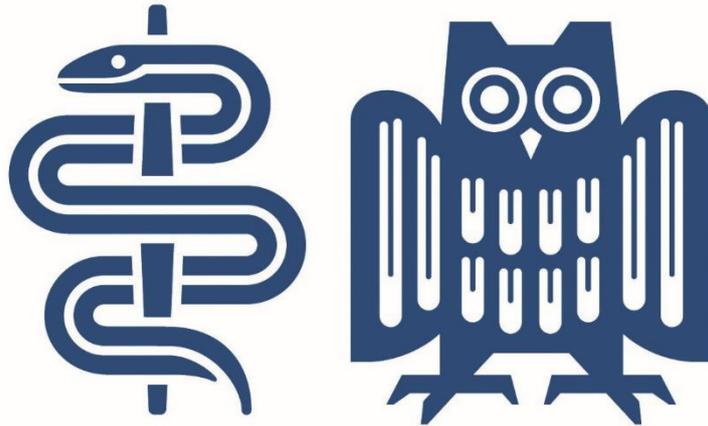


Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Kommissarische Leitung: Prof. Dr. med. Barbara Gärtner



Einfluss von Eap auf die Adhäsion von *Staphylococcus aureus* an ultralange von Willebrand-Faktor Fäden (ULVWF) unter Flussbedingungen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

Vorgelegt von Corinne Bauer
geboren am 08.09.1988
in Lörrach

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle („antigen presenting cell“)
ADAMTS-13	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13
<i>agr</i>	Accessory gene regulator
BSA	Bovines Serumalbumin
ClfA	Clumping Factor A
Coa	Koagulase
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalitis
Eap	Extracellular adherence protein
EC	Endothelzellen (endothelial cells)
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
eDNA	extrazelluläre DNA
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
Efb	Extracellular Fibrinogen binding Protein
EGM-2	Endothelial cell Growth Medium 2
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Emp	Extracellular Matrix binding Protein
ETA-C	Exfoliativtoxine A-C
Fab-Region	Fragment antigen binding Region von Antikörpern
Fc-Fragment	Fragment crystallisable von Antikörpern
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FnbpA	Fibronectin binding protein A
G3CREC	<i>Escherichia coli</i> , welcher gegen Cephalosporine der 3. Generation resistent ist
GpIb/IIb/IIIa	Glykoprotein Ib/IIb/IIIa
HA-MRSA	Hospital-acquired MRSA
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM-1	IntercellularAdhesion Molecule 1
LFA-1	Lymphocyte Function Associated Molecule-1
LPS	Lipopolysaccharid
LPXTG-Motiv	Leu-Pro-any-Thr-Gly-Motiv

Mac-1	Macrophage-1-antigen
MALDI-TOF	Matrixunterstützte Laser- Desorption/Ionisation (MALDI) in Kombination mit Massenspektrometrie (Time of Flight =TOF)
MHC-II	Major Histocompatibility Complex II
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
NAT	Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NF- κ B	Nuclear Factor ' κ -light-chain-enhancer' of activated B-cells
Nptase	Neutrale Phosphatase
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
Rcf	Relative centrifugal force
RNA	Ribonucleic acid
rsbU	Protein Phosphatase (Typ 2C)
SA113	<i>Staphylococcus aureus</i> Stamm 113
Sar	Staphylococcal accessory regulator
SEA-SEE	Staphylococcal enterotoxin A-E
SERAM	Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules
SigB	alternativer Sigma Faktor B
SIRS	Severe Inflammatory Response Syndrome
SSSS	Staphylococcal Scaled Skin Syndrome
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRITC	Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat
TSB	Tryptic Soy-Broth Agar
TSS	Toxisches Schocksyndrom
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin-1
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
ULVWF	Ultralange von Willebrand Faktor Fäden
vWbp	Von Willebrand Faktor bindendes Protein
vWF	von Willebrand Faktor
WTA	Wall Teichoic Acid
ZVK	Zentraler Venenkatheter

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung/Summary	-1-
2. Einleitung	-4-
2.1 Eigenschaften von <i>S. aureus</i>	-4-
2.2 Genetische Variabilität	-6-
2.3 Infektionen	-7-
2.3.1 Toxin-vermittelte Erkrankungen	-8-
2.3.2 Katheter-assoziierte Erkrankungen	-9-
2.3.3 Invasive Erkrankungen	-11-
2.4 Virulenzfaktoren	-12-
2.4.1 Zellwand und Kapsel	-12-
2.4.2 Enzyme	-14-
2.4.3 MSCRAMM	-16-
2.4.4 SERAM	-16-
2.4.5 Biofilmbildung	-17-
2.5 Eap	-18-
2.5.1 Interaktion mit Eukaryontischen Zellen	-21-
2.5.2 Störung der Angiogenese und Wundheilung	-21-
2.5.3 Immunmodulation durch Interaktion mit ICAM-1	-22-
2.6 <i>S. aureus</i> in der Tierzucht	-23-
2.7 Von-Willebrand-Faktor	-24-
2.8 ADAMTS-13	-26-
2.9 Interaktion von vWF mit <i>S. aureus</i>	-26-
2.10 Bedeutung der Dissertation und Ausblick	-27-
3. Material und Methoden	-28-
3.1 Materialien	-28-
3.1.1 Bakterienstämme	-28-
3.1.2 Nährmedien	-28-
3.1.3 Material für die Anzucht der eukaryonten Zellen	-29-

3.1.4	Materialien für die Färbung der Bakterien	-30-
3.1.5	Materialien für die Versuchsdurchführung	-30-
3.1.6	Materialien für die Färbung der Objektträger	-31-
3.1.7	Das IBIDI-Pumpsystem und Objektträger	-32-
3.1.8	Software	-33-
3.1.9	Rückenhautkammer	-34-
3.1.10	Versuchstiere	-34-
3.2	Methoden	-35-
3.2.1	Versuchstiere für die Flussversuche und Rückenhautkammer	-35-
3.2.2	Präparation der Rückenhautkammer	-35-
3.2.3	Versuchsdurchführung	-38-
3.2.4	Färbung der Bakterien mit CFSE für <i>in vivo</i> -Versuche	-38-
3.2.5	Auswertung der Daten aus den Tierversuchen	-40-
3.2.6	Anzucht der Bakterien für die Flussversuche	-40-
3.2.7	Anzucht in Flüssigmedium	-40-
3.2.8	Kryokonservierung der Bakterienstämme	-40-
3.2.9	ELISA zur Bestimmung der von Willebrand-Faktor Ausschüttung	-41-
3.2.10	Protokoll zur Gewinnung und Aufreinigung der Erythrozyten	-41-
3.2.11	Vorbereiten der Objektträger	-42-
3.2.12	Objektträger mit Gelatine beschichten	-43-
3.2.13	HUVEC-Gewinnung	-43-
3.2.14	HUVEC ernten und aussäen	-44-
3.2.15	Färbeprotokoll Bakterien	-46-
3.2.16	Versuchsaufbau und -durchführung	-47-
3.2.17	Hinzufügen von Eap	-49-
3.2.18	Hinzufügen von Lambda-DNA	-49-
3.2.19	Färbeprotokoll Objektträger	-50-
3.2.20	Mikroskopieren	-52-

4. Ergebnisse	-53-
4.1 <i>In vivo</i> -Ergebnisse mit Rückenhautkammer	-54-
4.2 Nabelschnurspendervariabilität	-55-
4.3 Stimulation der HUVEC mit Eap	-59-
4.4 Vergleich SA113 Wildtyp und Δeap Mutante	-60-
4.5 Die Rolle der freien DNA im System	-63-
4.6 Clusterbildung am ULVWF	-65-
4.7 Endothelbindung von <i>S. aureus</i>	-68-
5. Diskussion	-71-
5.1 Ergebnisse der <i>in vivo</i> -Versuche mit Rückenhautkammer	-74-
5.2 Variabilität der Nabelschnurspenderinnen	-76-
5.3 Analyse der Fluss-Ergebnisse	-78-
5.4 Versuche mit DNA	-83-
5.5 Clusterbildung	-85-
5.6 Schlussfolgerung	-86-
5.7 Ausblick	-88-
6. Anhang	-91-
7. Literaturverzeichnis	-92-
8. Publikationen	-105-
9. Danksagung	-106-
10. Lebenslauf	-108-

1. Zusammenfassung

Staphylococcus aureus ist ein weit verbreiteter Erreger sowohl lokaler wie auch schwerer systemischer Infektionskrankheiten. Dazu gehört insbesondere die infektiöse Endokarditis wie sie auch in den Industrienationen häufig vorkommt. Im Gegensatz zu anderen Erregern wie zum Beispiel Streptokokken, die ebenfalls dieses Krankheitsbild verursachen können, ist *S. aureus* in der Lage, auch an unbeschädigtes Endothel zu binden, invasiv das Gewebe der Herzklappen zu zerstören und somit schwerwiegende Funktionsstörungen des Herzkreislaufsystems zu verursachen.

Im Jahr 2013 konnten wir in einer Kooperationsarbeit mit der experimentellen Dermatologie der Uniklinik Mannheim zeigen, dass die Bindung von *S. aureus* an intaktes, mittels TNF- α stimuliertem Endothel unter physiologischen Flussbedingungen hauptsächlich über von Endothelzellen intraluminal sezernierte, ultralange von Willebrand Faktor Fäden (ULVWF) vermittelt wird (Pappelbaum et al. 2013). Dieser Mechanismus trägt sehr wahrscheinlich wesentlich zur Pathogenität dieses bakteriellen Erregers bei, denn nur durch die Adhäsion an die extrazelluläre Endothelmatrix ist es den Bakterien letztendlich möglich, den Blutstrom zu verlassen, sich im Wirtsorganismus auszubreiten und systemische Infektionen mit eventuell multipler Abszessbildung hervorzurufen. Die bakterielle Bindung an ULVWF unter physiologischen Flussbedingungen ist ein multifaktorielles Geschehen, in welches unter anderem auch Teichonsäuren aus der bakteriellen Zellwand und verschiedene andere zellwandgebundene Proteine involviert sind.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das von *S. aureus* sezernierte und zum Teil an die Oberfläche rückgebundene Extrazelluläre Adhärenzprotein (Eap) zur Bindung an ULVWF unter Flussbedingungen von 10 dyn/cm² beiträgt. Dies entspricht den physiologischen Flussbedingungen, wie sie in großen, herznahen Arterien und an Herzklappen vorherrschen. Die Versuche mit einer SA113 *eap* Mutante, welche nicht in der Lage ist, Eap zu produzieren, halbierte die Anzahl gebundener Bakterien an die ULVWF-Fäden im Vergleich zum Wildtyp-Stamm unter den genannten Flussbedingungen. Wurde die *eap*-defiziente Mutante hingegen vor den Flussversuchen mit nativ aufgereinigtem Eap inkubiert, erreichte die Bindung von SA113 Δeap wieder Bindungswerte wie der Wildtyp-Stamm, so dass dieser Effekt durch die Substitution von extrazellulärem Eap vollständig reversibel war.

Versuche mit Bakterienzellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen zeigten, dass Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase besser an ULVWF binden konnten als Bakterien aus der stationären Phase. Ein Grund hierfür kann die vermehrte Produktion von zellwandgebundenen Adhäsionsmolekülen während der frühen Wachstumsphase sein. Da bereits gezeigt werden konnte, dass extrazelluläre DNA (eDNA) an ULVWF binden kann und darüber die Stabilität der Fäden moduliert, zugleich aber auch *S. aureus* an eDNA zu binden vermag, (Peisker et al. 2016) wurde des Weiteren auch der Einfluss von eDNA auf die Bindung von *S. aureus* an ULVWF unter physiologischen Flussbedingungen untersucht. Das Hinzufügen von Lambda-DNA zum Flusssystem verbesserte die Adhäsion der Bakterien an ULVWF in unseren Versuchen jedoch nicht signifikant, sodass davon ausgegangen werden kann, dass im Blutstrom vorhandene eDNA die Adhäsionsfähigkeit von *S. aureus*, an aktiviertes Endothel zu binden, nicht maßgeblich beeinflusst.

Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass Eap signifikant zur Bindung von *S. aureus* an aktiviertes Endothel beiträgt, und somit wahrscheinlich einen relevanten Pathogenitätsfaktor im Zusammenhang mit infektiöser Endokarditis und anderen systemischen Infektionen darstellt.

Summary

Staphylococcus aureus is a frequent cause for local, self-limiting infections, but it may also cause severe systemic diseases such as sepsis and infective endocarditis. In contrast to other pathogenic bacteria causing the latter type of disease, *S. aureus* is able to bind to intact endothelium, and to invade and destroy heart tissues and heart valves, which may lead to severe dysfunction of the cardiovascular system.

We have recently shown in a cooperation with the Department of Dermatology at the University Hospital Mannheim that binding of *S. aureus* to the intact endothelial cell layer is mediated predominantly by lumenally secreted Ultra large von Willebrand factor (ULVWF) fibers under high-shear-flow conditions, and that bacterial binding to ULVWF is multifactorial, involving wall teichoic acids and several cell wall-anchored proteins (Pappelbaum et al. 2013).

Here we show that the secreted and partially cell wall reattached extracellular adhesion protein Eap contributes to binding of *S. aureus* to ULVWF at a shear stress of 10 dyne/cm², reflecting physiological flow rates found in larger arteries and at heart valves. Inactivation of *eap* in *S. aureus* strain SA113 nearly halved the binding of the mutant to ULVWF under these flow conditions, when compared to the binding rates of the wild type. Preincubation of the mutant with Eap fully restored the binding rates to wild type level.

Exponential growth phase cells were found to possess a significantly higher adhesion capacity to ULVWF than stationary phase cells, presumably due to an enhanced expression of cell wall-anchored adhesion factors during the early growth stage. Presence of extracellular DNA, which was recently shown to bind to ULVWF under high-shear flow, could not significantly enhance the attachment of *S. aureus* to ULVWF.

Our data suggest that Eap is likely to contribute to *S. aureus*' ability to cause infective endocarditis by promoting the pathogen's ability to adhere to ULVWF under high-shear-flow conditions.

2. Einleitung

2.1. Eigenschaften von *S. aureus*

Seit der Entdeckung von *Staphylococcus aureus* im Jahre 1880 durch den schottischen Chirurgen Alexander Ogston (1844-1929) ist das Bakterium als Erreger schwerer, oft lebensbedrohlicher Infektionen bekannt (Ogston 1882).

