

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Institute für Infektionsmedizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Herrmann

ENTWICKLUNG EINES ADHÄSIONS- UND  
INTERNALISATIONSTESTS FÜR  
STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN HUMANEM  
VOLLBLUT

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2015

vorgelegt von Janina Jungmann

geboren am 18. September 1983 in Völklingen



*Meinen Eltern und Florian.*



# Inhaltsverzeichnis

|          |                                                                  |           |
|----------|------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Zusammenfassung</b>                                           | <b>1</b>  |
| 1.1      | Zusammenfassung . . . . .                                        | 1         |
| 1.2      | Summary . . . . .                                                | 3         |
| <b>2</b> | <b>Einleitung</b>                                                | <b>5</b>  |
| 2.1      | Zielsetzung . . . . .                                            | 5         |
| 2.2      | Staphylococcus aureus . . . . .                                  | 6         |
| 2.3      | Durchflusszytometrie . . . . .                                   | 16        |
| <b>3</b> | <b>Materialien und Methoden</b>                                  | <b>19</b> |
| 3.1      | Materialien und molekularbiologische Hilfsmittel . . . . .       | 19        |
| 3.1.1    | Bakterienstämme . . . . .                                        | 19        |
| 3.1.2    | Antikörper . . . . .                                             | 20        |
| 3.1.3    | Enzyme, Antibiotika, Lösungen und Medien . . . . .               | 21        |
| 3.2      | Methoden . . . . .                                               | 23        |
| 3.2.1    | Anzucht und Lagerung . . . . .                                   | 23        |
| 3.2.2    | Anzucht in Flüssigmedium . . . . .                               | 23        |
| 3.2.3    | Blutgewinnung . . . . .                                          | 23        |
| 3.2.4    | Assay zur quantitativen Analyse . . . . .                        | 24        |
| 3.2.5    | Einfluss von Oberflächenproteinen von S.aureus . . . . .         | 27        |
| 3.2.6    | Einfluss von Eap . . . . .                                       | 27        |
| 3.2.7    | Adhäsion in verschiedenen Wachstumsphasen . . . . .              | 28        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                | <b>31</b> |
| 4.1      | Prinzipien und Vorarbeiten . . . . .                             | 31        |
| 4.1.1    | Internalisationsnachweis mit Lysostaphin . . . . .               | 31        |
| 4.1.2    | Adhäsion und Internalisation in Lymphozytenpopulationen . .      | 33        |
| 4.2      | Kinetik der Adhäsion und Internalisation in Leukozyten . . . . . | 36        |
| 4.3      | Adhäsion und Internalisation verschiedener Stämme . . . . .      | 38        |

## *Inhaltsverzeichnis*

|          |                                                                          |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4      | Adhäsion und Internalisation zu verschiedenen Zeitpunkten . . . . .      | 41        |
| 4.5      | Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsion . . . . .     | 46        |
| 4.6      | Einfluss von eap . . . . .                                               | 52        |
| 4.7      | Adhäsion von <i>S. aureus</i> in verschiedenen Wachstumsphasen . . . . . | 54        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>                                                        | <b>57</b> |
| 5.1      | Kinetik der Adhäsion und Internalisation in Leukozyten . . . . .         | 59        |
| 5.2      | Adhäsion und Internalisation in Leukozytensubpopulationen . . . . .      | 60        |
| 5.3      | Adhäsion und Internalisation verschiedener Stämme . . . . .              | 60        |
| 5.4      | Zeitkinetik der Adhäsion und Internalisation . . . . .                   | 64        |
| 5.5      | Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsion . . . . .     | 65        |
| 5.6      | Ausblick und Limitationen . . . . .                                      | 68        |
|          | <b>Literaturverzeichnis</b>                                              | <b>71</b> |
|          | <b>Danksagung</b>                                                        | <b>81</b> |

# Abbildungsverzeichnis

|      |                                                                              |    |
|------|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1  | Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von <i>S. aureus</i> . . . . .       | 6  |
| 2.2  | Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie . . . . .                  | 17 |
| 3.1  | Ablaufdiagramm Adhäsionsanalyse, Internalisationsanalyse . . . . .           | 29 |
| 3.2  | Ablaufdiagramm Trypsinverdau . . . . .                                       | 30 |
| 4.1  | Fluoreszenzintensität . . . . .                                              | 32 |
| 4.2  | Kinetik des Lysostaphinverdaus . . . . .                                     | 32 |
| 4.3  | Einfluss verschiedener Lysostaphin-Endkonzentrationen . . . . .              | 34 |
| 4.4  | Adhäsion und Internalisation durch Lymphozytensubpopulationen . . .          | 34 |
| 4.5  | Adhäsion und Internalisation von <i>S. aureus</i> gfp durch T-Zellen . . . . | 35 |
| 4.6  | Monozytenadhäsion und Internalisation mit monoklonalen Antikörpern           | 36 |
| 4.7  | Adhäsions- und Internalisationskinetik von RN4220 gfp . . . . .              | 37 |
| 4.8  | Adhäsions- und Internalisationskapazität verschiedener Stämme . . .          | 39 |
| 4.9  | Lineare Regressionsanalyse . . . . .                                         | 41 |
| 4.10 | Adhäsions- und Internalisation von LS1 gfp . . . . .                         | 42 |
| 4.11 | Adhäsions- und Internalisationskinetik weiterer Stämme . . . . .             | 44 |
| 4.12 | Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsion von LS1 .         | 47 |
| 4.13 | Adhäsionskinetik unter Trypsineinfluss . . . . .                             | 50 |
| 4.14 | Einfluss von eap auf die Adhäsion und Internalisation . . . . .              | 53 |
| 4.15 | Einfluss verschiedener Wachstumsphasen auf die Adhäsion . . . . .            | 55 |





# Abkürzungsverzeichnis

|             |                                                    |
|-------------|----------------------------------------------------|
| agr         | accessory gene regulator                           |
| APC         | Antigen präsentierende Zellen                      |
| BHI         | Brain heart infusion                               |
| CA-MRSA     | community aquired Methicillin resistenter S.aureus |
| CD          | cluster of differantation                          |
| ClfA        | clumping factor A                                  |
| ClfB        | clumping factor B                                  |
| Eap         | extracellular adherence protein                    |
| ELN         | Elastin                                            |
| Emp         | extracellular matrix binding protein               |
| FACS        | fluorescence activated cell sorting                |
| FC-Rezeptor | fragment crystallizable Rezeptor                   |
| FCS         | fetales Kälberserum                                |
| FITC        | Flurescein Isothiocyanat                           |
| FN-1        | Fibronectin                                        |
| FnbpA       | Fibronectin binding protein A                      |
| FnbpB       | Fibronectin binding protein B                      |
| FS          | Fibrinogen                                         |
| FSC         | Vorwärtsstreulichtintensität                       |
| gfp         | grün fluoreszierendes Protein                      |
| HA-MRSA     | hospital aquired Methicillin resistenter S.aureus  |
| HIV         | Humanes Immundefizienz Virus                       |
| i.v.        | intravenös                                         |
| IgG         | Immunglobulin G                                    |
| LB          | Lennox Broth                                       |
| MAP         | MHC analogous protein                              |
| MHC         | major histocompatibillity complex                  |
| MRSA        | Methicillin resistenter S.aureus                   |

|         |                                                                    |
|---------|--------------------------------------------------------------------|
| MSCRAMM | microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules |
| Nptase  | neutrale Phosphatase                                               |
| OD      | optische Dichte                                                    |
| PBS     | Phosphatgepufferte Salzlösung                                      |
| PerCp   | Peridinin Chlorophyll Protein Complex                              |
| PMN     | Polymorph-nucleäre Monozyten                                       |
| PT      | Prothrombin                                                        |
| rpm     | revolutions per minute                                             |
| RT      | Raumtemperatur                                                     |
| S.a.    | Staphylococcus aureus                                              |
| SERAM   | secretable expanded repertoire adhesive molecules                  |
| SSC     | Seitwärtsstreulichtintensität                                      |
| SSSS    | Staphylococcal scaled skin syndrom                                 |
| TSS     | Staphylococcal toxic shock syndrom                                 |
| VN      | Vitronectin                                                        |
| VRSA    | Vancomycin resistenter S.aureus                                    |
| WBC     | Withe blood cells                                                  |

# Tabellenverzeichnis

|     |                               |    |
|-----|-------------------------------|----|
| 3.1 | Bakterienstämme . . . . .     | 19 |
| 3.2 | Antikörper . . . . .          | 20 |
| 3.3 | Enzyme . . . . .              | 21 |
| 3.4 | Proteine . . . . .            | 21 |
| 3.5 | Lösungen und Medien . . . . . | 22 |



# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* gilt als einer der häufigsten Erreger von akuten und chronischen Infektionen. Die Pathogenese einer *S. aureus*-Infektion wird durch die Interaktion der Bakterien mit der jeweiligen Wirtszelle beeinflusst. Neben den Virulenzfaktoren kommt den zellulären Faktoren des angeborenen Immunsystems eine Schlüsselrolle in der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung einer Infektion zu. Bei der Interaktion von *S. aureus* mit Blutzellen bilden die Adhäsion und Internalisation wesentliche Schritte im Prozess der Phagozytose. Zur Untersuchung dieser Schritte existieren bereits verschiedene Assays, die sich jedoch meist auf die Untersuchung einzelner zellulärer Faktoren konzentrieren.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines globalen, phänotypischen Vollbluttests zur gleichzeitigen quantitativen Analyse von Adhäsion und Internalisation von *S. aureus* in Blutzellen mittels Durchflusszytometrie. Das Prinzip des Tests beruht auf der Co-Inkubation von gfp-exprimierenden (grün fluoreszierendes Protein) *S. aureus*-Stämmen mit humanen Leukozyten in Vollblut. In einem initialen Globaltest werden die Adhäsion und Internalisation der gfp-positiven *S. aureus* an Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten durchflusszytometrisch untersucht. Durch die Verwendung von Lysostaphin werden die adhären und planktonischen Bakterien verdaut. Die bereits internalisierten Bakterien bleiben jedoch intakt und färben die phagozytoseaktiven Leukozyten, so dass zwischen adhären und internalisierten *S. aureus* unterschieden werden kann. Aufgrund des Testdesigns ist es möglich, die Adhäsion und die Internalisation von professionellen und nicht-professionellen Phagozyten gleichzeitig aus einer Probe zu analysieren. Das verwendete Vollblut dient als natürliches Opsonin, so dass die pathophysiologische Situation möglichst exakt wiedergespiegelt werden kann.

Insgesamt konnte ein standardisierbarer und reproduzierbarer Funktionstest entwickelt werden, mit dem eine phänotypische Charakterisierung verschiedener *S. au-*

## 1 Zusammenfassung

*reus*-Stämme möglich ist. Es konnte zwischen *S. aureus*-Stämmen mit ausgeprägter Zellinteraktion (LS1, RN6390) und Stämmen mit reduzierter Zellinteraktion (Newman, Möckli) unterschieden werden. Hierdurch wird deutlich, dass sich bestimmte Stämme der Immunantwort besser entziehen können und so zu Infektionen führen können. Zusätzlich konnte der Einfluss löslicher Substanzen wie eap (extracellular adherence protein) und anderer Oberflächenproteine untersucht werden.

Adhäsion und Internalisation konnten bei Granulozyten und Monozyten, jedoch auch bei Lymphozyten beobachtet werden. Durch fluoreszenzmarkierte Antikörper konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um CD19-positive B-Zellen handelt.

## 1.2 Summary

*Staphylococcus aureus* is considered as a leading cause of acute and chronic infections. Pathogenesis of *S. aureus* infections are influenced by the interaction of the bacteria with the host cells. Both virulence factors and cellular factors of the inherent immune system play a key role in the origin and process of an infection. In the interaction of *S. aureus* with blood cells adhesion and internalisation are essential steps in the phagocytosis process. For the analysis of these steps there are already several assays which mostly focus only on specific cellular factors.

Goal of this thesis was the development of a global phenotypical whole blood assay for the quantitative analysis of adhesion and internalization of *S. aureus* in leucocyte populations by using flow cytometric methods. The test method relies on the co-incubation of gfp-expressing (green fluorescent protein) *S. aureus*-strains with human leucocytes in whole blood. In an initial global testing adhesion and internalisation of gfp-positive *S. aureus* in lymphocytes, monocytes and granulocytes are considered with flow cytometric methods. By adding lysostaphin adherent and planktonic bacteria are digested. Internalised bacteria however remain unimpaired and mark phagocytosing leucocytes. In this way we are able to distinguish between adherent and internalized *S. aureus*. Our test design allows for a simultaneous analysis of professional and non-professional phagocytes within a single probe. As the whole blood serves as a natural opsonine the pathophysiological situation can be accurately modelled.

In summation, we were able to develop a robust and easy to replicate assay that allows for a phenotypical analysis of different *S. aureus* strains. In this course, we were able to classify the considered strains in those with a pronounced cell interaction (LS1, RN6390) and strains with a reduced cell interaction (Newman, Möckli). This shows that certain strains manage to evade the immune response and hence lead to infections. In addition, we were able to analyse the influence of dissovable substances such as eap (extracellular adherence protein) as well as other surface proteins.

Using our assay, we were able to observe adhesion and internalization in monocytes, granulocytes and in particular, also in lymphocytes. By applying fluorescent antibodies we could identify this lymphocyte population as CD-19 positive B-cells.





## 2 Einleitung

### 2.1 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte die folgenden Ziele:

1. Im Zuge dieser Arbeit sollte ein globaler, gut standardisierbarer, durchflußzytometrischer Vollbluttest zur Analyse der Adhäsion und Internalisation von *S.aureus* durch verschiedenen Leukozytenpopulationen entwickelt werden. Hierbei sollte die in-vivo Situation möglichst genau widerspiegelt werden.
2. Mit Hilfe dieses Tests sollten das Adhäsions- und Internalisationsverhalten verschiedener *S.aureus* Stämme untersucht werden. Hierzu wurden sowohl Stämme ausgewählt, welche noch eine Vielzahl von Wildtyp-Eigenschaften besitzen (LS1) als auch solche die klassische Laborstämme repräsentieren (RN220).
3. Mittels Durchflußzytometrie ist es möglich, die Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zu differenzieren. Weiterhin sollte eine Analyse der Adhäsion und Internalisation von Lymphozytensubpopulationen durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt werden.
4. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung eines möglichen Einfluss von Oberflächenproteinen. Hierbei sollte sowohl der Einfluss der MSCRAMMs sowie der Einfluss löslicher Adhäsine (SERAMs) untersucht werden. Stellvertretend für die löslichen Adhäsine sollte der Einfluss von eap, von dem bekannt ist, dass es über immunmodulatorische Eigenschaften verfügt, untersucht werden.
5. Mit Hilfe des Assays sollte außerdem die Adhäsion und Internalisation durch *S. aureus* in verschiedenen Wachstumsphasen untersucht werden. Hierbei sollte die exponentielle Wachstumsphase mit der postexponentiellen Wachstumsphase verglichen werden und ein möglicher Einfluss der Kapselbildung untersucht werden.

## 2.2 Staphylococcus aureus

Bei *S. aureus* handelt es sich um ein gram-positives, unbewegliches, nicht sporenbildendes Bakterium, das zur Familie der Staphylococcaceae (früher *micrococcaceae*) zählt. Staphylokokken besitzen eine kugelige Form. Ihre Größe beträgt im Durchmesser in etwa  $1\ \mu\text{m}$ . Aufgrund ihres Teilungsverhaltens in zwei Ebenen imponieren ihre Kolonien als Haufen- oder Traubenform, woher auch ihr Name rührt (*gr. staphyle* Traube). Aufgrund dessen können sie rein optisch von der Gruppe der Streptokokken unterschieden werden, die sich nur in einer Ebene teilen und sich deshalb in Kettenform anordnen.

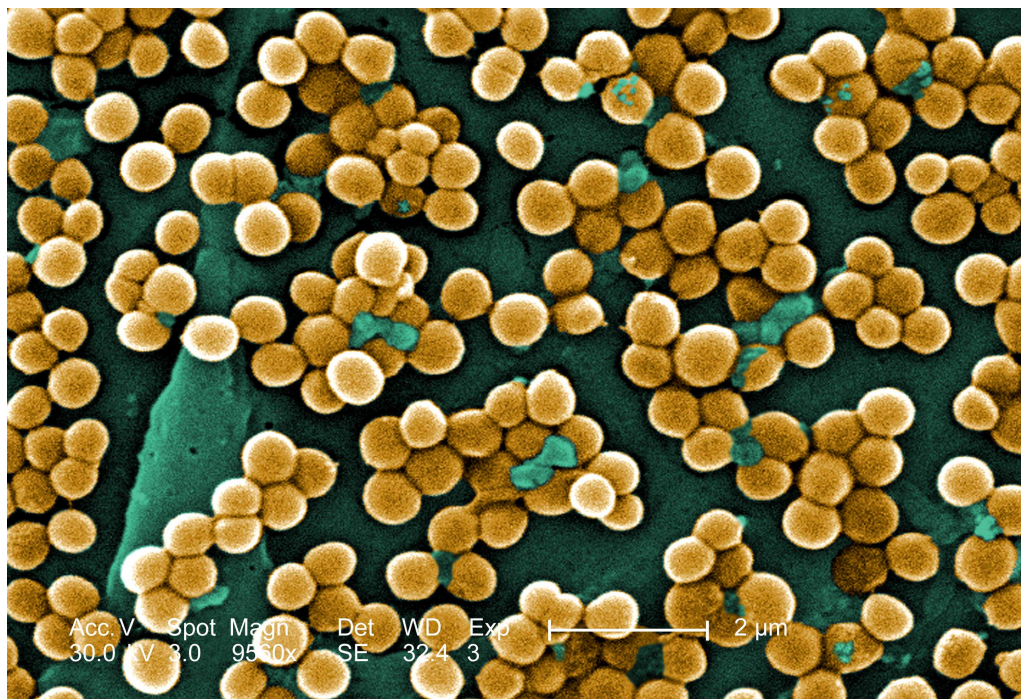


Abbildung 2.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *S. aureus*. Deutlich zu sehen ist die namensgebende traubenförmige Anordnung der Bakterien. (Quelle: Public Health Image Library, CDC).

Weiterhin kann *S. aureus* von den übrigen Mitgliedern der Staphylokokken Spezies aufgrund seiner Koagulase-Aktivität sowie positiver Mannitolvermentations- und Desoxyribonukleasetestungen und seiner zumeist gold-gelblichen Färbung differenziert werden (Lowy 1998). Dem koagulase-positiven *S. aureus* kommt in der 30 Spezies und Subspezies umfassenden Gruppe der Staphylokokken die größte Bedeutung als humanpathogener Keim zu, da er deutlich virulenter ist als seine koagulase-negativen Artgenossen.

## 2.2 *Staphylococcus aureus*

Weitere humanpathogene Erreger dieser Gruppe sind *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* und *Staphylococcus haemolyticus*. *S. aureus* gehört zu den fakultativ anaerob wachsenden Bakterien, mit der Ausnahme von *S. aureus* subsp. *Anaerobius*, welcher zu den obligat anaeroben Bakterien gezählt wird.

*S. aureus* ist hochobertragend gegenüber widrigen Umweltbedingungen. Die Bakterien wachsen bei Temperaturen zwischen 15 °C und 45 °C auf gewöhnlichen Nährböden. Das Temperaturoptimum liegt allerdings zwischen 30 °C und 37 °C, entsprechend der menschlichen Körpertemperatur. Auch verfügt *S. aureus* über eine große pH-Toleranz und ist unempfindlich gegenüber Austrocknung. *S. aureus* bildet auf festen Nährböden goldgelbe (*lat. aureus* golden) konvex geformte Kolonien. Bei Wachstum auf Blutagar ist oftmals um die Kolonien eine Hämolysezone zu finden. Diese wird durch Toxine, vor allem durch  $\alpha$ -Toxin gebildet.

### Die Zellwand

Die Zellwand von *S. aureus* ist eine dynamische, semi-rigide Struktur, die aus 3 Komponenten besteht. Neben Peptidoglykan, welches mit 50 % den Hauptbestandteil der Zellwand ausmacht und den Murein sacculus bildet, sind Teichonsäuren und Oberflächenproteine die weiteren Bestandteile.

Die Peptidoglykanschicht besteht aus sich wiederholenden Polysacchariduntereinheiten, von N-Acetylglukosamin und N-Acetylmuraminsäure, die über die  $\beta - 1,4$  Position miteinander verbunden sind. Es kommt zur Ausbildung von Pentaglycin-Brücken an den Aminosäureseitenketten des N-Acetylglukosamin durch Peptidtransferasen. Diese Pentaglycinbrücken sind verantwortlich für das Ansprechen von *S. aureus* auf Lysostaphin, eine Glycylglycin- Endopeptidase die Pentaglycinbrücken spaltet (Lowy 1998), (Plata, et al. 2009).

Der Effekt der Peptidoglykane kann als endotoxin-ähnlich beschrieben werden. Sie bewirken die Produktion von Zytokinen durch Makrophagen. Und es kommt zur Aktivierung des Komplementsystems und zur Aggregation von Blutplättchen (Lowy 1998).

### Die Kapsel

Kapsel-Polysaccharide werden von mehr als 90 % aller *S. aureus* Isolate ausgebildet (Luong, et al. 2002), wobei 11 verschiedene Serotypen unterschieden werden können. 75 % der Isolate werden den Serotypen CP5 (50 %) und CP8 (25 %) zugeordnet (O’Riordan & Lee 2004), (Lowy 1998). Stämme mit diesen Kapseltypen sind

## 2 Einleitung

für einen Großteil der sowohl stationär als auch ambulant vermittelten Infektionen verantwortlich. Die meisten methicillinresistenten Stämme weisen eine Kapsel vom Typ CP5 auf (Lee 1996).

Die stark bekapselten Stämme, wie *M* und *Smith diffuse* werden den Kapselserotypen 1 und 2 zugeordnet. Diese sind in der Lage mukoide Kolonien auf festen Medien zu bilden. Unter den klinischen Isolaten sind sie selten zu finden. Die übrigen Serotypen produzieren nicht-mukoide Kolonien, die aufgrund ihrer Morphologie nicht von den unbekapselten Stämmen unterschieden werden können.

Die Bekapselung von *S. aureus* trägt zur Steigerung der Virulenz des Erregers bei. Sowohl Stämme mit starker Bekapselung (Serotyp 1 und 2) als auch Stämme mit einer Kapsel vom Serotyp 5 und 8 sind in der Lage, der Phagozytose durch die polymorphonukläre Leukozyten (PMN's) aus dem Weg zu gehen und zu einem Verbleiben des Erregers im Blutsystem des Wirtes zu führen (O'Riordan & Lee 2004). Cunnion et al zeigten, dass die Bekapselung mit der Opsonierung durch das Komplementsystem interferiert. C3-defiziente Mäuse wurden intravenös mit bekapselten *S. aureus* vom Serotyp 5 in Kontakt gebracht, wobei 64 % der komplement-defizienten Mäuse verstarben (Cunnion, et al. 2001).

Es wurde auch gezeigt, dass die Kapsel die Adhäsion von *S. aureus* an Endothelzellen beeinflusst (Pöhlmann-Dietze, et al. 2000). Poutrel et al. haben 1997 bei 30 verschiedenen Isolaten die Bindung von CP5-spezifischen Antikörpern mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei zeigte sich, neben der Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen, eine große Differenz in der Kapselproduktion zwischen den verschiedenen Stämmen sowie auch zwischen den einzelnen Bakterien (Poutrel, et al. 1997).

Die maximale Kapselproduktion findet während der post-exponentiellen Wachstumsphase statt. Übereinstimmend hiermit wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass die Kapselexpression durch das quorum-sensing system agr positiv reguliert wird (Dassy, et al. 1993), (Luong et al. 2002).

### **Adhärenz und Oberflächenproteine**

Die Adhärenz von *S. aureus* an die Oberflächen des Wirts ist einer der entscheidenden Schritte auf dem Weg zur Invasion und Kolonisation und so zur Ausprägung einer Infektion (von Eiff, et al. 2001). *S. aureus* besitzt eine Vielzahl von Oberflächenproteinen, welche die Adhärenz an verschiedene Gewebe vermitteln.

Es können verschiedene Gruppen von Oberflächenproteinen unterschieden werden.

Die Gruppe der *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs) vermittelt die Bindung der Bakterien an Komponenten der extrazellulären Matrix (Navarre & Schneewind 1999). MSCRAMMs zeichnen sich durch ein LPXTG-Leitmotiv aus, das allen zu dieser Gruppe gehörenden Proteinen gemeinsam ist und sich in der C-terminalen Region befindet. Das LPXTG-Leitmotiv (auch Zellwand-Sorting Signal genannt) dient als Zielstruktur für eine Sortase, welche die kovalente Bindung der Proteine an das Peptidoglykangerüst der Zellwand vermittelt (Ythier, et al. 2010). Genetische Analysen zeigen, dass das Genom von *S. aureus* 21 Oberflächenproteine enthält, die ein LPXGT-Leitmotiv besitzen (Roche, et al. 2003).

Zur Gruppe der MSCRAMMs gehören unter anderem ClfA, ClfB, Protein A, FnbpA, FnbpB und CnA. Die MSCRAMMs sind in der Lage mit den extrazellulären Liganden des Wirts wie Kollagen, Fibrinogen (FG), Fibronectin (FN-1), Vitronectin (VN), Elastin (ELN), Prothrombin (PT) und den von Willebrand Faktor (vWF) zu binden, wobei diese Proteine oftmals redundante Funktionen besitzen. Beispielsweise sind die Fibronectin-bindenden Proteine A und B in der Lage Fibronectin (Massey, et al. 2001), Fibrinogen (Wann, et al. 2000) und Elastin (Roche, et al. 2004) zu binden. Auf diese Weise können sie immunmodulatorisch und antiphagozytotisch wirken und die Kolonisation und die Infektion des Wirts begünstigen.

Zur Gruppe der löslichen Adhäesine, den *secretable expanded repertoire adhesive molecules* (SERAMs), gehört unter anderem das *extracellular adherence protein* (Eap). Weitere zu dieser Gruppe gehörende Adhäsionsproteine sind das *extracellular fibrinogen binding protein* (Efb) (Palma, et al. 2001) und das *extracellular matrix binding protein* (Emp) (Bodén & Flock 1992). Im Gegensatz zu den MSCRAMMs weisen die SERAMs kein LPXGT- Leitmotiv auf, was dazu führt, dass diese Gruppe von Adhäesinen nach der Sekretion nicht kovalent sondern ionisch gebunden wird.

Eap wird auch als p70 und MAP bezeichnet (Jönsson, et al. 1995). Die Bezeichnung als MAP (*MHC analogous protein*) durch Jönsson kommt aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit zur N-terminalen  $\beta$ -Kette der *Major Histocompatibility Complexes* (MHC) der Klasse 2 zustande.

Das Maximum der Eap-Produktion findet während der spätexponentiellen Wachstumsphase statt. Hussein untersuchte 140 klinische *S. aureus* Isolate, welche mit Ausnahme von 5 alle Eap aufwiesen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Stamm Newman größere Mengen Eap produziert als die anderen untersuchten Stämme.

Hussein et al teilten Eap, basierend auf einer PCR-Analyse, in drei Gruppen ein:

## 2 Einleitung

Gruppe I (1,8 kb PCR Produkt), Gruppe II (2 kb PCR Produkt); hierzu gehört auch Newman. Gruppe III (2,4 kb PCR Produkt) wurde ausschließlich in Wood 46 gefunden (Hussain, et al. 2001).

