihr routinemäßiger Einsatz zur Prävention einer Infektion mit einer Inzidenz von ca. 1 % der Implantat-behandelten Patienten (siehe 1.1.1.) kritisch beurteilt werden (Campoccia *et al.*, 2010). Kälicke *et al.* (2006) verglichen in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen Antibiotika- und Antiseptika beschichtete Implantate. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass beide Beschichtungen gleichermaßen die Infektionsrate *in vivo* signifikant senken und schlussfolgerten, dass die Antiseptikabeschichtung aufgrund der fehlenden Resistenzproblematik der Antibiotikabeschichtung überlegen sei. Auf mögliche toxische Effekte des verwendeten Octenidins und Irgasans auf den Menschen wurde bei diesen Überlegungen jedoch nicht eingegangen.

Unabhängig von den genannten Vorteilen des Kupfers gegenüber anderen antibakteriellen Agentien gilt auch für das Kupfer, dass große Mengen eines jeden Stoffes potentiell schädlich sind (U.S. Department of Health and Human Services, 2004). Deshalb ist es wichtig eine Kupferkonzentration zu bestimmen, die ein optimales Verhältnis zwischen antibakterieller Wirkung einerseits und Toleranz der humanen Zellen andererseits gewährleistet. Es bleibt zu klären, ob die experimentell ermittelten Kupferkonzentrationen realistisch für *in vitro* Ko-Kulturen von Bakterien und eukaryoten Zellen sind oder ob sie für Fibroblasten oder Osteoblasten toxisch sind. Heidenau *et al.* (2005) geben in ihrer Arbeit für Kupferionen eine LD<sub>50</sub> für Mausfibroblasten (L929) von 0,23 mM an. Allerdings ist bei einem Vergleich mit den hier vorgelegten Ergebnissen zu beachten, dass sich sowohl die Inkubationsmedien und Inkubationszeiten als auch die Kupferquelle (CuCl<sub>2</sub>) unterscheiden. Untersuchungen mit

Staphylokokken / Osteoblasten Ko-Kulturen sind der nächste Schritt, um das oben angesprochene optimale Verhältnis zwischen antibakterieller Wirkung und Toleranz des umliegenden Gewebes *in vitro* bestimmen zu können.

#### **4.4. Optimierung der Fluoreszenzmikroskopie mittels Fluorochrom-produzierenden Staphylokokken**

In der vorliegenden Arbeit galt es, das Wachstum von Erregern der Implantat-assoziierten Infektion, den Staphylokokken, auf antimikrobiellen Oberflächen zu quantifizieren. Neben der einfachen und leicht reproduzierbaren Analyse mittels serieller Verdünnung der suspendierten Bakterien und nachfolgender Zählung von zu Kolonien auswachsenden einzelnen Bakterien resp. kleinen Bakterienkonglomeraten, wurde die Fluoreszenzmikroskopie zur Visualisierung und semiquantitativen Bewertung möglicher antibakterieller Effekte eingesetzt. Zudem konnten so mögliche morphologische Veränderungen des Biofilms durch die Oberflächenbeschichtungen und damit für die Pathogenese relevante Vorgänge erfasst werden (Gristina 2004/1987; Costerton *et al.*, 1999; Zimmerli *et al.*, 2004). So wäre es vorstellbar, dass die Wirtsabwehr auf unter Kupfereinfluss nur in losen Zellverbänden wachsende Bakterien effizienter wirken und so eine periprothetische Infektion verhindern könnte.

In dieser Arbeit wurden die Bakterien nach Verwendung eines Farbstoffgemisches des BacLight Viability Kits mikroskopisch dargestellt. Damit ist es möglich Zellen anhand ihrer Membranintegrität in tot und lebendig einzuteilen. Allerdings führte dies bei den hier verwendeten Versuchsbedingungen in den Versuchen mit löslichem und festem Kupfer zu einer unspezifischen Anfärbung in Gegenwart von Humanserum (siehe Abb. 17 und 20).

Für eine alternative Darstellung wurden die Testkeime mit Plasmiden transformiert, die Gene für Fluorochrome tragen. Nach deren Expression sollten die Zellen ohne Anfärbung fluoreszenzmikroskopisch erfassbar sein. Dabei wird die mikroskopische Beobachtungsdauer nicht durch die Halbwertszeit eines einmalig applizierten Farbstoffes bestimmt, so dass über beliebig lange Zeiträume wiederholte Untersuchungen identischer Stellen eines Biofilms durchgeführt werden können. Die Voraussetzung ist eine andauernde Expression des Fluorochromgens (Yarwood *et al.*, 2004; Boles und Horswill, 2008).

Ein Vorteil der Differenzierung von Zellen anhand ihrer Membranintegrität, und damit ihrer Lebensfähigkeit, ist die ggf. quantitative Erfassung von Zellen im VBNC („viable but non-culturable“) Zustand. Der Nachweis dieser Zellen mittels Lebendkeimzählung nach

Kultivierung musste zwangsläufig versagen. Der VBNC Zustand ist in der Infektiologie von besonderer Bedeutung, da Bakterien in diesem Zustand für eine Infektion verantwortlich sein können, sich jedoch der mikrobiologischen Diagnostik entziehen (Fux *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit gelang es zwei Plasmide zu konstruieren, die für ein grün fluoreszierendes Protein, GFP (green fluorescent protein) und ein rot fluoreszierendes Protein, DsRM (DsRed-monomer) kodieren. Die Expression beider Fluorochrome gelang in dem *S. aureus*-Stamm RN4220, die Expression des GFPmut2-Gens im *S. aureus*-Stamm ATCC25923. Mit diesen Stämmen konnte der antibakterielle Effekt des Kupfers auch bei Verwendung von Humanserum im Medium morphologisch erfasst werden.

Das in dieser Arbeit verwendete GFP-Derivat *gfpmut2* kodiert für eine Aminosäuresequenz-Variante mit verbesserten optischen Eigenschaften. Die Fluoreszenz ist um ein Vielfaches stärker als im GFP-Wildtyp und im Verlauf der Wachstumskurve deutlich früher sichtbar: während des exponentiellen Wachstums gelingt die Detektion innerhalb von 8 min. gegenüber 2 h beim Wildtyp-Protein (Cormack *et al.*, 1996).