Neben der klinisch asymptomatischen Besiedlung mit *S. aureus* („Kolonisation“) ist das Bakterium in der Lage, viele verschiedene Krankheiten von unterschiedlichem Schweregrad auszulösen. Die Reihe der Krankheitsbilder, die durch *S. aureus* verursacht werden können, reichen von lokalisierten Entzündungen der Haut wie beispielsweise Furunkel oder Karbunkel der Haut bis hin zu lebensbedrohlichen Infektionen wie Pneumonie, insbesondere nach vorausgegangenem Virusinfekt, Endokarditis, Osteomyelitis, Meningitis, Toxischem Schocksyndrom und der generalisierten Sepsis (Lowy 1998).

S. aureus sind unbewegliche, nicht sporenbildende, fakultativ anaerobe, Grampositive und Katalase-bildende Kokken, die sich im mikroskopischen Präparat als einzelne Kokken, oder in Haufen darstellen. *S. aureus* ist leicht auf reichhaltigen Nährböden und in Flüssigkulturen anzuzüchten, da seine Ansprüche in Bezug auf die Zusammensetzung des Mediums gering sind. Auf bluthaltigen Nährböden wachsen die Bakterien in kleinen, rundlichen, gelb bis orangefarbenen Kolonien mit überwiegend umgebender β -Hämolyse, die je nach Erythrozytenart der Spenderspezies unterschiedlich sein kann (Hague et al. 1967).

Unter allen Vertretern der *Micrococcaceae*, zu denen auch *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus hominis* zählen, ist *S. aureus* für den Menschen der mit Abstand virulenteste Keim. Diese außerordentliche Humanpathogenität verdankt das Bakterium verschiedenen Virulenzfaktoren wie zum Beispiel der schützenden Polysaccharid-Kapsel und dem IgG Bindeprotein Spa (weitere Virulenzfaktoren s. Kapitel 2.4).

Zudem gehört *S. aureus* aufgrund seiner herausragenden Adaptationsfähigkeit an die verschiedensten Bedingungen im Wirtsorganismus und seiner Pathogenität zu den häufigsten bakteriellen Erregern sowohl bei Menschen wie auch bei Tieren (Archer et al. 1998).

Ein weiteres nicht zu unterschätzendes Problem ist die Multiresistenz, die mittlerweile viele Stämme von *S. aureus* besitzen. Sie bereiten im Krankenhausalltag oft große Probleme und sind die häufigsten Auslöser nosokomialer Wund-, Atemwegs- und Hautinfektionen, die sowohl aufgrund von Kolonisation bei Patienten oder Personal, aber auch durch mangelnde Hygiene in den Krankenhäusern, begünstigt werden (Lee 2007).

Sie können sich gut an ihren jeweiligen Wirt anpassen und besiedeln beim Menschen bevorzugt den Nasen-Rachen-Raum und die Intertrigines. Quellen für die Erregerausbreitung ist meist direkter Hautkontakt und verunreinigte Gegenstände, auf denen *S. aureus* problemlos mehrere Wochen überleben kann (Boyce 2007, Kolmos et al. 2007).

Nicht selten verursachen diese asymptomatischen Besiedlungen mit *S. aureus* auch schwere Infektionen bei Trägern. Eine Studie aus dem Jahre 2001 konnte zeigen, dass 86% der Isolate aus dem Nasen-Rachen-Raum identisch waren mit denen einer Blutstrominfektion beim selben Patienten, und damit eine endogene Infektion vorlag (Von Eiff et al. 2001).

Resistenzen gegen β -Lactamase-empfindliche-Penicilline sind heutzutage bei *S. aureus* weit verbreitet, so dass davon ausgegangen werden kann, dass etwa 90% der in der Gesellschaft wie im Gesundheitssystem kursierenden Stämme gegen diese Antibiotikagruppe resistent sind (Lowy 2003).

Der Nachweis von Staphylokokken erfolgt nach Gram-Färbung unter dem Mikroskop nach kultureller Anreicherung in geeigneten Medien. Im Anschluss wird zur Genus- und Speziesdifferenzierung ein Plasmakoagulase- und/oder ein Clumpingfaktor-Test durchgeführt. Jedoch sind heute auch molekulare Nachweisverfahren, besonders zur Testung auf Enterotoxin oder TSST-1, möglich um bei bestimmten Fragestellungen im betreffenden Stamm die Toxinproduktion nachweisen zu können. Auch das Vorhandensein des Gens für die Produktion von Eap, welches in dieser Dissertation untersucht wurde, kann im zu identifizierenden Stamm kann mittlerweile mittels Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren (NAT) untersucht werden, da dieses Gen ausschließlich in *S. aureus* vorkommt und auch in nahezu allen Isolaten zu finden ist (Hussain et al. 2008).

2.2. Genetische Variabilität

S. aureus besitzt nicht zuletzt aufgrund einer Reihe mobiler genetischer Elemente wie Prophagen, Transposons und Plasmide und einer Vielzahl an Punktmutationen, so genannter single-nucleotide polymorphisms (SNPs), eine große genetische Variabilität, sodass eine Vielzahl unterschiedliche Stämme mit jeweils spezifischen Eigenschaften existiert (Sabirova et al. 2014). So enthält der im Rahmen dieser Dissertation verwendete Laborstamm SA113 unter anderem Punktmutationen im „accessory gene regulator“ (*agr*) Locus, einem der wichtigsten regulatorischen Elemente der Virulenzfaktorproduktion in dieser Spezies (Herbert et al. 2010). Das für Vorversuche im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchte *S. aureus* Isolat, der Stamm Newman, weist ebenfalls mehrere Punktmutationen auf, die die Virulenz dieses Isolates nachhaltig beeinflussen. So enthält der Stamm Newman im Sensormolekül des Zweikomponentensystems SaeRS eine Punktmutation, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Sensors führt und zu einer hohen Expression von Exoproteinen wie beispielsweise Eap führt (Karlsson et al. 2001, Schäfer et al. 2009). Auf der anderen Seite fehlen diesem Isolat die in der bakteriellen Zellwand verankerten Fibronectin-Bindeproteine A und B, da diesen aufgrund von Punktmutationen in den entsprechenden Genen die C-terminalen Erkennungssequenzen fehlen, die zur kovalenten Verankerung in der Zellwand benötigt werden (Grundmeier et al. 2004). Varianten von SA113 und *S. aureus* Newman, bei denen *vwb* bzw. die *fnbps* repariert wurden, existieren zum heutigen Zeitpunkt noch nicht. Neuere Publikationen legen jedoch nahe, dass das vWF-Bindeprotein vWbp der wesentliche Faktor von *S. aureus* für das Binden an von-Willebrand-Faktor-Fäden ist (Claes et al. 2014).

Interessanterweise können die verschiedenen Stämme auch von Labor zu Labor deutlich variieren. Mehrere Vermehrungszyklen unter verschiedenen Bedingungen tragen dazu bei, dass sich die Bakterienpopulation schon in kürzester Zeit verändert und isolatspezifische Varianten entstehen, in denen bestimmte Gene vermehrt oder vermindert exprimiert werden. So besitzen wahrscheinlich die meisten Labore einen etwas anderen Stamm vom „gleichen“ *S. aureus* Isolat 8325-4 aus dem auch SA113 hervorging, auch wenn eventuell nur ein geringfügiger Unterschied besteht (Baek et al. 2013).

2.3 Infektionen

In einer großen Studie von de Kraker und Mitarbeitern, in welcher die Bedeutung von Blutstrominfektionen, ausgelöst durch *S. aureus* (MRSA) und *E. coli* (G3CREC) untersucht wurde, konnte festgestellt werden, dass die Mortalität und die Aufenthaltsdauer im Krankenhaus eine große Belastung für das Gesundheitssystem darstellen (de Kraker et al. 2011). Besonders die multiresistente Variante von *S. aureus*, MRSA, ist im Vergleich zur Methicillin-empfindlichen Variante von *S. aureus*, gefürchtet. Eine Studie konnte zeigen, dass Patienten, die an eine Bakteriämie verursacht durch MRSA litten, ein deutlich schlechteres Outcome hatten, als Patienten, die sich mit einem Antibiotika-empfindlichen Stamm (MSSA) infiziert hatten (Wang et al. 2015). Diese zunehmende Resistenz von *S. aureus* gegen eine Vielzahl von Antibiotika könnte in Zukunft viele Probleme verursachen und erfordert ein gutes Monitoring von MRSA in Kliniken.

Die Verbreitung von *S. aureus* ist aber keinesfalls ein Problem, welches sich nur auf Krankenhäuser beschränkt. Das Bakterium kann sich gut an den jeweiligen Wirt anpassen und besiedelt beim Menschen bevorzugt den Nasen-Rachen-Raum und die Intertrigines. Die Trägerrate eines in der Regel antibiotikasensiblen Stammes von *S. aureus* liegt bei gesunden Erwachsenen in Deutschland bei 15-40%. Quellen für die Erregerausbreitung sind meist direkter Hautkontakt und verunreinigte Gegenstände (Boyce et al. 2007, Kolmos et al. 2007). Als Kommensale wird er dabei in der Regel durch das Immunsystem des immunkompetenten Menschen gut kontrolliert, so dass es in dieser gesunden Bevölkerungsgruppe nur selten zu Infektionen kommt. Die Kolonisation mit *S. aureus* gilt aber trotzdem als Risikofaktor für eine Infektion des Trägers und ist ein bedeutendes Reservoir für die Übertragung von *S. aureus* auf immunsupprimierte Patienten im Krankenhausumfeld (van Belkum 2016). Ob es zu einer Infektion kommt, hängt dabei im Wesentlichen von den Pathogenitätsfaktoren des Keims und von den entsprechenden Wirtsfaktoren ab (Wertheim et al. 2004).

Ein besonders hohes Risiko für eine Infektion mit *S. aureus* haben Menschen mit chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus und angeborenen Störungen des Immunsystems. Des Weiteren gehören i.v. Drogenabhängige, Dialysepatienten, HIV-Infizierte, Menschen mit chronischen Wunden oder Tracheostoma sowie Intensivpatienten zu den Risikopersonen für eine Infektion (Lowy 1998, Mandell 2008).

S. aureus kann verschiedene Arten von Infektionen verursachen, die in drei Gruppen unterteilt werden können. Diese werden im nachfolgenden Text genauer dargestellt:

2.3.1 Toxin-vermittelte Erkrankungen

Zu der ersten Gruppe gehören die unmittelbar durch die Toxine selbst ausgelösten Erkrankungen wie Staphylokokken Enterotoxin-vermittelte Enteritiden und das Toxische Schock Syndrom (TSS). Am häufigsten kommen Lebensmittelvergiftungen durch die Enterotoxine A bis H vor. *S. aureus* kann sich schnell in unzureichend gekühlten Lebensmitteln vermehren und so kann in kurzer Zeit in diesen Lebensmitteln viel Enterotoxin akkumuliert werden, welches in der Folge dann auch Temperaturen über 120°C problemlos übersteht (Casman et al. 1963). Die Enterotoxine haben die Eigenschaften von Superantigenen, das heißt, sie binden direkt an MHC-II-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen und verknüpfen sie mit T-Zellrezeptoren auf T-Zellen. So werden gleichzeitig viele CD4⁺-T-Zellen aktiviert, was zu einer massiven Zytokinausschüttung im Körper führt und damit zu einer Veränderung der Zellpermeabilität und folglich zu einem Entgleisen des Elektrolythaushaltes (Krakauer et al. 2013).

Da jedoch bei diesem Krankheitsbild keine vermehrungsfähigen Keime aufgenommen werden, handelt es sich um eine Intoxikation. Typisch hierfür ist das schnelle Auftreten von Symptomen wie Übelkeit und Erbrechen und ein selbstlimitierender Verlauf nach 8-48 Stunden nach Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln.

Ebenfalls zur Gruppe der toxinvermittelten Erkrankungen gehört das Staphylococcal scaled skin syndrome (SSSS), welches durch *S. aureus* Stämme verursacht wird, die die Exfoliativtoxine ETA, ETB und/oder ETC produzieren. Der Erkrankung liegt eine intradermale Spaltbildung mit nachfolgendem Ödem zwischen Stratum spinosum und Stratum granulosum der Epideris zugrunde. Die generalisierte Verlaufsform, von welcher besonders häufig Säuglinge und ältere, immunsupprimierte Menschen betroffen sind, resultiert aus einer Toxinausschüttung über den kompletten Organismus infolge fehlender, schützender spezifischer Antikörper. Diese Erkrankung tritt am häufigsten als Hospitalinfektion auf, kann aber auch in Gemeinschaftseinrichtungen wie zum Beispiel Kindertagesstätten vorkommen (Lillibridge et al 1972).

Das Toxic shock Syndrom (TSS) ist eine weitere Erkrankung im Rahmen der Toxin-vermittelten Erkrankungen und beruht auf der Superantigenwirkung des Toxic-shock-syndrome-Toxins (TSST-1) und dessen Auswirkungen auf das Immunsystem. Aufgrund der Inaktivierung regulatorischer T-Zellen und der Aktivierung einer großen Anzahl von T-Zellen mit nachfolgender Zytokinfreisetzung im ganzen Körper kommt es zu einer gefährlichen Überaktivierung des Immunsystems, dessen Folge dann der schwere Schock ist (Tilahun et al. 2014).

An diesem Syndrom erkranken im Gegensatz zu den meisten anderen *S. aureus*-assoziierten Erkrankungen vorwiegend jüngere Menschen. Im späten Erwachsenenalter besitzen bereits mehr als 90% der Bevölkerung in Deutschland und den USA Antikörper gegen TSST-1 (Schröder et al. 1988). Menstruierende Frauen mit Tampongebrauch, welche sexuell aktiv sind, sind am häufigsten von einem durch TSST-1 ausgelösten TSS betroffen. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass es sich insgesamt um ein eher seltenes Krankheitsbild handelt, das eine Inzidenz von etwa 0,79 von 100.000 Frauen aufweist. Deutlich seltener noch kann das TSS aber auch als Komplikation bei der Benutzung von Diaphragmen, im Wochenbett oder nach septischen Aborten auftreten (LeRiche et al. 2012).

Unabhängig von der Geschlechtszugehörigkeit kann das TSS auch von Hauterkrankungen, Insektenstichen, Varizella-Läsionen oder chirurgischen Wunden ausgehen und zu schweren Komplikationen führen. Um diesen Problemen vorzubeugen konnte kürzlich eine Arbeitsgruppe zeigen, dass die Impfung mit einer nicht toxischen Variante von TSST-1, genannt mTSST-1, in einem Mausmodell einen Schutz gegen tödlich verlaufende Infektionen bieten konnte (Narita et al. 2015).