Eap steht unter der Kontrolle verschiedener globaler Regulatorsysteme. In (Harraghy, et al. 2005) wurde gezeigt, dass die Expression von Eap in agr und sar A Mutanten 3 – 5 fach reduziert ist. In (Dunman, et al. 2001) wurde nachgewiesen, dass es durch agr und sar A zu einer Hochregulation von Eap kommt. Neben agr und sar A stellt sae ebenfalls ein weiteres wichtiges Regulatorsystem von Eap dar (Harraghy et al. 2005).

Eap weist sowohl immunmodulatorischen Eigenschaften als auch zahlreiche adhesive Funktionen auf und besitzt ein breites Bindungsspektrum. Neben extrazellulären Matrix Proteinen bindet es auch an Plasmaproteine, wobei in diesem Fall anderen Adhäsionsproteinen eine größere Bedeutung zu zukommen scheint (Harraghy, et al. 2003). Palma et al haben sieben verschiedene Proteine beschrieben an die Eap bindet, zu welchen unter anderem auch Fibrinogen und Fibronectin zählen (Palma, et al. 1999). Des Weiteren ist Eap in der Lage mit Hilfe einer neutralen Phosphatase (Nptase) an die bakterielle Zellwand zurückzubinden und auf diese Weise die Adhäsion von *S. aureus* an eukaryonten Zellen wie Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten, APC's und T- Zellen zu vermitteln (Palma et al. 1999) (Flock & Flock 2001) (Hussain, et al. 2002) (Thompson, et al. 2010). Durch die Verwendung von Eap Minusmutanten kommt es zu einer Abnahme der Bindungskapazität an Epithelzellen um bis zu 80 % (Kreikemeyer, et al. 2002).

Aufgrund der Rückbindefähigkeit von Eap an *S. aureus* kommt es zu einer Brückenbildung zwischen Bakterium und Zelle, wobei ICAM-1 als Bindungsmolekül der eukaryontischen Zellen dient. (Hussain et al. 2002) zeigten, dass durch extern zugeführtes Eap eine Agglutination des jeweiligen Wildtyps als auch der entsprechenden Mutanten herbeigeführt werden kann. Dies bedeutet, dass die Bindung von Eap an die Zelloberfläche von *S. aureus* unabhängig von der endogenen Eap Produktion ist (Hussain et al. 2002). Außerdem ist Eap in der Lage, an andere Eap Moleküle zu binden, was einer Bakterienaggregation Vorschub leistet (Hussain, et al. 2008).

Neben der Adhäsion nimmt Eap auch Einfluss auf die Internalisation von *S. aureus* durch nicht-professionelle Phagozyten (Dziewanowska, et al. 1999) (Peacock, et al. 1999) (Sinha, et al. 1999) (Harraghy et al. 2003). Haggart et al. konnten eine gesteigerte Internalisation des Newman Wildtyps im Vergleich zur entsprechenden Eap-negativen Mutante zeigen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Be-

handlung mit anti-Eap Antikörpern die Internalisationskapazität reduziert (Haggar, et al. 2003). Dies deutet darauf hin, dass Eap eine wichtige Rolle bei der Internalisation von *S. aureus* Newman spielt (Harraghy et al. 2003).

Eap gilt als ein wichtiger Pathogenitätsfaktor, da Eap an ICAM-1 bindet und so die Invasion der Leukozyten in das umliegende Gewebe verhindert. Weiterhin ist Eap in der Lage, die Neutrophilenrekutierung zu beeinflussen, was eine Supprimierung des Immunsystems zur Folge haben könnte und somit die Entstehung einer Infektion begünstigen könnte (Chavakis, et al. 2002). Das Protein beeinflusst die Entzündungsreaktion durch Induktion der T-Zell-Appoptose sowie durch eine Reduktion der Hypersensitivitätsreaktion Typ IV (Lee, et al. 2002) (Harraghy et al. 2005). In (Sobke, et al. 2006) wurde der Einfluss von Eap auf die Angiogenese gezeigt. Neben seinem Einfluss auf die Adhäsion und das Immunsystem scheint Eap auch einen Einfluss auf die Biofilmbildung zu haben (Thompson et al. 2010).

### **Killing und Persistenz**

*S. aureus* wurde bis zum Ende der 90er Jahre als extrazelluläres Pathogen angesehen (Finlay & Cossart 1997), (Lowy 2000). Mittlerweile gilt *S. aureus* als fakultativ intrazelluläres Bakterium. Zu der Vermutung, dass *S. aureus* in der Lage ist, in Wirtszellen einzudringen und zu persistieren, führte unter anderem die Tatsache, dass Patienten nach einer Antibiotikabehandlung relativ hohe Rückfallraten aufwiesen (Lowy 1998), (Garzoni, et al. 2007). In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass *S. aureus* in nicht-professionelle Phagozyten wie Endothelzellen (Ogawa, et al. 1985), (Lowy 2000), Osteoblasten (Hudson, et al. 1995), (Lowy 2000), Epithelzellen (Almeida, et al. 1996), (Lowy 2000), Fibroblasten (Sinha et al. 1999), (Lowy 2000) und Keratinozyten (Nuzzo, et al. 2000), (Lowy 2000) eindringen kann. Einige Stämme sind durch den Schutz vor der Wirtsabwehr (Komplementsystem, professionelle Phagozyten, Defensine) und der Wirkung von Antibiotika in der Lage, intrazellulär zu überleben und zum Tod der Wirtszelle zu führen (Garzoni & Kelley 2009). Die intrazelluläre Lokalisation wurde von Sinha für alle von ihnen untersuchten klinischen Isolate und für einen Teil der von ihnen analysierten Laborstämme gezeigt (Sinha et al. 1999).

Neben der Fähigkeit der Invasivität gegenüber nicht-professionellen Phagozyten ist *S. aureus* ebenfalls im Stande, die Phagozytose durch professionelle Phagozyten wie Granulozyten und Makrophagen, welche die Schlüsseleffektoren des Immunsystems darstellen, zu überleben und so zu Infektionen zu führen (Voyich, et al. 2005),

## 2 Einleitung

(Kubica, et al. 2008), (Foster 2005). Der weitere intrazelluläre Verlauf wird entscheidend von der unterschiedlichen Expression der bakteriellen Virulenzfaktoren beeinflusst (Garzoni et al. 2007).

### Pathogenität

Einerseits ist *S. aureus*, für den der Mensch ein natürliches Reservoir darstellt, ein asymptomatischer Kommensale. Typischerweise besiedelt *S. aureus* die Schleimhaut der vorderen Nasenabschnitte (Foster 2009), (Peacock, et al. 2001). Eine Besiedelung dieser Bereiche stellt einen Prädiktor für eine Infektion mit *S. aureus* dar und verdreifacht die Wahrscheinlichkeit, eine durch *S. aureus* hervorgerufene Bakteriämie zu erwerben (van Belkum 2006), (Wertheim, et al. 2005).

Weitere wesentlichen Prädilektionsstellen neben dem vestibulum nasi sind die Haut, die Schleimhaut des Oropharynx, die Achseln, die Vagina, Perineum und die Stirn-Haar-Grenze. Es können drei verschiedene Träger-Typen unterschieden werden: 20 % der Bevölkerung sind persistierende Träger und sind somit dauerhaft mit einem *S. aureus* Stamm besiedelt. 60 % weisen eine intermittierende Besiedelung mit wechselnden Stämmen auf. Bei 20 % der Bevölkerung ist keine Besiedelung mit *S. aureus* nachzuweisen (Lowy 1998), (Wertheim et al. 2005).

Eine erhöhte Kolonisationsrate ist vor allem bei folgenden Gruppen festzustellen: bei Klinikpersonal, bei Menschen mit einem insulinabhängigen Diabetes mellitus bzw. mit einem schlecht eingestellten Diabetes mellitus, bei Drogensüchtigen (i.v.-Applikation), bei chirurgischen Patienten, bei hämodialysepflichtigen Patienten, bei Patienten mit HIV Infektionen sowie bei Patienten mit einer Leukozytenfunktionsstörung (Bamberger & Boyd 2005), (Lowy 1998).

Neben seiner Eigenschaft als asymptomatischer Kommensale besitzt *S. aureus* das Potential eines hochvirulenten Pathogens, das eine Vielzahl teils schwerwiegender Infektionen ambulanter als auch nosokomialer Genese hervorrufen kann. Sowohl im ambulanten als auch im nosokomialen Bereich wird eine steigende Krankheitsinzidenz beobachtet. Das SENTRY Surveillance Program untersuchte über einen Zeitraum von zwei Jahren (1997-1999) weltweit *S. aureus* Infektionen und konnte zeigen, dass *S. aureus* der führende Verursacher von Infektionen des unteren Respirationstrakts, von Haut- und Weichteilinfektionen sowie von Blutstrominfektionen ist (Diekema, et al. 2001). Eine Untersuchung in den Jahren 1990 bis 1992 zeigte, dass *S. aureus* der häufigste Erreger nosokomial erworbener Pneumonien und chirurgischer Wundinfektionen ist (Emori & Gaynes 1993). Weiterhin gilt das Bakteri-



## 2.2 *Staphylococcus aureus*

um als ein häufiger Auslöser von Endokarditiden und Osteomyelitis (Schito 2006), (Plata et al. 2009) sowie von septischen Arthritiden (Josefsson, et al. 2001). Auch teils oberflächliche sich selbst limitierende Hautinfektionen wie Folikulitiden sowie Abszesse und Furunkel werden durch *S. aureus* ausgelöst (Bamberger & Boyd 2005). Grundsätzlich bietet jegliche Störung der Haut- und Mukosabariere sowie ein geschwächtes Immunsystem eine optimale Ausgangslage für das Bakterium um Anschluß an das angrenzende Gewebe und den Blutstrom zu finden.

Hinsichtlich der Ätiopathogenese können durch *S. aureus* ausgelöste Krankheiten unterteilt werden in diejenigen, die durch invasives Auftreten des Erregers bedingt sind und solche, die durch Toxine hervorgerufen werden (Lowy 1998). Ein typischer Vertreter für eine invasive Infektion sind die schon zuvor erwähnten Endokarditiden. Eine Bakteriämie kann praktisch durch alle *S. aureus* Infektionen hervorgerufen werden und ist mit einer hohen Mortalitätsrate assoziiert. In einer Testreihe mit 724 Patienten verstarben 157 (22 %) innerhalb von 12 Wochen an einer *S. aureus* induzierten Bakteriämie (Corey 2009). Mit dem Anstieg der Bakteriämieinzidenz ist auch eine gleichzeitige Zunahme bei der Verwendung intravaskulär verbleibender Kathetern verzeichnet worden. Mit 14 % stellt eine katheter-assoziierte Bakteriämie die dritthäufigste Ursache für nosokomiale Infektionen dar (Bouza, et al. 2002).

Neben den durch das invasive Auftreten des Bakteriums hervorgerufenen Erkrankungen besteht die Möglichkeit von toxinvermittelten Erkrankungen. Zu den durch Toxine bedingten Infektionen gehören unter anderem die Lebensmittelvergiftungen, wobei *S. aureus* zu einem der häufigsten Auslöser weltweit gehört (Le Loir, et al. 2003). Das *Staphylococcal Toxic Shock Syndrom* (TSS) stellt eine weitere durch Toxin-vermittelte Erkrankung dar. Ebenfalls durch Toxine ausgelöste Erkrankungen sind das *Staphylococcal Scaled Skin Syndrom* (SSSS) und die Impetigo bullosa, die durch exfoliative Toxine hervorgerufen werden, wobei es zu einer Epidermolyse und Blasenbildung großer Hautareale kommen kann (Lowy 1998).

Eine Infektion kann sowohl exogen als auch endogen bedingt sein. Als wichtiger Risikofaktor für eine endogene Infektion gilt, wie bereits erwähnt, die Besiedelung des vestibulum nasi (von Eiff et al. 2001), (Nouwen, et al. 2004). Die Kolonisation ist zwar die Voraussetzung für eine Infektion, sie muss aber nicht zwangsläufig eine Infektion nach sich ziehen. Allerdings besteht für die kolonisierte Person ein erhöhtes Risiko an einer Infektion des jeweiligen Stammes zu erkranken (Lowy 1998). Eine exogene Erregerübertragung kann durch Handkontakt mit Klinikmitarbeitern oder Patienten die *S. aureus* -Träger sind erfolgen. Des Weiteren ist eine Übertragung

## 2 Einleitung

durch Tröpfcheninfektion möglich. Ebenfalls eine mögliche Infektionsquelle stellen kontaminierte Gegenstände wie medizinische Gerätschaften und Oberflächen dar, auf welchen *S. aureus* mehrere Wochen überleben kann (Boyce 2007).

### **Antibiotikaresistenz**

Neben der Tatsache, dass in den vergangenen Jahrzehnten ein beträchtlicher Anstieg nosokomial als auch ambulant erworbener *S. aureus* Infektionen verzeichnet worden ist, ist es durch einen oftmals unkontrollierten und nicht fachgerechten Einsatz von Antibiotika sowie der Fähigkeit des Pathogens, sich in relativ kurzen Zeitabständen dem Selektionsdruck anpassen zu können, zur Entstehung zahlreicher Resistenzen gekommen, welche die Behandlung von *S. aureus* Infektionen erschweren.

Hierbei stehen vor allem die Infektionen mit Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRSA) im Vordergrund. Bei MRSA-Stämmen handelt es sich um Bakterienstämme, die eine Resistenz gegenüber allen Antibiotika mit  $\beta$ -Laktamstruktur aufweisen. Diese Stämme haben innerhalb der letzten Jahrzehnte eine enorme Ausbreitung erfahren. Mittlerweile geht man von einer Prävalenz der MRSA-Stämme von bis zu 20 % in deutschen Krankenhäusern und von 33 % bis 55 % in US-amerikanischen Einrichtungen aus (Appelbaum 2006). Neben Krankenhäusern im Allgemeinen treten MRSA auch auf Intensivstationen sowie in Alten- und Pflegeheimen vermehrt auf. Auch unter ambulant erworbenen Stämmen sind mit zunehmender Prävalenz MRSA zu finden.

Im Gegensatz zu den hospital acquired Infektionen (HA-MRSA) treten community acquired Infektionen (CA-MRSA) bei gesunden Personen auf, die keinerlei Kontakt zu medizinischen Einrichtungen haben. Meist rufen CA-MRSA relativ harmlose Haut- und Weichteilinfektionen hervor, dennoch besitzen sie die Kapazität, ernsthafte Erkrankungen auszulösen (Graves, et al. 2010).

Für die Resistenz ist das *mecA* Gen verantwortlich, das für das 78.kDa große Penicillin-bindende-Protein 2a kodiert und sich auf einem mobilen genetischen Element, dem Staphylokokken Kassetten Chromosom (SCCmec) befindet. Von diesen wurden bisher acht Typen beschrieben, wobei SCCmec IV und V vor allem bei CA-MRSA Stämmen vorkommt und bis auf die  $\beta$ -Laktamresistenz keine weiteren Antibiotikaresistenzen aufweisen (Daum, et al. 2002), (Plata et al. 2009) (DeLeo, et al. 2009).

Neben der wachsenden Prävalenz von MRSA- Stämmen wird in den letzten Jahren ein vermehrtes Vorkommen von multiresistenten Stämmen beobachtet, die auch

gegen Vancomycin Resistenzen (VRSA) aufweisen, das als eines der Reserveantibiotika bei MRSA-Infektionen gilt (Loomba, et al. 2010).

### **Adhäsion und Internalisation**

Die Pathogenese einer *S. aureus* Infektion ist zum einen von den Virulenzfaktoren des Erregers abhängig, zum anderen wird sie durch die zellulären Faktoren des angeborenen Immunsystems beeinflusst.

Die Phagozytose von *S. aureus* durch Leukozyten, in erster Linie durch professionelle Phagozyten wie neutrophile Granulozyten und Monozyten, stellt einen Schlüsselschritt in der Bekämpfung von Infektionen durch das Immunsystem dar (Bassøe, et al. 2000). Dieser Prozess umfasst unter anderem die Schritte der Adhäsion an die Zelloberfläche und den der Internalisation. Die Adhäsion des zu phagozytierenden Partikels auf der Zelloberfläche über einen Komplementrezeptor oder über den Fc Rezeptor und die sich daran anschließende Internalisation werden durch Serum Komplementfaktoren und Immunglobuline (Opsonine) beeinflusst (Nuutila & Lilius 2005), (Lehmann, et al. 2000). Die Komplementfaktoren spielen in erster Linie eine wichtige Rolle bei der Adhäsion, wohingegen IgG für die Internalisation durch die Phagozyten wichtig ist.

### **Analyse von Adhäsion und Internalisation**

Zur Analyse der Phagozytose wurden eine Vielzahl von Assays entwickelt, wobei die Durchflusszytometrie die Möglichkeit einer simultanen Analyse einzelner Zellen in Suspension ermöglicht (Hampton & Winterbourn 1999).

Hierzu werden sowohl ethanol-fixierte *S. aureus* (Lehmann et al. 2000) als auch vitale *S. aureus* sowie Latex/Polystyrene Beads (DeLoid, et al. 2009), (Lehmann, et al. 1998), (Ogle, et al. 1988) verwendet. *S. aureus* kann mit Fluorochromen wie Flurescein Isothiocyanat (FITC) (White-Owen, et al. 1992), (Lehmann et al. 2000) oder Rhodamine Green-X (Lehmann et al. 1998), (Lehmann et al. 2000) gelabelt werden. Die Fluoreszenzintensität der mit FITC gelabelten Bakterien reagiert sensibler auf Änderungen des intrazellulären pH-Werts, was von Nachteil in Phagozytose-Assays sein kann (Lehmann et al. 2000), (Nuutila & Lilius 2005).

Neben *S. aureus* besteht auch die Möglichkeit *Streptococcus pneumoniae* (Nuutila & Lilius 2005), (Rodríguez, et al. 2001), *Escherichia coli* (Nuutila & Lilius 2005), (Oda & Maeda 1986), *Candida albicans* (Nuutila & Lilius 2005), (Salih, et al. 2000) sowie Zymosan (Nuutila & Lilius 2005), (Lehmann et al. 2000), (Bassøe et al. 2000),

## 2 Einleitung

(Bjerknes & Bassøe 1983) zur Analyse der Phagozytose zu nutzen. Auch diese Partikel werden meist mit FITC gelabelt (Nuutila & Lilius 2005).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Transfektion eines grün fluoreszierenden Protein (GFP)- tragenden Expressionsplasmids. GFP stammt aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* und kann in verschiedensten Organismen zur Expression gebracht werden. Hierbei sind keine Co-Faktoren oder spezielle Substrate nötig. Weiterhin gilt GFP als äußerst stabil und weist eine geringe Toxizität auf (Aymanns, et al. 2011), (Zimmer 2002), (Chalfie, et al. 1994).

Es existieren eine Vielzahl von Assays zur Analyse der Adhäsion und Internalisation, die eine Leukozyten-Separation erfordern, beispielsweise durch Dichtegradientenzentrifugation. Diese kann allerdings zu einer Modifikation sowohl der Funktion als auch der Morphologie führen (White-Owen et al. 1992). Während der Isolierungsschritte kann es zu einer gesteigerten Expression von Komplement-Rezeptoren durch Degranulation der intrazellulären Granula kommen. Dies wirft die Frage auf, ob die Phagozytosekapazität durch dieses Verfahren die pathophysiologische Situation widerspiegelt (Nuutila & Lilius 2005), (Watson, et al. 1992).

Bei dem Verfahren der Leukozyten-Separation ist eine Co-Stimulation mit Opsoninen durch das Hinzufügen von Serum oder Plasma nötig. Hierbei ist zu beachten, dass ein Übermaß an Opsoninen zu einer Störung der Bindung führen kann (Nuutila & Lilius 2005).

Eine weitere Möglichkeit stellt ein Vollblutassay, wie es in dieser Arbeit etabliert wurde, dar. Durch eine Stimulation mit Vollblut entfallen die Schritte einer Leukozytenseparation und einer Co-Stimulation, da das autologe Plasma als natives Opsonin dient und auf diese Weise die in vivo-Situation widergespiegelt wird. Des Weiteren ermöglicht die Applikation eines Vollbluttests neben der Analyse des Adhäsions- und Internalisationsverhaltens von professionellen Phagozyten auch die Untersuchung von nicht-professionellen Phagozyten, wie den T-Zellen, hinsichtlich dieser Fragestellung.

Um eine Differenzierung zwischen den an der Zelloberfläche gebundenen und von der Zelle internalisierten Partikeln zu ermöglichen, besteht die Möglichkeit einer Fluoreszenzlöschung (*quenching*) durch den Verdau mit Tryptan Blau oder Kristallviolett (Nuutila & Lilius 2005), (Liu, et al. 2000).

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung von adhärenenten und internalisierten *S. aureus* stellt der Lysostaphin-Verdau dar. Lysostaphin ist ein Enzym das die Eigenschaften einer Glycylglycin Endopeptidase besitzt und die Pentaglycin-

brücken in der Peptidoglycanschicht von *S. aureus* spaltet (Kumar 2008), (Schindler & Schuhardt 1964). Lysostaphin hat sich, in niedriger Konzentration und bei kurzer Anwendungszeit, als nicht-toxisch für die phagozytischen Zellen erwiesen und ist nicht in der Lage in diese einzudringen. Aufgrund dessen stellt Lysostaphin eine Basis zur in vitro Analyse der Adhäsion und Internalisation von *S. aureus* durch phagozytische Zellen dar (Easmon, et al. 1978).

## 2.3 Durchflusszytometrie

Im folgenden Abschnitt wird das Verfahren der Durchflusszytometrie erläutert. Die Durchflusszytometrie ist eine lasergestützte Meßmethode, die es ermöglicht, simultan Struktureigenschaften und Fluoreszenzen von Zellen in Suspension zu ermitteln, siehe Abbildung 2.2. Grundvoraussetzung hierfür ist das Vorliegen der Zellen in Einzelzellsuspension. Dies wird durch hydrodynamische Fokussierung erreicht.

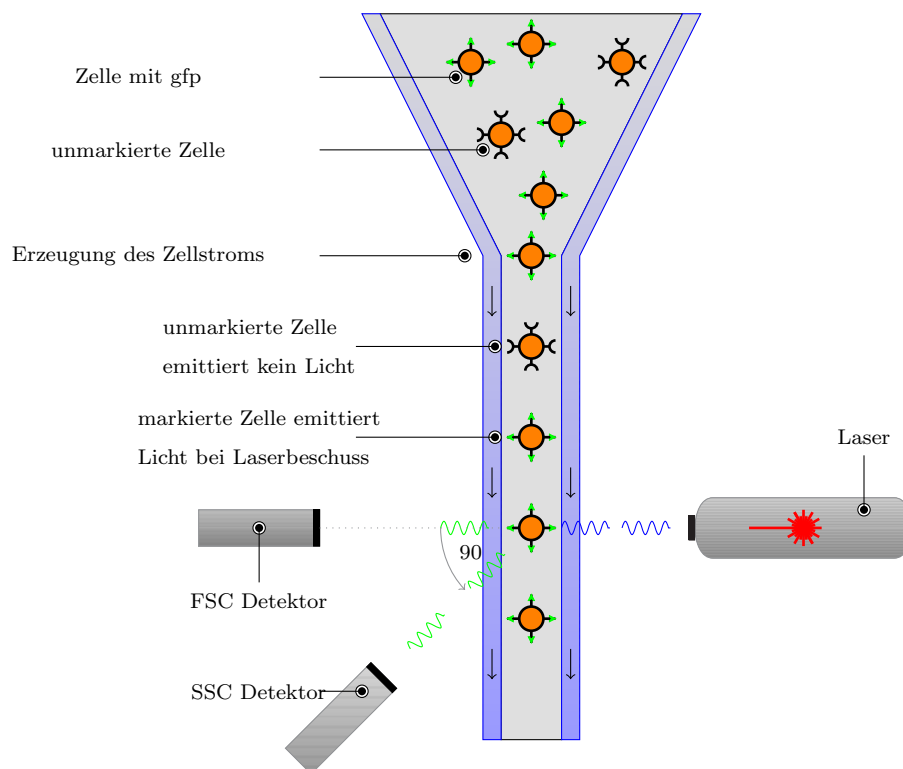


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie

Hierfür wird das jeweilige Analysat mittels Überdruck durch eine Metallkapillare in einen coaxialen Hüllstrom (sheathfluid) eingeleitet. Die Zellsuspension wird

## 2 Einleitung

durch den Hüllstrom so verdünnt, dass sie in einzelne Zellen aufgetrennt wird. Der Zellstrom wird im rechten Winkel von einem Laserstrahl getroffen. Passiert eine Zelle den Kreuzungspunkt zwischen dem Flüssigkeitsstrahl und dem Laserstrahl, geht von der Zelle eine Lichtstreuung (light scatter) aus. Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer BD FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) verfügt als Lichtquelle über einen Argonlaser, der bei 488nm monochromatisches Licht emittiert.

Das Streulicht, das von der Zelle ausgeht, wird an zwei Punkten detektiert. Zum einen wird die Intensität des Vorwärtsstreulichts (FSC) erfasst. Das vorwärts streuende Licht wird mit einem Ablenkungswinkel von  $0,5-2^\circ$  detektiert. Durch die Vorwärtsstreulichtintensität kann auf die Zellgröße geschlossen werden.

Neben der Intensität des vorwärts streuenden Lichts wird durch den light scatter auch die Seitwärtsstreulichtintensität (SCS) bestimmt. Diese wird mit einem Ablenkungswinkel von  $90^\circ$  erfasst. Die Intensität des seitwärts streuenden Lichts gibt Auskunft über die morphologischen Eigenschaften einer Zelle, wie beispielsweise die Granularität und Zellkomplexität. Des Weiteren gibt die Seitwärtsstreulichtintensität in geringem Maße Aufschluss über die Zellgröße.

Basierend auf der Zellmorphologie und der Größe, die mit Hilfe der beiden zuvor beschriebenen Parameter ermittelt werden kann, konnte in dieser Arbeit zwischen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten differenziert werden.

Neben der Detektion der Struktureigenschaften durch die Erfassung der Lichtstreuung ist es gleichzeitig möglich, die Fluoreszenzintensität zu messen. Hierfür müssen die Zellen mit bestimmten Fluorochromen markiert werden. Das Prinzip der Fluoreszenzmessung beruht darauf, dass die Fluorochrome Lichtenergie in Form von Anregungslicht absorbieren, wodurch ihre Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Fallen die Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück, so emittieren sie ein Fluoreszenzlicht mit einer bestimmten Wellenlänge. Das Fluoreszenzlicht, das in alle Richtungen emittiert wird, wird in einem Winkel von  $90^\circ$  detektiert.

Grundsätzlich ist eine Markierung mit verschiedenen Arten von Fluoreszenzfarbstoffen möglich, da die Messung der Fluoreszenzen unabhängig von der Lokalisation und je nach Lichtquelle auch unabhängig vom Spektrum ist. In dieser Arbeit wurde in Bakterienzellen gfp zur Expression gebracht, das in den Bakterien als zytoplasmatisches Molekül vorliegt. Durch die Fluoreszenzmarkierung mit gfp werden die Leukozyten identifiziert, die Bakterien binden beziehungsweise internalisieren können.

Zusätzlich dazu werden in dieser Arbeit Zellantigene mit Fluorochrom gekoppelten monoklonalen Antikörpern markiert. Auf diesem Wege ist es möglich Lymphozyten-subpopulationen zu identifizieren.

Eine Mehrfachfluoreszenzmarkierung ist möglich, da sich die Fluorochrome mit unterschiedlichen Emissionsspektren anregen lassen. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometer BD FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) ist eine vierfache Markierung möglich. Es werden Farbteilerspiegel und Bandpassfilter zur optischen Auftrennung der Emissionsspektren der unterschiedlichen Fluorochrome verwendet. Das Fluoreszenzlicht wird durch Photomultiplier registriert und in elektrische Signale umgewandelt. Anschließend wird das analoge Signal digitalisiert.