Das zweite in dieser Arbeit konstruierte Fluorochrom, das rot leuchtende DsRM ist bei 37°C ungünstig gefaltet (Shaner *et al.*, 2005). Deswegen zeigen so markierte Bakterien im Vergleich zur GFP-Markierung schlechtere optische Eigenschaften. So war bei gleichem Versuchsaufbau eine längere Belichtungszeit notwendig und trotzdem die Sensitivität geringer. Zudem wurde die Fluoreszenzintensität des DsRed-Monomers mit steigender Kupferionenkonzentration geringer (Rahimi *et al.*, 2008). Dies war allerdings beim vorliegendem Versuchsaufbau von Vorteil, da so intakte Bakterienzellen mit größerer Sensitivität erfasst werden konnten: ein Anstieg der intrazellulären Kupferkonzentration in einer toten Zelle führte zu einem frühen Erlöschen der Fluoreszenz.

Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der mit den Fluorochrom-Plasmiden transformierten Staphylokokken gelang sowohl auf einfachen Objektträgern als auch auf den Implantatoberflächen. Dabei war die Dokumentation des topographischen Wachstumsverhaltens auf den Oberflächen mit unterschiedlicher Rauigkeit mit den Fluorochrom-produzierenden Staphylokokken analog der Färbung mit dem BacLight Viability Kit möglich, ohne allerdings die Anfälligkeit gegenüber unspezifischen Reaktionen mit Serumbestandteilen zu zeigen (siehe Abb. 36 und 37).

In Anwesenheit des antibakteriellen Agens Kupfer nahm die Zahl der fluoreszierenden Staphylokokken ab. So lässt sich der bakterizide Effekt des Kupfers auf die Bakterien annähernd quantifizieren.

Offen bleibt dabei, ob die Fluorochrome in einem reifen Biofilm in allen Zellschichten produziert werden. Rani *et al.* (2007) konnten zeigen, dass innerhalb eines Biofilmes metabolische Aktivitäten, wie z.B. die Proteinsynthese, in verschiedenen Zellschichten unterschiedlich stark ablaufen. Während der Reifung des Biofilmes und der damit verbunden hohen metabolischen Aktivität der Zellen ist eine Fluorochromsynthese im Großteil der Zellen wahrscheinlich. Sobald jedoch die Fluorochrome der metabolisch inaktiven Schichten aufgrund ihrer Halbwertszeit nicht mehr fluoreszieren und keine neuen Proteine mehr synthetisiert werden, sind diese Schichten fluoreszenzmikroskopisch nicht mehr darstellbar. Beim Screening zur Prävention der Biofilmbildung auf Implantatoberflächen spielt das Verhalten der reifen Biofilme jedoch eine untergeordnete Rolle.

Die Fluorochromhalbwertszeit ist bei der Interpretation von fluoreszenzmikroskopischen Bildern zu bedenken. Ein fluoreszierendes Protein kann als Indiz für eine lebende Zelle interpretiert werden, obwohl diese bereits durch die Kupferwirkung abgestorben ist. Dieses Artefakt tritt nur in einem geringgradig Protein-denaturierendem Milieu auf. Die Fluoreszenz wird zudem durch Änderungen des pH-Wertes, der Belichtung und der Temperatur beeinflusst (Tsien 1998). Sogenannte „superfolder GFP“ zeigen daher eine andere Faltungskinetik und höhere Stabilität gegenüber chemischer Denaturierung bei gleicher optischer Aktivität als herkömmliche GFP (Pédelacq *et al.*, 2006). Diese Optimierung der Fluorochrome ist bei vorliegender Fragestellung nicht hilfreich, da hier Absterbekinetiken untersucht werden sollten.

Umgekehrt war von großer Bedeutung, ob die Synthese des Fluorochroms den Stoffwechsel des synthetisierenden Bakteriums verändert und so möglicherweise den antibakteriellen Effekt des Kupfers beeinflusst. Valdivia *et al.* (1996) konnten in Wirt-Erreger-Untersuchungen zeigen, dass die GFP-Synthese die untersuchten Bakterien nicht bei der Invasion und Replikation in Makrophagen beeinflusst und Chalfie *et al.* (1994), dass das Bakterienwachstum nicht beeinträchtigt wird. Allerdings fanden Allison *et al.* (2007), dass die GFP-Synthese zwar nicht das Wachstum beeinträchtigt, aber die Sensitivität gegenüber Antibiotika. Deshalb sollen beim Screening von antibakteriellen Oberflächenbeschichtungen nicht transformierten Testkeime als Kontrolle verwendet werden.

Die Quantifizierung der Bakterienmasse mittels Fluoreszenzmikroskopie ist eine ungenaue Methode, weshalb geringe Veränderungen der Sensitivität der GFP-exprimierenden Bakterien gegenüber Kupfer unerheblich sind. Größere Unterschiede zwischen GFP-exprimierenden Transformanten und Wildtypbakterien werden durch die gleichzeitige Quantifizierung mittels Kultur-gebundener Lebendkeimzählung aufgedeckt.

Besondere Vorteile der mikroskopischen Darstellung von Staphylokokken mit rekombinanten Fluorochromen gegenüber der Färbung mit entsprechenden Substanzen sind bei großen Versuchsansätzen zum Screening von Oberflächen die niedrigeren Kosten und die einfachere Handhabung.

Die fluorochrombasierte Fluoreszenzmikroskopie ist somit eine sinnvolle Ergänzung zur Verwendung von Farbstoffen. Mit dem in dieser Arbeit hergestellten GFP-produzierendem *S. aureus* Testkeim können in Zukunft Probekörper auf mögliche antibakterielle Effekte untersucht werden.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit gelang es das Wachstum zweier Staphylokokkenstämme, *S. aureus* ATCC 25923 und *S. epidermidis* RP62A, auf Titanoberflächen mit und ohne Einfluss von Kupfersulfat zu charakterisieren. Die erhobenen Erkenntnisse wurden verwendet, um den Effekt zweier Verfahren zur Oberflächenfunktionalisierung auf das Staphylokokkenwachstum zu untersuchen. Darüberhinaus wurde die fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilmwachstums mittels Fluorochrom-produzierender Staphylokokken optimiert.

Die Oberflächenrauigkeit des Titans hatte keinen Einfluss auf die Menge der adhärenenten Bakterien, aber auf die Morphologie der Biofilme. Während auf glatten Oberflächen die Staphylokokken in großen zusammenhängenden Konglomeraten wuchsen, saßen die Bakterien auf rauen Oberflächen in den Nischen und Konkavitäten. Dort können die Zellen mit einem Maximum ihrer Oberfläche an den Probekörper adhäreren.