2.3.2 Katheter-assoziierte Erkrankungen

Die zweite Gruppe von Infektionen sind die Katheter-assoziierten Infektionen, wie sie besonders häufig auf Intensivstationen vorkommen. Die Patienten sind dort auf zentrale Katheter angewiesen und zudem oft durch schwere Krankheit geschwächt. Der Hauptinfektfokus sind hier zentrale Venenkatheter, durch die eine schwere Sepsis ausgelöst werden kann. Allein das Einbringen von Fremdkörpern in den menschlichen Körper stellt ein Risikofaktor für eine Infektion dar. (Seifert et al. 2004). In einer Studie von 2014 aus Taiwan

konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* der häufigste Erreger einer Katheter-assoziierten Sepsis war, gefolgt von *Pseudomonas aeruginosa* (Chen et al. 2014).

TABELLE									
Die häufigsten Erreger von nosokomialen Infektionen (NI) auf Intensivstationen; Anteil der nosokomialen Infektionen (in %) mit dem jeweiligen Erreger für die beatmungsassoziierten Infektionen der unteren Atemwege, ZVK-assoziierte Sepsis und HWK-assoziierten Harnwegsinfektionen; Gesamt und stratifiziert nach ITS-Art									
Art der ITS	Alle ITS	Interdisziplinär < 400 Betten	Interdisziplinär ≥ 400 Betten	Innere	Chirurgie	Neurochirurgie	Pädiatrie	Neurologie	Kardiologie
beatmungsassoziierte Infektionen der unteren Atemwege									
S. aureus (gesamt)	20,6	19,8	22,6	19,1	19,8	32,6	11,2	31,8	8,7
– darunter MRSA	7,2	9,6	8,7	6,1	6,0	5,2	0,9	13,6	2,7
P. aeruginosa	17,7	21,8	19,7	16,4	17,2	10,4	16,4	10,3	13,3
Klebsiella spp.	12,3	10,2	13,7	10,6	12,7	14,1	12,1	11,2	12,1
E. coli	12,2	10,0	14,6	10,1	12,4	14,8	6,0	7,6	11,6
Enterobacter spp.	5,8	5,8	9,1	6,7	9,4	11,0	11,2	9,7	11,1
ZVK-assoziierte Sepsis									
KNS	32,1	26,1	29,3	32,9	33,6	41,0	34,3	42,0	38,2
S. aureus (gesamt)	8,7	11,1	9,1	9,2	7,8	9,5	11,2	5,0	4,5
– darunter MRSA	5,8	8,6	5,7	5,2	6,0	2,2	1,4	4	4,9
Enterococcus	18,5	16,9	20,2	24,0	17,4	11,7	13,3	13,0	17,4
Klebsiella spp.	5,2	7,4	6,0	4,2	4,2	3,7	6,3	6	4,5
Candida albicans	5,6	8,5	4,8	3,9	6,5	2,9	2,8	3,0	5,9
HWK-assoziierte Harnwegsinfektion									
E. coli	27,8	27,2	26,6	25,1	28,3	35,4	n.a.	25,8	22,5
Enterococcus	26,5	27,4	27,6	26,3	27,6	22,8	n.a.	25,5	14,9
P. aeruginosa	14,2	14,8	14,7	11,2	15,2	13,2	n.a.	13,6	12,2
Candida albicans* ¹	8,7	7,0	10,0	12,5	7,8	4,7	n.a.	10,4	6,3
Klebsiella spp.	8,1	8,0	8,5	7,2	7,8	9,2	n.a.	9,3	9,5
Enterobacter spp.	5,0	4,9	5,2	3,3	4,9	7,3	n.a.	4,3	7,7

*¹ als alleiniger Erreger, KNS, Koagulase-negative Staphylokokken, n.a., keine Werte angegeben, da unzureichende Datenmenge (< 100 Infektionen)

Tabelle 1: Nosokomiale Infektionen und multiresistente Erreger in Deutschland:
Epidemiologische Daten aus dem Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
(Dtsch Arztebl Int 2011; 108(6): 87-93; DOI: 10.3238/arztebl.2011.0087)

Der Tabelle kann entnommen werden, dass dies fast analog auch für Deutschland zutrifft. Hier ist *S. aureus* der zweithäufigste Erreger nosokomialer ZVK-assoziiierter Septikämien, nach den Koagulase-negativen Staphylokokken. Bei den beatmungsassoziierten Infektionen der unteren Atemwege ist *S. aureus* sogar der häufigste Erreger. Ein wesentlicher Grund für die Häufigkeit von Staphylokokken als Auslöser ZVK-assoziiierter Infektionen ist die herausragende Eigenschaft von einigen Koagulase-negativen Staphylokokken und *S. aureus*, an unbelebte Materie zu adhären und die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen im Wirtsorganismus (Costerton et al. 1999). Zentrale Venenkatheter aus Kunststoff stellen für *S. aureus*, ebenso wie für Koagulase-negative Staphylokokken, eine mögliche Oberfläche zur Anhaftung dar. Kommt ein steriler ZVK beim Einbringen in den Menschen beim Durchtritt

durch die Haut mit diesen Bakterien in Kontakt, so können diese Bakterien an die ZVK Oberfläche binden und so in den Körper des Patienten gelangen. Dort kann sich das Bakterium, vom Immunsystem des Menschen weitestgehend geschützt, vermehren und einen vielschichtigen Biofilm ausbilden. Dieser Biofilm entsteht durch die Bildung von Polysacchariden und das Einbinden von extrazellulärer DNA (eDNA). Dadurch verkleben die Keime miteinander und bilden einen einheitlichen Film aus Bakterien und extrazellulärer Matrix, der einen wirkungsvollen Schutz gegen Opsonophagozytose darstellt (Harraghy et al. 2006). Hat sich ein Biofilm gebildet, können sich aus diesem einzelne Bakterien und auch ganze Cluster lösen und sich so im kompletten Blutkreislauf verbreiten. Die Folge ist eine schwere Sepsis, eventuell auch begleitet von daraus resultierenden Organabszessen. Die Biofilmbildung ist ebenfalls ein großes Problem der antibiotischen Therapie, da dort unterschiedliche Bakterienzellen in verschiedenen Stoffwechselluständen nebeneinander koexistieren. Eine inaktive Subpopulation von Bakterien mit geringer Stoffwechselaktivität (sogenannte Persister) ist zudem einer Antibiotikatherapie schlechter zugänglich, weil viele Antibiotikagruppen vorwiegend aktive Stoffwechsellvorgänge der Bakterien beeinflussen und sich somit eine Sanierung des Infektfokusses schwierig gestaltet (Stewart et al. 2001).

2.3.3 Invasive Erkrankungen

Zu dieser dritten Gruppe von Erkrankungen gehört eine Vielzahl unterschiedlichster Krankheitsbilder. Angefangen von lokal beschränkten Erkrankungen wie Furunkel, Karbunkel und Abszessen, bis hin zu tiefgehenden systemischen Infektionen wie Pyodermien, eitrige Meningitiden, Pneumonien, Osteomyelitis, Endokarditis und Sepsis. Ausgehend von eher lokalen Infektionen kann sich *S. aureus* schnell in andere Organsysteme absiedeln, was dort zu Abszessbildung und Ausbildung von Empyemen führt. Durch Ausschwemmung der Keime in die Blutbahn kann schnell eine gefährliche Sepsis entstehen.

In einer großen Studie, die in Ländern mit hohem Einkommen der Bevölkerung durchgeführt wurde, zeigt auch heute noch eine vergleichsweise hohe Mortalität der *S. aureus* Infektionen. Bei Patienten, die alle Kriterien der schweren Sepsis beziehungsweise des septischen Schocks durch *S. aureus* erfüllten, lag die Gesamtmortalität im Krankenhaus bei 24%, bei der infektiösen Endokarditis sogar bei 35% (Le Moing et al. 2015).

Die gefürchtete Staphylokokken-Endokarditis entsteht ebenfalls durch Keimausschwemmung in die Blutbahn und hat im Gegensatz zu Endokarditiden, die durch Enterokokken oder orale Streptokokken verursacht werden, einen foudroyanten Verlauf durch schnelle Zerstörung und Abszedierung an den Herzklappen. Während beispielsweise Streptokokken nur beschädigtes Endothel und Herzklappen befallen, können Staphylokokken auch an unbeschädigtes Endothel binden und dort eine Infektion hervorrufen (Moreillon et al. 2002).

S. aureus ist der häufigste Erreger der Endokarditis, sowohl an nativen wie auch an künstlichen Herzklappen. Trotz des enormen medizinischen Fortschrittes in den letzten Jahrzehnten hat die Häufigkeit der infektiösen Endokarditis nicht abgenommen. Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass es heutzutage neue Risikofaktoren für die Endokarditis gibt, die noch vor einigen Jahrzehnten nicht bekannt waren. Dazu gehören der intravenöse Drogenabusus, sklerotische Herzklappenveränderungen bei älteren Patienten, der Gebrauch von künstlichen Herzklappen sowie die Verbreitung von nosokomialen Erregern (Moreillon 2004).

Für die Bindung an intaktes Endothel spielen die Fibronektin-Bindeproteine eine wesentliche Rolle, wie schon Sinha et al. im Jahre 2000 zeigten (Sinha et al. 2000) und Kerdudou im Jahre 2006 mittels Intravitalmikroskopie an Hamstern bestätigen konnte. In den Versuchen reduzierte sich die Bindung an postkapilläre Venolen deutlich, wenn eine *fnbpA*-Mutante von *S. aureus* verwendet wurde (Kerdudou et al. 2006).

2.4 Virulenzfaktoren

2.4.1 Zellwand und Kapsel

Die Zellwand von *S. aureus* ist sehr dick und besteht zu 50 Prozent aus Peptidoglycan, in der N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure 1,4-glykosidisch verbunden sind. Diese Zuckerketten werden wiederum durch Proteinseitenketten miteinander quervernetzt, so dass ein relativ formstabilen Makromolekül, der Peptidoglykansakkulus entsteht (Lowy 1998). Auf und in der Zellwand von *S. aureus* sind eine Vielzahl von Proteinen und Teichonsäuren verankert, die zur Virulenz der verschiedenen Stämme beitragen. Eines der zellwandständigen Proteine ist der Clumping Faktor (ClfA und B), der als Rezeptor für Fibrinogen/Fibrin fungiert. Dadurch ist es dem Bakterium unter anderem möglich, sich

auf verletztem Gewebe, aber auch an Kunststoffmaterialien und auf Implantaten, auf denen sich Fibrinogen anlagert, festzusetzen. Des Weiteren fördert die Bindung von Fibrin an die bakterielle Oberfläche die Bildung hochmolekularer Fibrinnetzwerke, in denen sich *S. aureus* weitestgehend geschützt vor der Phagozytose durch Immunzellen vermehren kann.

Außerdem bilden die meisten *S. aureus* Stämme Protein A (Spa), welches ebenfalls mit dem Peptidoglykansakkulus verbunden ist, zum Teil aber auch durch proteolytische Prozessierung in das extrazelluläre Milieu abgegeben wird (O'Halloran et al. 2015). Es bindet an das F_c-Fragment von Immunglobulinen, so dass dieser Teil nicht mehr an den F_c-Rezeptor von Makrophagen binden kann. (Sjodahl 1977). Dadurch wird die Opsonierung des Bakteriums, und damit die Phagozytose, verhindert (Dossett et al. 1969), ebenso wird der Zelltod von B-Zellen hervorgerufen (Goodyear et al. 2003). Weitergehend gilt Spa auch als ein wichtiger Bindungsfaktor von *S. aureus* an die globuläre Form von vWF und für die Bindung an immobilisierten vWF unter langsamen Flussbedingungen (O'Seaghdha et al. 2006).

Die Kapsel spielt ebenfalls eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor des Bakteriums. Sie besteht meist aus Polymeren der Glucosaminuronsäure oder der Mannosaminuronsäure und bietet dem Bakterium viele Vorteile, insbesondere Schutz vor Opsonierung und Phagozytose (Nanra et al. 2013) sowie Schutz vor Austrocknung und wurde bereits von Gilbert et al 1931 erstmalig beschrieben. Etwa 30 Jahre später konnte in *in vivo* Versuchen festgestellt werden, dass die Kapsel einen wesentlichen Virulenzfaktor darstellt. Mäuse, welche mit einem bekapselten Stamm infiziert wurden starben deutlich häufiger, als die Mäuse der Vergleichsgruppe, die mit einem unbekapselten Stamm infiziert waren (Cohn 1962, Lowy 1998).

Die Kapselbildung hängt stark von den Umgebungsbedingungen des Bakteriums ab und erfolgt hauptsächlich *in vivo* unter Selektionsdruck. Dennoch besitzen 90% der untersuchten *S. aureus* Stämme eine Kapsel (Lee et al. 1994).

Bislang sind 11 verschiedene Kapseltypen bekannt, wobei die Typen 5 und 8 in 92% der für menschliche Infektionen verantwortlichen *S. aureus* Isolate detektiert werden können, wobei aber immer nur ein Teil der Bakterien bekapselt ist (Roughman et al. 2005).

2.4.2 Enzyme mit Virulenzfunktion

S. aureus verfügt über eine Vielzahl von Enzymen, die wesentlich zur Pathogenität des Bakteriums beitragen, wie Protease und Lipasen. Proteasen können Proteine in der Umgebung von *S. aureus* spalten (z.B. im Serum von Menschen und Tieren) und die Oligopeptide und Aminosäuren zum eigenen Wachstum und Vermehrung verwenden. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden von Kolar et al. Experimente mit Schweineserum durchgeführt, in welchem eine Mutante von *S. aureus* gezüchtet wurde, die keine Proteasen herstellen kann (Protease Null Variante). Schon nach einer Stunde Inkubationszeit konnte eine deutliche Abnahme des Gesamtüberlebens des *S. aureus* Stammes ohne Proteasenbildung, im Vergleich zum Wildtyp-Stamm beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass *S. aureus* seine Proteasen auch zur Generierung neuer Nährstoffe einsetzen könnte. Des Weiteren sind die von *S. aureus* produzierten Proteasen in der Lage, antimikrobielle Proteine zu spalten und sich damit einen Vorteil gegenüber dem Wirtsimmunsystem zu verschaffen. Weiterhin ist bekannt, dass Proteasen bei der Abszessbildung eine wichtige Rolle spielen, indem sie dem Bakterium das Eindringen in die Wirtsgewebe erleichtern (Kolar et al. 2013).