Durch die Durchflusszytometrie ist es möglich, physikalische Eigenschaften wie Größe und Granularität von Zellen zusammen mit der Mehrkanalfluoreszenz messen. Zur optischen Darstellung wurde in dieser Arbeit zumeist die zweidimensionale Dot-Plot Darstellung gewählt. In der Dot-Plot Darstellung werden die Intensitätsverteilungen von zwei Messparametern auf der x- und y-Achse aufgetragen. Jede Zelle die gemessen wurde, wird dann als Punkt entsprechend ihrer Intensität auf der x- und y-Achse abgetragen. Durch die zweiparametrische Darstellung von FSC zu SSC konnten in dieser Arbeit die Lymphozyten, Monozyten und Granulozytenpopulationen voneinander unterschieden werden. Mit Hilfe eines Gatings um die jeweilige Population kann diese Population von den anderen Zellen separiert analysiert werden.

Mit Hilfe einer Quadrantenanalyse der jeweiligen durch das Gating definierten Regionen ist es möglich, mittels Antikörpermarkierung die einzelnen Zelltypen weiter in Subpopulationen zu differenzieren.





## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien und molekularbiologische Hilfsmittel

#### 3.1.1 Bakterienstämme

Tabelle 3.1 zeigt eine Auflistung der verwendeten Bakterienstämme.

| Name   | Plasmid                      | Eigenschaften                                                                                                                                                                                                                   | Referenz                                                |
|--------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Newman | Newman pBT bla<br>Zp:: gfp   | klinisches Isolat FnBP –<br>(LPXTG Motiv -)<br>Starke Eap Expression                                                                                                                                                            | (Duthie &<br>Lorenz 1952),<br>(Schäfer,<br>et al. 2009) |
| Möckli | Möckli pBT bla<br>Zp::gfp    | Klinisches Isolat<br>(MSSSA 1112)                                                                                                                                                                                               | (Bischoff,<br>et al. 2001)                              |
| LS1    | LS1 pBT bla<br>Zp::gfp       | Klinisches Isolat<br>(septische Arthritis)<br>Geringe Mengen FnBP                                                                                                                                                               | (Bremell,<br>et al. 1990),<br>(Nair, et al. 2003)       |
| RN4220 | RN4220 pCN 56 bla<br>Zp::gfp | Laborstamm 8325 Derivat<br>besitzt 11 bp Deletion in<br>rsbU und ist daher sigma<br>Faktor – B defizient<br>partieller agr Defekt                                                                                               | (Nair,<br>et al. 2011),<br>(Kreiswirth,<br>et al. 1983) |
| RN6390 | RN6390 pBT bla<br>Zp::gfp    | Laborstamm 8325 Derivat<br>besitzt 11 bp Deletion in<br>rsbU und ist daher sigma<br>Faktor – B defizient<br>Mutation in teaR hierdurch<br>reduzierte Biofilm-Bildung<br>und Reduktion der<br>Expression von<br>Virulenzfaktoren | (Novick 1967),<br>(Cassat,<br>et al. 2006)              |

Tabelle 3.1: Bakterienstämme

### 3.1.2 Antikörper

Die folgende Tabelle 3.2 zeigt die verwendeten Antikörper.

| Antikörper | Farbstoff | Expression auf | Beschreibung                                                                                 |
|------------|-----------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| CD3        | PerCP     | T-Zellen       | Monoclonal mouse,<br>anti-human CD3,<br><br>Becton-Dickinson,<br>Heidelberg Cat.-Nr. 345766  |
| CD4        | PerCP     | T-Helferzellen | Monoclonal mouse,<br>anti-human CD4,<br><br>Becton-Dickinson,<br>Heidelberg Cat.-Nr. 345770  |
| CD8        | PerCp     | T-Killerzellen | Monoclonal mouse,<br>anti-human CD8,<br><br>Becton-Dickinson,<br>Heidelberg Cat.-Nr. 345774  |
| CD19       | PerCp     | B-Zellen       | Monoclonal mouse,<br>anti-human CD19,<br><br>Becton-Dickinson,<br>Heidelberg Cat.-Nr. 345790 |
| CD14       | PerCP     | Monozyten      | Monoclonal mouse,<br>anti-human CD14,<br><br>Becton-Dickinson,<br>Heidelberg Cat.-Nr. 345786 |

Tabelle 3.2: Antikörper

### 3.1.3 Enzyme, Antibiotika, Lösungen und Medien

Tabelle 3.3 listet die verwendeten Enzyme auf, Tabelle 3.4 die verwendeten Proteine und Tabelle 3.5 die verwendeten Lösungen und Medien.

| Enzym                   | Information                                                                                                                                                                                                                 | Hersteller      |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Lysostaphin (SsL-90-02) | Herkunft: <i>Staphylococcus simulans</i><br>biovar <i>staphylolyticus</i><br><br>Spezifische Aktivität: 1650 U/mg<br><br>Stammlösung: 2 mg Trockenpulver<br>auf 1 ml PBS<br>Lagerung: in Aliquots bei $-20^{\circ}\text{C}$ | genmedics       |
| Trypsin                 |                                                                                                                                                                                                                             | Biochrom L2 153 |

Tabelle 3.3: Enzyme

| Proteine | Konzentration                   | Referenz               |
|----------|---------------------------------|------------------------|
| Eap      | ((10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )) | (Sobke<br>et al. 2006) |

Tabelle 3.4: Proteine

### 3 Materialien und Methoden

| Lösungen und Medien | Zusammensetzung                                                                                                              | Hersteller                                                                      |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| BHI                 |                                                                                                                              | Bacto Brain Heart Infusion<br>Becton-Dickinson<br>Heidelberg<br>Cat.-Nr. 237200 |
| 1xPBS               | 8 g NaCL, 0 g,2 KCL,<br>1 g,42 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>0 g,27 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>(ph-Wert: 7,35) | Eigenherstellung                                                                |
| Puffer-Lösung       | 1PBS, 2 FCS<br>0,05 Na-Azid                                                                                                  | Eigenherstellung                                                                |

Tabelle 3.5: Lösungen und Medien

## 3.2 Methoden

In dieser Arbeit wird ein Adhäsions-und Internalisations-Assay für *S. aureus* mit Blutzellen in Vollblut etabliert. Dabei werden *S. aureus*-gfp mit Vollblut koinkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

### 3.2.1 Anzucht und Lagerung

Die Anzucht von *S. aureus* erfolgt auf LB-Agar-Platten. Für die Herstellung der LB-Agar-Platten wird 500 ml Medium und 7,5 g Agar in Pulverform verwendet. Medium und Agar werden zusammen in der Mikrowelle erhitzt, anschließend auf ca. 40 °C abgekühlt und das entsprechende Antibiotikum zugefügt. Für die Selektion von RN4220 gfp wird Kanamycin (50 µg/ml), für die restlichen Stämme wird Tetracyclin (5 µg/ml) verwendet. Pro Platte werden 20 – 30 ml flüssiger Agar benötigt. Die Platten werden offen unter der Sterilbak für ca. 24h zum Trocknen gelagert. Danach wird ein 3-Ösenausstrich des jeweiligen Bakterienstammes angefertigt. Hierzu wird eine Beimpfungsöse eines bei –70 °C gelagerten Stocks verwendet. Die ausgestrichenen Platten werden für 24h im Wärmeschrank inkubiert (37 °C). Danach können sie bei Kühlschranklagerung für ca. 4 Wochen genutzt werden.

### 3.2.2 Anzucht in Flüssigmedium

Für die Herstellung einer Übernachtskultur wird BHI-Bouillon als Nährmedium verwendet. Für Newman gfp, Möckli gfp, LS1 gfp und RN6390 gfp wird Kanamycin (50 µg/ml) im Verhältnis 1:1000 hinzugefügt. Bei Verwendung von RN4220 gfp wird Tetracyclin (5 µg/ml) hinzugefügt. Zusätzlich wird eine Kolonie des jeweiligen Bakterienstamms hinzugegeben. Die Übernachtskultur wird für 16 h bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

### 3.2.3 Blutgewinnung

Für alle Experimente wird peripheres humanes Vollblut verwendet. Die Entnahme erfolgt unmittelbar vor Beginn des jeweiligen Experiments aus der V. cubitalis eines gesunden Probanden mit Hilfe einer Lithium-Heparin-Monovette. In den mit eap durchgeführten Versuchen, werden Citratblut-Monovetten verwendet. Bis zur Verwendung des Vollbluts wird es in den Monovetten, mit welchen es auch abgenommen

### 3 Materialien und Methoden

wurde, bei Raumtemperatur (20 – 22 °C) maximal eine Stunde horizontal gelagert und in regelmäßigen Zeitabständen bewegt.

#### 3.2.4 Assay zur quantitativen Analyse

##### Fluoreszierende *S. aureus* -Stämme

In dieser Arbeit werden die *S. aureus*-Stämme Newman, Möckli, LS1, RN4220 und RN6390 verwendet, die das grün fluoreszierende Protein (gfp) kontinuierlich exprimieren. In den *S. aureus* -Stämmen Newman, Möckli, LS1, RN4220 und RN6390 wurde das grün fluoreszierende Protein zur Expression gebracht, wobei die Stämme Newman, Möckli, LS1 und RN4220 unter der Kontrolle einer Kanamycin-Kassette stehen und RN4220 eine Tetracyclin-Kassette enthält. Gfp liegt in Bakterien als zytoplasmatisches Molekül vor, wobei es sehr stabil ist und eine geringe Toxizität aufweist. Es wurde ursprünglich aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* isoliert. Das Chromophor wird autokatalytisch gebildet. Es benötigt also keinerlei Co-Faktoren für die Fluoreszenz (Aymanns et al. 2011) (Zimmer 2002) (Chalfie et al. 1994).

##### Bakterienaufbereitung und Einstellung der optischen Dichte

Nach 16 h werden 2 ml der Übernachtskultur aus dem Inkubator entnommen und anschließend mit 10 ml PBS gewaschen (RT, 300 rpm (1912 g), 5 min.). Der Überstand wird dekantiert und das Pellet wird mit 2 ml PBS resuspendiert. Am Photometer wird die optische Dichte der Übernachtskultur bestimmt. Hierzu wird die Extinktionsmessung bei 600 nm Wellenlänge in einer Küvette mit dem Probevolumen 1 ml vorgenommen. Für die Messung wird die Bakteriensuspension im Verhältnis 1: 20 mit PBS verdünnt. Der Leerwert wird mit 1 ml PBS bestimmt. Bis auf die in den Kapiteln 4.1, 4.2 und 4.3 dargestellten Arbeiten wird eine optische Dichte von OD 1,5 standardmäßig eingestellt. Für die in den Kapiteln 4.1, 4.2 und 4.3 durchgeführten Arbeiten sind Bakteriensuspensionen mit der optischen Dichte OD 0,25 verwendet worden.

##### Koinkubation von *S. aureus* mit Blutzellen (Vollblut)

Die Bakteriensuspension der optischen Dichte OD 1,5 wird in ein 2 ml Eppli-Tube überführt und abzentrifugiert (RT, 8400 g, 5 min.), der Überstand wird mit einer Pipette abgenommen und das Bakterienpellet wird mit 500 µl PBS resuspendiert.

12,5  $\mu\text{l}$  dieser Bakteriensuspension der optischen Dichte OD 1,5 werden in ein 1,5 ml Eppi-Tube pipettiert. Dazu werden 250  $\mu\text{l}$  des zuvor entnommenen venösen Vollbluts gegeben. Unmittelbar nach dem Hinzufügen des Vollbluts wird die Probe gevortext. Anschließend erfolgt die Inkubation der Proben im Wärmeschüttelbad (1000 rpm, 37 °C, 1 – 60 min.). Als Referenzwert werden 250  $\mu\text{l}$  Vollblut mit 12,5  $\mu\text{l}$  PBS inkubiert. Während dieser Koinkubation kommt es zur Adhäsion und Internalisierung von *S. aureus* mit den verschiedenen Blutzellen. Zu den angegebenen Untersuchungszeitpunkten (1 – 60 min.) werden die Proben (250  $\mu\text{l}$  Vollblut und 12,5  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension) aus dem Wärmeschüttelbad entnommen und nach der Aufbereitung durchflusszytometrisch analysiert.

#### **Erythrozytenlyse**

Die Proben werden nach der Inkubation mit jeweils 1 ml 1-facher Facs-Lysing-Solution (FACS Lysing Solution, Becton-Dickinson, Heidelberg) versetzt. Dann werden sie für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieses Vorgangs sollte mehrmals gevortext werden. Aufgrund der geringen osmotischen Resistenz der kernlosen Erythrozyten werden diese, unter Aufklären der Flüssigkeit, durch die Zugabe der Lyselösung lysiert. Die Leukozyten hingegen bleiben intakt und werden gleichzeitig fixiert.

#### **Adhäsions-und Internalisationsanalyse**

Nach der Erythrozytenlyse werden die aus adhärennten beziehungsweise internalisierten Bakterien und WBC bestehenden Proben zentrifugiert (RT, 450 g, 5 min.), der Überstand wird dekantiert und die Restflüssigkeit wird auf Filterpapier ablaufen gelassen. Danach wird das Pellet gevortext. Das Pellet wird dann mit 300  $\mu\text{l}$  Facs-Puffer resuspendiert und die Suspension mit einer Pipette in ein Facs-Tube überführt. Es folgt die Analyse am Durchflusszytometer.

Zur Differenzierung zwischen adhärennten und internalisierten Bakterien wird die Glycylglycin-Endopeptidase Lysostaphin (genmedics, 2 mg/ml, verdünnt mit PBS) mit einer Endkonzentration von 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verwendet. Durch die Verwendung von Lysostaphin werden die planktonischen und die adhärennten *S. aureus* lysiert, wohingegen bereits internalisierte *S. aureus* erhalten bleiben. Es kommt zu einem selektiven Verlust der Fluoreszenz extrazellulärer *S. aureus* -Stämme, während die Fluoreszenz der adhärennten und internalisierten Bakterien erhalten bleibt. Lysostaphin, das zuerst in *Staphylococcus simulans* identifiziert wurde, spaltet die Pentaglycinbrücken

### 3 Materialien und Methoden

in der Peptidoglycanschicht, die charakteristisch für die Zellwand der Staphylococci sind (Kumar 2008), (Schindler & Schuhardt 1964), (Easmon et al. 1978).

Die Proben, die zur Internalisationsanalyse vorgesehen sind, werden, wie zuvor beschrieben, vorbereitet und inkubiert. Zu den jeweils vorgesehenen Entnahmezeitpunkten (1 – 60 min.) werden die Proben aus dem Thermomixer genommen und zu jeder Probe wird 50  $\mu$ l Lysostaphin der Endkonzentration 20  $\mu$ g/ml pipettiert. Anschließend werden die Probe kurz gevortext. Danach werden die Proben für 30 weitere Minuten im Wärmeschüttelbad inkubiert (1000 rpm, 37°C). Als Referenz wird zusätzlich eine Probe mit 250  $\mu$ l Vollblut + 12,2  $\mu$ l PBS + 50  $\mu$ l Lysostaphin der Endkonzentration 20  $\mu$ g/ml erstellt. Nach Ablauf der 30 Minuten erfolgt hier ebenfalls die Zugabe von 1 ml Facs-Lysing-Solution.

Die weitere Verfahrensweise ist identisch mit der zur Adhäsionsanalyse. Nachdem das Pellet mit 300  $\mu$ l Puffer-Lösung resuspendiert und mit einer Pipette in ein Facs-Tube überführt wird, erfolgt auch hier die durchflusszytometrische Analyse.

#### **Adhäsion und Internalisation von Lymphozytensubpopulationen**

Zur Differenzierung bestimmter Leukozytensubpopulationen, werden für die Analyse im Mehrkanaldurchflusszytometer fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper eingesetzt. Die Bakterienaufbereitung und Koinkubation der Bakteriensuspension mit dem humanen Vollblut erfolgt wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 3.2.4 Bakterienaufbereitung und Einstellung der optischen Dichte und Kapitel 3.2.4 Koinkubation von *S. aureus* mit Blutzellen (Vollblut)).

Nach dem Erythrozytenlyseverfahren (FACS Lysing Solution, Becton-Dickinson, Heidelberg) werden die Proben in den Facs-Tubes zentrifugiert (RT, 1400 rpm (416 g), 5 min.), der Überstand wird dekantiert, die Restflüssigkeit wird Filterpapier ablaufen gelassen und anschließend das Pellet gevortext. Die Markierung der Zellen wird mit PerCP-konjugierten monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Als Monozytenmarker wird CD14 PerCP verwendet, als B-Zell-Marker CD19 PerCP, als T-Zell-Marker wird CD3 PerCP verwendet und zur Differenzierung der T-Zellpopulation wird CD4 PerCP als T-Helferzellenmarker und CD8 PerCP als T-Killerzellenmarker eingesetzt.

Zu dem Bakterienpellet wird 8  $\mu$ l des jeweiligen Antikörpers pipettiert. Die Proben werden für 30 min. auf Eis bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend werden die Proben mit 2 ml Facs-Puffer gewaschen (RT, 1400 rpm, 416 g, 5 min.). Der Überstand wird abgegossen und die Restflüssigkeit auf Filterpapier ablaufen gelassen, dann wird das



Pellet gevortext. Das Pellet wird in 300  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert, es folgt die durchflusszytometrische Analyse.

### 3.2.5 Einfluss von Oberflächenproteinen von *S. aureus*

Zur Untersuchung des Einflusses von Oberflächenproteinen von *S. aureus* auf die Adhäsion und Internalisation wird Trypsin verwendet. Trypsin ist eine Endopeptidase, die proteolytisch auf Oberflächenproteine wirkt, wobei sie speziell zwischen den Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet. Wie zuvor bereits erläutert wird eine Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes hergestellt. Die Bakterien werden mit PBS gewaschen. Die optische Dichte wird am Photometer gemessen und auf OD 1,5 eingestellt.

Nachdem die der optischen Dichte OD 1,5 entsprechende Menge der Bakterien-suspension in ein 2 ml Eppi-Tube überführt und abzentrifugiert wurde (RT, 8400 g, 5 min.), wird der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Zu dem Bakterienpellet wird 150  $\mu$ l Trypsin pipettiert. Die Inkubation der Suspension erfolgt für 5 min. bei 37 °C im Wärmeschrank.

Nach der Inkubation wird die Trypsin-Bakterien-Suspension mit einer Pipette abgenommen und in ein weiteres 2 ml Eppendorf-Tube überführt, in das zuvor 1500  $\mu$ l einer Mischung aus PBS und 10 % FCS gegeben wurde. Die Probe wird kurz gevortext. Anschließend wird die Probe zentrifugiert (RT, 8400 rpm, 5 min.). Der Überstand wird mit einer Pipette abgenommen und das Bakterienpellet mit 500  $\mu$ l PBS resuspendiert. Der weitere Ablauf ist mit dem zuvor beschriebenen Verfahrensablauf identisch.

### 3.2.6 Einfluss von Eap

Zur Untersuchung des Einflusses von *eap* auf die Adhäsion und Internalisation von *S. aureus* in Blutzellen wurde *eap* verwendet, das zuvor aus dem *S. aureus*-Stamm Newman isoliert und aufgereinigt worden ist (Sobke et al. 2006), (Athanasopoulos, et al. 2006). Bei der Verwendung von *eap* werden anstelle von Lithium-Heparin Monovetten Citrat Monovetten zur Blutabnahme eingesetzt, da die Bindung von *eap* an Zellen durch Heparin inhibiert wird.

250  $\mu$ l Citratblut werden zusammen mit 4,02  $\mu$ l *eap* der Endkonzentration 10  $\mu$ g/ml in ein Eppendorf-Tube pipettiert, erst dann erfolgt die Zugabe von 12,5  $\mu$ l der Bakterien der OD 1,5. Nach der Zugabe der Bakterien werden die jeweiligen

### 3 Materialien und Methoden

Proben gevortext. Die Suspension aus dem mit *eap* supplementierten Vollblut und Bakterien wird für maximal 60 min. im Wärmeschüttelbad (Thermomixer) inkubiert (1000 rpm, 37 °C) und entsprechend dem in Kapitel 3.2.4 Adhäsions- und Internalisationsanalyse beschriebenen Adhäsionsverfahren aufbereitet.

#### 3.2.7 Adhäsion in verschiedenen Wachstumsphasen

Es wird der Einfluss der exponentiellen Wachstumsphase (vier Stunden Kultur, log-Phase) mit dem der postexponentiellen Wachstumsphase (Übernachtskultur) auf die Adhäsion von *S. aureus* untersucht.

Zur Analyse des Einflusses der exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase) auf die Adhäsion von *S. aureus* wird eine Vier-Stunden-Kultur hergestellt. Hierzu wird eine Subkultur der Übernachtskultur erstellt. Es werden 100 µl der jeweiligen Übernachtskultur abgenommen und in 5 ml BHI gegeben. Diese Suspension wird vier Stunden im Schüttelinkubator inkubiert (150 rpm, 37 °C). Anschließend werden 2 ml der vier Stunden Kultur entnommen und mit 10 ml PBS gewaschen (3000 rpm, 5 min., RT). Der weitere Versuchsablauf ist mit dem zuvor beschriebenen identisch.

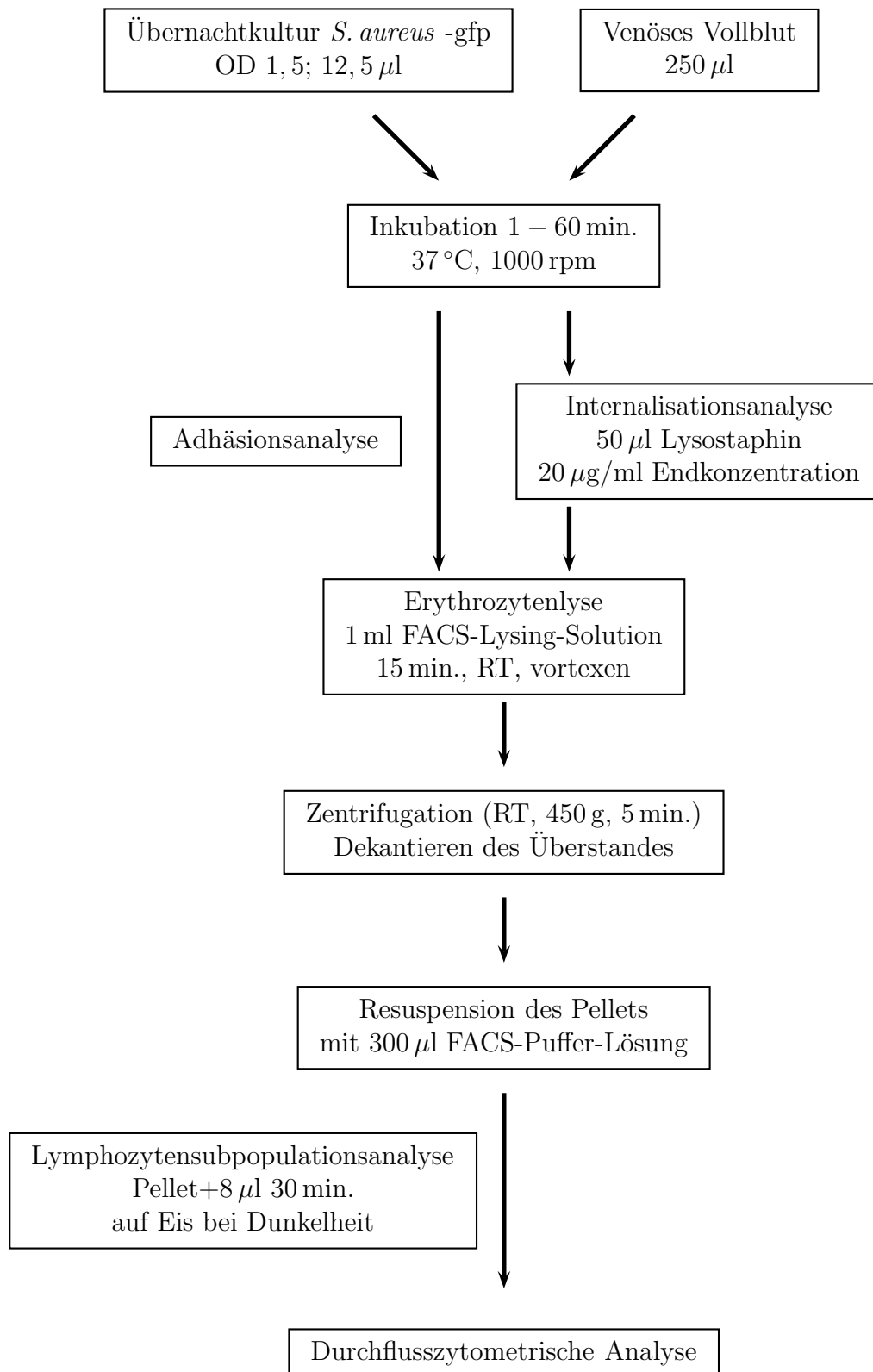


Abbildung 3.1: Ablaufdiagramm Adhäsionsanalyse, Internalisationsanalyse

### 3 Materialien und Methoden

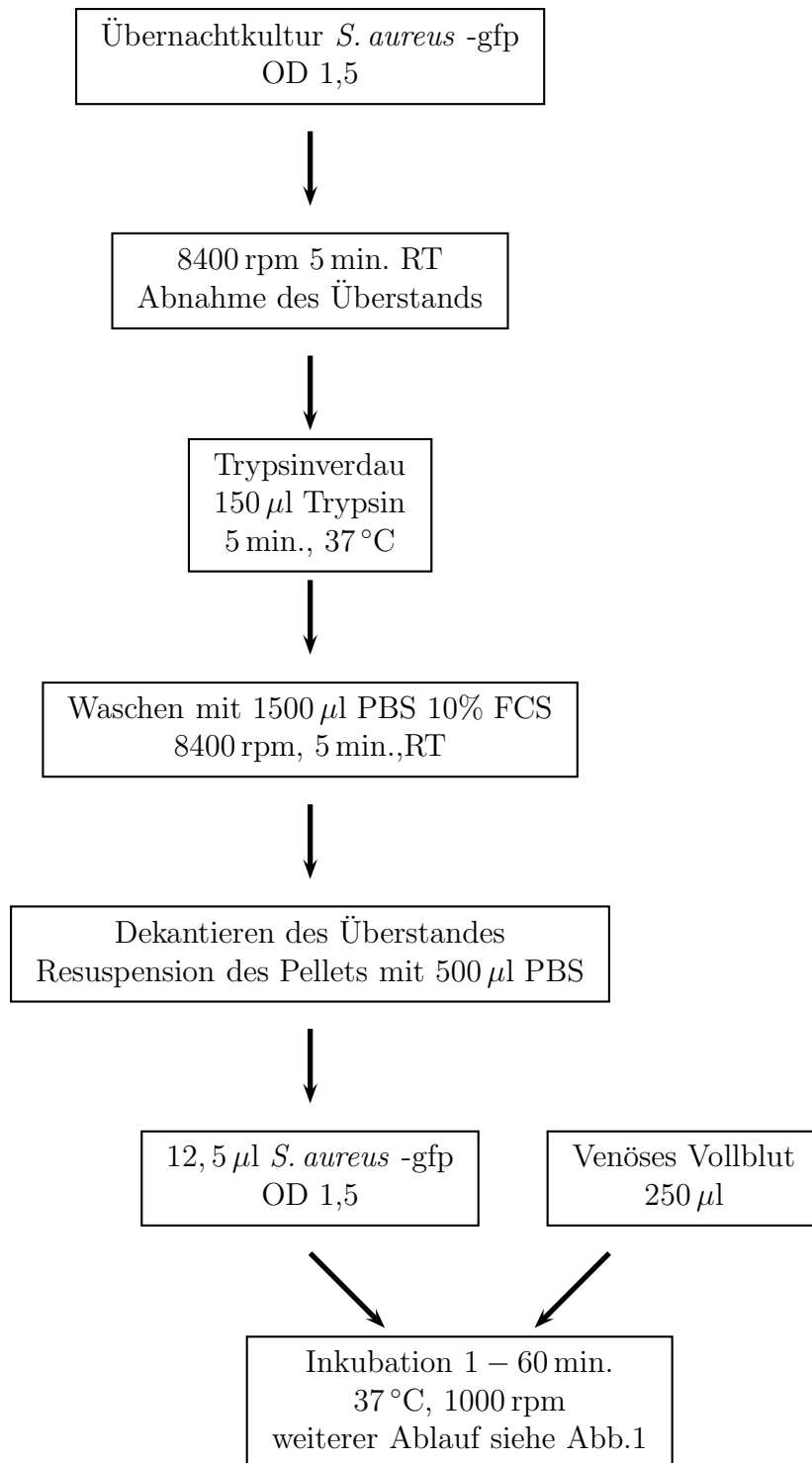


Abbildung 3.2: Ablaufdiagramm Trypsinverdau

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Prinzipien und Vorarbeiten

#### 4.1.1 Internalisationsnachweis mit Lysostaphin

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein in-vitro-Test zur durchflusszytometrischen Analyse der Adhäsion und der Internalisation von *S. aureus* durch humane Blutzellen entwickelt.