Kupfersulfat hemmte das Wachstum oder tötete die planktonischen Bakterien konzentrationsabhängig. Die Biofilmbakterien wurden durch die hier gewählten Kupfersulfatkonzentrationen hingegen zeitabhängig getötet. Eine Eradikation eines bestehenden reifen Biofilms mittels Kupfersulfat ist somit möglich. Es gelang auch mit Kupfer, das aus Kupferplättchen freigesetzt wurde, die Staphylokokken abzutöten. Eine Polyallylaminbeschichtung der Kupferplättchen hemmte mit zunehmender Schichtdicke die Kupferfreisetzung und den bakteriziden Effekt, während diese Beschichtung auf Titan allein keinen Effekt auf das Wachstum der Staphylokokken hatte. Somit kann mittels Polyallylaminbeschichtung die Freisetzungskinetik von Kupferionen aus Oberflächen beeinflusst werden. Auch in Titanprobekörper mittels Plasma Immersions Ionenimplantation eingebrachtes Kupfer zeigte einen bakteriziden Effekt und hemmte das Wachstum der Staphylokokken. Mit diesem Verfahren lässt sich somit eine Titanoberfläche so behandeln, dass Bakterienwachstum auf der Oberfläche verringert oder verhindert wird. Die Verwendung der beiden Verfahren zur Oberflächenfunktionalisierung orthopädischer Endoprothesen scheint daher ein sinnvoller Ansatz zur Verringerung von Implantat-assoziierten Infektionen, die häufig durch Staphylokokkenbiofilme ausgelöst werden.

Weiterhin konnte die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Staphylokokkenbiofilme verbessert werden. Es gelang ein grünes und ein rotes Fluorochromogen in Staphylokokken zu exprimieren. Damit wurde es möglich, unabhängig von in diesem Kontext unspezifisch wirkenden Färbungen, wie z.B. dem BacLight Viability Kit, das Wachstum der fluoreszierenden Staphylokokken auf den Metalloberflächen zu beobachten.

## 6. Thesen

1. *S. aureus* und *S. epidermidis* bilden auf Titanoberflächen einen Biofilm aus.
2. Die Oberflächenrauigkeit, beschrieben durch den Mittenrauwert Ra, hat in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die adhärierende Bakterienmenge.
3. Die Inokulationsdosis hat auf das Bakterienwachstum nur innerhalb der ersten 24 Stunden Einfluss, so dass ein je nach Inokulationsdosis unterschiedlicher antibakterieller Effekt innerhalb der ersten 24 Stunden stattgefunden haben muss.
4. Die MHK von Kupfersulfat für *S. aureus* beträgt 5 mM und für *S. epidermidis* 2,5 mM, die MBK für beide Stämme 10 mM. Die MBEC beträgt für beide Stämme ebenfalls 10 mM Kupfersulfat bei einem Beobachtungszeitraum von 10 Tagen. Eine Verdopplung der Konzentration vermag keine schnellere Eradikation zu erreichen, so dass die Eradikation eines Biofilmes oder planktonischer Bakterien in der stationären Wachstumsphase mittels Kupfersulfat ein zeitabhängiger Effekt ist.
5. Eine Cu-PIII Dotierung von Titan vermag das Wachstum von *S. epidermidis* suffizient zu hemmen.
6. Auf mit PPAAM beschichtete Kupferplättchen kommt es mit zunehmender Schichtdicke zu einer geringeren bakteriziden Wirkung auf das Bakterienwachstum.
7. Eine PPAAM Beschichtung auf reinen Kupferplättchen sorgt mit zunehmender Schichtdicke zu einer geringeren Kupferfreisetzung.
8. Die Verwendung des BacLight Viability Kit auf Kupferplättchen oder nach Zugabe von Kupfersulfat in Anwesenheit von Humanserum ist aufgrund von unspezifischen Farbeffekten nicht indiziert.
9. *S. aureus* RN 4220 kann durch Expression von GFP oder DsRM, *S. aureus* ATCC 25923 nur mit GFP fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden.
10. GFP-exprimierende Staphylokokken-Stämme zeigen in Anwesenheit von Humanserum keine unspezifische Anfärbung wie durch das BacLight Viability Kit.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aufl.	Auflage
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CA-MRSA	„community-associated“ (englisch) Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
CB	Caso-Bouillon
d	<i>dies</i> (lateinisch)
DC	„duty cycle“ (englisch)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch, „deoxyribonucleic acid“)
DRG	„Diagnosis-related Group“ (englisch)
DsRM	DsRed-Monomer
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eds.	Editoren
Em	Emission
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lateinisch)
Ex	Excitation
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GHz	Gigahertz
h	<i>hora</i> (lateinisch)
HS	Humanserum
Hz	Hertz
i.d.R.	in der Regel

IMIKRO	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock
KBE	koloniebildenden Einheiten
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Lennox L Broth Base
LD <sub>50</sub>	mittlere letale Dosis
M	Mol
max.	maximal
MBEC	minimale Biofilmeradikationskonzentration (englisch, „minimum biofilm eradication concentration“)
MBK	minimale bakterizide Konzentration
MCS	„multiple cloning site“ (englisch)
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMR	„multimetal resistance“ (englisch)
MMT	„multimetal tolerance“ (englisch)
mod.	modifiziert
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (englisch, „messenger ribonucleic acid“)
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSE	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus epidermidis</i>
ms	Millisekunde
MSCRAMM	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
MSSA	Methicillin sensible <i>Staphylococcus aureus</i>
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
Pa	Pascal

PAM	Peptidylglycin- $\alpha$ -amidierende Monooxygenase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	<i>potentia hydrogenium</i> (lateinisch)
PIA	polysaccharide intercellular adhesion
PIII	Plasma-Immersionen-Ionenimplantation
plankt.	planktonisch
PPAAc	plasmapolymerisierte Acrylsäure
PPAAm	plasmapolymerisiertes Allylamin
R <sub>a</sub>	Mittenrauwert
RDA	empfohlene mittlere Tagesdosis
RIP	RNAIII-inhibiting-peptide
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch, „revolutions per minute“)
R <sub>rms</sub>	quadratische Rauheit (englisch, rms = „root-mean-squared“)
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
sccm	Standardkubikzentimeter
SCVs	small colony variants
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEP	totale Endoprothese
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TSB	Tryptone Soya Broth
U	Unit
ÜNK	Über-Nacht-Kulturen
V	Volt
VBNC	„viable but non-culturable“ (englisch)
Vergr.	Vergrößerung
v/v	Volumen pro Volumen
w	Watt
w/v	Masse pro Volumen