Von Lipase hingegen ist bekannt, dass sie zur Biofilmbildung und Abszessbildung *in vivo* beiträgt. In Mausmodellen zur Untersuchung der intraperitonealen Abszessbildung wurde 2012 gezeigt, dass eine Lipase-defiziente Mutante von *S. aureus* nach intraperitonealer Injektion bedeutend weniger Organabszesse verursacht als der vergleichbare Wildtyp-Stamm. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte in derselben Studie zudem belegen, dass die aktive Immunisierung der Mäuse mit rekombinanter Lipase die Tiere vor der tödlichen Infektion schützen konnte (Hu et al. 2012).

Die Hyaluronidase wird in allen *S. aureus* Stämmen produziert und ist für die Gewebeerstörung und damit für die Ausbreitung und Abszessbildung von Bedeutung. Sie spaltet die Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix des Bindegewebes (Hynes und Walton 2000, Hart et al. 2009). Sie stellt auch *in vivo* einen wichtigen Virulenzfaktor von *S. aureus* dar, wie in einem Mausmodell der schweren Lungeninfektionen gezeigt wurde. Mäuse, die mit einem Hyaluronidase-defizienten Stamm infiziert wurden, wiesen in ihren Lungen eine wesentlich niedrigere Bakterienbelastung und mehr Hyaluronsäuren auf (Ibberson et al. 2014).

Vier verschiedene, membranschädigende Hämolsine sind bei *S. aureus* bekannt (α , β , γ und δ -Hämolsin) und jeder bis dato untersuchte *S. aureus* Stamm kann mindestens einen Vertreter dieser Hämolsine bilden. Sie zerstören die Membran von Erythrozyten und anderen Wirtszellen (Hague 1967). Eine besondere Bedeutung kommt dem α -Hämolsin zu, weil es neben der kompletten Lyse von menschlichen Erythrozyten auch die Zellmembran verschiedener professioneller Phagozyten zu schädigen vermag und auf diese Weise massiven Einfluss auf die angeborene Immunantwort nimmt (Joubert et al. 2007).

Die Koagulase bildet zusammen mit Prothrombin einen Komplex, der auch ohne Prothrombin-Aktivierung Fibrinogen zu Fibrin polymerisiert. Somit ist die freie Koagulase als Virulenzfaktor an der Bildung der charakteristischen Fibrinkapsel um Läsionen von *S. aureus* beteiligt, speziell bei der Abszessbildung. Koagulase-defiziente Stämme verursachten in einem *in vivo* Modell zur Abszessbildung in der Haut und im Weichteilgewebe deutlich kleinere Abszesse, als die entsprechenden Wildtyp-Stämme (Malachowa et al. 2016). Die Abszessbildung ist eine charakteristische Eigenschaft von *S. aureus*, denn nur so kann der Keim lokalisierte Läsionen zu erzeugen, die ihn vor Angriffen des Immunsystems schützen (Cawdery et al. 1969). Auch diagnostisch wird die Koagulasebestimmung als Hauptmerkmal der Speziesbestimmung von *S. aureus* genutzt, wobei mittlerweile auch die moderne MALDI-TOF Massenspektrometrie von Bedeutung ist (El-Bouri et al. 2012).

In ein Fibrinnetzwerk eingebundene *S. aureus* Zellen können sich mit der Hilfe eines weiteren Exoproteins, der Staphylokinase Sak, aus dieser Struktur wieder befreien. Sak katalysiert die Entstehung von Plasmin aus Plasminogen, welches die Fibrinkapsel partiell zu lysieren vermag, die sich in der frühen Phase des Abszesses gebildet hat und ermöglicht so die weitere Ausbreitung im Gewebe (Okada et al. 2000, Bokarewa et al. 2006).

Die sekretierten DNasen von *S. aureus* sind thermostabile Nukleasen, die in der Lage sind, DNA und RNA zu spalten (Heins et al. 1967), so dass die Ausbreitung der Erreger im Gewebe durch Hemmung der Immunabwehr erleichtert wird. Staphylokokken sind mit Hilfe der DNasen in der Lage, extrazelluläre Fallen aus DNA (NETs), die von neutrophilen Granulozyten im Falle einer Infektion aus den Immunzellen ausgeschleust wird, zu spalten. *S. aureus*

entkommt so der Immunantwort des Wirtsimmunsystems und kann dadurch auch den Zelltod von Immunzellen begünstigen (Thammavongsa et al. 2013).

Weitere Vertreter in der Gruppe der Virulenzfaktoren sind die Leukozidine, die in der Lage sind polymorphkernige Granulozyten und Makrophagen zu zerstören. Sie beeinträchtigen auf diese Weise maßgeblich das Phagozytosepotential des Wirtes und führen so zu einer Form der Immunevasion. Zu besonders schwerwiegenden Infektionen führt das Pantone-Valentine Leukozidin (PVL), das in der Lage ist, Poren in der Zellmembran von Leukozyten zu formen, wodurch es rasch zur Lyse, bzw. bei niedrigen PVL-Konzentrationen, zum Zelltod kommt (Löffler et al. 2010).

S. aureus Stämme, die diesen Virulenzfaktor besitzen, verursachen oft tiefe Hautinfektionen oder seltener eine rasch verlaufende nekrotisierende Pneumonie, deren Mortalität bei etwa 40% liegt und die besonders häufig jüngere Menschen betrifft (Gillet et al. 2002).

2.4.3 MSCRAMMs

Die Gruppe der MSCRAMMs („microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“) sind in die bakterielle Zellwand mittels LPXTG-Motiv verankert. Viele Vertreter dieser Gruppe, wie die Fibronektin-Bindeproteine und die Clumping Faktoren, aber auch Protein A vermitteln den ersten Kontakt zwischen Bakterium und dem Wirtsorganismus, was ein erster wichtiger Schritt zur Infektion ist (Foster 1998).

2.4.4 SERAM

Zur zweiten Gruppe der Oberflächenproteine gehören die SERAM („secretable expanded repertoire adhesive molecules“), die nicht an die Zelloberfläche gebunden sind, sondern sezerniert und partiell an die bakterielle Zellwand zurückgebunden werden.

Beispiele für SERAMs sind Koagulase (Coa), das Extracelluläre Fibrinogen Bindung Protein (Efb), das Extracelluläre Matrix Bindung Protein (Emp) und das hier untersuchte Extracelluläre Adhärenz Protein (Eap). Ihre Bedeutung im Zusammenhang mit der Entstehung von Infektionen ist zurzeit Gegenstand intensiver Forschung. Ebenso ist ihre wahre Bedeutung für die Entstehung verschiedenster Krankheitsbilder wahrscheinlich noch weitestgehend unklar

Ein für die Virulenz von *S. aureus* schon gut untersuchter Vertreter dieser Gruppe ist Eap. Das Exoprotein wird wachstumsphasenabhängig vom Bakterium sezerniert, kann aber über eine Zellwand-gebundene neutrale Phosphatase (Nptase) und vermutlich weitere Faktoren an die bakterielle Oberfläche zurückbinden (Flock und Flock 2001). Eine detaillierte Beschreibung der vielfältigen Funktionen dieses Proteins wird in Kapitel 2.5 dargestellt.

2.4.5 Biofilmbildung

Auch die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist eine wichtige Virulenzeigenschaft von *S. aureus*, denn die Bakterien sind im Biofilm verstärkt vor dem Immunsystem geschützt und Antibiotika können einzelne Subpopulationen dieses multizellulären Konstrukts nur unzureichend abtöten, wie es bereits für *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt wurde (Suci et al. 1994).

In der Medizin wird die Biofilmbildung von pathogenen Keimen oft unterschätzt, denn in etwa 80% der bakteriellen Infektionskrankheiten schützen sich die Bakterien mit einem Biofilm vor dem Immunsystem (Fux et al. 2005).

Im Zuge der *S. aureus* Biofilmreifung kommt es auch zu einer Dichtemessung der Bakterienpopulation, dem sogenannten „Quorum sensing“. Dies bedeutet, dass die Bakterien ein Signalmolekül in das umgebene Milieu abgeben, das von spezifischen Rezeptoren auf der bakteriellen Zelloberfläche erkannt werden kann. Akkumuliert dieses in der Umgebung der Bakterienzelle, so kommt es zur Aktivierung des Rezeptors und einer nachfolgenden regulatorischen Anpassung des Transkriptoms der bakteriellen Zelle. In der Folge dieser transkriptionellen Veränderungen können sich größere Bakterienansammlungen vom Biofilm ablösen und in den Blutkreislauf des Wirtes gelangen. So sind Biofilme eine Quelle für chronische Infektionen und wiederkehrende Septikämien, die auch in einer generalisierten Sepsis enden können. *S. aureus* Biofilme werden besonders mit Wundinfektionen, Endokarditiden und Infektionen von medizinischen Implantaten in Verbindung gebracht (Paharik und Horswill 2016).

Die Infektion von Implantaten ist meist besonders schwerwiegend für den Patienten, da diese aufgrund der schlechten Sanierbarkeit mit Antibiotika in der Regel wieder entfernt werden müssen. Besonders gefährdet sind Implantate und Katheter mit großen Oberflächen oder mit Hautdurchtrittsstellen, da die Keime der Hautflora hier besonders leicht eindringen

und sich vermehren können. Beispiele für infizierte medizinische Produkte sind vor allem die Venenverweilkanülen, künstliche Herzklappen und Gelenkprothesen. Hier ist *S. aureus* für 50% der Protheseninfektionen verantwortlich (Barrett et al. 2014).

Eine entscheidende Rolle in der Biofilmbildung spielt auch Eap, welches durch seine Eigenschaft des Bindens verschiedener Proteine im Blut und an sich selbst die Aggregation und die Anhaftung an Prothesenmaterialien unterstützt (Thompson et al. 2010).

2.5 Eap (Extracellular adherence protein)

Eap gehört zur Gruppe der SERAM, und hat je nach Stamm eine Größe zwischen 60 und 73 kDa (McGavin et al. 1993).

Das Exoprotein wird von nahezu allen *S. aureus* Stämmen gebildet, im Gegensatz zu Koagulase-negativen Staphylokokken wie *S. epidermidis*, die kein Eap produzieren (Hussain et al. 2008).

Bereits in den 1990er Jahren wurde Eap von verschiedenen Forschergruppen erstmals als kationisches Protein auf der Zelloberfläche von *S. aureus* beschrieben (Jahreis et al. 1995). Die spätere Charakterisierung eines spezifischen Isolates ergab, dass das Protein in diesem Fall aus 689 Aminosäuren besteht, wobei sich eine 110 Aminosäuren lange Sequenz sechsmal wiederholt. Der Vergleich von Eap mit bekannten Proteinstrukturen zeigte eine große Ähnlichkeit mit der C-Terminalen von bakteriellen Superantigenen, welche an den T-Zellrezeptor binden können und damit eine Immunreaktion verursachen (Geisbrecht et al. 2005). Die Größe von Eap kann je nach Stamm von *S. aureus* variieren, die vorangegangenen Angaben beziehen sich nur auf ein spezifisches Isolat von Eap, welches in dieser Veröffentlichung untersucht wurde.

Bis jetzt konnten sieben Plasmaproteine identifiziert werden, an die Eap binden kann, unter anderem Fibronectin, die α -Kette von Fibrinogen und Prothrombin. An die Oberfläche von Staphylokokken kann Eap mittels seiner neutralen Phosphatase nach Sekretion zurückgebunden werden (Flock und Flock 2001). In Versuchen konnte Eap wesentlich schlechter an die Oberfläche von anderen bakteriellen Spezies wie *S. epidermidis*, *Streptococcus mutans* oder *Escherichia coli* binden (Palma et al. 1999). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch die Zugabe von Eap die bakterielle Adhäsion an Fibroblasten und Epithelzellen (Keratinocyten) verbessert werden kann (Palma 1999, Bur et al. 2013).

Die maximale Produktion von Eap wird stark von den Wachstumsbedingungen beeinflusst und findet in LB-Medium in der exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase statt. Messungen im Überstand nach 4 Stunden und 19 Stunden, was der exponentiellen Phase und der stationären Phase entspricht, ergaben, dass sich 70% des Eap im Überstand befindet, wobei aber insgesamt mehr Eap in der stationären Phase produziert wurde (Palma et al. 1999). In Hinblick auf die Expression gibt es jedoch große Unterschiede zwischen den einzelnen *S. aureus* Stämmen, wobei das *S. aureus* Isolat Newman aufgrund der zuvor schon beschriebenen Punktmutation im *saeS*-Gen besonders viel Eap produziert (Schäfer et al. 2009, Mainiero et al. 2010).