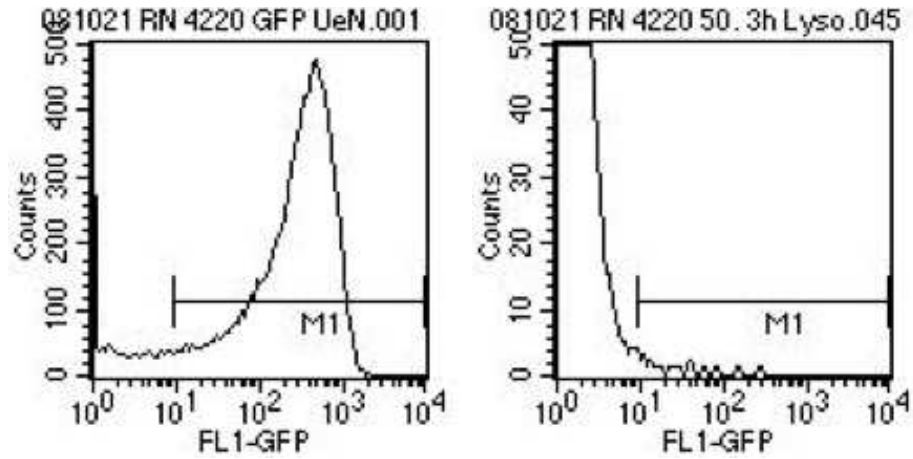
Das Prinzip dieses Tests basiert auf der Koinkubation von heparinisiertem humanem Vollblut (250  $\mu$ l) mit vitalen *S. aureus*-Stämmen (12,5  $\mu$ l), die kontinuierlich das grün fluoreszierende Protein (gfp) exprimieren. Durch die Inkubation der Bakterien mit dem Vollblut sowie durch Anwesenheit von Komplementfaktoren und Antikörper wurde die in-vivo Situation möglichst genau widergespiegelt.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit die Adhäsions- und Internalisationskapazität der Leukozyten gegenüber verschiedenen *S. aureus* Laborstämmen und klinischen Isolaten untersucht. Basierend auf der Zellmorphologie konnte in der durchflußzytometrischen Analyse die Leukozytenpopulation in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten differenziert werden.

Zur Differenzierung zwischen adhärierten und internalisierten *S. aureus* diente Lysostaphin. Durch Lysostaphin wurden die planktonischen und die adhärenen *S. aureus* lysiert, während die internalisierten *S. aureus* erhalten blieben. Hierbei kam es zu einem vollständigen Fluoreszenzverlust der extrazellulären *S. aureus* (Abbildung 4.1). In Vorarbeiten zur Testetablierung wurde die Dauer des Lysostaphinverdaus ermittelt. Wie Abbildung 4.2 zeigt, reduzierte sich bereits fünf Minuten nach dem Zufügen von Lysostaphin zur Bakteriensuspension die Zahl der gfp positiven Zellen auf 25%. Nach 25 Minuten sank die Zahl der gfp positiven Zellen auf unter 5%. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Inkubationszeit für den Lysostaphinverdaus auf 30 Minuten für alle weiteren Versuche in dieser Arbeit festgelegt.

Neben der Dauer des Lysostaphinverdaus wurde die Lysostaphinendkonzentra-

## 4 Ergebnisse



(a) Fluoreszenzintensität vor Lyso- (b) Fluoreszenzintensität nach Lysostaphinverdau

Abbildung 4.1: Fluoreszenzintensität von RN4220 gfp vor (a) und nach dem Lysostaphinverdau (b); es zeigt sich ein vollständiger Fluoreszenzverlust nach dem Lysostaphinverdau (b).

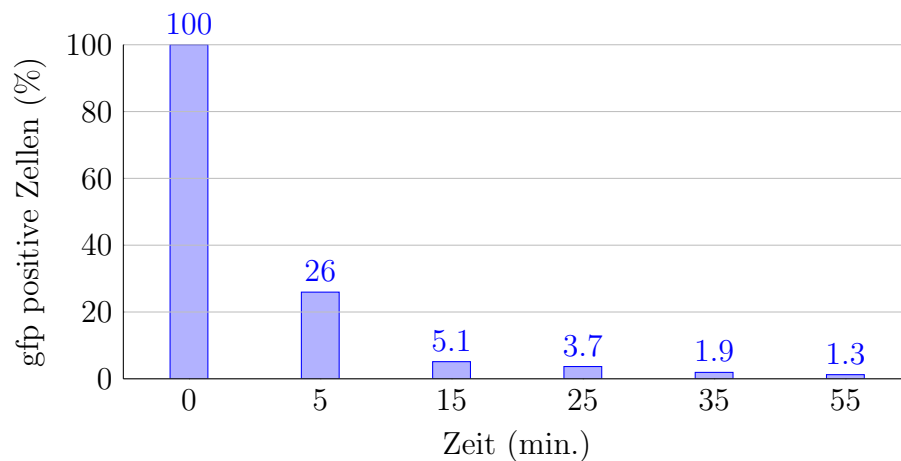


Abbildung 4.2: Einfluss von Lysostaphin ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) auf die Fluoreszenz gfp positiver *S. aureus* am Beispiel von RN4220 gfp. Nach fünf Minuten sinkt die Zahl der gfp positiven Zellen auf 25 %.

tion für die Versuche dieser Arbeit ermittelt. Hierzu wurde der Einfluss von Lysostaphin der Endkonzentrationen 20  $\mu\text{g/ml}$ , 30  $\mu\text{g/ml}$  und 40  $\mu\text{g/ml}$  auf die Fluoreszenzintensität der Leukozytenpopulationen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) untersucht. Hierbei war kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Lysostaphin-Endkonzentrationen bezüglich der Fluoreszenzintensität der drei Leukozytenpopulationen festzustellen, siehe Abbildung 4.3. Unter dem Einfluss noch höherer Lysostaphinkonzentrationen hat der zytotoxische Effekt von Lysostaphin auf die Leukozyten überwogen.

Durch alle der drei Lysostaphinendkonzentrationen verringerte sich die Zahl der gfp positiven Lymphozyten von 6 % auf unter 1 %. Durch Lysostaphin beeinflusst nahm die Zahl der gfp positiven Monozyten um etwa 26 %-Punkte zu. Die Zahl der gfp positiven Granulozyten sank um 1 %-Punkt, von 97 % auf 96 % gfp positive Zellen, siehe Abbildung 4.2. Der leichte Anstieg des Anteils der gfp positiven Monozyten bei 40  $\mu\text{g/ml}$  Lysostaphin konnte durch einen bereits einsetzenden zytotoxischen Effekt erklärt werden. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Arbeiten eine Lysostaphinkonzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  gewählt, da hierdurch das Risiko einer möglichen Zellschädigung bei gleichem Effekt minimiert wird.

Die Reduktion der gfp positiven Zellen war auf die Lyse der planktonischen und adhärenen gfp positiven *S. aureus* durch Lysostaphin zurückzuführen. Dabei blieben die von den Leukozyten internalisierten *S. aureus* erhalten. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Arbeiten eine Lysostaphinkonzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  gewählt.

### 4.1.2 Adhäsion und Internalisation in Lymphozytenpopulationen

Adhäsion und Internalisation von *S. aureus* gfp wurden in Monozyten und Granulozyten und interessanterweise auch zu einem geringeren Anteil in Lymphozyten beobachtet.

Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper gegen Antigene der Lymphozyten wurde der jeweilige prozentuale Anteil der *S. aureus* gfp bindenden beziehungsweise internalisierenden Lymphozytensubpopulationen mit der Mehrkanaldurchflußzytometrie dargestellt.

In dieser Arbeit wurden PerCP konjugierte monoklonale Antikörper gegen Antigen CD3 als T-Zell Marker und PerCP konjugierte monoklonale Antikörper gegen Antigen CD19 als B-Zell Marker verwendet. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der Anteil der CD3 positiven T-Zellen, die *S. aureus* RN4220 gfp binden oder internalisieren gering ist, siehe Abbildung 4.4.

#### 4 Ergebnisse

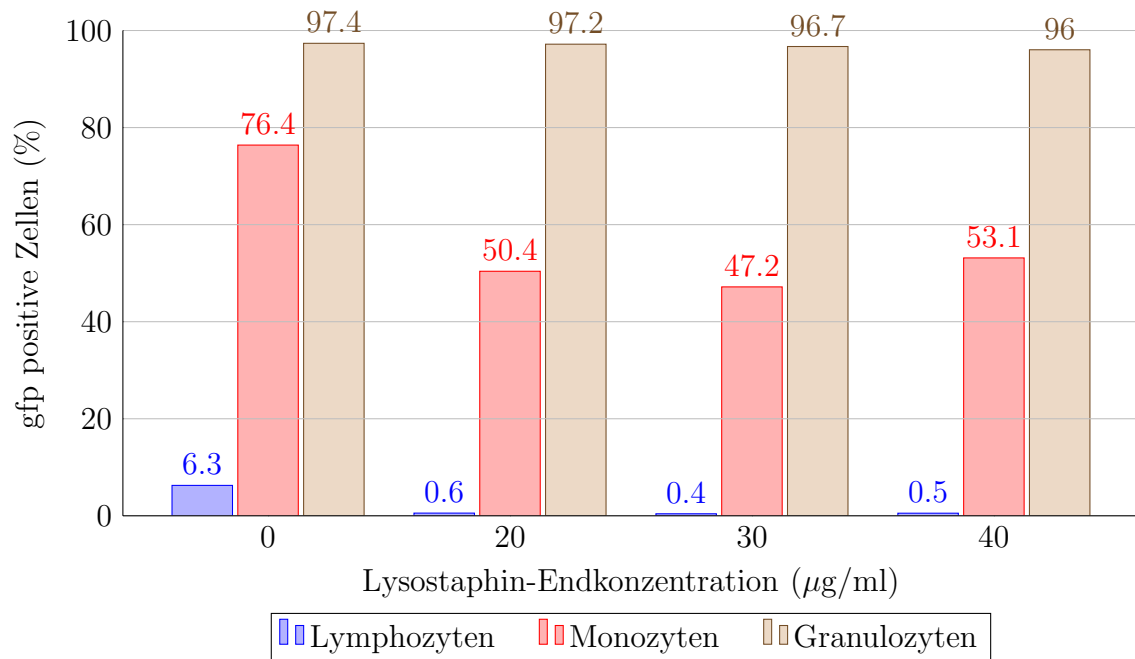


Abbildung 4.3: Einfluss verschiedener Lysostaphin-Endkonzentrationen. Vergleich der Lysostaphinendkonzentration von 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml bezüglich der Lyse adhären- und planktonischen *S. aureus* RN4220 gfp (OD 0,25).

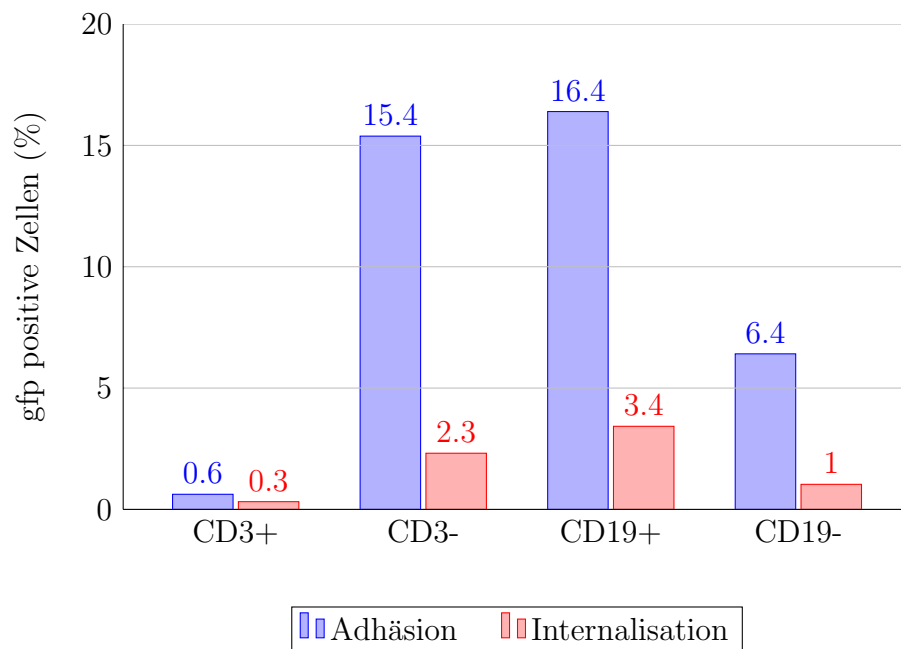


Abbildung 4.4: Nachweis von Adhäsion und Internalisation von *S. aureus* RN4220 gfp (OD 0,25) durch Lymphozytensubpopulationen mit Hilfe mono-klonaler Antikörper (CD3: T-Zell-Marker, CD19: B-Zell-Marker).



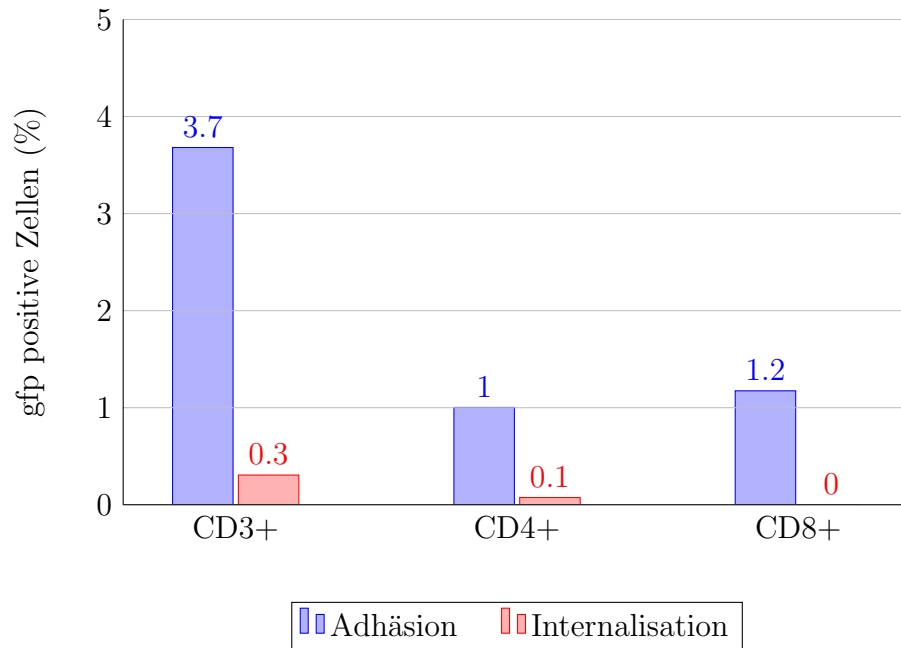


Abbildung 4.5: Nachweis von Adhäsion und Internalisation von *S. aureus* RN4220 gfp (OD 0,25) durch T-Helferzellen (CD4+) und T-Killerzellen (CD8+) mit monoklonalen Antikörpern.

Hingegen konnte die Adhäsion sowie zu einem geringeren Ausmaß auch die Internalisation von *S. aureus* RN4220 gfp durch die CD19-positiven B-Zellen deutlich gezeigt werden. Von den CD19 positiven Lymphozyten banden 16 % RN4220 gfp, 3 % der CD19-positiven Lymphozytensubpopulation internalisierten *S. aureus*, siehe Abbildung 4.4. Bei dem Vergleich der CD19 positiven und der CD3 negativen Lymphozytenpopulation wurde deutlich, dass sich die jeweiligen prozentualen Anteile in etwa entsprechen. Dies legte nahe, dass es sich hierbei um dieselbe Subpopulation handelt. Zusätzlich konnte durch die Verwendung von CD19 eine CD19-negative Population identifiziert werden, welche einen größeren prozentualen Anteil hatte als die CD3 positiven T-Zellen. Hierbei handelte es sich also nicht ausschließlich um T-Zellen, sondern um eine weitere Population, die *S. aureus* gfp binden und zu einem geringen Teil auch internalisieren konnte. Die genauere Abgrenzung dieser Population wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Durch Verwendung von monoklonalen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene CD4 und CD8 war es möglich, die T-Zellen weiter in die Subpopulationen der T-Helferzellen (CD4) und der T-Killerzellen (CD8) zu differenzieren. Hierbei wurde deutlich, dass sowohl die T-Helferzellen als auch die T-Killerzellen

## 4 Ergebnisse

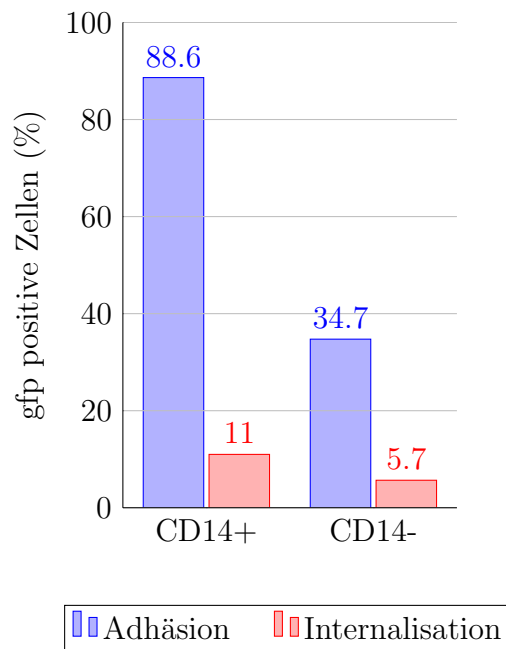


Abbildung 4.6: Adhäsion und Internalisation von *S. aureus* RN4220 gfp (OD 0,25) durch CD14 positive Monozyten und CD14 negative Monozyten.

*S. aureus* gfp in geringem Maße binden können. Keine der beiden Population zeigte jedoch die Fähigkeit zur Internalisation, siehe Abbildung 4.5.

Mit Hilfe der Antikörpermarkierung wurde der Anteil der CD14 positiven Monozyten an der Adhäsion und Internalisation ermittelt. Abbildung 4.6 zeigt auf, dass ca. 90 % der CD14 positiven Monozyten *S. aureus* gfp banden und ca. 10 % auch internalisierten. Aus der Quadrantenstatistik der Monozytenpopulation geht hervor, dass eine CD14 negative Subpopulation im Monozytengate *S. aureus* gfp adhärierte und ein geringer Teil dieser Subpopulation *S. aureus* auch internalisierte.

## 4.2 Kinetik der Adhäsion und Internalisation in Leukozyten

Nach der Testetablierung wurden die Zeitpunkte der maximalen Adhäsion und Internalisation analysiert. 23 % der Lymphozytenpopulation konnten sofort RN4220 gfp binden, diese Zahl verringerte sich innerhalb der folgenden 5 Minuten (13 % gfp pos. Zellen) um zum Zeitpunkt 15 Minuten wieder anzusteigen (19 % gfp pos. Zellen) und nach 60 Minuten wieder leicht zu fallen (16 % gfp pos. Zellen). Diese Daten zeigen, dass die Lymphozytenadhäsion in weniger als 5 Minuten abgeschlos-

## 4.2 Kinetik der Adhäsion und Internalisation in Leukozyten

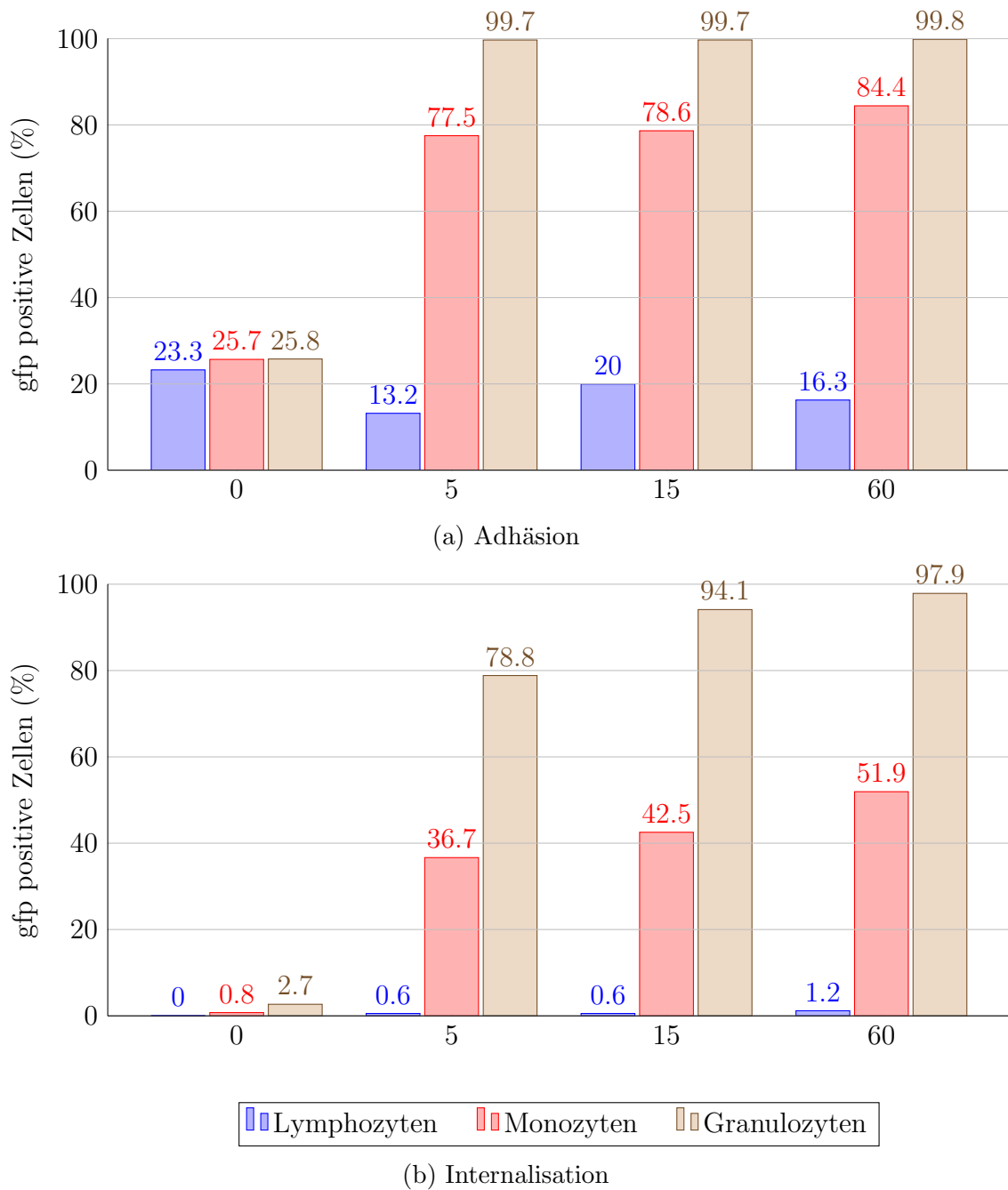


Abbildung 4.7: Adhäsions- und Internalisationskinetik von RN4220 gfp (OD 0,25). Die Adhäsion (a) und Internalisation (b) wird zu den Zeitpunkten 0, 5, 15, 60 Minuten untersucht; nach 5 Minuten ist die Adhäsion in weiten Teilen abgeschlossen, für die Analyse der Internalisation wird eine Inkubationszeit von 60 Minuten benötigt.

## 4 Ergebnisse

sen war (Abbildung 4.7 (a)). Bei der Analyse der Internalisation der Lymphozyten wurde deutlich, dass nur sehr wenige Lymphozyten RN4220 gfp aufnehmen konnten und dass die Internalisation der Bakterien durch die Lymphozyten mindestens eine Stunde benötigte, siehe Abbildung 4.7 (b).

Bei der Monozytenpopulation war zu erkennen, dass es innerhalb von 60 Minuten zu einer Steigerung des adhärierenden Monozytenanteils kam. Nach 5 Minuten hatten 77 % der Monozytenpopulation RN4220 gfp gebunden. Anschließend stieg dieser Wert nur noch leicht und annähernd linear auf 84 % gfp positiven Monozyten nach 60 Minuten an, Abbildung 4.7 (a). Die Zahl der Monozyten, die RN4220 internalisierten stieg innerhalb der ersten 5 Minuten signifikant von 3 % auf 36 % an. Nach 15 Minuten erhöhte sich diese Zahl auf 42 % und nach 60 Minuten auf 51 % gfp positive Monozyten. Wie schon bei der Adhäsion zeigte sich auch bei der Internalisation der Monozyten nach 5 Minuten Inkubation eine geringe, wenn auch stetige Zunahme der Zellen, die RN4220 gfp internalisierten, siehe Abbildung 4.7 (b). Das bedeutet, dass die Adhäsion und Internalisation der Monozyten gegenüber RN4220 bereits nach 5 Minuten in weiten Teilen abgeschlossen war.

Der Aufgabe der unspezifischen Immunabwehr entsprechend, konnten 100 % der Granulozyten bereits nach 5 Minuten RN4220 gfp adhärieren. Die Internalisation von RN4220 gfp durch die Granulozyten stieg kontinuierlich von ca. 80 % nach 5 Minuten auf 98 % nach 60 Minuten. Dies zeigt, dass nahezu alle Granulozyten RN4220 gfp banden und internalisierten.

Dieses Ergebnis zeigt, dass für eine Analyse der Adhäsion der drei Leukozytenpopulationen eine Inkubationszeit von 5 Minuten ausreicht. Für eine Internalisationsanalyse müssen die Proben 60 Minuten inkubiert werden um die maximale Internalisationskapazität zu erreichen.

### 4.3 Adhäsion und Internalisation verschiedener Stämme

Durch das in dieser Arbeit entwickelte Adhäsions- und Internalisationsassay war eine phänotypische Charakterisierung verschiedener *S. aureus* Laborstämme sowie klinischer Stämme möglich. Es konnte zwischen *S. aureus* Stämmen mit gesteigerter Adhäsion und Internalisation (LS1, RN4220) und *S. aureus* Stämme mit geringer Adhäsions- und Internalisationskapazität (Newman, Möckli) unterschieden werden, siehe Abbildung 4.8.