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Klassifikation der Implantat-assoziierten Infektionen anhand des Beginns der Symptome nach Implantation
- Abb. 2: Phasen der Biofilmbildung
- Abb. 3: Eine Strandszene in San Diego, gezeichnet mit einer achtfarbigen Palette bakterieller Kolonien, die fluoreszierende Proteine, abstammend vom GFP und dem rot fluoreszierendem Korallenprotein dsRed, exprimieren.
- Abb. 4: Auf orthopädischen Schrauben wachsende Staphylokokkenbiofilme sind gezeigt. Ein *S. aureus* 1945GFPuvr Biofilm auf einer 316L SS Schraube ist gezeigt.
- Abb. 5: Wachstumsverlauf von *S.aureus* ATCC 25923 (Abb. 5a)) und *S.epidermidis* RP62A (Abb. 5b)) über 10 Tage auf HA-gestrahnten und polierten Titan-Probekörpern.
- Abb. 6: Rasterelektronenmikroskopische Bilder (2000x Vergrößerung) von *S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 6a)und c)) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 6b) und d)) auf Ti HA-gestrahlt (Abb. 6a) und b)) und Ti poliert (Abb. 6c) und d))
- Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (40x Vergrößerung) von *S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 7a) und c)) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 7b) und d)) auf Ti HA-gestrahlt (Abb. 7a) und b)) und Ti poliert (Abb. 7c) und d))
- Abb. 8: Wachstumsverlauf von *S.aureus* ATCC 25923 (Abb. 8a)) und *S.epidermidis* RP62A (Abb. 8b)) Biofilm-Bakterien über 10 Tage auf HA-gestrahnten und polierten Titan-Probekörpern.
- Abb. 9: Wachstumsverlauf von *S. aureus* ATCC 25923 Biofilmbakterien (Abb. 9a)) und planktonischer Bakterien (Abb. 9b)) über 10 Tage auf HA-gestrahnten Titan-Probekörpern mit unterschiedlichen initialen Kulturbedingungen.

- Abb. 10: Wachstumsverlauf von *S. aureus* ATCC 25923 in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an CuSO<sub>4</sub>-Lösung.
- Abb. 11: Wachstumsverlauf von *S. epidermidis* RP62A in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an CuSO<sub>4</sub>-Lösung.
- Abb. 12: Einfluss von Kupfer auf das Bakterienwachstum (*S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 12a)) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 12b)) in Abhängigkeit von der Expositionsdauer.
- Abb. 13: Einfluss von Kupfer auf das Bakterienwachstum (*S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 13a)) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 13b)) in Abhängigkeit von der Bakterienkonzentration.
- Abb. 14: Wachstumsverlauf von Staphylokokkenbiofilmen und der planktonischen Fraktion (*S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 14a)) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 14b)) mit und ohne CuSO<sub>4</sub>-Zugabe auf HA-gestrahlt Titan.
- Abb. 15: Wachstumsverlauf von Staphylokokkenbiofilmen (Abb. 15a) und b)) und der planktonischen Fraktion (Abb. 15c) und d)) (*S. aureus* ATCC 25923 Abb. 15a) und c)) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 15b) und d)) mit und ohne CuSO<sub>4</sub>-Zugabe auf HA-gestrahlt Titan.
- Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (10x und 40x Vergrößerung) von *S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 16a)) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 16b)) auf Ti HA-gestrahlt mit 10 mM CuSO<sub>4</sub>.
- Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (10x und 40x Vergrößerung) von HA-gestrahlt Titan mit 10 mM CuSO<sub>4</sub>.
- Abb. 18: Wachstumsverlauf von *S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 18a)) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 18b)) auf Allylamin und Acrylsäure beschichteten Titan-Probekörpern. Referenz: polierte Titan-Probekörper.

- Abb. 19: Wachstumsverlauf von *S. epidermidis* RP62A auf Titan HA-gestrahlt und reinem Kupfer ohne und mit Polyallyaminbeschichtung unterschiedlicher Dicke.
- Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (10x und 40x Vergrößerung) von *S. aureus* ATCC 25923 (Abb. 20a) und *S. epidermidis* RP62A (Abb. 20b) auf reinen Kupferplättchen (PI~78).
- Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (10x und 40x Vergrößerung) von reinen Kupferplättchen (PI~78).
- Abb. 22: Wachstum von *S. epidermidis* RP62A auf reinem Kupfer ohne und mit Polyallyaminbeschichtung unterschiedlicher Dicke an Versuchstag 4.
- Abb. 23: Wachstumsverlauf von *S. epidermidis* RP62A auf HA-gestrahelter Titanlegierung ohne PIII-Behandlung (PI 169) und mit Kupfer modifizierter Oberfläche mittels PIII (PI 170, DC = 90; PI 171, DC = 0,2).
- Abb. 24: Klonierung von pAT18-PblaZ\_DsRM
- Abb. 25: P<sub>blaZ</sub> und pAT18\_DsRM
- Abb. 26: Amplifikation von P<sub>blaZ</sub>\_DsRM
- Abb. 27: *E. coli* DH5α\_pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_DsRM
- Abb. 28: Klonierung von pAT18-PblaZ\_gfpmut2
- Abb. 29: *E. coli* DH5α\_pAT18- P<sub>blaZ</sub>\_gfpmut2
- Abb. 30: Klonierung von pAT18-PblaZ\_gfpmut2\_TTBOB
- Abb. 31: P<sub>blaZ</sub>\_gfpmut2\_TTBOB und P<sub>blaZ</sub>\_DsRM\_TTBOB
- Abb. 32: *S. aureus* RN 4220\_pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_gfpmut2\_TTBOB

Abb. 33: *S. aureus* ATCC 25923\_pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_gfpmut2\_TT<sub>BOB</sub>

Abb. 34: Klonierung von pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_DsRM\_TT<sub>BOB</sub>

Abb. 35: *S. aureus* RN 4220\_pAT18-P<sub>blaZ</sub>\_DsRM\_TT<sub>BOB</sub>

Abb. 36: Fluoreszenzmikroskopie von Fluorochrom-exprimierenden *S. aureus* RN 4220.

Abb. 37: Fluoreszenzmikroskopie von GFP-exprimierenden *S. aureus* RN 4220 und *S. aureus* ATCC 25923 angefärbt mit dem BacLight Viability Kit.