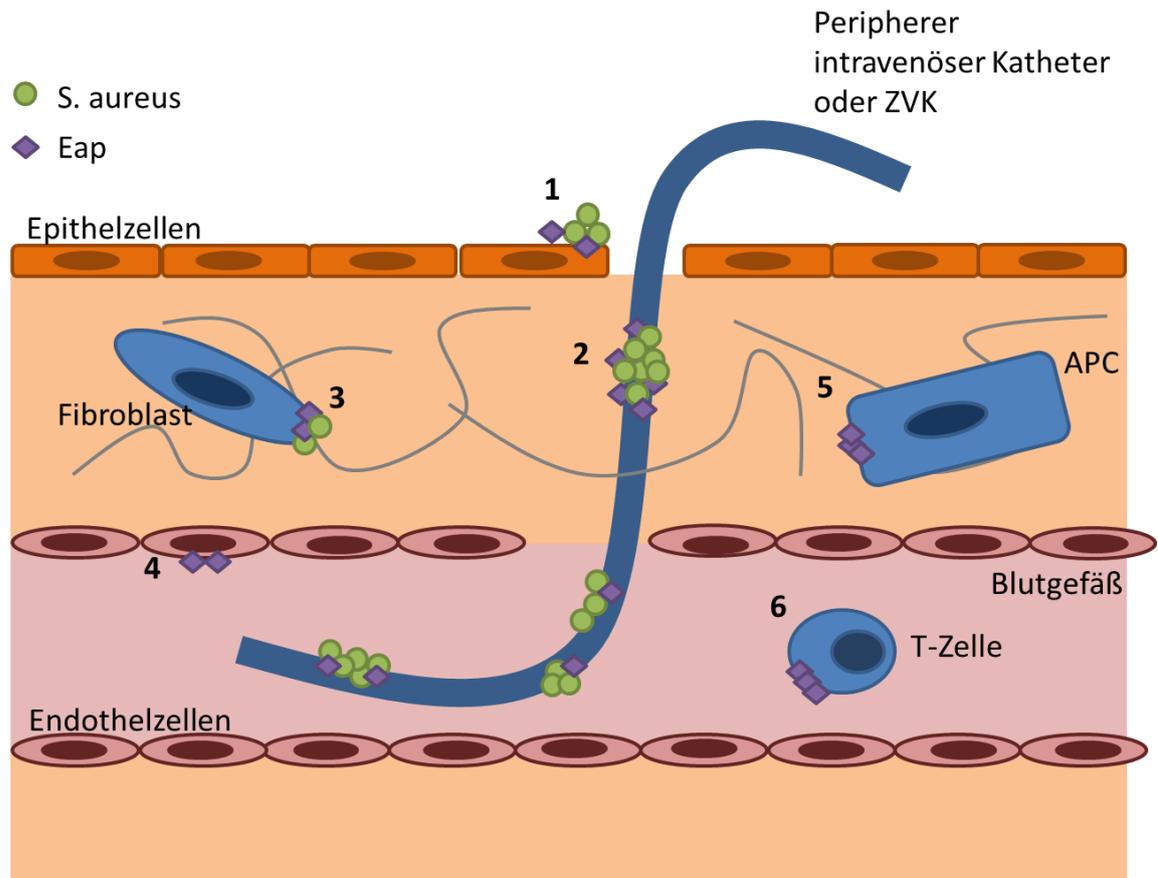


Abb. 1a: Übersicht der Interaktionen von Eap mit verschiedenen Zelltypen und Kunststoffmaterialien nach Einbringen eines Katheters in ein Blutgefäß. (Ergänzt nach Harraghy et al. 2003)

- (1) Eap ist wichtig für die Adhäsion an Epithelzellen, indem es sowohl die Adhäsion als auch die Internalisierung von *S. aureus* unterstützt (Hussain et al. 2002, Kreikemeyer et al. 2002, Hagggar et al. 2003, Bur et al. 2013).
- (2) Die Adhäsion von *S. aureus* an Implantate oder Katheter ist im klinischen Umfeld besonders wichtig. Eap kann an die Plasmaproteine binden, die am Fremdkörper haften, oder es bindet via Eap-Eap-Interaktionen direkt an das auf dem Fremdkörper befindlichen Eap (Palma et al. 1999, Kreikemeyer et al. 2002).
- (3) Eap ist beteiligt an der Adhäsion und Internalisierung an Fibroblasten (Hussain et al. 2002, Kreikemeyer et al. 2002, Hagggar et al. 2003).
- (4) Eap bindet an ICAM-1 von Endothelzellen, was die Bindung von Leukozyten am ICAM-1-Rezeptor blockiert und damit die Extravasation von Leukozyten verhindert (Chavakis et al. 2002).
- (5) Die Bindung von Eap an ICAM-1 auf Antigenpräsentierenden Zellen (APC) könnte die Interaktion mit T-Zellen verhindern mit schweren Folgen für das Immunsystem. (Cabañas und Hogg 1993, Rodriguez-Fernandez et al. 1999).
- (6) Die Interaktionen von Eap mit T-Zellen verursachen den Tod der T-Zellen und schwächen so die Immunabwehr (Lee et al. 2002).

2.5.1 Interaktion mit eukaryontischen Zellen

Eap bindet an Fibroblasten und Epithelzellen, wie Untersuchungen von Hussain et al. (2002), Kreikemeyer et al. (2002) und Hagggar et al. (2003) zeigten. Wurde in den Versuchen eine *eap* Mutante von *S. aureus* untersucht, konnte eine Reduktion der Adhäsion um 80% erreicht werden (Kreikemeyer et al. 2002). Wurde Eap anschließend substituiert, konnte sowohl beim Wildtyp als auch bei der *eap* Mutante ein Anstieg der Adhäsion an Zellen beobachtet werden. Dies belegt auch, dass die Bindung von exogenem Eap an die Zelloberfläche unabhängig vom endogen produzierten Eap ist und es mehrere Proteine auf der Oberfläche des Bakteriums geben muss, die Eap binden können (Hussain et al. 2002). Des Weiteren konnten Hussain et al. zeigen, dass Anti-Eap-Antikörper die Adhäsion von *S. aureus* Newman an Fibroblasten und Epithelzellen vermindern.

S. aureus war lange Zeit nur als extrazellulärer Organismus bekannt. Verschiedene Arbeiten konnten jedoch belegen, dass der Keim nicht nur an Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten adhäreren, sondern auch in diese eindringen kann. (Dziewanowska et al. 1999; Peacock et al. 1999; Sinha et al. 1999, 2000). Dass die Invasion in diese Zellen auch von Eap beeinflusst wird, zeigten Hagggar et al. 2003, indem sie nachwiesen, dass ein *S. aureus* Wildtypisolat besser in Endothelzellen eindringen kann als eine isogene *eap* Mutante des Bakteriums. Wurde wiederum Eap exogen zugeführt, konnte sowohl die Internalisierung des Wildtyps als auch der *eap* Mutante gesteigert werden, wohingegen die Internalisierung durch Vorbehandlung mit Anti-Eap-Antikörpern vermindert wurde.

Diese Versuche wurden jedoch alle in statischen Systemen durchgeführt, um die Adhäsion an die verschiedenen eukaryonte Zelltypen zu untersuchen.

2.5.2 Störung der Angiogenese und Wundheilung

Infektionen mit *S. aureus* sind auch für eine verzögerte Wundheilung bekannt und Eap scheint auch bei diesem Pathogenese-Phänotyp eine wichtige Funktion zu übernehmen. So konnte belegt werden, dass Eap Entzündungszellen an der Einwanderung in das betroffene Gewebe und die Neovaskularisation hemmt. Dies kommt durch ein vermindertes Ausschütten von ICAM-1 und durch die daraus resultierende verminderte Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NFκB in Leukozyten zustande und durch eine zusätzliche Verminderung der Expression des Tissue Faktors.

Des weiteren blockiert Eap die α_V -Integrin-vermittelte Endothelzellmigration sowie die Kapillarneubildung *in vitro* und *in vivo*, und verlangsamt somit die Wundheilung (Athanasopoulos et al. 2006).

2.5.3 Immunmodulation durch Interaktion mit ICAM-1

Eap ist außerdem in der Lage, über β_2 -Integrin- und Urokinase-vermittelte Signalwege die Leukozytenreaktion zu inhibieren, wodurch eine Adhäsion von Leukozyten an das Endothel sowie eine Extravasation vermindert wird. Darüber hinaus wird die Interaktion von ICAM-1 mit Mac-1 und LFA-1 (lymphocyte function associated molecule) blockiert, was eine negative Interaktion von T-Zellen mit APCs hervorruft. Weiterhin wird durch die Anwesenheit von Eap die Invasion von Makrophagen und Neutrophilen in infiziertes Gewebe unterdrückt, und dadurch die Immunabwehr empfindlich gestört. Ebenfalls zeigten Mäuse, die mit einem Eap-positiven Stamm infiziert wurden, im Falle einer bakteriellen Peritonitis ein 2 bis 3-fach geringeres Neutrophilen-Recruitment als bei einer Infektion mit einem *eap*-negativen Stamm (Chavakis et al. 2002, 2005, 2007).

Die antiinflammatorische Wirkung von Eap kann aber auch medizinisch von Nutzen sein. In einer Studie von Xie et al. konnte 2006 gezeigt werden, dass Eap einen günstigen Einfluss auf den Verlauf der Multiplen Sklerose hat. Durch die Interaktion mit ICAM-1 und die Blockade von β_2 -Intergrin, die das Neutrophilen-Recruitment erschwert, wird die Adhäsion und Extravasation von T-Zellen markant vermindert. So kann im Mausmodell mit EAE die Entstehung einer Autoimmunenzephalomyelitis verhindert werden. Es handelt sich bei der EAE um eine experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis, die in der Maus als Tiermodell für Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems genutzt werden kann (Stromnes et al. 2006, Kumar et al. 2015).

Ähnliche Ergebnisse existieren für ein Mausmodell der Psoriasis, in welchem gezeigt werden konnte, dass Eap das T-Zell-Recruitment in die erkrankten Hautregionen vermindert und die Krankheit deutlich gebessert wird (Wang et al. 2010).

Eap ist auch in der Lage, die Bindung von Neutrophilen an nicht-stimulierte und an TNF α -stimulierte Endothelzellen zu verhindern, sodass im infizierten Gewebe eine geringere Inflammation entsteht. Dies konnte sowohl unter statischen als auch unter Flussbedingungen gezeigt werden (Haggar 2004).

Versuche an peripheren mononucleären Blutzellen wurden 2005 ebenfalls von Haggart et al. durchgeführt. Hier bewirkte Eap in niedriger Dosierung eine Proliferation dieses Zelltyps, hatte jedoch in höheren Dosen eine Inhibierung der T-Zell-Proliferation zur Folge. Es kam bei hoher Dosierung ebenfalls gehäuft zum T- und B-Zell-Tod. Durch polyklonale Eap-Antikörper konnte dieser zytotoxische Effekt verhindert werden.

Auch im Bereich der Tumorthherapie könnte Eap von Nutzen sein. So konnte 2007 gezeigt werden, dass Eap aufgrund seiner Eigenschaften die Adhäsion und die Migration von Tumorzellen zu verhindern, die Knochenmetastasierung bei Mamma-Karzinom deutlich reduzieren konnte (Schneider et al. 2007).

2.6 *S. aureus* in der Tierzucht

Auch im veterinärmedizinischen Bereich ist *S. aureus* ein weit verbreiteter Erreger, und besonders als Verursacher der Mastitis bei Milchkühen bekannt (Reyher et al. 2012, Tiwari et al. 2007).

Sogar in der Schweinezucht konnte MRSA als Kolonisationskeim nachgewiesen werden. Durch den unkritischen Einsatz von Antibiotika in der Tierzucht konnte in einer neuen Studie, die Schweinezuchtbetriebe an der Deutsch-Niederländischen Grenze untersuchte, gezeigt werden, dass 20,7% der Schweine mit MRSA besiedelt waren. In fast allen Zuchtbetrieben konnte MRSA auch in Proben aus der Stallluft nachgewiesen werden, sodass die aerogene Übertragung, welche als Übertragungsweg eher untypisch ist und auch das Personal des Zuchtbetriebes gefährden kann, in diesem Zusammenhang auch möglich wäre (Schmithausen et al. 2015).

Aber nicht nur Nutztiere, auch viele andere Haustiere wie Kaninchen oder Meerschweinchen können Träger von MRSA sein, und deshalb spielen Krankheiten, die in Form von Zoonosen vom Tier auf den Menschen übertragen werden, eine immer größere Rolle (Agnolletti et al. 2014, Drougka et al. 2016).

Dennoch sind die meisten tierpathogenen Isolate von *S. aureus* nach heutigem Erkenntnisstand nicht auf den Menschen übertragbar. Was gelegentlich vorkommen kann, ist dass humanpathogene Isolate von Menschen auf Haustiere oder Tiere in der Tierzucht übertragen werden und diese besiedeln, wodurch *S. aureus* wiederum andere Tiere und Menschen besiedeln oder infizieren kann (Lee 2003).

2.7 Von-Willebrand Faktor

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein großes und multifunktionales Glycoprotein, welches aus über 2000 Aminosäuren mit vier verschiedenen Repeats, die mit A bis D bezeichnet werden, besteht, von denen jede wiederum 3 bis 4 Domänen besitzt (Titani et al. 1986).

Der vWF spielt eine entscheidende Rolle bei der Blutgerinnung. Zum einen transportiert und stabilisiert er den Gerinnungsfaktor VIII, welcher ohne vWF schnell abgebaut werden würde (Lollar 1991).

Zum anderen vermittelt er die Bindung von Thrombozyten an das Gefäßendothel. Dies gilt insbesondere für Gefäßendothelien, die hohen Scherkräften ausgesetzt sind, wie sie in Kapillaren, an Herzklappen und an Gefäßbifurkationen vorkommen (Sakariassen et al. 1979, Sixma et al. 1984, Stel et al. 1985).

Sowohl die Endothelzellen der Gefäße, als auch die Thrombozyten selbst speichern vWF in Weibel-Palade-Körperchen oder in α -Granula (Metcalf et al. 2008, Nightingale und Cutler 2013). Das Makromolekül wird bei Verletzung oder hohem Fluss im Gefäß von den Endothelzellen freigesetzt, oder auch durch gezielte Stimulation aus Endothelzellen und Thrombozyten. Bei Verletzungen der Gefäßwand kann vWF auch an Proteine, besonders an Kollagen vom Typ I und III der extrazellulären Matrix, welches unter der Endothelzellschicht liegt, binden (Sixma und deGroot 1991, Sadler et al. 1991, Ruggeri und Ware 1993). Die Aktivierung von Endothelzellen führt zu einer raschen Ausschüttung von vWF an deren luminaler Seite (Goerge et al. 2002). Direkt nach der Sekretion wird der vWF durch den Blutfluss entlang des Endothels gestreckt und bildet so ultralange vWF-Fäden (ULVWF), die sich nun auf den intakten Endothelzellen befinden und durch eine Protease geschnitten werden können (s. Kap. 2.6) (Dong et al. 2002).

Um wiederum eine Thrombozytenadhäsion und -aggregation zu bewirken, muss sich der vWF zu großen Multimeren von bis zu 15 MDa über Disulfid-Brücken verbinden.

Thrombozyten interagieren mit vWF-Multimeren, wozu auch der ULVWF gehört, über den GpIb- und den GPIIb/IIIa-Komplex, (Ruggeri et al. 1983) wobei der GpIb-Komplex für den initialen Kontakt zwischen Thrombozyt und vWF verantwortlich ist, während GpIIb/IIIa erst nach Aktivierung der Thrombozyten eine Bindung an vWF vermitteln kann (Ikeda et al. 1991).

Diese beiden Bindungsarten sind wesentlich für die Adhäsion von Thrombozyten an vWF unter Flussbedingungen mit hoher Scherkraft. In diesem Fall entsteht die Bindung durch die A1-Domäne des vWF, welche von GpIb erkannt wird (Sixma et al. 1991). Des Weiteren vermittelt ein Arg-Gly-Asp-Motiv die Bindung an die C1-Domäne durch GpIIb/IIIa auf aktivierten Thrombozyten (Berliner et al. 1988).