### 4.3 Adhäsion und Internalisation verschiedener Stämme

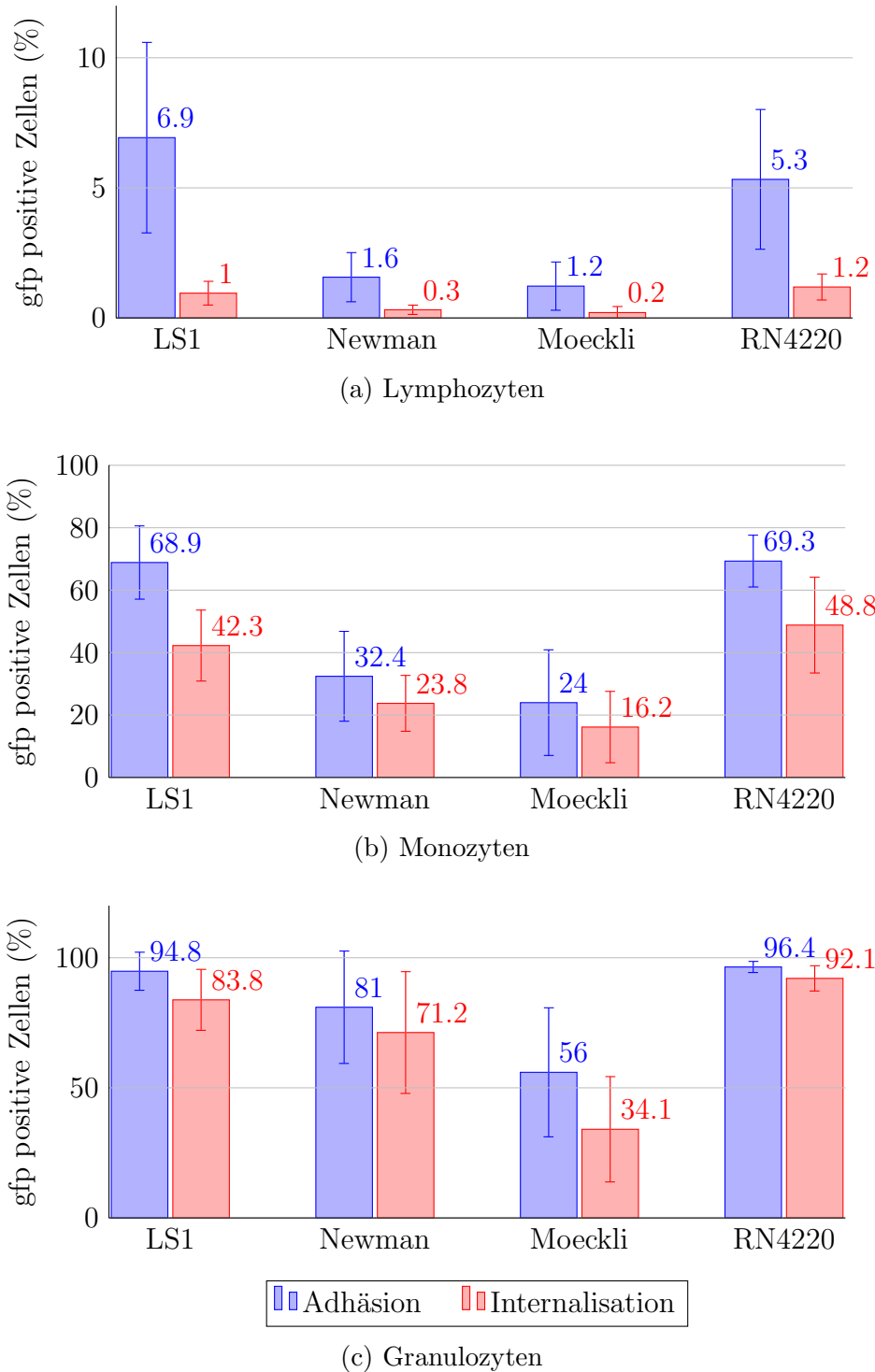


Abbildung 4.8: Vergleich der Adhäsion und Internalisation von *S. aureus* LS1 gfp, Newman gfp, Moeckli gfp, RN4220 gfp (OD 0,25) nach 60 Minuten Inkubation in Vollblut. LS1 gfp und RN4220 gfp werden durch die jeweilige Leukozytenpopulationen stärker gebunden und aufgenommen als Newman gfp und Moeckli gfp.

#### 4 Ergebnisse

Aus Abbildung 4.8 (a) ist ersichtlich, dass die Lymphozyten von den betrachteten *S. aureus*-Stämmen LS1 gfp am besten binden (6,9 % gfp positive Lymphozyten) konnten. Die Analyse der Internalisation zeigt, dass die Lymphozyten RN4220 gfp und LS1 gfp gleichermaßen gut internalisieren konnten. Gegenüber Möckli gfp wies die untersuchte Lymphozytenpopulation sowohl die geringste Adhäsions- als auch die geringste Internalisationskapazität auf.

Die Monozyten banden LS1 gfp und RN4220 gfp in gleicher Weise (LS1 gfp: 68 % gfp positive Monozyten, RN4220 gfp: 69 % gfp positive Monozyten), wobei RN4220 gfp von den Monozyten besser internalisiert wurde als LS1 gfp. 49 % der Monozytenpopulation nahmen RN4220 gfp auf. Im Vergleich dazu konnten 42 % der analysierten Monozytenpopulation LS1 gfp internalisieren. Auch gegenüber den Monozyten wies Möckli gfp von den vier untersuchten *S. aureus* Stämmen die geringste Adhäsionskapazität (24 % gfp positive Monozyten) und Internalisationskapazität (16 % gfp positive Monozyten) auf, siehe Abbildung 4.8 (b).

Die Granulozyten konnten, wie auch die Lymphozyten und Monozyten, am besten die Stämme RN4220 gfp und LS1 gfp binden. 96 % der Granulozytenpopulation banden RN4220 gfp und 94 % der analysierten Granulozytenpopulation banden LS1 gfp. Möckli gfp entzog sich der Adhäsion und Internalisation durch die Granulozyten von den untersuchten Stämmen am besten, siehe Abbildung 4.8 (c).

Unterschiede hinsichtlich der Adhäsions- und Internalisationskapazität fanden sich, nach 60 Minuten Koinkubation in humanem Vollblut, bei den Lymphozyten und Monozyten. Die Granulozyten wiesen hingegen keine signifikanten Unterschiede in der Adhäsions- und Internalisationskapazität auf. Dies kann auf ihre hohe unselektive phagozytotische Aktivität zurückgeführt werden. Allerdings zeigte sich auch hier ein Trend zur Differenzierung zwischen *S. aureus* Stämmen mit geringer und gesteigerter Adhäsions- und Internalisationskapazität.

Aufgrund des differierenden Adhäsions- und Internalisationsverhaltens der untersuchten Bakterienstämme wurde deutlich, dass sich bestimmte Bakterienstämme der zellulären Immunantwort besser entziehen können als andere. Hierbei handelte es sich bei den von uns untersuchten Stämmen um Newman gfp und Möckli gfp.

In der linearen Regressionsanalyse werden die Anzahl der durch die WBC gebundenen *S. aureus* gegen die internalisierten *S. aureus* aufgetragen. Die ermittelte Bestgerade zeigt bei den Monozyten und Granulozyten eine annähernd proportionale Steigung. Dies bedeutet, dass die Adhäsion und die Internalisation der hier analysierten *S. aureus* Stämme miteinander korrelierte. Hierdurch konnte gezeigt werden,

#### 4.4 Adhäsion und Internalisation zu verschiedenen Zeitpunkten

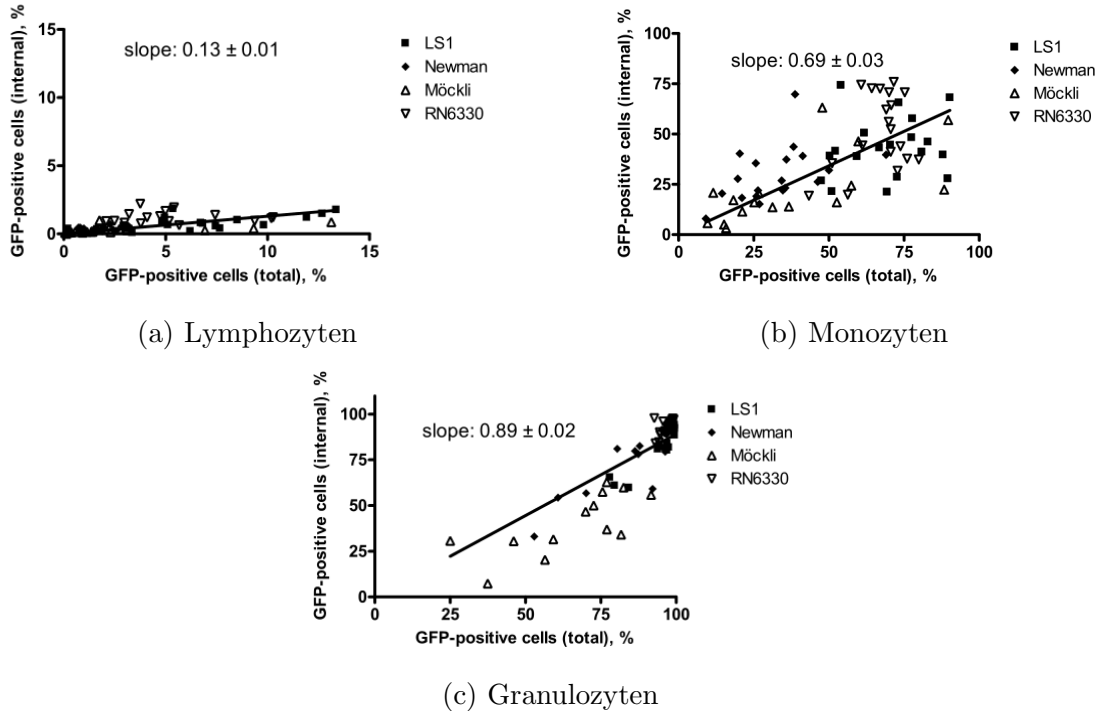


Abbildung 4.9: Lineare Regressionsanalyse. Korrelation zwischen der Adhäsion und Internalisation der Monozyten und Granulozytenpopulation.

dass die Bakterien die von den Leukozyten gebunden wurden auch von diesen internalisiert wurden. 89 % der Granulozyten und 69 % der Monozyten internalisierten die von ihnen gebundenen Bakterien auch.

Von der Population der Lymphozyten konnten 13 % der Zellen die Bakterien binden diese auch internalisieren. Die Korrelation zwischen Adhäsion und Internalisation der Granulozyten war bei Möckli gfp am geringsten. Dies bedeutet, dass Möckli gfp zwar gebunden wurde, sich aber dennoch der Internalisation durch die Granulozyten entziehen konnte (Abbildung 4.9 (a), (b), (c)).

#### 4.4 Adhäsion und Internalisation zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Adhäsion und Internalisation von LS1 gfp durch die jeweilige Leukozytenpopulation wurde zu unterschiedlichen Zeiten der Inkubation in Vollblut untersucht (Abbildung 4.10).

Die Analyse der Adhäsion von LS1 gfp durch Lymphozyten zeigte, dass nur das

#### 4 Ergebnisse

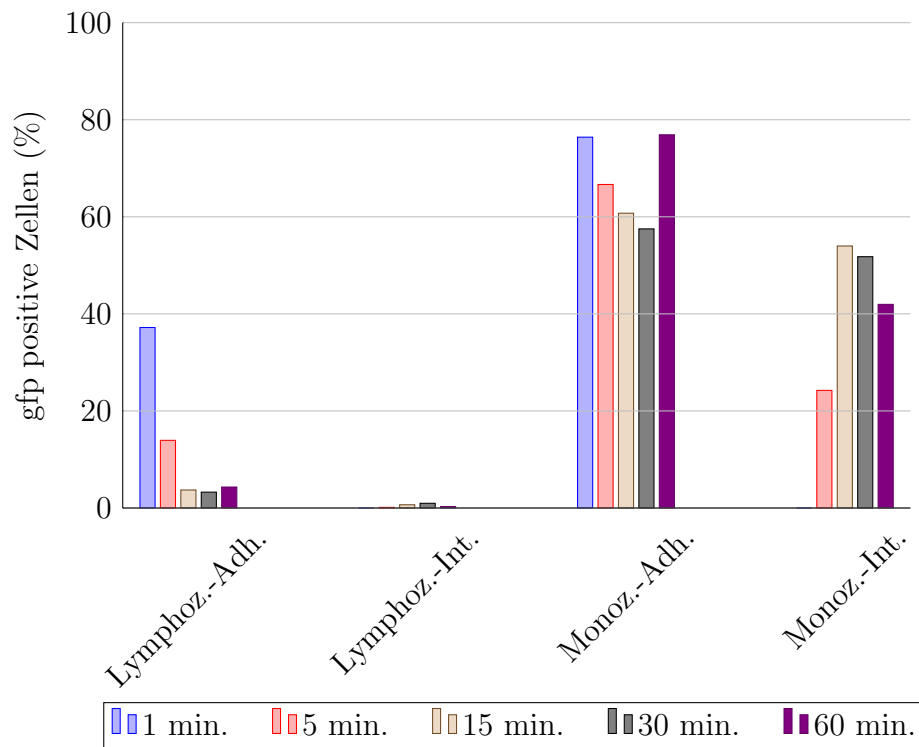


Abbildung 4.10: Kinetik der Adhäsion und Internalisation von LS1 gfp (OD 1,5) zu den Zeitpunkten 1, 5, 15, 30 und 60 Minuten .

langfristige Adhäsionsverhalten der "eigentlichen" immunologischen Aufgabe entspricht. Anfänglich (Zeitpunkt 1 Minute) zeigte sich eine unerwartet hohe, möglicherweise unspezifische, Bindung. Genauer konnte gezeigt werden, dass nach einer Minute Koinkubation mit humanem Vollblut 37 % der untersuchten Lymphozytenpopulation gfp positive *S. aureus* banden. Innerhalb der folgenden 60 Minuten reduzierte sich die Zahl der *S. aureus* gfp bindenden Lymphozyten. Nach 15 Minuten Inkubation hatte sich die Zahl der bindenden Lymphozyten auf 8 % reduziert. Nach 60 Minuten Inkubation sankt dieser Wert auf 4 %. Die Internalisation von LS1 gfp durch die Lymphozyten war auch nach 60 Minuten Inkubation in Vollblut gering (1 % gfp positive Lymphozyten).

Von der untersuchten Monozytenpopulation banden innerhalb der ersten Minute 76 % LS1 gfp. Nach 15 Minuten reduzierte sich die Zahl der gebundenen *S. aureus* gfp auf 60 %. Nach 60 Minuten Inkubation wurde ein erneutes Ansteigen der Adhäsionskapazität der Monozyten gegenüber LS1 gfp auf 76 % beobachtet. Die Internalisationskapazität der Monozyten gegenüber LS1 gfp betrug nach 5 Minuten etwa 25 % und erreichte nach 15 Minuten das Maximum von 53 % um anschließend wieder auf



#### 4.4 Adhäsion und Internalisation zu verschiedenen Zeitpunkten

etwa 42 % zu fallen.

Es wurde nun die Adhäsions- und Internalisationskinetik von LS1 gfp mit der entsprechenden Kinetik weiterer gfp positiver *S. aureus* Stämme verglichen (Abbildung 4.11).

**RN6390.** Bei der Analyse der Adhäsion und Internalisation von RN6390 gfp (Abbildung 4.11 (a)) zeigte sich, dass nach einer Minute Inkubation mit Vollblut 19 % der Lymphozyten RN6390 gfp binden. Die Bindungskapazität stieg nach 15 Minuten Inkubation um weitere 6 %-Punkte auf 26 % an, nach 60 Minuten sinkt diese auf 6 % ab. Eine Internalisationstendenz war erst nach 15 Minuten Inkubation in Vollblut zu beobachten (2 %), welche im weiteren zeitlichen Verlauf unverändert blieb.

Die Bindungskapazität der Monozyten gegenüber RN6390 gfp nahm innerhalb der ersten 15 Minuten zu. Nach einer Minute banden 29 % der Monozyten RN6390 gfp. Die Adhäsion stieg zum Zeitpunkt 15 Minuten auf 70 % RN6390 gfp bindende Monozyten an. Dieser Wert blieb nach 60 Minuten Inkubation annähernd konstant. Eine Internalisation von RN6390 gfp durch die Monozyten konnte nach 15 Minuten beobachtet werden, wobei die Internalisation von RN6390 gfp durch die Monozytenpopulation von 55 % zum Zeitpunkt 15 Minuten auf 45 % RN6390 gfp bindende Monozyten nach einer Stunde Inkubation sank.

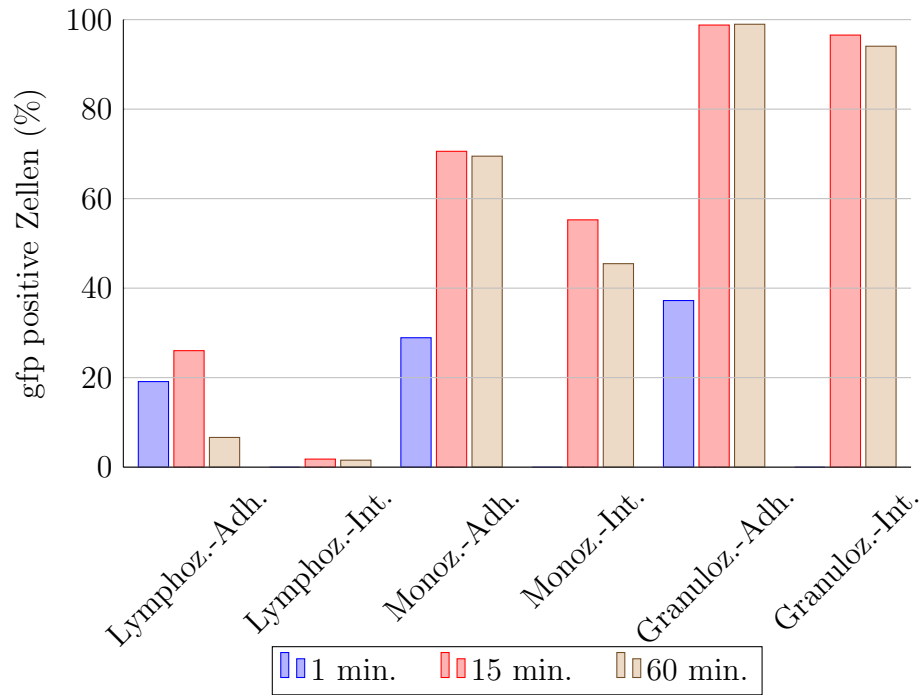
Die Adhäsion von RN6390 gfp durch die Granulozyten wies innerhalb der ersten 15 Minuten der Inkubation steigende Werte auf. Nach einer Minute banden 37 % der Granulozyten RN6390 gfp, nach 15 Minuten Inkubation kam es zu einer Steigerung dieses Werts auf 98 % und blieb im weiteren Verlauf konstant.

Die Analyse der Internalisation von RN6390 gfp durch die Granulozyten zeigte, dass nach 15 Minuten Inkubation in Vollblut 96 % der Granulozyten RN6390 gfp aufnehmen konnten. Die Zahl der internalisierten Bakterien zu späteren Messzeitpunkten konnte im Rahmen der Messgenauigkeit als konstant angesehen werden.

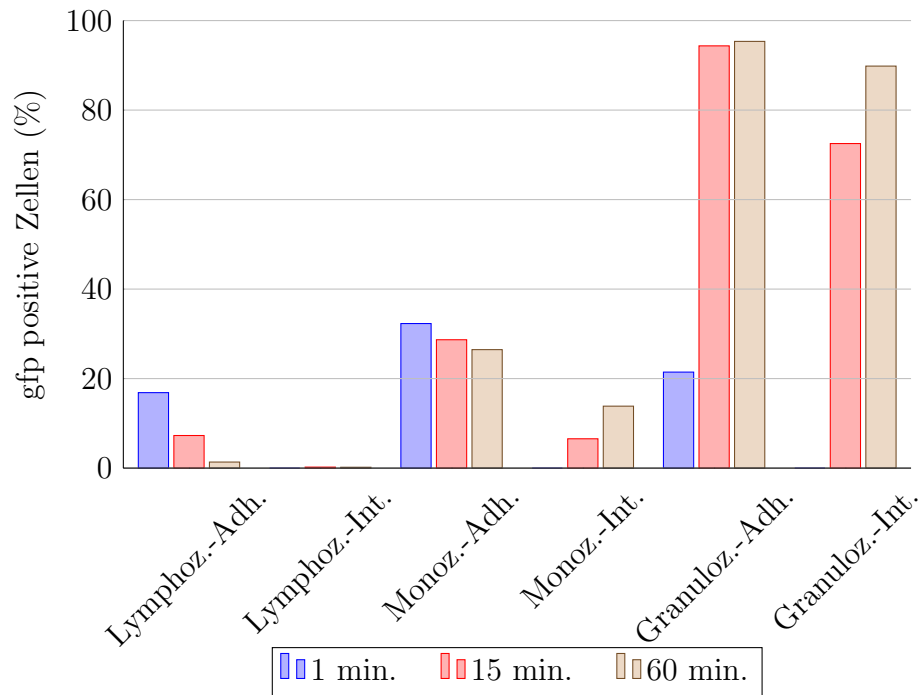
**Newman.** Die Adhäsion von Newman gfp durch die Lymphozyten nahm im gemessenen Zeitraum ab. Nach einer Minute banden 17 % der Lymphozyten Newman gfp. Dieser Wert fiel nach 15 Minuten auf 7 %, und sank nach 60 Minuten Inkubation auf 1 %. Wie bei RN6390 gfp wurde bei Newman gfp zu keinem der analysierten Zeitpunkte eine Internalisation durch Lymphozyten gemessen (siehe Abbildung 4.11 (b)).

Nach einer Minute Inkubationszeit banden 32 % der Monozyten Newman gfp. Die

#### 4 Ergebnisse



(a) RN6390



(b) Newman

Abbildung 4.11: Adhäsions- und Internalisationskinetik weiterer Laborstämme und klinischer Isolate. Die Adhäsion und Internalisation von RN4220 gfp, RN6390 gfp, Möckli gfp und Newman gfp (OD 1,5) wird zu den Zeitpunkten 1, 15 und 60 Minuten untersucht. Es zeigt sich ein qualitativ identisches Verhalten der Adhäsion und Internalisation von Möckli gfp und Newman gfp.

#### 4.4 Adhäsion und Internalisation zu verschiedenen Zeitpunkten

Zahl der durch die Monozyten gebundenen *S. aureus* Newman gfp fiel zum Zeitpunkt 15 Minuten auf 29 % und sank nach 60 Minuten erneut auf 26 %. Die Zahl der Monozyten die *S. aureus* Newman gfp internalisieren stieg von 7 % zum Zeitpunkt 15 Minuten auf 14 % zum Zeitpunkt 60 Minuten. Nach einer Minute konnte keine Internalisation von Newman gfp durch die Monozyten beobachtet werden (Abbildung 4.11 (b)).

Die Zahl der Granulozyten, die Newman gfp banden, stieg im zeitlichen Verlauf an. In der ersten Minute banden 21 % der Granulozyten Newman gfp. In den folgenden 15 Minuten war ein Anstieg der Adhäsion auf 94 % gfp positive Granulozyten zu beobachten. Nach 60 Minuten Inkubation in Vollblut blieb der Wert annähernd konstant mit 95 % *S. aureus* bindenden Granulozyten. Auch die Zahl der Granulozyten, die Newman gfp internalisierten, stieg von 73 % zum Zeitpunkt 15 Minuten auf 90 % zum Zeitpunkt 60 Minuten an. Eine Internalisation konnte, wie schon bei den zuvor untersuchten *S. aureus* Stämmen, nach einer Minute Inkubation nicht beobachtet werden, siehe Abbildung 4.11 (d).

Zusammenfassend zeigte sich bei der Analyse der Adhäsionskinetik der einzelnen *S. aureus* Stämme durch die Lymphozyten die Tendenz zur Abnahme der Bindungskapazität innerhalb der analysierten 60 Minuten. Bei der Adhäsion der *S. aureus* Stämme durch die Monozyten konnte zwischen LS1 gfp und Newman gfp unterschieden werden. Zwar nahm die Anzahl der von den Monozyten gebundenen *S. aureus* gfp nach 15 Minuten Inkubation ab, allerdings stieg die Zahl der Monozyten die LS1 gfp binden nach 60 Minuten wieder an, wohingegen es bei der Adhäsion von Newman gfp zu einer konstanten Abnahme der Bindungskapazität zu diesem Zeitpunkt kam.

Die Zahl der Granulozyten die LS1 gfp gebunden haben zeigte eine konstante Zunahme innerhalb der analysierten 60 Minuten. Die Adhäsion RN6390 gfp und Newman gfp durch die Granulozytenpopulation unterschied sich hiervon insofern, als das zwar auch innerhalb der ersten 15 Minuten eine Steigerung der Adhäsion beobachtet wurde, es aber nach diesen ersten 15 Minuten zu einer Stagnation der Bindungskapazität kam.

Die Adhäsion von RN6390 gfp durch die Leukozytenpopulationen war nicht in eine dieser zwei Gruppen einzuordnen. Die Lymphozyten banden bis zur 15 Minuten eine steigende Anzahl von RN6390 gfp, danach fiel die Zahl der adhärenierten *S. aureus* unter den Ausgangswert von einer Minute. Die Monozyten und Granulozyten wiesen

gegenüber RN6390 gfp die gleiche Adhäsionskinetik auf. Bis zur 15 Minute nahm die Zahl der Zellen dieser beiden Leukozytenpopulationen die RN6390 gfp binden zu. Zum Zeitpunkt 60 Minuten zeigte sich im Vergleich zum Wert nach 15 Minuten eine Stagnation der Adhäsionskapazität.

### 4.5 Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsion

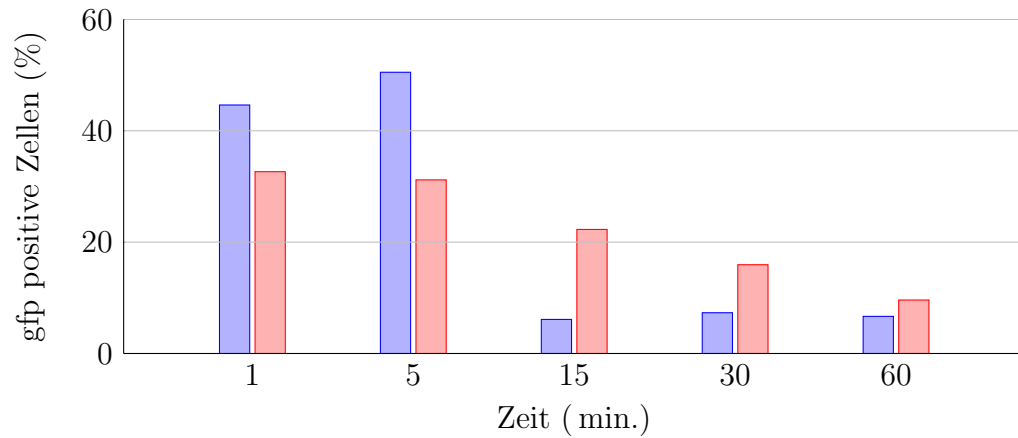
Um den Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsion zu untersuchen, wurde der *S. aureus* Stamm LS1 gfp vor der Inkubation mit Vollblut, mit Trypsin inkubiert. Trypsin spaltet die mit der Zellwand verankerten Proteine, die auch als *Microbial Surface Components Recognizing Adhesiv Matrix Molecules* (MSCRAMMs) bezeichnet werden proteolytisch. Aufgrund der kurzen Inkubationszeit der Bakterien mit Trypsin wurde eine Schädigung der Zellen vermieden und nur die extrazellulären Proteine wurden gespalten.