## 9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bakterienstämme

Tab. 2: Plasmide

Tab. 3: Primer

Tab.4: Antibiotika

**10. Literaturverzeichnis**

- Adachi K, Tsurumoto T, Yonekura A, Nishimura S, Kajiyama S, Hirakata Y, Shindo H. 2007. New quantitative image analysis of staphylococcal biofilms on the surfaces of nontranslucent metallic biomaterials. *J Orthop Sci.* 12:178-84.
- Allison DG, Sattenstall MA. 2007. The influence of green fluorescent protein incorporation on bacterial physiology: a note of caution. *J Appl Microbiol.* 103:318-24.
- Anguita-Alonso P, Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Orlando F, Saba V, Scalise G, Sevo M, Tuzova M, Patel R, Balaban N. 2007. RNAIII-inhibiting-peptide-loaded polymethylmethacrylate prevents in vivo *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:2594-6.
- Arens S, Schlegel U, Printzen G, Ziegler WJ, Perren SM, Hansis M. 1996. Influence of materials for fixation implants on local infection: an experimental study of steel versus titanium DCP in rabbits. *J Bone Joint Surg Br.* 78:647-51
- Aviv M, Berdicevsky I, Zilberman M. 2007. Gentamicin-loaded bioresorbable films for prevention of bacterial infections associated with orthopedic implants. *J Biomed Mater Res A.* 83:10-9.
- Baker J, Sitthisak S, Sengupta M, Johnson M, Jayaswal RK, Morrissey JA. 2010. Copper stress induces a global stress response in *Staphylococcus aureus* and represses *sae* and *agr* expression and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 76:150-60.
- Balaban N, Stoodley P, Fux CA, Wilson S, Costerton JW, Dell'Acqua G. 2005. Prevention of staphylococcal biofilm-associated infections by the quorum sensing inhibitor RIP. *Clin Orthop Relat Res.* 437:48-54.
- Baldoni D, Haschke M, Rajacic Z, Zimmerli W, Trampuz A. 2009. Linezolid alone or combined with rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in experimental foreign-body infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:1142-8.
- Barbour ME, O'Sullivan DJ, Jenkinson HF, Jagger DC. 2007. The effects of polishing methods on surface morphology, roughness and bacterial colonisation of titanium abutments. *J Mater Sci Mater Med.* 18:1439-47.
- Barth E, Myrvik QM, Wagner W, Gristina AG. 1989. In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. *Biomaterials.* 10:325-8.
- Beveridge TJ, Makin SA, Kadurugamuwa JL, Li Z. 1997. Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol Rev.* 20:291-303.

- Bode LG, Kluytmans JA, Wertheim HF, Bogaers D, Vandenbroucke-Grauls CM, Roosendaal R, Troelstra A, Box AT, Voss A, van der Tweel I, van Belkum A, Verbrugh HA, Vos MC. 2010. Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*. 362:9-17.
- Boles BR, Horswill AR. 2008 Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*. 4:e1000052.
- Borkow G, Gabbay J. 2004. Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. *FASEB J*. 18:1728-30.
- Borkow G, Gabbay J. 2005. Copper as a biocidal tool. *Curr Med Chem*. 12:2163-75.
- Borkow G, Gabbay J. 2009. Copper, An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections. *Current Chemical Biology*. 3, 272-278
- Borkow G, Gabbay J, Dardik R, Eidelman AI, Lavie Y, Grunfeld Y, Ikher S, Huszar M, Zatzoff RC, Marikovsky M. 2010. Molecular mechanisms of enhanced wound healing by copper oxide-impregnated dressings. *Wound Repair Regen*. 18:266-75.
- Brady RA, Calhoun JH, Leid JG, Shirtliff ME. 2009. Infections of Orthopaedic Implants and Devices. In: Shirtliff ME, Leid JG, Eds. *The Role of Biofilms in Device-Related Infections*. 3. Aufl. Heidelberg: Springer, 15-55.
- Broekhuizen CA, de Boer L, Schipper K, Jones CD, Quadir S, Feldman RG, Dankert J, Vandenbroucke-Grauls CM, Weening JJ, Zaat SA. 2007. Peri-implant tissue is an important niche for *Staphylococcus epidermidis* in experimental biomaterial-associated infection in mice. *Infect Immun*. 75:1129-36.
- Broekhuizen CA, de Boer L, Schipper K, Jones CD, Quadir S, Vandenbroucke-Grauls CM, Zaat SA. 2008. *Staphylococcus epidermidis* is cleared from biomaterial implants but persists in peri-implant tissue in mice despite rifampicin/vancomycin treatment. *J Biomed Mater Res A*. 85:498-505.
- Brown MR, Allison DG, Gilbert P. 1988. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemother*. 22:777-80.
- Campoccia D, Montanaro L, Speziale P, Arciola CR. 2010. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials*. 31:6363-77.
- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*. 37:1771-6.

- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*. 173:33-8.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263:802-5.
- Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK; Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus Investigative Team. 2003. Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med*. 348:1342-7.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. 1978. How bacteria stick. *Sci Am*. 238:86-95.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284:1318-22.
- Coventry MB. 1975. Treatment of infections occurring in total hip surgery. *Orthop Clin North Am*. 6:991-1003.
- Darouiche RO. 2004. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med*. 350:1422-9.
- Darouiche RO, Mansouri MD, Zakarevicz D, Alsharif A, Landon GC. 2007. In vivo efficacy of antimicrobial-coated devices. *J Bone Joint Surg Am*. 89:792-7.
- De Giglio E, Cometa S, Ricci MA, Cafagna D, Savino AM, Sabbatini L, Orciani M, Ceci E, Novello L, Tantillo GM, Mattioli-Belmonte M. 2011. Ciprofloxacin-modified electrosynthesized hydrogel coatings to prevent titanium-implant-associated infections. *Acta Biomater*. 7:882-91.
- Del Pozo JL, Patel R. 2009. Infection Associated with Prosthetic Joints. *N Engl J Med*. 361:787-794.
- Elzanowska H, Wolcott RG, Hannum DM, Hurst JK. 1995. Bactericidal properties of hydrogen peroxide and copper or iron-containing complex ions in relation to leukocyte function. *Free Radic Biol Med*. 18:437-49.
- Espírito Santo C, Lam EW, Elowsky CG, Quaranta D, Domaille DW, Chang CJ, Grass G. 2011. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 77:794-802.
- Espírito Santo C, Taudte N, Nies DH, Grass G. 2008. Contribution of copper ion resistance to survival of Escherichia coli on metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 74:977-86.