Im Gegensatz zu der globulären Form des vWF ist in der ULVWF Variante unter Fluss die GpIb α Bindungsstelle exponiert, an welche Thrombozyten mit sehr hoher Affinität binden können (Dong et al. 2002). Dieser wichtige und erste Schritt der Blutgerinnung ist auch entscheidend bei Entzündungsreaktionen im Körper. Petri *et al.* konnten 2010 zeigen, dass der ULVWF unter Flussbedingungen ein Schlüsselprotein für die Extravasation von Leukozyten durch intaktes Endothel darstellt (Petri et al. 2010).

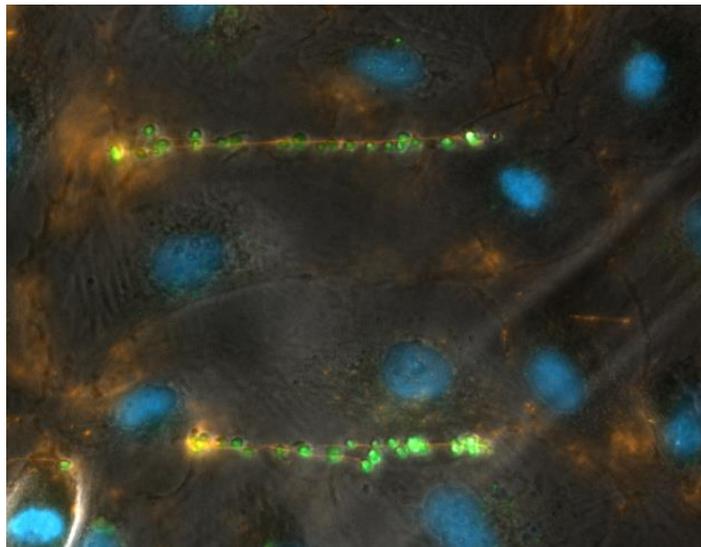


Abb. 1b: Adhärenente Thrombozyten [grün] am ULVWF [rot] unter Flussbedingungen von $10\text{dyn}/\text{cm}^2$, im Hintergrund sind die Zellkerne der Endothelzellen [blau] und die Endothelzellen selbst [Hellfeld] zu sehen.

2.8. ADAMTS-13 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13)

ADAMTS-13 ist eine zinkhaltige Metalloprotease, welche in der Lage ist, vWF-Multimere und deshalb auch ULFWF-Fäden zu schneiden und damit eine überschießende Blutgerinnung zu verhindern (Dong et al. 2002).

Seit den frühen 1980er Jahren ist bekannt, dass die Thrombotische-Thrombozytopenische Purpura (TTP) durch ungewöhnlich lange vWF-Multimere entsteht und bei den Betroffenen zu einer unkontrollierten disseminierten intravasalen Gerinnung führt, wodurch Thromben im kompletten Körper entstehen. Sie entstehen durch IgG-Antikörperbildung gegen ADAMTS-13, wodurch das Enzym irreversibel gehemmt wird (Furlan et al. 2001).

Auch schwere Entzündungsreaktionen wie SIRS, Sepsis oder die Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) können Aktivität von ADAMTS-13 herabsetzen und so die Spaltung von vWF-Multimeren beeinträchtigen was zu Gefäßverschlüssen und Thrombenbildung führen kann (Reiter et al. 2005, Tsai et al. 2009).

2.9. Interaktion von vWF mit *S. aureus*

Bereits im Jahr 2000 wiesen Hartleib *et al.* nach, dass *S. aureus* mittels Protein A an vWF binden kann, es gelang damals jedoch nicht, Versuche unter Flussbedingungen durchzuführen (Hartleib et al. 2000).

2002 wurde ein weiteres vWF bindendes Protein (vWbp) identifiziert, welches sehr spezifisch an den vWF bindet und in allen untersuchten *S. aureus* Stämmen gefunden werden konnte. Es wurde identifiziert als von den Bakterien sezerniertes, lösliches Protein, da es keine Zellwandverankerung besitzt. (Bjerketorp et al. 2002) Zwei Jahre später zeigte dieselbe Arbeitsgruppe, dass vWbp eine Koagulaseaktivität besitzt und menschliches Plasma erfolgreich koagulieren kann (Bjerketorp et al. 2004). Erst vor kurzem konnte jedoch zusätzlich gezeigt werden, dass vWbp auch unter Flussbedingungen an die A1-Domäne des vWF, im Sinne eines flussabhängigen Anstiegs der Adhäsion von *S. aureus* an das Endothel, zu binden vermag und vermutlich einen der wichtigsten Bindungsfaktoren für *S. aureus* an aktiviertes Endothel darstellt (Claes et al. 2014). Da schon ältere Arbeiten zeigten, dass die beiden für die Expression von Virulenzfaktoren in *S. aureus* bedeutenden regulatorischen Loci *agr* und *sar* für die Bindung des Pathogens an Fibrinogen und vWF unter Flussbedingungen von Bedeutung sind (Shenkman et al. 2001) und die für vWbp und Eap

kodierenden Gene *vwb* und *eap* ähnliche Promotorelemente enthalten (Harraghy et al. 2008), lag die Vermutung nahe, dass neben vWbp möglicherweise auch Eap zur Bindung der Staphylokokken an ULVWF beiträgt.

2.10 Bedeutung der Dissertation und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, welche Rolle Eap bei der Adhäsion von *S. aureus* an ULVWF unter physiologischen Flussbedingungen spielt.

In einer Kooperationsarbeit mit der experimentellen Dermatologie des Universitätsklinikums Mannheim konnten wir bereits 2013 den Wirtsfaktor, welcher für die Bindung von Staphylokokken an das aktivierte Gefäßendothel verantwortlich ist als ULVWF identifizieren. Der Bindungspartner auf Seite der Staphylokokken war zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht bekannt, weshalb wir Eap als einen wichtigen Bindungspartner an den ULVWF vermuteten.

Mit Hilfe der in der Arbeit beschriebenen Untersuchungsmethoden ist es uns gelungen, zu zeigen, dass Eap für die Bindung von Staphylokokken an intaktes, aktiviertes Endothel über ULVWF unter Flussbedingungen wichtig ist. Des Weiteren konnte von uns gezeigt werden, dass *S. aureus* auch *in vivo* über ULVWF an aktiviertes Endothel zu binden vermag.

Beide Befunde liefern neue Erkenntnisse, wie *S. aureus* in der frühen Phase der Endokarditis selbst unter starken Scherflussbedingungen an intaktes aber aktiviertes Endothel zu binden vermag und tragen eventuell dazu bei, neue Therapieoptionen im Kampf gegen *S. aureus* induzierte Infektionen des Endothels zu finden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Veränderung	Beschreibung
SA113	Keine	<i>S. aureus</i> Laborstamm
SA113 Δeap	SA113 Derivat, das kein <i>Eap</i> produziert	Gen für <i>eap</i> im Genom nicht vorhanden, <i>eap</i> -Homologe aber noch vorhanden
<i>S. aureus</i> Cowan I		Für die Versuche wurden die Bakterien mit CSFE markiert (s. Protokoll)
<i>S. aureus</i> Newman		Aktivierung von SaeRS durch eine Punktmutation und Fehlen der Fibronektinbindeproteine A und B

3.1.2 Nährmedien

Als Nährmedium wurde bei allen Versuchen Müller-Hinton-Bouillon (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) verwendet. Der pH-Wert des Mediums beträgt $7,4 \pm 0,2$. Der Zusatz eines Antibiotikums zur Selektion war nicht erforderlich, da die *eap*-Mutation im Genom des Bakteriums verankert ist.

Zusammensetzung in g/l:

- Rinderinfusion.....2,0
- Maisstärke..... 1,5
- Pepton aus Casein (saurer Hydrolysat).....17,5

21g des Mediums werden in einem Liter destilliertem Wasser unter Rühren gelöst. Danach wird die Lösung mit einem Filter der Porengröße $0,22 \mu\text{m}$ (MILLIPORE Steritop der Firma Merck) steril filtriert. Das Medium wurde nicht autoklaviert, sodass die darin vorhandene Stärke und Zucker noch für Mikroorganismen verwertbar war.

Müller-Hinton-Bouillon wurde für alle Versuche benutzt, da es sich um ein reiches Medium handelt, das auch für anspruchsvolle Mikroorganismen geeignet ist und einheitlich hergestellt werden kann. Das Wachstum von Staphylokokken wird vom Hersteller mit „gut“ angegeben.

Für die Anzucht der Bakterienstämme aus dem Gefrierschrank(-80°C) wurden Trypticase-Soja-Agarplatten mit 5% Schafblut der Firma BD Biosciences verwendet. Der pH-Wert des Agars beträgt 7,2±0,1. Auch hier wurden keine Antibiotika zur Selektion der Bakterien eingesetzt.

Zusammensetzung in g/l:

- Casein, tryptisch verdaut15,0
- Sojapepton..... 5,0
- Natriumchlorid 5,0
- Agar.....15,0

3.1.3 Materialien für die Anzucht der eukaryoten Zellen

Material	Hersteller	Verwendung
Medium 199 + Earle's salts	PAA Laboratories GmbH, Pasching Austria	Medium für HUVECs
EGM-2	Lonza, Walkersville MD USA	Wachstum der HUVECs in den Slides (Nährmedium)
0,05% Trypsin-EDTA	Gibco, Paisley UK	Lösen der HUVEC vom Flaschenboden
0,5% Gelatine	Herstellung im Labor	Coaten der Slides
PBS (Phosphate buffered saline)	Herstellung im Labor	Waschen der Zellen
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Herstellung im Labor	Pufferlösung für Zellen und Bakterien

PBS wurde im Labor selbst in folgender Zusammensetzung in g/l hergestellt:

- 8,0g Natriumchlorid (NaCl)
- 0,2g Kaliumchlorid (KCl)
- 1,78g Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 0,27g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

Die HUVEC stammen von freiwilligen und gesunden Spendern der Universitätsfrauenklinik in Mannheim (Aktenzeichen des Ethikvotums: 2010-237N-MA). Die Zellen wurden im Labor aus frischen Nabelschnüren extrahiert (s. Protokoll) und für Versuchszwecke in Flaschen mit oben genanntem Medium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.1.4 Materialien für die Färbung der Bakterien

Material	Hersteller	Verwendung
FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat)	Invitrogen Molecular Probes	Färben der Bakterien nach Protokoll
TRITC (Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat)	Invitrogen Molecular Probes	Färben der Bakterien nach Protokoll
Natriumhydrogencarbonat NaHCO ₃	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	Herstellung Färbepuffer
Natriumcarbonat Na ₂ CO ₃	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	Herstellung Färbepuffer

3.1.5. Materialien für die Versuchsdurchführung

Material	Hersteller	Verwendung
Erythrozyten	Freiwillige gesunde Spender	Herstellung eines physiologischen Mediums für die Versuche
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma Aldrich, Seelze, Germany	Pufferlösung für Erythrozyten und Bakterien
Histamin 10mM		Stimulation der HUVEC
Lambda-DNA	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Stabilisierung der ULVWF-Fäden

Die verwendeten Erythrozyten stammen von gesunden, freiwilligen Spendern und wurden aus Vollblut durch Zentrifugation gewonnen. Die Erythrozyten wurden mehrfach mit HEPES gewaschen und anschließend abzentrifugiert (s. Protokoll). Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass keine Plasmaproteine und Enzyme mehr vorhanden sind, wie z.B. ADAMTS -13, die die Fadenbildung beeinträchtigen könnten.

Der Versuchsansatz für einen Versuch beträgt 4 ml und setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 1 ml Erythrozyten (s. Protokoll zur Gewinnung von Erythrozyten)
- 2,908 ml HEPES
- 20 µl Histamin
- 72 µl Bakteriensuspension
- Lambda-DNA (je nach Versuchsaufbau)

3.1.6 Materialien für die Färbung der Objektträger

Material	Hersteller	Verwendung
Polyclonal Rabbit Anti-Human von Willebrand Factor	Deko, Glostrup Denmark	Erster Antikörper zum Färben der Objektträger
Alexa Fluor 555 IgG goat anti rabbit	Invitrogen, USA	Zweiter Antikörper zum Färben der Objektträger
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat NaH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Germany	Herstellung Färbepuffer für die Objektträger
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Germany	Herstellung Färbepuffer für die Objektträger
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Austria	Herstellung Färbepuffer für die Objektträger
DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindole-dihydrochlorid)	Sigma Chemie, Deutschland	Färbung der Zellkerne auf den Objektträger
Normal goat IgG	R&D Systems, Minneapolis	Herstellung der Blocklösung für Objektträger

3.1.7 Das IBIDI®-Pumpensystem und Slides

Das IBIDI Pumpensystem setzt sich aus verschiedenen Bestandteilen zusammen, die in ihrer Gesamtheit ein System ergeben, welches den Blutfluss durch Gefäße imitieren kann.

Das System besteht aus einer Computer-kontrollierten Pumpe, an welche die Flusseinheit angeschlossen wird. In der Flusseinheit befindet sich das passende Set zur Perfusion der Objektträger. Dieses besteht aus Reservoirien für die Flüssigkeit, zuführenden Schläuchen und den passenden Adaptern für die Objektträger. Die Sets sind in verschiedenen Größen erhältlich, je nach gewünschter Flussrate.

Für die Steuerung der Pumpe und zur Berechnung der Flussraten wird die PumpControl-Software von IBIDI verwendet.

Das System wurde für die Untersuchung der Auswirkung von Scherkräften auf Zellkulturen entwickelt und erlaubt die direkte Beobachtung der Zellen sowie die Aufnahme von Immunfluoreszenzsignalen unter geeigneten Mikroskopen. Auf diese Weise können die Flussbedingungen im arteriellen oder venösen System unter Laborbedingungen nachgeahmt werden.

In allen IBIDI-Systemen herrscht ein laminarer Fluss, so dass die unidirektionale Fließrichtung in Arterien oder Venen sehr gut untersucht werden kann.