Wie aus Abbildung 4.12 deutlich zu erkennen ist, wurden nach einer und nach fünf Minuten Inkubation deutlich weniger oberflächenproteindefiziente *S. aureus* (LS1 gfp + Trypsin) durch die Lymphozyten gebunden, als dies durch die unbehandelten *S. aureus* (LS1 gfp) möglich war. Ein identisches Bild zeigte sich auch bei der Analyse der Monozyten und Granulozyten.

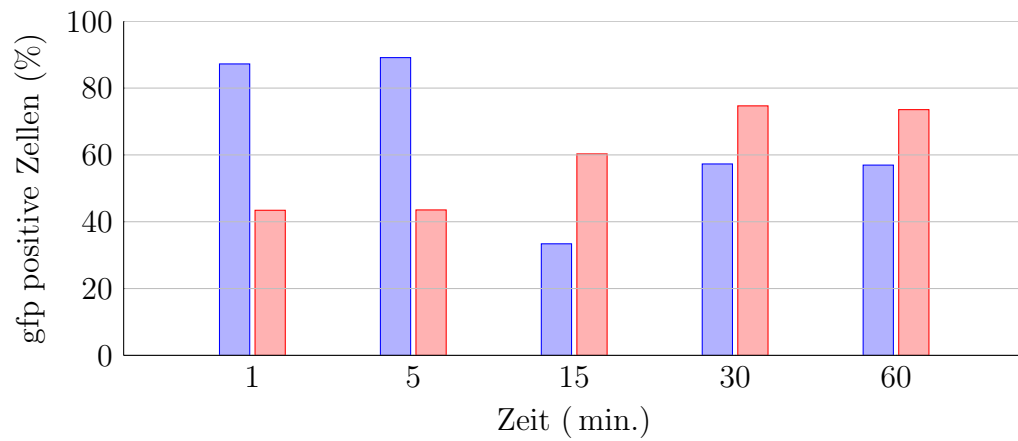
29 % der untersuchten Lymphozytenpopulation wurden nach einer Minute von den oberflächenproteindefizienten *S. aureus* (LS1 gfp + Trypsin) gebunden. 39 % der Lymphozyten banden zu diesem Zeitpunkt unbehandelte *S. aureus* (LS1 gfp). Nach 15 Minuten stieg die Lymphozytenadhäsionskapazität der oberflächenproteindefizienten *S. aureus* (LS1 gfp + Trypsin) im Vergleich der unbehandelten *S. aureus* (LS1 gfp) an. 14 % der Lymphozytenpopulation banden zu diesem Zeitpunkt oberflächenproteindefiziente *S. aureus* des Stammes LS1 gfp, die unbehandelten Bakterien dieses Stammes wurden von 8 % der Lymphozytenpopulation gebunden, siehe Abbildung 4.12 (a).

81 % der Monozytenpopulation banden nach einer Minute *S. aureus* LS1 gfp, wohingegen oberflächenproteindefiziente *S. aureus* LS1 gfp von 59 % der Monozyten gebunden wurden. Zum Zeitpunkt 15 Minuten banden mehr Monozyten oberflächenproteindefiziente *S. aureus* (LS1 gfp + Trypsin) als native *S. aureus* (LS1 gfp). Die oberflächenproteindefiziente *S. aureus* (LS1 gfp + Trypsin) wurden von 62 % der analysierten Monozytenpopulation gebunden, wohingegen 44 % der Monozyten die

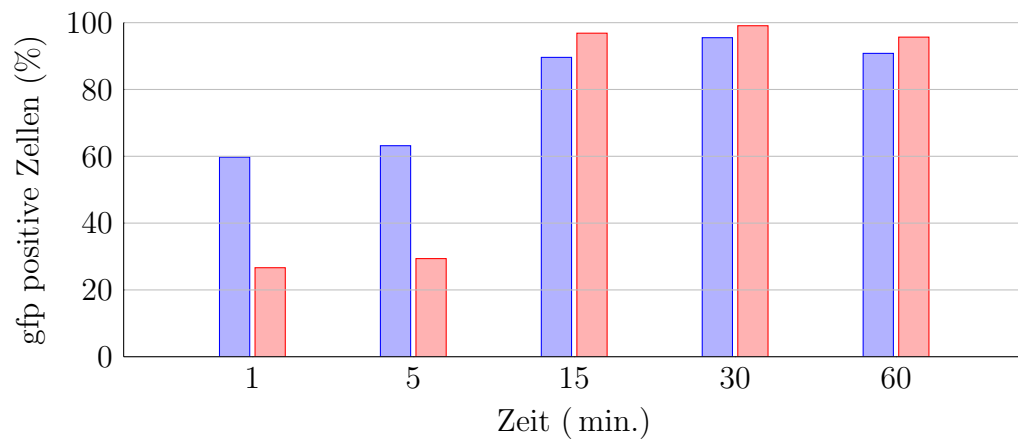
#### 4.5 Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsion



(a) Lymphozyten



(b) Monozyten



■ ohne Trypsin    ■ mit Trypsin

(c) Granulozyten

Abbildung 4.12: Adhäsion von *S. aureus* LS1 gfp (OD 1,5) durch die Lymphozyten (a), Monozyten (b) und Granulozyten (c) zu verschiedenen Zeitpunkten unter dem Einfluss von Trypsin (5 Minuten). Unter dem Einfluss von Trypsin zeigt sich eine Reduktion der frühen Adhäsion.

#### 4 Ergebnisse

nicht zuvor mit Trypsin behandelten *S. aureus* (LS1 gfp) banden. Nach 60 Minuten Inkubation wiesen die untersuchten Monozyten eine höhere Adhäsion gegenüber den oberflächenproteindefizienten *S. aureus* (LS1 gfp + Trypsin) als gegenüber den nativen *S. aureus* (LS1 gfp) auf, siehe Abbildung 4.12 (b).

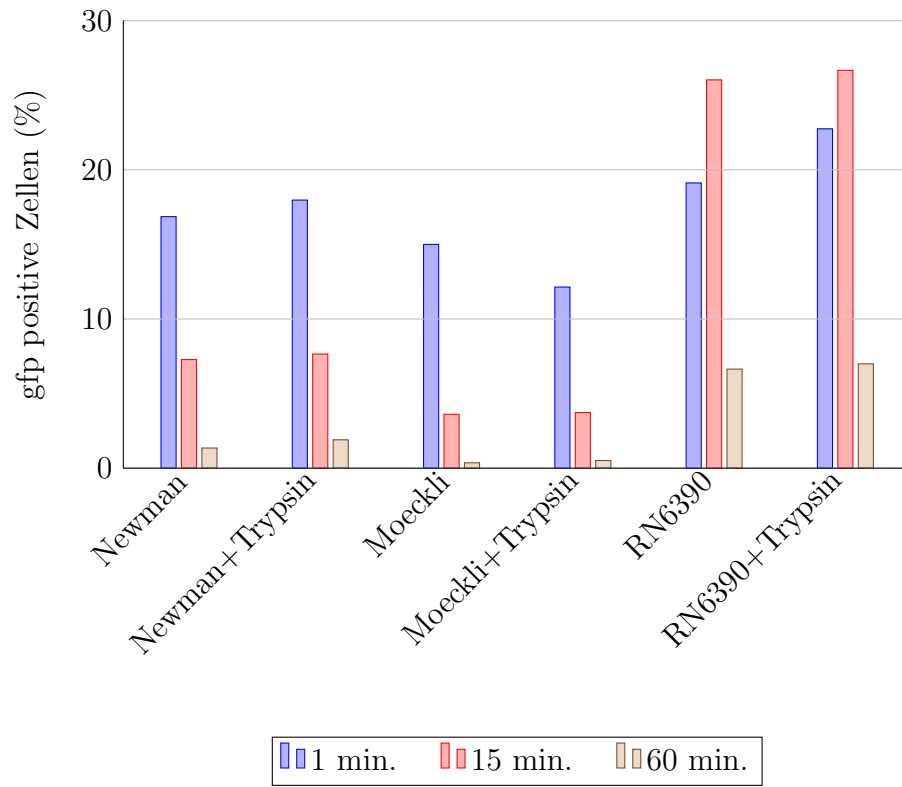
Des Weiteren zeigte sich, dass es bei der Interaktion zwischen den Monozyten und den nativen *S. aureus* (LS1 gfp) zu dem frühen Zeitpunkt der Inkubation (eine Minute) zu einer höheren Adhäsion kam als zu den späteren analysierten Zeitpunkten der Inkubation. Diese Adhäsionskinetik wiesen die oberflächenproteindefizienten *S. aureus* (LS1 gfp + Trypsin) nicht auf. Innerhalb der untersuchten 60 Minuten stieg die Zahl der Monozyten, die *S. aureus* (LS1 gfp + Trypsin) binden, leicht und konstant an.

Bei der Adhäsion von LS1 gfp an die Granulozyten zeigte sich nach einer Minute Inkubation nur ein geringer Unterschied zwischen den zuvor mit Trypsin behandelten *S. aureus* (LS1 gfp + Trypsin) und den nativen *S. aureus* (LS1 gfp). Nach 15 Minuten stieg die Adhäsion der mit Trypsin behandelten *S. aureus* im Vergleich zu den unbehandelten Bakterien an. Zu diesem Zeitpunkt banden 88 % der Granulozytenpopulation LS1 gfp, 97 % der Granulozyten binden oberflächenproteindefiziente *S. aureus* (LS1 gfp). Nach 60 Minuten Inkubation in Vollblut nahm die Adhäsionskapazität der Granulozyten sowohl gegenüber den mit Trypsin vorinkubierten *S. aureus* (92 %) als auch den nativen *S. aureus* vom Stamm LS1 gfp (79 %) leicht ab, siehe Abbildung 4.12 (c).

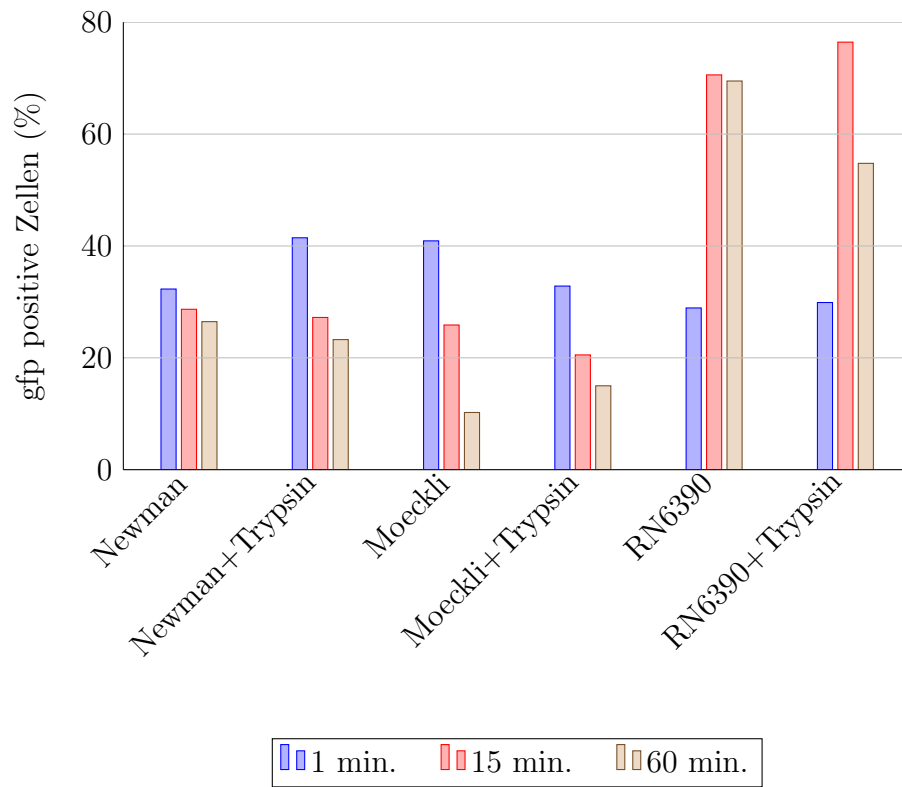
Zusammenfassend war ein Trend zur Reduktion der frühen Adhäsionsfähigkeit der Leukozyten durch die Lyse der bakteriellen Oberflächenproteine mit Trypsin festzustellen. Die Abnahme der Adhäsionsfähigkeit zeigte sich vor allem bei der Adhäsion der Monozyten und Lymphozyten. Dies legt nahe, dass die frühe Adhäsion von LS1 gfp an die Lymphozyten und Monozyten zu großen Teilen durch die zellwandassoziierten Proteine bestimmt wird. Nach 15 Minuten Inkubation zeigte sich, dass durch das Fehlen der zellwandgebundenen Adhäsine die Bindung von LS1 gfp an die Lymphozyten und Monozytenpopulation scheinbar begünstigt zu werden scheint. Dieser Effekt zeigte sich auch, jedoch in geringerer Ausprägung bei den analysierten Granulozyten.

Im Folgenden soll der Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsion weiterer *S. aureus* gfp Laborstämme und klinischer Isolate untersucht werden.

#### 4.5 Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsion



(a) Lymphozyten



(b) Monozyten

## 4 Ergebnisse

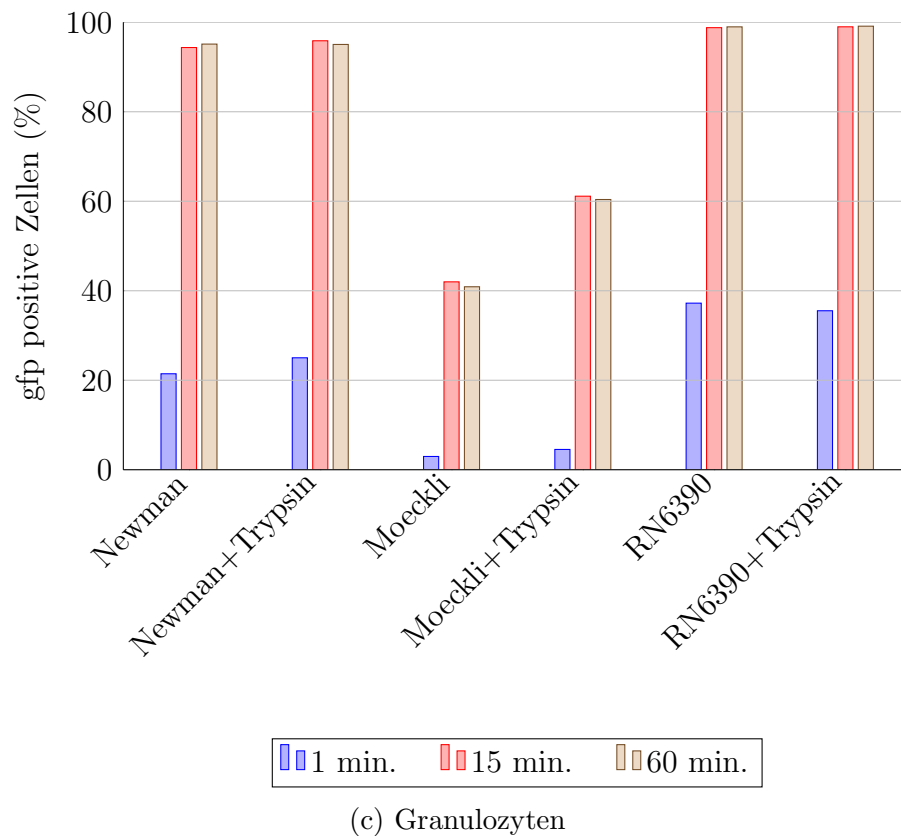


Abbildung 4.13: Vergleich der Adhäsion von Newman gfp, Möckli gfp, RN6390 gfp und RN4220 gfp (OD 1,5) durch Lymphozyten (a), Monozyten (b) und Granulozyten (c) unter dem Einfluss von Trypsin (5 Minuten) zu den Zeitpunkten 1, 15 und 60 Minuten. Bei Möckli gfp und RN4220 gfp zeigt sich eine Abnahme der frühen Adhäsionskapazität.



#### 4.5 Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsion

**Newman.** Bei der Analyse des Bindungsverhaltens von Newman gfp durch die verschiedenen Leukozytenpopulationen zeigte sich bei den Lymphozyten und Granulozyten kein Einfluss durch das Fehlen von bakteriellen Oberflächenproteinen. Lediglich bei der Monozytenpopulation zeigte sich bei der frühen Adhäsion (1 Minute) eine Zunahme der Bindungskapazität der oberflächenproteindefizienten *S. aureus*.

**Möckli.** Hier zeigte sich bei der Lymphozytenpopulation eine leichte Abnahme der frühen Bindungskapazität (1 Minute) von 15 % auf 12 %. Zu den weiteren untersuchten Zeitpunkten blieb die Adhäsion der Lymphozyten unbeeinflusst. Die Bindungskapazität durch die Monozyten nahm durch den Trypsinverdau nach einer Minute um 8 %- Punkte sowie nach 15 Minuten um 5 %- Punkte ab. Bei den Granulozyten zeigte sich zu den späteren Zeitpunkten (15, 60 Minuten) eine Steigerung der Adhäsionskapazität um 19 %- Punkte.

**RN6390.** Bei der Analyse der Adhäsion von RN6390 gfp zeigte sich, bis auf ein Ansteigen der Adhäsionskapazität von Lymphozyten und Monozyten gegenüber oberflächenproteindefizienten *S. aureus* zum Zeitpunkt 15 Minuten kein weiterer Einfluss des Trypsinverdaus.

Insgesamt ist festzustellen, dass das Adhäsionsverhalten der in dieser Arbeit untersuchten *S. aureus* Stämme durch den Trypsinverdau in unterschiedlicher Weise beeinflusst wurde.

Bei dem Stamm Möckli gfp wirkte sich das Fehlen der Oberflächenproteine mit einer leichten Abnahme der Adhäsion durch die Lymphozyten und Monozyten zum Zeitpunkt 1 Minute aus. Dieses Verhalten konnte auch schon bei der Analyse der Adhäsion von LS1 beobachtet werden. Ebenfalls konnte eine Reduktion der Adhäsionskapazität der Lymphozyten und Monozyten nach 15 Minuten bei Möckli gfp beobachtet werden. Dieses Verhalten zeigte sich nicht bei der Analyse von LS1 gfp. Eine Abnahme der Adhäsionskapazität bei oberflächenproteindefizienten Bakterien konnte bei den Stämmen Newman und RN6390 nicht beobachtet werden. Dies legt nahe, dass der Einfluss von Oberflächenproteinen auf die Adhäsion stammabhängig ist und insbesondere die frühe Bindung beeinflusst.

## 4.6 Einfluss von eap

Als weiterer Einflussfaktor auf die Adhäsion und die Internalisation verschiedener *S. aureus*-Stämme durch die WBC wurde der sezernierte Virulenzfaktor eap untersucht. Um eine mögliche Beeinflussung der Adhäsion durch eap zu untersuchen, wurde eap zusammen mit dem humanen Vollblut und der jeweiligen *S. aureus* Suspension inkubiert.

Nach 60 Minuten Inkubation in Vollblut wurde die späte Adhäsions- und Internalisationsphase von Möckli gfp und RN4220 gfp durch eap nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 4.14).

Auch wurde kein Einfluss von eap auf die späte Adhäsions- und Internalisationsphase der Lymphozyten und der Granulozyten gegenüber RN6390 gfp gesehen, siehe Abbildung 4.14 (a), (c). Nach 60 Minuten Inkubation in Vollblut war eine Abnahme der Adhäsions- und Internalisationskapazität, von 61 % auf 54 % beziehungsweise von 57 % auf 48 % gfp positive Monozyten, gegenüber RN6390 gfp durch den Einsatz von eap festzustellen, siehe Abbildung 4.14 (b).

Die späte Adhäsionsphase von Newman gfp an die Leukozytenpopulationen wurde nach 60 Minuten Inkubation in Vollblut nicht durch die Anwesenheit von eap beeinflusst.

Auch die Internalisation von Newman gfp durch die Lymphozyten- und Granulozytenpopulation blieb von eap unbeeinflusst. Hingegen sank die Zahl der von den Monozyten internalisierten *S. aureus* Newman gfp nach der Zugabe von eap um 7 %-Punkte.

In der späten Adhäsionsphase von LS1 gfp an die Monozyten bewirkte der Einsatz von eap einen Rückgang der *S. aureus* bindenden Monozyten von 63 % auf 54 %. Ein Einfluss von eap auf die Bindung von LS1 gfp an die Lymphozyten- beziehungsweise die Granulozytenpopulation zeigte sich nicht, siehe Abbildung 4.14 (a) und (c).

Auf die Internalisation von LS1 konnte kein Einfluss durch die Zugabe von eap nachgewiesen werden. In der späten Adhäsionsphase wurde ein Trend zur Reduktion der Adhäsion von LS1 gfp durch die Lymphozyten deutlich (Abbildung 4.14 (a)).

Insgesamt konnte jedoch bei den hier durchgeführten Arbeiten kein einheitlicher Einfluss von eap auf die Adhäsion und Internalisation festgestellt werden.

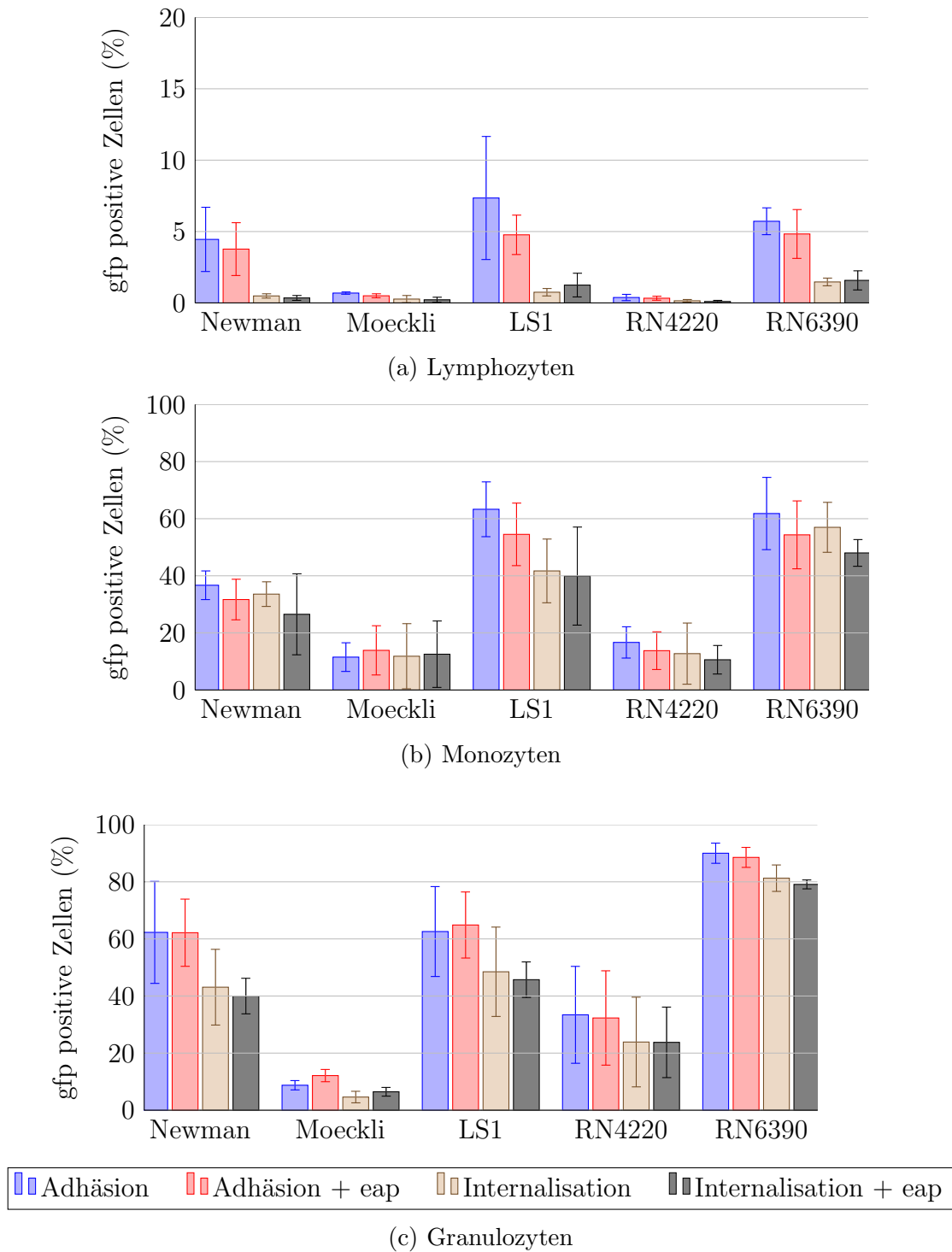


Abbildung 4.14: Einfluss von eap auf die Adhäsion und Internalisation. Vergleich der Adhäsion und Internalisation der *S. aureus* Stämme Newman gfp, Möckli gfp, RN4220 gfp, RN6390 gfp unter dem Einfluss von eap (Endkonzentration: 10  $\mu$ g/ml) nach 60 Minuten Inkubation in Vollblut.

## 4.7 Adhäsion von *S. aureus* in verschiedenen Wachstumsphasen

Im Folgenden wurde der Einfluss verschiedener bakterieller Wachstumsphasen auf die Adhäsion von *S. aureus* gfp Stämme durch WBC untersucht. Hierzu wurde die Adhäsion von *S. aureus* gfp, der sich in der exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase) befindenden mit der Adhäsion der sich in der postexponentiellen Wachstumsphase (lag-Phase) befindenden *S. aureus* gfp verglichen.

In der exponentiellen Phase (4 Stunden Kultur) findet die Synthese der Oberflächenproteine statt. Auch hat zu diesem Zeitpunkt eine mögliche Kapselbildung, die ebenfalls Einfluss auf die Adhäsion der Bakterienpopulation hat, noch nicht stattgefunden.

Die postexponentielle Phase (Übernachtskultur), welche die Übergangsphase zwischen der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase darstellt, ist durch die Bildung von Toxinen und Exotoxinen gekennzeichnet. Die Bakterienstämme, die in der Lage zur Kapselbildung sind, verfügen zu diesem Zeitpunkt über eine Kapsel.

Die Differenz zwischen der Adhäsion der Lymphozyten und den jeweiligen sich in der exponentiellen (4h-Kultur) und in der postexponentiellen Wachstumsphase befindenden *S. aureus* gfp fiel gering aus. Von den in dieser Arbeit untersuchten *S. aureus* gfp Stämmen wurden jeweils die sich in der Übernachtskultur befindenden *S. aureus* gfp in größerem Ausmaß durch die Lymphozyten gebunden. Am deutlichsten wurde die Differenz bei der Bindung von Newmann gfp an die Lymphozyten. Annähernd 3 % der Lymphozytenpopulation banden die Übernachtskultur, wohingegen 1 % der untersuchten Lymphozyten *S. aureus* gfp der 4-h Kultur banden (Abbildung 4.15 (a)). Die geringste Differenz der Adhäsionsfähigkeit zwischen den beiden Wachstumsphasen wurde bei dem *S. aureus*-Stamm RN4220 gfp beobachtet.

Die Übernachtskultur (postexponentielle Wachstumsphase) von RN4220 gfp wurde von 24 % der Monozyten gebunden, wohingegen die entsprechende 4-h Kultur von 13 % der Monozytenpopulation gebunden wurde. Der deutlichste Unterschied zwischen der Adhäsion der 4-h Kultur und der Übernachtskultur war bei der Bindung des *S. aureus* Stammes Newman an die Monozyten zu finden. Hier binden 43 % der Monozyten die Übernachtskultur (postexponentielle Phase), 13 % der Monozyten haben *S. aureus*, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase (4-h Kultur) befinden, gebunden, siehe Abbildung 4.15 (b).