- Evans RP. 2011. Current concepts for clean air and total joint arthroplasty: laminar airflow and ultraviolet radiation: a systematic review. *Clin Orthop Relat Res.* 469:945-53.
- Faúndez G, Troncoso M, Navarrete P, Figueroa G. 2004. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* 4:19.
- Fei J, Liu GD, Pan CJ, Chen JY, Zhou YG, Xiao SH, Wang Y, Yu HJ. 2011. Preparation, release profiles and antibacterial properties of vancomycin-loaded Ca-P coating titanium alloy plate. *J Mater Sci Mater Med.* 22:989-95.
- Finke B, Luethen F, Schroeder K, Mueller PD, Bergemann C, Frant M, Ohl A, Nebe BJ. 2007. The effect of positively charged plasma polymerization on initial osteoblastic focal adhesion on titanium surfaces. *Biomaterials.* 28:4521-34.
- Fitzgerald RH Jr, Nolan DR, Ilstrup DM, Van Scoy RE, Washington JA 2nd, Coventry MB. 1977. Deep wound sepsis following total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 59:847-55.
- Francolini I, Donelli G, Stoodley P. 2003. Polymer designs to control biofilm growth on medical devices. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2: 307–319.
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 13:34-40.
- Gant VA, Wren MW, Rollins MS, Jeanes A, Hickok SS, Hall TJ. 2007. Three novel highly charged copper-based biocides: safety and efficacy against healthcare-associated organisms. *J Antimicrob Chemother.* 60:294-9.
- Geipel U, Herrmann M. 2004. Das infizierte Implantat. *Der Orthopäde.* 33:1411–1428.
- Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, Paulsen IT, Kolonay JF, Brinkac L, Beanan M, Dodson RJ, Daugherty SC, Madupu R, Angiuoli SV, Durkin AS, Haft DH, Vamathevan J, Khouri H, Utterback T, Lee C, Dimitrov G, Jiang L, Qin H, Weidman J, Tran K, Kang K, Hance IR, Nelson KE, Fraser CM. 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol.* 187:2426-38.
- Gollwitzer H, Gerdesmeyer L. 2006. Antiinfektiöse Oberflächenbeschichtung. In: Gradinger R, Gollwitzer H, Hrsg. *Ossäre Integration.* Heidelberg: Springer, 62-68.
- Grass G, Rensing C, Solioz M. 2011. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol.* 77:1541-7.

- Gristina A. 2004. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. 1987. *Clin Orthop Relat Res.* 427:4-12. (Reprinted with permission from Gristina, AG.1987. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science.* 237:1588-95.
- Gristina AG, Costerton JW. 1985. Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg Am.* 67:264-73.
- Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. 2006. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet.* 368:874-85.
- Haenle M, Skripitz C, Mittelmeier W, Skripitz R. 2012a. Economic impact of infected total knee arthroplasty. *ScientificWorldJournal.* 2012:196515.
- Haenle M, Skripitz C, Mittelmeier W, Skripitz R. 2012b. Ökonomische Auswirkungen infizierter Hüfttotalendoprothesen im DRG-System. *Orthopäde.* 41:467-76
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166:557-80.
- Hajdu S, Lassnigg A, Graninger W, Hirschl AM, Presterl E. 2009. Effects of vancomycin, daptomycin, fosfomicin, tigecycline, and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Orthop Res.* 27:1361-5.
- Harris LG, Richards RG.2004. *Staphylococcus aureus* adhesion to different treated titanium surfaces. *J Mater Sci Mater Med.* 15:311-4.
- Harrison JJ, Ceri H, Stremick CA, Turner RJ. 2004. Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environ Microbiol.* 6:1220-7.
- Harrison JJ, Ceri H, Turner RJ. 2007. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 5:928-38.
- Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. 2005. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* 7:981-94.
- Harrison JJ, Turner RJ, Joo DA, Stan MA, Chan CS, Allan ND, Vrionis HA, Olson ME, Ceri H. 2008. Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:2870-81.
- Hebert CK, Williams RE, Levy RS, Barrack RL. 1996. Cost of treating an infected total knee replacement. *Clin Orthop Relat Res.* 331:140-5.

- Heidenau F, Mittelmeier W, Detsch R, Haenle M, Stenzel F, Ziegler G, Gollwitzer H. 2005. A novel antibacterial titania coating: metal ion toxicity and in vitro surface colonization. *J Mater Sci Mater Med.* 16:883-8.
- Källicke T, Schierholz J, Schlegel U, Frangen TM, Köller M, Printzen G, Seybold D, Klöckner S, Muhr G, Arens S. 2006. Effect on infection resistance of a local antiseptic and antibiotic coating on osteosynthesis implants: an in vitro and in vivo study. *J Orthop Res.* 24:1622-40.
- Kilgus DJ, Howe DJ, Strang A. 2002. Results of periprosthetic hip and knee infections caused by resistant bacteria. *Clin Orthop Relat Res.* 404:116-24.
- Kwon AS, Park GC, Ryu SY, Lim DH, Lim DY, Choi CH, Park Y, Lim Y. 2008. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 32:68-72.
- Lehner B, Witte D, Suda AJ, Weiss S. 2009. Revisionsstrategie bei der Protheseninfektion. *Orthopäde.* 38:681-8.
- Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley P. 2002. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun.* 70:6339-45.
- Leoni E, De Luca G, Legnani PP, Sacchetti R, Stampi S, Zanetti F. 2005. Legionella waterline colonization: detection of Legionella species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *J Appl Microbiol.* 98:373-9.
- Lewis K. 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol.* 5:48-56.
- Li H, Ogle H, Jiang B, Hagar M, Li B. 2010. Cefazolin embedded biodegradable polypeptide nanofilms promising for infection prevention: a preliminary study on cell responses. *J Orthop Res.* 28:992-9.
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Hrsg. 2007. *Biochemie und Pathobiochemie.* 8. Aufl. Heidelberg: Springer, 655-678.
- Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R. 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol.* 178:175-83.
- Mändl S, Rauschenbach B. 2000. Plasma-Immersion-Ionenimplantation. Ein neues Verfahren zur homogenen Oberflächenmodifizierung komplex geformter medizinischer Implantate. (Plasma immersion ion implantation. A new method for homogeneous surface modification of complex forms of medical implants.) *Biomed Tech (Berl).* 45:193-8.