Die entsprechenden Bilder zur Auswertung wurden für alle *in vitro* Versuche mit dem CellObserver Mikroskop (ZEISS Deutschland, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt

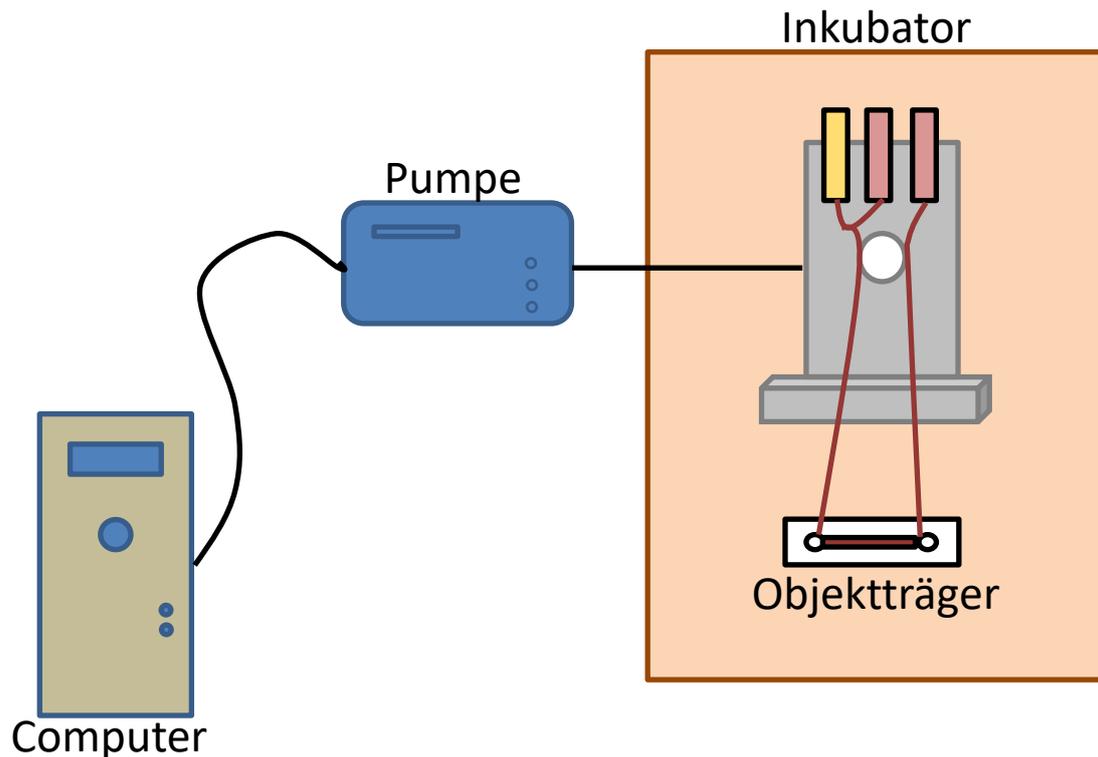


Abb. 2: Überblick über das IBIDI®-Pumpsystem mit seinen Bestandteilen.

Über einen Computer mit entsprechender Software wurde die Pumpe gesteuert, die einen konstanten Fluss über den Objekträger erzeugt. Innerhalb eines Inkubators befanden sich in unserem Versuchsaufbau die Behälter mit den Bakterien und Erythrozyten in Puffer, sowie ein zusätzlicher Behälter für PFA, welches als Fixierungsmittel verwendet wurde.

3.1.8 Software

Für die photometrische Messung der optischen Dichte der Bakteriensuspensionen wurde das System Gen5® (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) verwendet.

Am Fluoreszenzmikroskop wurde für die Visualisierung der Objekträger und zur Auswertung die Software ZEN 2012® von Carl Zeiss verwendet. Für die Bildbearbeitung (Invertieren der Bilder) wurde IrfanView64 Version 4.42 genutzt.

Zur statistischen Auswertung und grafischen Darstellung wurden GraphPadPrism® Version 5 und Microsoft Excel® 2016 eingesetzt.

3.1.9. Rückenhautkammer

Die Rückenhautkammer stellt eine hervorragende und etablierte Methode dar, um Mikrozirkulation und Angiogenese *in vivo* zu beobachten. Sie besteht aus zwei symmetrischen Titanrahmen mit jeweils einem 11,8 mm großen Beobachtungsfenster. Des Weiteren sind drei große Bohrungen für das Anbringen der Schrauben und Muttern vorhanden und am oberen Rand mehrere kleine Bohrungen um die Kammer an der Haut mit Nähten zu befestigen. Das Komplettgewicht beträgt nur etwa 3,2 g, sodass die Kammer sehr leicht ist und die Tiere in ihrem normalen Verhalten wenig beeinträchtigt sind. Bei allen *in vivo* Versuchen kam ein Zeiss Axiotech Mikroskop (ZEISS Deutschland, Oberkochen, Deutschland) zum Einsatz.

3.1.10. Versuchstiere

Die Versuchstiere stammen aus der Versuchstierhaltung der Universitätsklinik Mannheim. Es handelt sich um C57BL/6 Wildtypmäuse und deren von-Willebrandfaktor-Knockout-Mutante C57BL/6 vWF^{-/-} aus hauseigener Zucht der Abteilung für experimentelle Dermatologie. Es wurden vorwiegend männliche Tiere mit einem Mindestalter von 8 Wochen und einem Mindestgewicht von 25g eingesetzt. Alle Tierversuche wurden unter der Genehmigungsnummer 39/11 durchgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere für die Flussversuche mit Rückenhautkammer

Für die Durchführung der *in vivo* Versuche mit dem Modell der Rückenhautkammer wurden C87BL/6 Wildtypmäuse und deren von-Willebrandfaktor-Knockout-Mutante C87BL/6 vWF^{-/-} aus hauseigener Zucht an der Universitätsklinik Mannheim verwendet. Die Durchführung der Tierexperimente erfolgte nach Vorgabe des Tierschutzantrages 37/2011 entsprechend der tierschutzrechtlichen Bestimmungen, im S2-Tierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität des Saarlandes.

Zum Aufbau der Rückenhautkammer wurden ausschließlich gesunde, geschlechtsreife Mäuse mit einem Mindestalter von 8-10 Wochen und mindestens 25 g Körpergewicht verwendet. Für den Zeitraum des Experiments (etwa eine Woche nach Präparation der Rückenhautkammer) wurden die Mäuse in einem klimatisierten Raum bei 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus in Einzelkäfigen im Institut für klinische-experimentelle Chirurgie (IKEC) in Homburg/Saar gehalten. Am Tag des Versuches wurden sie nach Anlage eines Karotiskatheters in das S2-Tierlabor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie gebracht. Standardlaborfutter (Altromin, Lage) und Wasser waren für die Tiere uneingeschränkt verfügbar. Das Wohlbefinden der Mäuse wurde täglich kontrolliert.

3.2.2 Präparation der Rückenhautkammer

Zum Aufbau der Rückenhautkammer wird die Maus mittels intraperitonealer Anästhesie narkotisiert (Ketamin 50-200mg/kg KG und Xylazin 5-10mg/kg KG). Nach Überprüfung des Versuchstieres auf Schmerzreize mittels des Zwischenzehenreflexes wurde die Haarentfernung vorgenommen. Der Bereich des Rückens, welcher später die Kammer trägt sollte komplett frei von Fell sein. Im ersten Schritt wurden die Haare grob mit einem Elektrokurzhaarschneider (Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen) entfernt. Um das Fell komplett zu entfernen wurde anschließend eine chemische Depilation mittels Creme (Pilca med Creme, Asid Bonz, Böblingen) durchgeführt.

Das freigelegte Hautareal wurde anschließend mit warmem Wasser gereinigt um anhaftende Reste der Creme zu entfernen. Anschließend wurde das Tier abgetrocknet um einer

Auskühlung entgegenzuwirken. Eine Hautdesinfektion wurde zum Schutz vor Infektionen der Kammer am trockenen Tier durchgeführt (Octenisept®, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt).

Das Versuchstier wurde nun in Bauchlage gebracht und mit weichen Kompressen gepolstert. Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) benetzt.

Die verschiebbare Rückenhautfalte wurde entlang der Mittellinie angehoben, die in der Haut verlaufenden Gefäße dienten dabei als Orientierung.

Mit zwei Haltenähten aus handelsüblichem Nähgarn wurden das kraniale und das kaudale Ende der Rückenhautfalte an einem Stativ befestigt, so dass die Haut aufgespannt wurde.

Unter diaphanoskopischer Sicht wurde zuerst der hintere der beiden Titanrahmen mit 4 Stichen an der Oberkante der Rückenhautfalte angenäht. Dabei ist auf die Unversehrtheit der großen Gefäße im Schulterbereich des Tieres zu achten. Mit einem Skalpell präparierte man nun zwei Löcher für den Durchtritt der beiden unteren Schrauben des Titanrahmens.

Anschließend wurde das spätere Sichtfenster der Rückenhautkammer mit einem Permanentmarker auf der Haut markiert und das Tier vom Stativ abgenommen und auf eine stabile Unterlage gelegt. Damit es nicht zu einem Verrutschen kam, wurde die Haut an den beiden unteren Schrauben mit Hilfe von zwei Gefäßklemmen fixiert.

Unter einem Stereo-Operationsmikroskop (Wild M650; Leitz, Schweiz) wurde im zuvor markierten Bereich die Kutis, Subkutis, Retraktormuskulatur und subkutanes Fettgewebe vorsichtig mittels mikrochirurgischer Instrumente auf einer Hautseite entfernt.

Die Größe des zirkulären Ausschnittes sollte etwa 15 mm betragen und die Größe des Beobachtungsfensters von 11 mm leicht überschreiten um eine Gewebekompression und damit eine Minderversorgung der verbleibenden Haut nach Anbringen des vorderen Teils des Rahmens zu verhindern.

Danach wurde der vordere Teil des Rahmens angebracht und mit den passenden Edelstahlmuttern an drei Punkten verschraubt. Der Abstand der beiden Rahmen sollte idealerweise 400-500 µm nicht überschreiten. Im letzten Schritt wurde die Kammer mit steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, B.Braun AG, Melsungen) gespült und das Deckglas (Ø 11,7 mm, Menzel, Braunschweig) in das Beobachtungsfenster eingelegt, wo es durch Adhäsion gut anhaftete. Zur Sicherung wurde ein Sprengring (Sicherungsring DIN 472,

Würth®, Künzelsau-Gaisbach) im Titanrahmen des vorderen Teils der Kammer eingebracht, und damit das Deckglas im Beobachtungsfenster fixiert.

Während der kompletten Versuchsdurchführung war so eine uneingeschränkte Sicht auf das Gefäßsystem der Rückenhaul vorhanden. Während der Aufwachphase wurden die Tiere in Einzelkäfig verbracht und mit einer Infrarotlampe vor Auskühlung geschützt.

Nach der Präparation der Kammer wurden die Versuche erst nach 48-72h fortgesetzt um den Tieren eine Erholungszeit nach der Narkose und Operation zu gewährleisten.

Die Rückenhaulkammer wurde von Tieren gut toleriert, sie zeigten stets ein normales Putz- und Fressverhalten (Menger et al. 2002, Laschke et al. 2005).

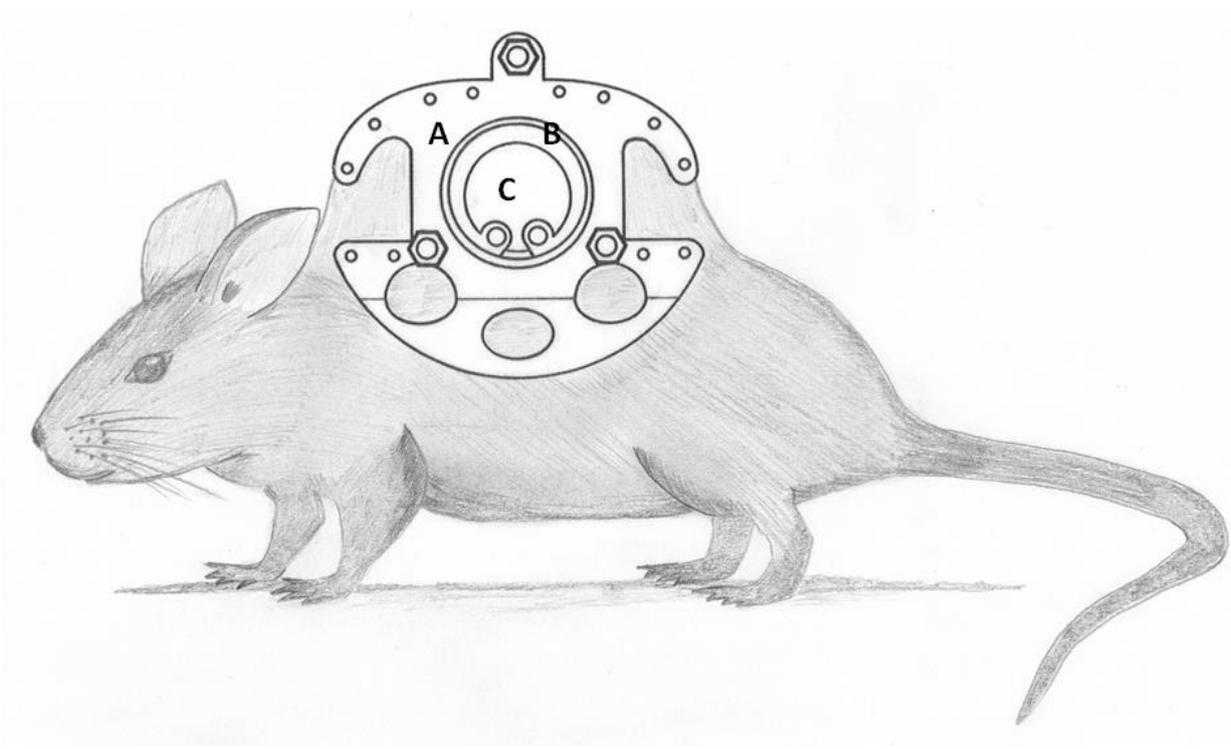


Abb.3: Schema einer Maus mit Rückenhaulkammer.

A: Titanrahmen, B: Sprengring, C: Beobachtungsfenster mit Deckglas

3.2.3 Versuchsdurchführung

Nach einer angemessenen Erholungszeit von 48-72h wurde den Tieren ein Karotiskatheter durch Prof. Dr. M. Laschke (Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie Homburg/Saar) gelegt. Auch hierfür waren die Tiere wie zuvor beschrieben narkotisiert worden. Im

Anschluss wurden sie in das S2-Tierversuchslabor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie verbracht, wo die weiteren Versuche durchgeführt wurden.