Auch die Granulozyten banden die sich in der postexponentiellen Wachstumspha-

#### 4.7 Adhäsion von *S. aureus* in verschiedenen Wachstumsphasen

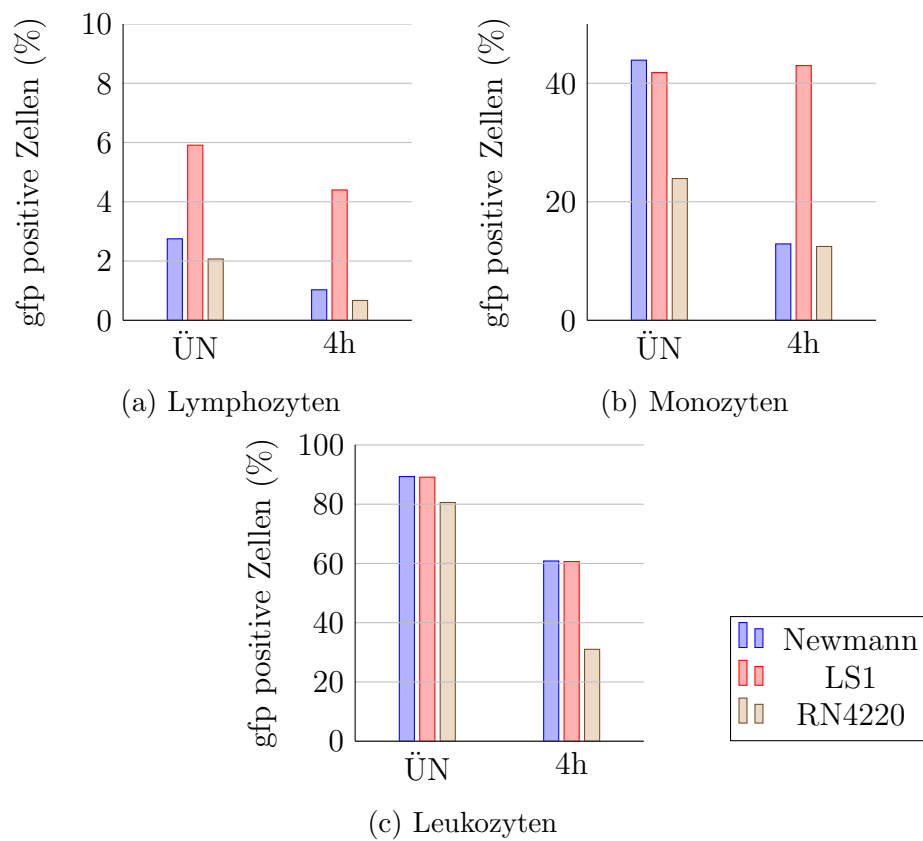


Abbildung 4.15: Vergleich der Adhäsion der sich in der exponentiellen Wachstumsphase (4 Stunden-Kultur) befindenden *S. aureus* gfp mit den sich in der postexponentiellen Wachstumsphase (Übernachtskultur) befindenden *S. aureus*.

#### 4 Ergebnisse

se (Übernachtskultur) befindenden Bakterien des jeweiligen *S. aureus* gfp Stammes in höherem Ausmaß als die jeweiligen sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindenden *S. aureus* gfp Stämme. Dies galt für alle in dieser Arbeit untersuchten *S. aureus* Stämme, wobei die Differenz zwischen dem Ausmaß der Adhäsion der Übernachtskultur und der 4h- Kultur bei RN4220 gfp am größten war. 81 % der untersuchten Granulozytenpopulation haben die Übernachtskultur von RN4220 gfp gebunden, 31 % der Granulozyten banden an die 4h Kultur. Die jeweilige Übernachtskultur der *S. aureus* Stämme Newman und LS1 wurden von 90 % der Granulozytenpopulation gebunden, 60 % der Granulozyten banden die entsprechende 4h Kultur. (Abbildung 4.15 (c)).

Insgesamt war kein adhäsionshemmender Einfluss einer möglichen Kapselexpression bei dem in vorliegender Arbeit untersuchten *S. aureus* Stämme in der postexponentiellen Wachstumsphase festzustellen. Bei der Adhäsion von *S. aureus* an die Lymphozyten war der Einfluss der Wachstumsphase zu vernachlässigen. Auch war kein Einfluss der Wachstumsphase auf die Adhäsion von LS1 gfp an die Monozytenpopulation sichtbar. In allen weiteren Fällen wurden die sich in der postexponentiellen Wachstumsphase befindenden *S. aureus* in höherem Umfang an die jeweiligen Leukozytenpopulationen gebunden. Daher wurde der Einfluss der Wachstumsphasen sowie eine mögliche Kapselexpression auf die Adhäsion der WBC als eher gering eingeschätzt.

## 5 Diskussion

Die Pathogenese einer *S. aureus* Infektion wird durch die Interaktion der Bakterien mit den jeweiligen Wirtszellen beeinflusst. Auf der einen Seite stellt *S. aureus* ein Pathogen dar, welches in der Lage ist, eine Immunantwort des jeweiligen Wirtsmechanismus hervorzurufen. Auf der anderen Seite kann *S. aureus* in die jeweiligen Wirtszellen eindringen, intrazellulär überleben und sich damit der Immunantwort des Wirtes entziehen und chronische Infektionen hervorrufen (Kubica et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein in vitro Vollblutassay zur quantitativen durchflusszytometrischen Analyse der Adhäsion und Internalisation von *S. aureus* durch professionelle und nicht-professionelle Phagozyten entwickelt. Das Assay erlaubt die Analyse von Adhäsion und Internalisation in derselben Probe. Bisherige Arbeiten, in welchen Vollblutassays zur Anwendung kamen, fokussieren sich auf die Untersuchung der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten, wie etwa (White-Owen et al. 1992) oder (Martin & Bhakdi 1992). Eine Differenzierung in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten bei gleichzeitiger Analyse der Adhäsion und Internalisation von *S. aureus* erfolgte nach bestem Kenntnis des Autors bisher noch nicht. Weiterhin konnte durch die Verwendung monoklonaler Antikörper eine Differenzierung der Leukozyten in ihre Subpopulationen erreicht werden (CD14: Monozyten Marker, CD3: T-Zell Marker, CD 19: B-Zell Marker, CD 4: T-Helferzell Marker, CD8: T-Killerzell Marker).

Durch die Koinkubation von vitalen *S. aureus* Stämmen mit Vollblut entfiel die Leukozytenseparation und die Kostimulation und es ergibt sich die Möglichkeit, diese in ihrem nativen Umfeld zu untersuchen. Eine Modifikation der Zellmorphologie und -funktionalität, wie sie etwa bei einer Dichtegradientenzentrifugation möglich ist, konnte damit vermieden werden (White-Owen et al. 1992). Ebenso wird durch den Entfall der Isolierungsschritte eine Degranulation der intrazellulären Granula und eine damit verbundene erhöhte Expression von Komplement-Rezeptoren minimiert. Bei einer Kostimulation mit Opsoninen kann es durch eine notwendige Zugabe von Serum oder Plasma zu einem Übermaß an Opsoninen kommen, was zu einer

## 5 Diskussion

Störung der Bindungskapazität führt (Nuutila & Lilius 2005). Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Assay dient das Plasma als natürliches Opsonin. Zusammenfassend ist daher anzunehmen, dass das vorliegende Verfahren die pathophysiologische Situation exakter widerspiegelt als bisherige Vollblutassays.

Lysostaphin wurde bereits in mehreren Arbeiten zu Differenzierung von planktonischen und internalisierten Zellen verwendet (DeLoid et al. 2009). Es hat sich in niedriger Konzentration und kurzer Anwendungsdauer als nicht-toxisch für phagozytische Zellen erwiesen und kann nicht in diese eindringen. Es kommt jedoch zu einem vollständigen Fluoreszenzverlust der extrazellulären *S. aureus*. Bereits nach 5 Minuten Inkubation mit Lysostaphin ( $20\mu\text{g/ml}$ ) sinkt die Zahl der gfp-positiven Zellen auf 26%. Der Lysostaphinverdau von mit fluorochrom behandelten Zellen ist jedoch nur möglich, wenn diese vital sind, da es sonst zu einer Freisetzung des Farbstoffes kommt. Damit stellte Lysostaphin die Basis zur in vitro Analyse der Adhäsion und Internalisation in dem in dieser Arbeit entwickelten Assay dar.

Als Fluorochrom wurde in dieser Arbeit ein gfp-tragendes (gfp=grün fluoreszierendes Protein) Expressionsplasmid zur Transfektion verwendet. Der Vorteil von gfp gegenüber anderen Fluorchromen besteht in seiner Stabilität und seiner geringen Toxizität (Aymanns et al. 2011). Des Weiteren kann gfp auch in anderen Organismen zur Transfektion gebracht werden. Ein weiteres Fluorochrom, welches häufig Verwendung zum Labeln verschiedener Organismen findet ist Flurescein Isothiocyanat (FITC). Der Nachteil von FITC besteht jedoch darin, dass die Fluoreszenzintensität der mit FITC gelabelten Bakterien sensitiv auf Änderungen des intrazellulären pH-Werts reagiert. Bei zunehmender Phagozytose kommt es zu einer "Ansäuerung" des intraphagolysosomalen Milieus, was zu einer Reduktion der Fluoreszenzintensität der internalisierten Organismen führt (Lehmann et al. 2000).

Es werden nur geringe Probevolumina ( $250\mu\text{l}$  Vollblut) benötigt, wodurch auch die Möglichkeit gegeben ist, in späteren Versuchsanordnungen sogar Proben von pädiatrischen Patienten zu untersuchen.

Durch Verwendung einer kommerziell erhältlichen Lyse Lösung (FACS Lysing solution BD) konnte eine gute Standardisierung gewährleistet werden. Es kommt es zum schnellen Abstoppen der phagozytischen Aktivität durch Fixation der Leukozyten sowie zum Abstoppen der Protein Expression bei gleichzeitiger Inaktivierung der Infektiösität der Proben.

Hervorzuheben sind aus unserer Sicht vor allem die Differenzierung zwischen stammspezifischen Unterschieden in den Adhäsions- und Internalisationskapazitäten



als auch die Beobachtung von Adhäsion und Internalisation von *S. aureus* durch CD19-positive B-Zellen.

## 5.1 Kinetik der Adhäsion und Internalisation in Leukozyten

Zunächst wurde exemplarisch die Adhäsion und Internalisation von RN4220 gfp durch die Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht, um den jeweiligen Zeitpunkt der maximalen Adhäsionskapazität bzw. Internalisationskapazität zu ermitteln. Die jeweiligen Leukozytenpopulationen wurden anhand ihrer Größe und Granularität differenziert (Gating).

Hierbei zeigte sich, dass nach 5 Minuten Inkubationszeit die Adhäsionskapazität aller Leukozytenpopulationen ihren jeweils maximalen Wert erreicht hat. Entsprechend ihrer Spezialisierung erreichen die Populationen maximale Adhäsionskapazitäten von ca. 16% bei den Lymphozyten, ca. 80% bei den Monozyten und ca. 100% bei den Granulozyten.

Im Gegensatz hierzu unterscheiden sich die Populationen signifikant im Sättigungszeitpunkt der Internalisation. Bei den Monozyten ist die Internalisation innerhalb von 5 Minuten abgeschlossen. Es zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der internalisierenden Granulozyten von 80% nach 5 Minuten und auf 98% nach 60 Minuten, womit nahezu alle Granulozyten RN4220 gfp binden und internalisieren.

Das Phänomen der Internalisierung ist insbesondere für die Leukozyten seit langem bekannt. Ausgehend von einer normalen Verteilung der Zellpopulation von 65% Granulozyten, 10% Monozyten und 25% Lymphozyten deckt sich das beobachtete Verhalten sehr exakt mit der Aussage in (Martin & Bhakdi 1992), dass nach 60 Minuten Inkubationszeit etwa 75% der Leukozyten phagozytieren. Jedoch wurden zum damaligen Zeitpunkt keine weiteren Differenzierungen in Subpopulationen durchgeführt. Interessanterweise konnte auch eine Internalisation bei ca. 1,2% der Lymphozyten nach 60 Minuten beobachtet werden. Dieser Effekt wurde nach bestem Kenntnis der Autorin bisher noch nicht beschrieben und wird im Nachfolgenden detaillierter besprochen.

Zusammenfassend haben unsere Untersuchungen zur Kinetik ergeben, dass die maximale Internalisationskapazität aller drei Populationen nach 60 Minuten Inkubationszeit erreicht ist. Dieses Resultat definiert den zeitlichen Rahmen unseres Assays.

## 5.2 Adhäsion und Internalisation in Leukozytensubpopulationen

Um die beobachtete Internalisation durch Lymphozyten detaillierter untersuchen zu können, wurde eine Spezifizierung der Adhäsion und Internalisation der Lymphozytensubpopulationen durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten, monoklonalen Antikörper gegen Antigene der Lymphozytensubpopulation durchgeführt.

Für die Subpopulation der CD19 positiven B-Zellen konnten Adhäsion und Internalisation nachgewiesen werden, wohingegen keine Adhäsion und Internalisation in signifikantem Ausmaß durch CD3 positive T-Zellen bzw. durch CD 4 positive T-Helferzellen und CD8 positive T-Killerzellen beobachtet werden konnte .

Diese Beobachtung untermauert die Funktion der B-Zellen, da diese als antigen-präsentierende Zellen beschrieben sind. Durch den Nachweis von Adhäsion und Internalisation ausschließlich in B-Zellen scheiden weitere Lymphozytensubpopulationen als natürliches Reservoir für *S. aureus* aus.

In analoger Weise wurde die Bedeutung der CD14 positiven Monozytenpopulation ermittelt. Hierbei zeigte sich neben CD14 positiven Monozyten eine weitere Population welche nicht durch CD14 Antikörper markiert werden konnte, jedoch *S. aureus* adherierte und internalisierte. Hierzu wurden keine weiterführenden Untersuchungen hinsichtlich einer Identifizierung unternommen, jedoch liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine Subpopulation von dendritischen Zellen handelt (Nestle, et al. 1993).

## 5.3 Adhäsion und Internalisation verschiedener Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere *S. aureus* Laborstämme sowie klinische Isolate hinsichtlich ihrer phänotypischen Charakterisierung, insbesondere hinsichtlich ihrer Virulenzeigenschaften, untersucht. Hierbei konnte zwischen Stämmen mit einer gesteigerten Adhäsion und Internalisation (LS1, RN4220) sowie mit Stämmen mit einer im Vergleich hierzu geringeren Adhäsions- und Internalisationskapazität (Newman, Möckli) unterschieden werden. Dass unterschiedliche *S. aureus* Stämme in Ihrer Internalisationskapazität variieren konnte in der Vergangenheit bereits für Osteoblasten, also nicht-professionelle Phagozyten gezeigt werden, siehe (Nair et al.

### 5.3 Adhäsion und Internalisation verschiedener Stämme

2003). Nach aktuellem Kenntnisstand wurden bisher noch keine stammspezifischen Untersuchungen der Adhäsions- und Internalisationskapazitäten von Leukozyten-subpopulationen durchgeführt.

Es konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Adhäsions- und Internalisationskapazität bei Lymphozyten und Monozyten beobachtet werden. Aufgrund der hohen phagozytischen Aktivität entfiel die Unterscheidung der Adhäsions- und Internalisationskapazitäten der Granulozyten über die betrachteten Stämme hinweg weniger ausgeprägt, unterstützt aber dennoch den Trend zur Differenzierung zwischen *S. aureus* Stämmen mit geringer und gesteigerter Adhäsions- und Internalisationskapazität.

Die beobachteten spezifischen Adhäsions- und Internalisationsprofile machen deutlich, dass sich bestimmte Bakterienstämme der zellulären Immunantwort besser entziehen können als andere. Grundlage hierfür bilden stammspezifische Mutationen und damit einhergehende Virulenzstrategien, die im folgenden für die in der Arbeit betrachteten Stämme dargestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass die stammspezifischen Unterschiede auch bei *S. aureus* -Isolaten aus klinischen Untersuchungsmaterialien zu reproduzieren sind.

**Newman.** Bei dem *S. aureus* Stamm Newman handelt es sich um ein klinisches Isolat, welches für seine ausgeprägten Virulenzeigenschaften bekannt ist und bereits ausgiebig hinsichtlich seiner molekularen Charakteristik analysiert ist (Baba, et al. 2008). Der *S. aureus* Stamm Newman konnte nur in einem vergleichsweise geringem Ausmaß gebunden und internalisiert werden.

Bekanntermaßen reagiert *S. aureus* auf Stress und Umweltveränderungen durch die Aktivierung globaler Regulatoren. Der Stamm Newman ist bzgl. des Zweikomponentengenregulatorsystems SaeR/S (*S. aureus* exoprotein expression) ein spezieller Stamm (Schäfer et al. 2009). SaeS/R bestimmt die Aktivierung einer ganzen Zahl von Klasse I Sae Zielgenen (*coa*, *fnbA*, *eap*, *sib*, *efb*, *fib*, *sae*). Durch eine Punktmutation in SaeR/S kommt es bei Newman zu einer Hyperaktivierung des SaeR/S-Systems und die hierdurch entstehenden Besonderheiten in der Gen Expression der Virulenzfaktoren sind ein möglicher Grund für die relativ ausgeprägte Virulenz des Stammes Newman (Mainiero, et al. 2010).

(Voyich, et al. 2009) untersuchte den Einfluss des Sae R/S Gen Regulatorsystems auf die angeborene Immunabwehr. Hierzu verwendete er eine isogenetische Mutationsmutante des Sae R/S Regulatorsystems in MW2 (USA 400). Hierbei konnte

## 5 Diskussion

gezeigt werden, dass es zu einer Aktivierung des Sae R/S Systems durch die Interaktion mit neutrophilen Granulozyten kommt. Das intrazelluläre Überleben von MW2 war signifikant besser als das der jeweiligen Mutationsmutante. Jedoch konnten Voyich et al. keinen statistischen Unterschied in der Aufnahme von MW2 und der jeweiligen Mutationsmutante nachweisen.

Weiterhin ist von Newman bekannt, dass er fnbp-unabhängig internalisiert wird, da es aufgrund einer Punktmutation zum Verlust des LPXTG Motivs im Fibronectin Binde Protein kommt und fnbp nicht kovalent mit der Zellwand verbunden werden kann (Schäfer et al. 2009),(Fraunholz & Sinha 2012). Ferner ist bekannt, dass Newman in einem hohen Ausmaß eap exprimiert und möglicherweise so versucht den Mangel an fnbp zu kompensieren. Eine eap-abhängige Internalisation konnte in der Vergangenheit für Epithelzellen und Fibroblasten nachgewiesen werden. In (Kneidl, et al. 2014) konnte außerdem nachgewiesen werden, dass fnbp einen Aktivator der Immunantwort durch Monozyten darstellt. Möglicherweise wird die Immunantwort durch das fehlerhafte fnbp unterdrückt.

Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass die Fähigkeit eines Stammes schnell auf die Anwesenheit von PMN's zu reagieren eine entscheidende Virulenzstrategie sein kann und durch die Aktivierung von Sae realisiert wird. Die in Newman vorhandene Hyperaktivierung von Sae erklärt somit wohlmöglich die relativ erhöhte Virulenz des Stammes welche sich, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, auch durch die Fähigkeit sich der Immunantwort zu entziehen widerspiegelt.

**Möckli.** Von den vier in dieser Arbeit untersuchten *S. aureus* Stämmen wies Möckli die geringste Adhäsions- und Internalisationskapazität auf. Hinsichtlich möglicher Virulenzeigenschaften, die dieses Verhalten erklären, sind in der Literatur bisher keine Nachweise zu finden. Jedoch liegt die Vermutung nahe, dass es wie bei den anderen in dieser untersuchten Arbeit mehrere stammspezifischen Mutationen sind, die zu der niedrigen Adhäsions- und Internalisationskapazität führen und es Möckli so erlauben sich der Immunantwort zu entziehen.

**LS1.** Bei LS1 handelt es sich um ein klinisches Isolat, welches weiterhin viele Wildtyp-Eigenschaften besitzt. Die *S. aureus* Stämme LS1 und RN4220 zeigen eine annähernd gleiche Adhäsions- und Internalisationskapazität, welche die von Newman und Möckli deutlich übertrifft. Dies legt nahe, dass sich diese beiden Stämme im Vergleich zu Newman und Möckli der Immunantwort weniger gut entziehen können und

### 5.3 Adhäsion und Internalisation verschiedener Stämme

eine geringere Virulenz aufweisen.

Ahmed et al. (Ahmed, et al. 2001) verglichen die Adhäsion und Internalisation von LS1 durch Osteoblasten mit der einer entsprechenden isogenetischen Mutante von *fnbpA* und *fnbpB*. Hierbei zeigte sich eine 10-fache Reduktion der gebundenen Bakterien. Eine Internalisation konnte nicht beobachtet werden. Jedoch wurde LS1, der niedrigere Level von *fnbp* produziert zu größeren Anteilen internalisiert als Stamm 8325-4, so dass daraus geschlossen werden kann, dass *fnbP* nicht allein für das Ausmaß der Adhäsions- und Internalisationskapazität verantwortlich ist. Dies unterstützt die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen bezüglich der Adhäsions- und Internalisationskapazität von Newman, die zwar geringer ist als die von LS1, jedoch trotz Verlust des LPXTG Motivs trotzdem vorhanden ist. Ferner konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass *fnbpA* und *fnbpB* für die Internalisation in Epithel- und Endothelzellen notwendig sind. Hieraus wird deutlich, dass die Adhäsions- und Internalisationskapazität eines jeweiligen Stammes von einer Vielzahl von Faktoren abhängig ist.

**RN4220.** Mit RN4220 wurde ein klassischer Laborstamm, der bereits Virulenzeigenschaften verloren hat, untersucht. RN4220 wurde von den jeweiligen Leukozytenpopulationen in ähnlichem Ausmaß gebunden und internalisiert wie LS1. Signifikante Unterschiede konnten zwischen den beiden Stämmen nicht beobachtet werden. Bei RN4220 handelt es sich um einen Laborstamm, der originär von NCT C 8325-4 abstammt. Von RN4220 ist bekannt, dass er mehrere Mutationen enthält, welche unter anderem auch Virulenzgene beeinflussen. Nair et al. (Nair et al. 2011) führten eine vollständige Genomsequenzierung von RN4220 durch. Hierbei konnten 121 Mutationen gefunden werden. Diese können unterteilt werden in solche, die das Überleben und die Fitness beeinflussen und solche die Einfluss auf die Virulenz nehmen. Unter anderem besitzt RN4220 eine Mutation in *clfA* (clumping factor). *ClfA* ist ein Oberflächenprotein, dass zur MSCRAMM-Familie gehört, bindet an die  $\gamma$ -Kette von Fibrinogen und vermittelt die Bindung an Fibrinogen-tragende Oberflächen. Des Weiteren trägt er zum Schutz gegen die Phagocytose durch neutrophile Granulozyten bei. Durch die Mutation kommt es zum Ersatz einer polaren, hydrophilen Aminosäure durch eine nichtpolare, hydrophobe Aminosäure. Dies unterbricht die Proteinfaltung und reduziert die Affinität zu Fibrinogen. Des Weiteren weist RN4220 eine Mutation in *agrA* auf, was in einer verspäteten Aktivierung von *agr* und zu einem Fehler in der Synthese von  $\delta$ - und  $\alpha$ -Hämolysinen führt. Weiterhin

## 5 Diskussion

ist eine Deletion von *cvfB* (encoding conserved virulence factor B) bekannt, was zu einer verringerten *agr* Expression sowie zu einer Reduktion der HLA Expression, der Protease Expression sowie der Virulenz führt. Ebenfalls ist von RN4220 bekannt, dass er über eine Deletion in *rsbU*, ein Gen im  $\sigma B$  Operon, verfügt was zu einer Defizienz in der  $\sigma B$  Expression führt. Nair et al zeigten, dass die Expression von *fnbA* und *clfA* von  $\sigma B$  abhängig ist sowie dass die Kapazität mit der *S. aureus* an Fibronectin bindet mit der Aktivität von  $\sigma B$  korreliert (Nair et al. 2003).

Diese bei RN4220 vorhandenen Mutationen beeinflussen unter anderem die Virulenz und die Fähigkeit sich vor der Phagocytose durch Granulozyten zu schützen. Sie erklären qualitativ, wieso sich RN4220 der Immunantwort schlechter entziehen kann als die anderen in dieser Arbeit betrachteten Stämme Newman und Möckli. Dies deckt sich mit den gemachten Beobachtungen.

Zusammenfassend konnten im Zuge dieser Arbeit stammabhängige Unterschiede in der Adhäsion und Internalisation von *S. aureus* durch die jeweiligen Leukozytenpopulationen nachgewiesen werden. Es kann zwischen Stämmen mit einer hohen (LS1 und RN4220) und Stämmen mit einer geringeren Adhäsions- und Internalisationsskapazität (Newman und Möckli) unterschieden werden. Hierbei kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass es *S. aureus* Stämme gibt welche sich der Immunantwort besser entziehen können und auf diese Weise zu chronischen und möglicherweise auch zu rezidivierenden Infektionen führen können. Hierbei ist nicht ein einzelner Virulenzfaktor verantwortlich, sondern vielmehr nehmen eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren Einfluss.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion und Internalisation der in dieser Arbeit untersuchten Stämme miteinander korreliert, wobei die Korrelation der Granulozyten bei Möckli am geringsten war. Somit wird Möckli zwar gebunden, kann sich jedoch der Internalisation durch die Granulozyten entziehen.

Ebenfalls konnte auch eine Korrelation zwischen der Adhäsion und Internalisation der Lymphozyten gezeigt werden, was bedeutet, dass diese, wenn auch in nur geringen Umfang, neben den professionellen Phagozyten wie Granulozyten und Makrophagen ebenfalls in der Lage sind *S. aureus* zu binden und zu internalisieren.

## 5.4 Zeitkinetik der Adhäsion und Internalisation

Die Adhäsion und Internalisation von LS1 gfp wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 5, 15, 30 und 60 Minuten) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass es sowohl

### 5.5 Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsion

im Fall der Adhäsion durch die Lymphozyten sowie auch bei der Bindung die Monozyten zunächst zu einer relativ hohen, möglicherweise unspezifischen Bindung kommt, welche im weiteren zeitlichen Verlauf abnimmt. Vergleichend hierzu wurde die Adhäsion und Internalisation der *S. aureus* Stämme Newman und RN6390 zu den Zeitpunkten 1, 15 und 60 Minuten untersucht. Hierbei zeigte sich bei Stamm Newman ein ähnliches Verhalten der Lymphozyten und Monozyten in der Adhäsion, wobei die Differenz zwischen den jeweiligen Zeitpunkten gering ausfiel. Bei RN6390 zeigte sich eine Adhäsionszunahme der Monozyten innerhalb der ersten 15 Minuten; zum Zeitpunkt 60 Minuten zeigte sich keine Adhäsionsteigerung.