- Mändl S, Sader R, Thorwarth G, Krause D, Zeilhofer HF, Horch HH, Rauschenbach B. 2002. Investigation on plasma immersion ion implantation treated medical implants. *Biomol Eng.* 19:129-32.
- McCann MT, Gilmore BF, Gorman SP. 2008. Staphylococcus epidermidis device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J Pharm Pharmacol.* 60:1551-71.
- Militz M, Bühren V. 2010. Wechsel infizierter Knie- und Hüftendoprothesen. *Chirurg.* 81:310-20.
- Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Talan DA; EMERGENCY ID Net Study Group. 2006. Methicillin-resistant S. aureus infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med.* 355:666-74.
- Nobelprize.org. Nobel Media AB 2013. The Nobel Prize in Chemistry 2008. [zitiert am 04.04.2013]. URL: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/)
- Ong KL, Kurtz SM, Lau E, Bozic KJ, Berry DJ, Parvizi J. 2009. Prosthetic joint infection risk after total hip arthroplasty in the Medicare population. *J Arthroplasty.* 24:105-9.
- Otto M. 2008. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322:207-28.
- Otto M. 2013. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.* 64:175-88.
- Parvizi J, Azzam K, Ghanem E, Austin MS, Rothman RH. 2009. Periprosthetic infection due to resistant staphylococci: serious problems on the horizon. *Clin Orthop Relat Res.* 467:1732-9.
- Parvizi J, Pawasarat IM, Azzam KA, Joshi A, Hansen EN, Bozic KJ. 2010. Periprosthetic joint infection: the economic impact of methicillin-resistant infections. *J Arthroplasty.* 25:103-7.
- Pédélecq JD, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC, Waldo GS. 2006. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 24:79-88.
- Phillips JE, Crane TP, Noy M, Elliott TS, Grimer RJ. 2006. The incidence of deep prosthetic Infections in a specialist orthopaedic hospital: a 15-year prospective survey. *J Bone Joint Surg Br.* 88:943-8.
- Polonio RE, Mermel LA, Paquette GE, Sperry JF. 2001. Eradication of biofilm-forming Staphylococcus epidermidis (RP62A) by a combination of sodium salicylate and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:3262-6.
- Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol.* 4:295-305.

- Rahimi Y, Goulding A, Shrestha S, Mirpuri S, Deo SK. 2008 Mechanism of copper induced fluorescence quenching of red fluorescent protein, DsRed. *Biochem Biophys Res Commun.* 370:57-61.
- Rani SA, Pitts B, Beyenal H, Veluchamy RA, Lewandowski Z, Davison WM, Buckingham-Meyer K, Stewart PS. 2007 Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol.* 189:4223-33.
- Rani SA, Pitts B, Stewart PS. 2005. Rapid diffusion of fluorescent tracers into *Staphylococcus epidermidis* biofilms visualized by time lapse microscopy. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:728-32.
- Redanz S, Standar K, Podbielski A, Kreikemeyer B. 2012. Heterologous expression of sahH reveals that biofilm formation is autoinducer-2-independent in *Streptococcus sanguinis* but is associated with an intact activated methionine cycle. *J Biol Chem.* 287:36111-22.
- Rózga M, Sokołowska M, Protas AM, Bal W. 2007. Human serum albumin coordinates Cu(II) at its N-terminal binding site with 1 pM affinity. *J Biol Inorg Chem.* 12:913-8.
- Salgado CD, Dash S, Cantey JR, Marculescu CE. 2007. Higher risk of failure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections. *Clin Orthop Relat Res.* 461:48-53.
- Schildhauer TA, Robie B, Muhr G, Köller M. 2006. Bacterial adherence to tantalum versus commonly used orthopedic metallic implant materials. *J Orthop Trauma.* 20:476-84.
- Schröder K, Finke B, Ohl A, Lüthen F, Bergemann C, Nebe B, Rychly J, Walschus U, Schlosser M, Liefeth K, Neumann HG, Weltmann KD. 2010. Capability of Differently Charged Plasma Polymer Coatings for Control of Tissue Interactions with Titanium Surfaces. *Journal of Adhesion Science and Technology* 24:1191–1205
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2. Aufl. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Segawa H, Tsukayama DT, Kyle RF, Becker DA, Gustilo RB. 1999. Infection after total knee arthroplasty. A retrospective study of the treatment of eighty-one infections. *J Bone Joint Surg Am.* 81:1434-45.
- Sen CK, Khanna S, Venojarvi M, Trikha P, Ellison EC, Hunt TK, Roy S. 2002. Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282:H1821-7.

- Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. 2006. Staphylococcus aureus small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis.* 43:961-7.
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods.* 2:905-9.
- Shapiro JA, Nguyen VL, Chamberlain NR. 2011. Evidence for persisters in Staphylococcus epidermidis RP62a planktonic cultures and biofilms. *J Med Microbiol.* 60:950-60.
- Sheehan E, McKenna J, Mulhall KJ, Marks P, McCormack D. 2004. Adhesion of Staphylococcus to orthopaedic metals, an in vivo study. *J Orthop Res.* 22:39-43.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol.* 59:223-39.
- Shirai T, Tsuchiya H, Shimizu T, Ohtani K, Zen Y, Tomita K. 2009. Prevention of pin tract infection with titanium-copper alloys. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 91:373-80.
- Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. 2010. Penetration of antibiotics through Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 65:1955-8.
- Smeltzer MS, Nelson CL, Evans RP. 2009. Biofilms and Aseptic Loosening. In: Shirtliff ME, Leid JG, Eds. *The Role of Biofilms in Device-Related Infections.* 3. Aufl. Heidelberg: Springer, 57-74.
- Stewart PS, Costerton JW. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 358:135-8.
- Stewart PS, Davison WM, Steenbergen JN. 2009. Daptomycin rapidly penetrates a Staphylococcus epidermidis biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:3505-7.
- Stoodley P, Kathju S, Hu FZ, Erdos G, Levenson JE, Mehta N, Dice B, Johnson S, Hall-Stoodley L, Nistico L, Sotereanos N, Sewecke J, Post JC, Ehrlich GD. 2005. Molecular and imaging techniques for bacterial biofilms in joint arthroplasty infections. *Clin Orthop Relat Res.* 437:31-40.
- Tao JH, Fan CS, Gao SE, Wang HJ, Liang GX, Zhang Q. 2006. Depression of biofilm formation and antibiotic resistance by sarA disruption in Staphylococcus epidermidis. *World J Gastroenterol.* 12:4009-13.
- Teterycz D, Ferry T, Lew D, Stern R, Assal M, Hoffmeyer P, Bernard L, Uçkay I. 2010. Outcome of orthopedic implant infections due to different staphylococci. *Int J Infect Dis.* 14:e913-8.

- Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H. 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg Infect Dis.* 10:1627-34.
- Trampuz A, Zimmerli W. 2005. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly.* 135:243-51.
- Trampuz A, Zimmerli W. 2006. Antimicrobial agents in orthopaedic surgery: Prophylaxis and treatment. *Drugs.* 66:1089-105.
- Trampuz A, Zimmerli W. 2008. Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis. *Curr Infect Dis Rep.* 10:394-403.
- Trieu-Cuot P, Carlier C, Poyart-Salmeron C, Courvalin P. 1991. Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a lacZ alpha gene for conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria. *Gene.* 102:99-104.
- Trieu-Cuot P, Derlot E, Courvalin P. 1993. Enhanced conjugative transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett.* 109:19-23.
- Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509-44
- Ugur A, Ceylan O. 2003. Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus* spp. *Arch Med Res.* 34:130-6.
- U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2004. Toxicological profile for copper. [zitiert am 02.03.2012]. URL: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=206&tid=37>
- Valdivia RH, Hromockyj AE, Monack D, Ramakrishnan L, Falkow S. 1996. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene.* 173:47-52.
- Vasilev K, Sah VR, Goreham RV, Ndi C, Short RD, Griesser HJ. 2010. Antibacterial surfaces by adsorptive binding of polyvinyl-sulphonate-stabilized silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 21:215102.
- Vaudaux P, Kelley WL, Lew DP. 2006. *Staphylococcus aureus* small colony variants: difficult to diagnose and difficult to treat. *Clin Infect Dis.* 43:968-70.
- Verheyen CC, Dhert WJ, de Bleeck-Hogervorst JM, van der Reijden TJ, Petit PL, de Groot K. 1993. Adherence to a metal, polymer and composite by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Biomaterials.* 14:383-91.
- von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med.* 344:11-6.

- Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR, Otto M. 2004. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* 6:269-75.
- Wang X, Qiu S, Yao X, Tang T, Dai K, Zhu Z. 2009. Berberine inhibits *Staphylococcus epidermidis* adhesion and biofilm formation on the surface of titanium alloy. *J Orthop Res.* 27:1487-92.
- Weaver L, Noyce JO, Michels HT, Keevil CW. 2010. Potential action of copper surfaces on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol.* 109:2200-5.
- Williams RE. 1963. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev.* 27:56-71.
- Wu Y, Zitelli JP, TenHuisen KS, Yu X, Libera MR. 2011. Differential response of *Staphylococci* and osteoblasts to varying titanium surface roughness. *Biomaterials.* 32:951-60.
- Xu KD, McFeters GA, Stewart PS. 2000. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology.* 146:547-9.
- Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. 2004. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol.* 186:1838-50.
- Yeung KW, Poon RW, Chu PK, Chung CY, Liu XY, Lu WW, Chan D, Chan SC, Luk KD, Cheung KM. 2007. Surface mechanical properties, corrosion resistance, and cytocompatibility of nitrogen plasma-implanted nickel-titanium alloys: a comparative study with commonly used medical grade materials. *J Biomed Mater Res A.* 82:403-14.
- Zhang W, Zhang Y, Ji J, Yan Q, Huang A, Chu PK. 2007. Antimicrobial polyethylene with controlled copper release. *J Biomed Mater Res A.* 83:838-44.
- Zietz C, Fritsche A, Finke B, Stranak V, Haenle M, Hippler R, Mittelmeier W, Bader R. 2012. Analysis of the release characteristics of Cu-treated antimicrobial implant surfaces using atomic absorption spectrometry. *Bioinorg Chem Appl.* 2012:850390.
- Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. 2004. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 351:1645-54.

## 11. Danksagung

Ich danke allen voran Herrn Prof. Dr. Dr. Andreas Podbielski für die Möglichkeit im Institut für Mikrobiologie meine Doktorarbeit zu verfassen, sowie für die fachlich exzellente Betreuung und über die Doktorarbeit hinausgehende Unterstützung.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer für die motivierenden Gespräche, sowie für die offene Art, mit der er mich an seinen eigenen Erfahrungen bei der Verfolgung der wissenschaftlichen Laufbahn teilhaben ließ.

Großer Dank gilt auch dem Leiter des Forschungslabors für Biomechanik und Implantattechnologie der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universität Rostock Prof. Dr. med. habil. Dipl.-Ing. Rainer Bader für die Vermittlung der Doktorarbeit als auch für die freundliche kollegiale Zusammenarbeit. Dank gilt auch der ehemaligen Mitarbeiterin des Forschungslabors für Biomechanik und Implantattechnologie Frau Dipl.-Biol. Carmen Zietz, die die Kupferkonzentrationsmessung der beschichteten Kupferplättchen durchgeführt hat.

Herrn PD Dr. Markus Bischoff vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums des Saarlandes möchte ich für die Überlassung des Plasmids, pHOM10, danken.

Mein genereller Dank gilt allen Wegbegleitern aus der AG Kreikemeyer. Hervorheben möchte ich hier vor allem Frau Dr. Nadja Patenge für die konstruktiven Anmerkungen zu dieser Arbeit und Frau Dipl.-Ing. Kathleen Arndt für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Herrn Dipl.-Humanbiol. Sylvio Redanz danke ich sehr herzlich, der mit seiner konstruktiv-kritischen Art für das Gelingen des molekularbiologischen Teils dieser Arbeit außerordentlich wichtig war. Herrn Dr. Nikolai Siemens danke ich für die motivierenden Gespräche im Laboralltag. Auch ein großes Dankeschön an alle weiteren Laborkollegen, insbesondere Dr. Tomas Fiedler, Jana Normann, Yvonne Humboldt, Lars Middelborg, Dr. Cordula Lembke, Dr. Kerstin Standar und Dr. Thomas Köller für die angenehme Zusammenarbeit und die sehr freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Abschließend möchte ich mich herzlichst bei meinen Eltern für die stetige und fortwährende Unterstützung, sowie für den Zuspruch, den sie mich jederzeit spüren ließen, bedanken.

## **12. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Veröffentlichung der Dissertation nicht enthalten.

## Publikationen:

Patenge N, Arndt K, Eggert T, Zietz C, Kreikemeyer B, Bader R, Nebe B, Stranak V, Hippler R, Podbielski A. 2012. Evaluation of antimicrobial effects of novel implant materials by testing the prevention of biofilm formation using a simple small scale medium-throughput growth inhibition assay. *Biofouling*. 28:267-77.

Eggert T, McGlynn KA, Duffy A, Manns MP, Greten TF, Altekruise SF. 2013. Epidemiology of fibrolamellar hepatocellular carcinoma in the USA, 2000-10. *Gut* (angenommen Mai 2013) doi: 10.1136/gutjnl-2013-305164

Eggert T, McGlynn KA, Duffy A, Manns MP, Greten TF, Altekruise SF. 2013. Fibrolamellar hepatocellular carcinoma in the USA, 2000–2010: A detailed report on frequency, treatment and outcome based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *United European Gastroenterology Journal* (angenommen August 2013) doi: 10.1177/2050640613501507

### **13. Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Entwicklung eines Systems zur Untersuchung der antimikrobiellen Eigenschaften von Implantatmaterialien zur Prävention von Implantat-assoziierten Staphylokokkeninfektionen“ selbstständig angefertigt habe und mir darüber hinaus keine weitere Hilfe zuteil geworden ist.

Ich versichere, dass ich bei der Anfertigung der Dissertation keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt habe.

Washington D.C., den 24.08. 2013