## 5.5 Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsion

Um den Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsion untersuchen zu können, wurden die Bakteriensuspensionen vor der Inkubation mit Vollblut mit Trypsin vorbehandelt. Trypsin spaltet die MSCRAMM's proteolytisch. Es handelt sich hierbei um eine Endopeptidase welche proteolytisch auf die Oberflächenproteine wirkt. Aufgrund der kurzen Inkubationszeit werden ausschließlich die mit der Zellwand verankerten Proteine gespalten und eine Schädigung der eigentlichen Zellwand wird vermieden. Zu den MSCRAMM's gehören unter anderem die Oberflächenproteine Protein A und der ClfA. Von Protein A ist ein antiphagozytischer Effekt bekannt. Protein A-defiziente *S. aureus* Mutanten werden effizienter durch neutrophile Granulozyten phagozytiert. Die Domänen von Protein A binden an die Fc Region von IgG. Die Konsequenz hieraus ist, dass die Oberfläche der Zelle mit IgG Molekülen ummantelt wird, die in der falschen Orientierung vorliegen um durch die neutrophilen Fc-Rezeptoren wahrgenommen zu werden. Ferner wird vermutet, dass ClfA ebenfalls antiphagozytotische Effekte bezüglich neutrophiler Granulozyten und Makrophagen hat, welche zumindest teilweise mit Fibrinogen zusammen hängen (Foster 2005).

Interessanterweise zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine Reduktion der frühen Adhäsionskapazität (innerhalb der ersten fünf Minuten) aller drei untersuchten Leukozytenpopulationen. Möglicherweise kommt es aufgrund Trypsinierung von *S. aureus* in den ersten Minuten zu einer Verzögerung der Immunantwort. Zu den späteren Zeitpunkten zeigten sich jedoch nur geringe, nicht signifikante Änderungen in der Adhäsionskapazität wobei es zu einer Zunahme der Adhäsion kam, was

## 5 Diskussion

durch antiphagozytotische Effekte von Oberflächenproteinen erklärt werden kann. Zunächst wurde die Untersuchung exemplarisch für LS1 gfp durchgeführt. Durch die Untersuchung weiterer *S. aureus* Stämme konnte das Resultat durch Möckli gfp bestätigt werden. Auch hier war ein Trend zur Reduktion der frühen Adhäsionskapazität festzustellen, wobei sich die Abnahme vor allem bei den Lymphozyten und Monozyten zeigt.

Neben dem Einfluss von MSCRAMM's auf die Adhäsionskapazität wurde auch der Einfluss von löslichen Adhäsinen (SERAM's) untersucht. Exemplarisch wurde in dieser Arbeit der Einfluss von eap auf die Adhäsions- und Internalisationskapazität untersucht, da bekannt ist, dass eap neben der Adhäsion auch die Internalisation von eukaryonten Zellen beziehungsweise von nicht-professionellen Phagozyten beeinflusst (Dziewanowska et al. 1999), (Peacock et al. 1999), (Sinha et al. 1999), (Harraghy et al. 2003).

Von eap ist ferner bekannt, dass es scheinbar in allen Stämmen vorhanden ist, wobei stammspezifische Unterschiede hinsichtlich der Quantität der eap-Produktion bestehen (Harraghy et al. 2003). Der ebenfalls hier verwendete *S. aureus* Stamm Newman produziert sehr hohe Mengen eap (Joost, et al. 2009). Ferner ist bekannt, dass eap die Fähigkeit hat an die Oberfläche von *S. aureus* zurück zubinden. Extern zugeführtes eap kann sowohl an die auf der Bakterienoberfläche lokalisierten eap-Komponenten sowie auch an andere sich auf der Oberfläche befindlichen Komponenten binden (Hussain et al. 2002). Grundsätzlich gilt eap als inhibierender Faktor bezüglich der zellulären Immunität. Hangar et al. (Haggar, et al. 2005) konnten einen dosisabhängigen Einfluss von eap auf die PBMC's zeigen. In niedrigen Konzentrationen hatte eap einen stimulierenden Effekt auf die PBMC's (0-9  $\mu\text{g/ml}$ ) währenddessen bei höheren eap Konzentrationen inhibitorische Effekte beobachtet werden konnten. Hieraus wird der Schluss gezogen, dass eap in den Anfängen einer Infektion, welche durch eine geringere Bakteriendichte charakterisiert ist, in stimulierenden Konzentrationen vorliegt, was letztendlich zu einer "bakteriellen Säuberung" führt. Zu den späteren Zeitpunkten der Infektion (wenn die Bakteriendichte hoch ist) liegt eap dann in höheren, inhibitorischen Konzentrationen vor und unterstützt die Apoptose und Nekrose von PBMC's und treibt somit die Chronifizierung der Infektion voran. Weitere Daten über eine mögliche Beeinflussung der Leukozytenadhäsion- und Internalisation durch die externe Zugabe von eap lagen zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Publikationen vor.

Im Rahmen der hier durchgeführten Arbeiten wurde externes eap der Endkonzen-



## 5.5 Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsion

tration 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zugefügt. Es wurde der Einfluss auf die Adhäsion und Internalisation der *S. aureus* Stämme Newman, Möckli, LS1, RN4220 und RN6390 untersucht. Hierbei zeigte sich sowohl bei der Analyse der Adhäsion als auch der Internalisation keine signifikante Beeinflussung der Adhäsions- sowie auch der Internalisationskapazität durch extern zugeführtes eap. Dies mag möglicherweise an der gewählten Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  liegen sowie an einer verhältnismäßigen geringen Inkubationszeit legt man die Arbeit von Haggart et al. zu Grunde.

Im weiteren wurde der mögliche Einfluss der jeweiligen Wachstumsphase auf die Adhäsion verschiedener *S. aureus* Stämme untersucht. Hierzu wurde die Adhäsion der sich in der exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase, 4-Stunden Kultur) mit der Adhäsion der sich in der postexponentiellen Wachstumsphase (lag-Phase, Übernachtskultur) befindenden *S. aureus* verglichen.

In der exponentiellen Wachstumsphase (4-Stunden Kultur) findet die Synthese der Oberflächenproteine statt. Die postexponentielle Wachstumsphase (Übernachtskultur), welche die Übergangsphase zwischen exponentieller und stationärer Wachstumsphase darstellt, ist durch die Bildung von Toxinen und Exotoxinen gekennzeichnet. Die Bakterienstämme die in der Lage zur Kapselbildung sind verfügen zu diesem Zeitpunkt über eine Kapsel, da die stärkste Kapselproduktion während dieser Wachstumsphase stattfindet. Durch die Kapselproduktion kommt es zu einer Zunahme der Virulenz, da die Kapsel die Interaktion zwischen C3b oder den Immunglobulinen und den jeweiligen Rezeptoren für diese Moleküle unterbindet und somit die Phagocytose negativ beeinflusst (O’Riordan & Lee 2004). Mittlerweile kann zwischen 11 verschiedenen Kapseltypen differenziert werden. Die Serotypen 1 und 2 (hierzu gehören die Stämme M und Smith diffuse), welche stark bekapselt sind produzieren mukoide Kolonien. Die restlichen Serotypen produzieren nonmukoide Stämme. Über 90% der klinischen Isolate sind bekapselt, wobei 80% die Kapselserotypen 5 oder 8 produzieren (O’Riordan & Lee 2004), (Wamel, et al. 2002). In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stämmen konnte keine gesteigerte Virulenz im Sinne einer verminderten Adhärenz im Vergleich zwischen der sich in der postexponentiellen und in der exponentiellen Wachstumsphase befindenden *S. aureus* festgestellt werden. Vielmehr zeigte sich bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stämmen eine gesteigerte Adhäsion der jeweiligen Übernachtskultur (postexponentielle Wachstumsphase). Dies kann möglicherweise dem verwendeten Flüssigmedium (BHI), welches zur Herstellung der jeweiligen Kultur verwendet worden ist geschuldet sein, da die bakteriellen Wachstumsbedingungen, wie unter anderem auch das

## 5 Diskussion

jeweiligen Medium, die Kapselproduktion beeinflussen können. Ferner konnte eine große Variabilität in der Menge der Kapselproduktion durch die individuellen Bakterien nachgewiesen werden (O’Riordan & Lee 2004). Ferner kann eine weitere Erklärung für die verringerte Adhäsion der 4 Stunden Kultur von *S. aureus* RN4220 ist möglicherweise das Vorliegen einer uncharakterisierten Mutation, die in einem fehlerhaften CP5 Phänotyp resultiert (Wann, et al. 1999).

Zusätzlich hierzu verfügt RN4220 über einen partiellen agr Defekt. Van Wamel et al. konnten nachweisen, dass sowohl eine Kapselproduktion von CAP 5 im Wildtyp sowie in der agr Mutante stattfindet, jedoch zeigte sich eine Reduktion der Cap 5 Produktion in der agr Mutante sowie in der agr/sarA Doppelmutante. Diese Ergebnisse konnten von O’Riordan insofern bestätigt werden, als dass die Mutation im agr Locus zu einer verminderten CP 5 Produktion und konsekutiv zu einer steigenden Adhärenz von *S.aureus* an Endothelzellen führt. Diese Daten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

## 5.6 Ausblick und Limitationen

Zusammenfassend konnte ein gut standardisierter, reproduzierbarer und robuster Funktionstest entwickelt werden, mit dem es möglich ist, stammspezifische Unterschiede bzgl. der Adhäsions- und Internalisationskapazität und den Einfluss löslicher Substanzen wie eap zu untersuchen.

Eine mögliche Limitation des Tests ist durch sein Design als phänotypischer Vollbluttest gegeben, da Blut unterschiedlicher Probanden untersucht wird und es zu entsprechenden statistischen Streuungen kommen kann.

Ferner konnte mit Hilfe dieses Tests erstmals Adhäsion und zu einem geringen Maße auch Internalisation durch Lymphozyten nachgewiesen werden, wobei um CD19-positive B-Zellen handelt. Neben zahlreichen klinischen Applikationen eröffnen sich die nachfolgenden Anknüpfungspunkte.

**Identifikation weiterer Zellpopulationen in Leukozyten-Gates.** Durch die Verwendung monoklonaler Antikörper konnte die Existenz weiterer adhärrierender Blutzellen nachgewiesen werden. Eine Identifikation dieser Zellpopulationen würde eine Erweiterung des vorgestellten Assays bedeuten.

**Untersuchung des Langzeitüberlebens verschiedener *S. aureus* -Stämme.** Wie zuvor in Kapitel 5.3 dargestellt, konnten wir stammspezifische Adhäsions- und Internalisationsfähigkeiten bei den untersuchten *S. aureus*-Stämmen feststellen. Bekanntermaßen ist *S. aureus* in der Lage, nach der Internalisierung der Zerstörung im Phagolysosom zu entkommen und damit Phagozytose durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen zu überleben. Die PMN's, insbesondere die Makrophagen aufgrund ihrer Langlebigkeit und Mobilität, können somit die Funktion eines trojanisches Pferdes übernehmen und die Dissemination der Infektion vorantreiben (Fraunholz & Sinha 2012). Interessant wäre daher eine Untersuchung des Langzeitüberlebens der betrachteten Stämme und klinischen Isolate in den jeweiligen Leukozytenpopulationen.

Neben den bereits erwähnten neutrophilen Granulozyten und Makrophagen internalisieren auch B-Zellen in geringem Umfang, wie in der Arbeit erstmalig nachgewiesen werden konnte. Es stellt sich daher die Frage, ob B-Zellen möglicherweise eine analoge Transportfunktion inne haben und somit zur Chronifizierung und Persistenz einer Infektion beitragen können.



# Literaturverzeichnis

- S. Ahmed, et al. (2001). 'Staphylococcus aureus fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria'. *Infection and immunity* **69**(5):2872–2877.
- R. A. Almeida, et al. (1996). 'Staphylococcus aureus invasion of bovine mammary epithelial cells'. *J Dairy Sci* **79**(6):1021–6.
- P. C. Appelbaum (2006). 'MRSA—the tip of the iceberg'. *Clin Microbiol Infect* **12 Suppl 2**:3–10.
- A. N. Athanasopoulos, et al. (2006). 'The extracellular adherence protein (Eap) of Staphylococcus aureus inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms'. *Blood* **107**(7):2720–7.
- S. Aymanns, et al. (2011). 'High-level fluorescence labeling of gram-positive pathogens'. *PLoS One* **6**(6):e19822.
- T. Baba, et al. (2008). 'Genome sequence of Staphylococcus aureus strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands.'. *Journal of bacteriology* **190**(1):300–310.
- D. M. Bamberger & S. E. Boyd (2005). 'Management of Staphylococcus aureus infections'. *Am Fam Physician* **72**(12):2474–81.
- C. F. Bassøe, et al. (2000). 'Concurrent measurement of antigen- and antibody-dependent oxidative burst and phagocytosis in monocytes and neutrophils'. *Methods* **21**(3):203–20.
- M. Bischoff, et al. (2001). 'Influence of a Functional sigB Operon on the Global Regulators sar and agr in Staphylococcus aureus'. *Journal of bacteriology* **183**(17):5171–5179.

## Literaturverzeichnis

- R. Bjerknes & C. F. Bassøe (1983). 'Human leukocyte phagocytosis of zymosan particles measured by flow cytometry'. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C* **91**(5):341–8.
- M. K. Bodén & J. I. Flock (1992). 'Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* strain Newman'. *Microb Pathog* **12**(4):289–298.
- E. Bouza, et al. (2002). 'Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment'. *Clin Microbiol Infect* **8**(5):265–74.
- J. M. Boyce (2007). 'Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection'. *J Hosp Infect* **65 Suppl 2**:50–4.
- T. Bremell, et al. (1990). 'Outbreak of spontaneous staphylococcal arthritis and osteitis in mice'. *Arthritis Rheum* **33**(11):1739–44.
- J. Cassat, et al. (2006). 'Transcriptional profiling of a *Staphylococcus aureus* clinical isolate and its isogenic agr and sarA mutants reveals global differences in comparison to the laboratory strain RN6390'. *Microbiology* **152**(Pt 10):3075–90.
- M. Chalfie, et al. (1994). 'Green fluorescent protein as a marker for gene expression'. *Science* **263**(5148):802–5.
- T. Chavakis, et al. (2002). 'Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes'. *Nat Med* **8**(7):687–93.
- G. R. Corey (2009). 'Staphylococcus aureus bloodstream infections: definitions and treatment'. *Clin Infect Dis* **48 Suppl 4**:S254–9.
- K. M. Cunnion, et al. (2001). 'Capsule production and growth phase influence binding of complement to *Staphylococcus aureus*'. *Infect Immun* **69**(11):6796–803.
- B. Dassy, et al. (1993). 'Involvement of the accessory gene regulator (agr) in expression of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*'. *J Gen Microbiol* **139 Pt 6**:1301–6.

- R. S. Daum, et al. (2002). ‘A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds’. *J Infect Dis* **186**(9):1344–7.
- F. R. DeLeo, et al. (2009). ‘Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections’. *Infect Dis Clin North Am* **23**(1):17–34.
- G. M. DeLoid, et al. (2009). ‘Heterogeneity in macrophage phagocytosis of *Staphylococcus aureus* strains: high-throughput scanning cytometry-based analysis’. *PLoS One* **4**(7):e6209.
- D. J. Diekema, et al. (2001). ‘Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999’. *Clin Infect Dis* **32 Suppl 2**:S114–32.
- P. M. Dunman, et al. (2001). ‘Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci’. *J Bacteriol* **183**(24):7341–53.
- E. S. Duthie & L. L. Lorenz (1952). ‘Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity’. *J Gen Microbiol* **6**(1-2):95–107.
- K. Dziwanowska, et al. (1999). ‘Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells’. *Infect Immun* **67**(9):4673–8.
- C. S. Easmon, et al. (1978). ‘Use of lysostaphin to remove cell-adherent staphylococci during in vitro assays of phagocyte function’. *Br J Exp Pathol* **59**(4):381–5.
- T. G. Emori & R. P. Gaynes (1993). ‘An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory’. *Clin Microbiol Rev* **6**(4):428–42.
- B. B. Finlay & P. Cossart (1997). ‘Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens’. *Science* **276**(5313):718–25.
- M. Flock & J. I. Flock (2001). ‘Rebinding of extracellular adherence protein Eap to *Staphylococcus aureus* can occur through a surface-bound neutral phosphatase’. *J Bacteriol* **183**(13):3999–4003.

## Literaturverzeichnis

- T. J. Foster (2005). 'Immune evasion by staphylococci'. *Nat Rev Microbiol* **3**(12):948–58.
- T. J. Foster (2009). 'Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion'. *Vet Dermatol* **20**(5-6):456–70.
- M. Fraunholz & B. Sinha (2012). 'Intracellular Staphylococcus aureus: live-in and let die.'. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2**:43.
- C. Garzoni, et al. (2007). 'A global view of Staphylococcus aureus whole genome expression upon internalization in human epithelial cells'. *BMC Genomics* **8**:171.
- C. Garzoni & W. L. Kelley (2009). 'Staphylococcus aureus: new evidence for intracellular persistence'. *Trends Microbiol* **17**(2):59–65.
- S. F. Graves, et al. (2010). 'Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus immune evasion and virulence'. *J Mol Med (Berl)* **88**(2):109–14.
- A. Hagggar, et al. (2003). 'Extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus enhances internalization into eukaryotic cells'. *Infect Immun* **71**(5):2310–7.
- A. Hagggar, et al. (2005). 'Dual effects of extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus on peripheral blood mononuclear cells'. *Journal of Infectious Diseases* **192**(2):210–217.
- M. B. Hampton & C. C. Winterbourn (1999). 'Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils'. *J Immunol Methods* **232**(1-2):15–22.
- N. Harraghy, et al. (2003). 'The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional Staphylococcus aureus protein Eap'. *Microbiology* **149**(Pt 10):2701–7.
- N. Harraghy, et al. (2005). 'sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp'. *Microbiology* **151**(Pt 6):1789–800.
- M. C. Hudson, et al. (1995). 'Internalization of Staphylococcus aureus by cultured osteoblasts'. *Microb Pathog* **19**(6):409–19.
- M. Hussain, et al. (2001). 'Analogues of Eap protein are conserved and prevalent in clinical Staphylococcus aureus isolates'. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**(6):1271–6.



- M. Hussain, et al. (2002). ‘Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts’. *Infect Immun* **70**(6):2933–40.
- M. Hussain, et al. (2008). ‘More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation’. *Infect Immun* **76**(12):5615–23.
- K. Jönsson, et al. (1995). ‘*Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog’. *J Biol Chem* **270**(37):21457–21460.
- I. Joost, et al. (2009). ‘Transcription analysis of the extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* in authentic human infection and in vitro’. *Journal of Infectious Diseases* **199**(10):1471–1478.
- E. Josefsson, et al. (2001). ‘Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant’. *J Infect Dis* **184**(12):1572–80.
- J. Kneidl, et al. (2014). ‘Soluble CD163 masks fibronectin-binding protein A-mediated inflammatory activation of *Staphylococcus aureus* infected monocytes’. *Cellular Microbiology* **16**(3):364–377.
- B. Kreikemeyer, et al. (2002). ‘The role of the map protein in *Staphylococcus aureus* matrix protein and eukaryotic cell adherence’. *Int J Med Microbiol* **292**(3-4):283–95.
- B. N. Kreiswirth, et al. (1983). ‘The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage’. *Nature* **305**(5936):709–12.
- M. Kubica, et al. (2008). ‘A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages’. *PLoS One* **3**(1):e1409.
- J. K. Kumar (2008). ‘Lysostaphin: an antistaphylococcal agent’. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**(4):555–61.
- Y. Le Loir, et al. (2003). ‘*Staphylococcus aureus* and food poisoning’. *Genet Mol Res* **2**(1):63–76.

## Literaturverzeichnis

- J. C. Lee (1996). 'The prospects for developing a vaccine against *Staphylococcus aureus*'. *Trends Microbiol* **4**(4):162–6.
- L. Y. Lee, et al. (2002). 'The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses'. *J Clin Invest* **110**(10):1461–71.
- A. K. Lehmann, et al. (1998). 'Flow cytometric quantitation of human opsonin-dependent phagocytosis and oxidative burst responses to meningococcal antigens'. *Cytometry* **33**(4):406–13.
- A. K. Lehmann, et al. (2000). 'Phagocytosis: measurement by flow cytometry'. *J Immunol Methods* **243**(1-2):229–42.
- Q. Liu, et al. (2000). 'Effect of decaglycerol monooleate on phagocytosis and respiratory burst activity of human neutrophils: an in vitro study'. *Food Chem Toxicol* **38**(5):423–8.
- P. S. Loomba, et al. (2010). 'Methicillin and Vancomycin Resistant *S. aureus* in Hospitalized Patients'. *J Glob Infect Dis* **2**(3):275–83.
- F. D. Lowy (1998). 'Staphylococcus aureus infections'. *N Engl J Med* **339**(8):520–32.
- F. D. Lowy (2000). 'Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen?'. *Trends Microbiol* **8**(8):341–3.
- T. Luong, et al. (2002). 'Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide expression by *agr* and *sarA*'. *Infect Immun* **70**(2):444–50.
- M. Mainiero, et al. (2010). 'Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system *saeRS*'. *Journal of bacteriology* **192**(3):613–623.
- E. Martin & S. Bhakdi (1992). 'Flow cytometric assay for quantifying opsonophagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by peripheral blood leukocytes.'. *Journal of clinical microbiology* **30**(9):2246–2255.
- R. C. Massey, et al. (2001). 'Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells'. *Cell Microbiol* **3**(12):839–51.

- D. Nair, et al. (2011). ‘Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain RN4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain’. *J Bacteriol* **193**(9):2332–5.
- S. P. Nair, et al. (2003). ‘The sigma B regulon influences internalization of *Staphylococcus aureus* by osteoblasts’. *Infect Immun* **71**(7):4167–70.
- W. W. Navarre & O. Schneewind (1999). ‘Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope’. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(1):174–229.
- F. O. Nestle, et al. (1993). ‘Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets’. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **151**(11):6535–6545.
- J. Nouwen, et al. (2004). ‘Human factor in *Staphylococcus aureus* nasal carriage’. *Infect Immun* **72**(11):6685–8.
- R. Novick (1967). ‘Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*’. *Virology* **33**(1):155–66.
- J. Nuutila & E.-M. Lilius (2005). ‘Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells’. *Cytometry A* **65**(2):93–102.
- I. Nuzzo, et al. (2000). ‘Apoptosis of human keratinocytes after bacterial invasion’. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**(3):235–40.
- T. Oda & H. Maeda (1986). ‘A new simple fluorometric assay for phagocytosis’. *J Immunol Methods* **88**(2):175–83.
- S. K. Ogawa, et al. (1985). ‘Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro’. *Infect Immun* **50**(1):218–24.
- J. D. Ogle, et al. (1988). ‘Phagocytosis of opsonized fluorescent microspheres by human neutrophils. A two-color flow cytometric method for the determination of attachment and ingestion’. *J Immunol Methods* **115**(1):17–29.
- K. O’Riordan & J. C. Lee (2004). ‘*Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides’. *Clin Microbiol Rev* **17**(1):218–34.

## Literaturverzeichnis

- M. Palma, et al. (1999). 'Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity'. *J Bacteriol* **181**(9):2840–5.
- M. Palma, et al. (2001). 'Extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* blocks platelet aggregation due to its binding to the alpha-chain'. *J Biol Chem* **276**(34):31691–31697.
- S. J. Peacock, et al. (2001). 'What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*?'. *Trends Microbiol* **9**(12):605–10.
- S. J. Peacock, et al. (1999). 'Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells'. *Microbiology* **145** ( Pt 12):3477–86.
- K. Plata, et al. (2009). 'Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity'. *Acta Biochim Pol* **56**(4):597–612.
- P. Pöhlmann-Dietze, et al. (2000). 'Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase'. *Infect Immun* **68**(9):4865–71.
- B. Poutrel, et al. (1997). 'Heterogeneity of cell-associated CP5 expression on *Staphylococcus aureus* strains demonstrated by flow cytometry'. *Clin Diagn Lab Immunol* **4**(3):275–8.
- F. M. Roche, et al. (2004). 'The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin'. *J Biol Chem* **279**(37):38433–40.
- F. M. Roche, et al. (2003). 'Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences'. *Microbiology* **149**(Pt 3):643–54.
- M. E. Rodríguez, et al. (2001). 'Flow cytometry-based phagocytosis assay for sensitive detection of opsonic activity of pneumococcal capsular polysaccharide antibodies in human sera'. *J Immunol Methods* **252**(1-2):33–44.

- H. R. Salih, et al. (2000). ‘Simultaneous cytofluorometric measurement of phagocytosis, burst production and killing of human phagocytes using *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* as target organisms’. *Clin Microbiol Infect* **6**(5):251–8.
- D. Schäfer, et al. (2009). ‘A point mutation in the sensor histidine kinase SaeS of *Staphylococcus aureus* strain Newman alters the response to biocide exposure’. *J Bacteriol* **191**(23):7306–14.
- C. A. Schindler & V. T. Schuhardt (1964). ‘LYSOSTAPHIN: A NEW BACTERIO-  
LYTIC AGENT FOR THE STAPHYLOCOCCUS’. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**:414–21.
- G. C. Schito (2006). ‘The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*’. *Clin Microbiol Infect* **12 Suppl 1**:3–8.
- B. Sinha, et al. (1999). ‘Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5 \beta 1$ ’. *Cell Microbiol* **1**(2):101–17.
- A. C. S. Sobke, et al. (2006). ‘The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* abrogates angiogenic responses of endothelial cells by blocking Ras activation’. *FASEB J* **20**(14):2621–3.
- K. M. Thompson, et al. (2010). ‘*Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein contributes to biofilm formation in the presence of serum’. *FEMS Microbiol Lett* **305**(2):143–7.
- A. van Belkum (2006). ‘Staphylococcal colonization and infection: homeostasis versus disbalance of human (innate) immunity and bacterial virulence’. *Curr Opin Infect Dis* **19**(4):339–44.
- C. von Eiff, et al. (2001). ‘Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group’. *N Engl J Med* **344**(1):11–6.
- J. M. Voyich, et al. (2005). ‘Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils’. *J Immunol* **175**(6):3907–19.
- J. M. Voyich, et al. (2009). ‘The SaeR/S gene regulatory system is essential for innate immune evasion by *Staphylococcus aureus*’. *The Journal of infectious diseases* **199**(11):1698–1706.

## Literaturverzeichnis

- W. v. Wamel, et al. (2002). ‘Regulation of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharides by agr and sarA in vitro and in an experimental endocarditis model’. *Microbial pathogenesis* **33**(2):73–79.
- E. R. Wann, et al. (1999). ‘Genetic analysis of the cap5 locus of *Staphylococcus aureus*’. *FEMS microbiology letters* **170**(1):97–103.
- E. R. Wann, et al. (2000). ‘The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen’. *J Biol Chem* **275**(18):13863–71.
- F. Watson, et al. (1992). ‘Neutrophil function in whole blood and after purification: changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines’. *Biosci Rep* **12**(2):123–33.
- H. F. L. Wertheim, et al. (2005). ‘The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections’. *Lancet Infect Dis* **5**(12):751–62.
- C. White-Owen, et al. (1992). ‘Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis’. *J Clin Microbiol* **30**(8):2071–6.
- M. Ythier, et al. (2010). ‘Natural variability of in vitro adherence to fibrinogen and fibronectin does not correlate with in vivo infectivity of *Staphylococcus aureus*’. *Infect Immun* **78**(4):1711–6.
- M. Zimmer (2002). ‘Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior’. *Chem Rev* **102**(3):759–81.

# Danksagung

Ich danke ganz herzlich bei meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Lutz von Müller für die Überlassung des Themas sowie für die stets konstruktive und intensive Betreuung.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Mathias Herrmann sowie allen weiteren Institutsmitarbeitern für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung und Hilfe sowie die Bereitschaft zum Blutspenden. Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei Frau Karin Hilgert, der guten Seele des Labors welche mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso möchte ich meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung danken. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Lebenspartner Florian Geiss für die unermüdliche Unterstützung, die stete Diskussionsbereitschaft, das Korrekturlesen und vor allem für die grenzenlose Geduld sowohl in moralischer als auch technischer Hinsicht.