Dafür wurde unter sterilen Bedingungen das Deckglas entfernt und die Zellen der Gefäße mit TNF- α stimuliert. Anschließend wurden unter Intravitalmikroskopischer Kontrolle CFSE-markierte Zellen des *S. aureus* Stamms Cowan I über den Karotiskatheter gespritzt. Für die intravitale Mikroskopie wurde ein Zeiss AxioTech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100 W Quecksilberlampe verwendet. Die Lampe war an einen Auflichtfilterblock für Blau (450-490nm Anregung; >520nm Emissionswellenlänge), Grün (530-560nm; >580nm) und Ultraviolett (330-390nm; >430nm) angeschlossen, wobei 10x und 20x Objektive zum Einsatz kamen. Die Bilder der intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurden mit einer mit dem Mikroskop verbundenen Videokamera (FK6990; Pieper, Schwerte, Deutschland) zur späteren Auswertung mittels DVD aufgezeichnet.

Die Adhäsion der Bakterien am Gefäßendothel wurde in regelmäßigen Abständen dokumentiert und das Experiment nach 30 min post bakterieller Inokulation beendet.

Die Euthanasie der Versuchstiere erfolgte mit Pentobarbital 2,5-5,0 ml/kg KG (Narcoren© 16g/100ml, Merial GmbH, Deutschland) Die Auswertung der Bilder erfolgte durch Karin Pappelbaum (Experimentelle Dermatologie, Universitätsklinikum Mannheim).

3.2.4 Färbung der Bakterien mit CFSE für die *in vivo*-Versuche

Vor der Versuchsdurchführung an den Mäusen wurden die Bakterien im Labor wie folgt vorbereitet.

Zwei Tage vor der Inokulation in die Tiere wurde der Stamm *S. aureus* Cowan I auf SBA ausplattiert und anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde eine Vorkultur mit 10ml LB-Medium angesetzt und wiederum bei 37°C über Nacht bei 150 rpm inkubiert.

Am Versuchstag wurden 10 ml TSB mit 100 µl der Über-Nacht-Kultur angeimpft und diese Kultur erneut bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Die Kultur sollte so lange inkubiert werden bis eine OD₆₀₀ von 3 bis 4 erreicht wurde, dies nimmt etwa 4 Stunden in Anspruch.

Die gesamte Kultur wurde anschließend bei 4000 x g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment wird in 10 ml PBS aufgenommen und so lange gemischt bis es sich vollständig gelöst hat.

Es wurde wiederum die OD₆₀₀ gemessen (Verdünnungsfaktor 1:10) und CFSE im Dunkeln aufgetaut. Erneut wurde die Suspension bei 4000 x g abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Sediment in PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde 1 ml der OD₆₀₀ Suspension in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben. Dieser Ansatz reicht für zwei Tiere, falls mehr Tiere inokuliert werden sollen, müsste die entsprechende Menge an 1 ml Aliquote vorbereitet werden.

Die nachfolgenden Schritte sollten ohne direkte Lichteinstrahlung erfolgen um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu vermeiden.

25 µl der 10 mM CFSE-Lösung wurden zum 1 ml Aliquot der Bakterienkultur hinzugegeben und gut gemischt, danach wurde das Gemisch für 15 Minuten bei 37°C und 500 rpm im Dunkeln inkubiert. Alle 5 Minuten wurde das Gemisch kurz invertiert um eine gute Durchmischung zu erreichen. Nachfolgend wurde das Gemisch für 2 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert und den Überstand vollständig abgenommen. Das Pellet wurde zweimal in 1 ml PBS gewaschen.

Das hergestellte Pellet wurde in 350 µl PBS resuspendiert und für maximal 5 bis 10 Sekunden mit der Ultraschallnadel (100 W) behandelt. Im Ansatz wurde dann die OD₆₀₀ gemessen (Verdünnungsfaktor 1:20), welche zwischen 18 und 22 liegen sollte. Das Fluoreszenzsignal der gefärbten Bakteriensuspension wurde dann in 100 µl mittels des microplate reader Wallac Victor² (Perkin Elmer, Programm CSFE) gemessen, die RLU sollte hier >700.000 sein. Mit 10 µl der gefärbten Bakteriensuspension wurde eine Verdünnungsreihe mit PBS angesetzt und die Verdünnungsreihen 10⁻⁶ bis 10⁻⁸ wurden auf SBA ausplattiert. Die beimpften Platten wurden wieder bei 37°C über Nacht inkubiert, es sollte sich dann eine CFU von 5-6x10⁹/ml ergeben.

3.2.5 Auswertung der Daten aus den Tierversuchen

Die Auswertung der Versuche mit Wildtyp- und von-Willebrand- Faktor Knockout Mäusen erfolgte durch Karin I. Pappelbaum aus dem Institut für experimentelle Dermatologie der Universitätsklinik Mannheim.

3.2.6 Anzucht der Bakterien für die Flussversuche

Die verschiedenen Bakterienstämme wurden alle zuerst auf Tryptic-Soy-Broth Agar (TSB-S) angezüchtet, dem 5% Schafblut zugesetzt sind (BD Biosciences).

Die Bakterien wurden aus dem Gefrierschrank bei -80°C mit Hilfe einer Impfschlinge auf dem Agar ausgestrichen und anschließend im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 für 12 h inkubiert.

3.2.7 Anzucht in Flüssigmedium

Als Flüssigmedium wurde Mueller-Hinton-Bouillon verwendet.

Es wurde eine Vorkultur als Über-Nacht-Kultur angelegt, dazu wurden 10 ml des Mediums verwendet (Culture-Flask-Volume 1:10), welches mit Bakterien von der Agarplatte beimpft wurde.

Für die Flussversuche wurden 25 ml des Mediums pro Stamm mit den Bakterien der Vorkultur beimpft und auf eine Start- OD_{600} von 0,05 fotometrisch eingestellt.

Die Kulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 230 rpm für 4 bzw. 24 Stunden inkubiert.

3.2.8 Kryokonservierung der Bakterienstämme

Um die Bakterienstämme später noch verwenden zu können und eine immer gleiche Qualität der Bakterien während der kompletten Studie zu garantieren, wurden aus einer Übernachtskultur 850 μl Bakteriensuspension mit 150 μl Glycerin 99,5% (getrocknet) gemischt und in ein Kryotube gegeben. Die Aufbewahrung erfolgt im Gefrierschrank bei -80°C .

3.2.9 ELISA zur Bestimmung der von Willebrand-Faktor Ausschüttung

Um eine Stimulation der HUVEC durch Eap auszuschließen, wurde in Vorversuchen ein ELISA durchgeführt. Es wurde die Ausschüttung von vWF unter Eap-Einfluss unter statischen Bedingungen gemessen. Die HUVEC wurden dazu in Zellkulturschalen bis zur Konfluenz angezogen und danach mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Eap (4 µg und 40µg) stimuliert. Nach 15 Minuten wurde der Überstand der HUVEC abgenommen, welcher anschließend für den ELISA verwendet wurde.

Als Coating-Antikörper wurde DAKO A0082 (Rabbit Anti-Human Von Willebrand Faktor, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verwendet und zur späteren Detektion wurde der Antikörper DAKO P0226 (Peroxidase-Conjugated Rabbit Anti-Human Von Willebrand Faktor, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) benutzt. Die ELISA-Untersuchungen wurden zusammen mit Natalia Halter (Technische Assistentin in der Experimentellen Dermatologie in Mannheim) durchgeführt.

3.2.10 Protokoll zur Gewinnung und Aufreinigung der Erythrozyten

Alle Erythrozyten, die für die folgenden Versuche verwendet wurden, stammen von gesunden, freiwilligen Spendern und wurden aus deren Vollblut wie nachfolgend beschrieben isoliert:

Nach der Zentrifugation wurde das Blutplasma mit allen Gerinnungsfaktoren, Proteinen und Enzymen sowie der Buffy coat, der alle Leukozyten enthält, abgesaugt.

Die übrigen zellulären Bestandteile des Blutes, jetzt hauptsächlich Erythrozyten, wurden in 15ml Tubes überführt, und diese Tubes mit HEPES komplett befüllt. Daraufhin erfolgte die erneute Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen für 10 Minuten. Diese Art der Resuspension in HEPES und der Zentrifugation wurde noch 3 bis 4 Mal wiederholt, um sicherzustellen, dass keine Thrombozyten, Fibrinogen oder Gerinnungsfaktoren mehr vorhanden sind, welche das Flusssystem durch Koagulation mit Erythrozyten okkludieren könnten. Des Weiteren dient diese Art der Aufreinigung der kompletten Entfernung von ADAMTS-13 aus dem Flusssystem, welche ansonsten die durch den Fluss generierten ULVWF-Fäden abschneiden würde.

Die so gewonnenen Erythrozyten wurden anschließend bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert.

3.2.11 Vorbereiten der Objektträger

Die Objektträger (von IBIDI 0,2 μ m Luer) werden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank geöffnet. Es sollte auf Sterilität geachtet werden, da die Zellen sonst kontaminiert sind und für die Versuche nicht mehr verwendet werden können.

Um den Objektträger zu beschichten wird Gelatine (0,05%) im Wasserbad auf 37°C erwärmt und jeweils 50 μ l pro Slide luftblasenfrei in den Einlass gegeben. Die Beschichtung der Innenseite der Objektträger dient dem besseren Anhaften und Wachstum der Zellen.

Die Objektträger wurden anschließend in Petrischalen gegeben und für 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

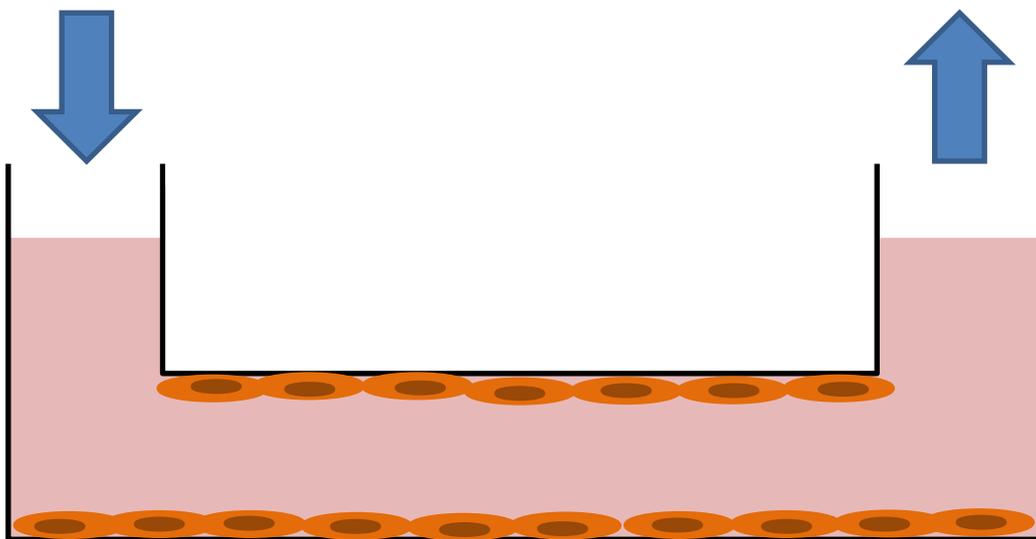


Abb. 4: Objektträger der Firma IBIDI I^{0,2 μ m} Luer Einlass und Auslass.

Die blauen Pfeile zeigen die Flussrichtung über die adhärennten und konfluenten HUVEC (orange), im Hintergrund der Zellen ist das Zellmedium in rosa dargestellt.

3.2.12 Objektträger mit Gelatine beschichten

Nach 2 Stunden können die Objektträger aus dem Brutschrank geholt und die übrige Gelatine abgesaugt werden.

Die Objektträger werden nun mit EGM-2 durchspült und alle vorhandenen Luftblasen entfernt. Pro Slide sollten zum Durchspülen ca. 1 ml EGM-2 verwendet werden. Es ist darauf zu achten, dass weder Einlass noch Auslass leerlaufen, um ein Austrocknen der Objektträger zu verhindern.

Die Aufbewahrung der Objektträger sollte so erfolgen, dass Einlass und Auslass je zu etwa 2/3 gefüllt sind.

3.2.13 HUVEC-Gewinnung

Die HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) stammen von gesunden Spendern der Universitätsfrauenklinik und der Hedwigsklinik in Mannheim. Die frischen Nabelschnüre wurden im Labor präpariert und die Zellen mithilfe von Kollagenase aus der Nabelschnurvene gelöst.

Die Zellen wurden vor ihrer Aussaat auf die Objektträger für 2 Tage mit Medium 199+Earle's salts in Flaschen im Brutschrank inkubiert, und bei Bedarf gesplittet.

Protokoll zur Gewinnung von Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs):

Alle HUVEC, die für die nachfolgenden Versuche verwendet wurden, wurden in Absprache mit der Hedwigsklinik Mannheim und der Universitätsfrauenklinik Mannheim für Versuchszwecke zur Verfügung gestellt.

Alle Nabelschnüre wiesen eine Länge von mindestens 20 cm auf und waren auf der kompletten Länge nicht durch Nabelschnurklemmen beschädigt. Die verwendeten Nabelschnüre wurden direkt nach der Geburt in sterile Behälter mit HEPES überführt und maximal 12 Stunden bei 4°C bis zur Extraktion der HUVEC gelagert.

Im Labor wurden die Nabelschnüre unter sterilen Bedingungen aus den Transportgefäßen entnommen und auf ihre Unversehrtheit überprüft. Danach wurden beide Enden der Nabelschnüre nochmals angeschnitten, die Nabelvene aufgesucht, und diese mit einer stumpfen Knopfsonde sondiert. Beide Enden wurden anschließend mit Gefäßklemmen

verschlossen und die Vene mit einer sterilen Einmalspritze gefüllt mit HEPES durchgespült. Dadurch wurden Blut und restliche Koagel in der Nabelschnurvene entfernt und diese auf Unversehrtheit überprüft.

Als nächstes wurde die Vene mit 0,2% Kollagenase II in HEPES-Puffer gefüllt um die HUVEC abzulösen, dafür wurde die komplette Nabelschnur bei 37°C im Wasserbad für 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Nabelschnur mehrmals mit einer Klemme beklopft um das Ablösen der Zellen zu unterstützen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Nabelschnur aus dem Wasserbad genommen und die HUVEC mit HEPES in ein Sammelgefäß gespült. Jede Nabelschnur wurde noch zweimal mit HEPES nachgespült um sicher zu gehen, dass möglichst viele Zellen gesammelt werden konnten. Die Zellen wurden nach Extraktion bei 280 rcf für 5 Minuten zentrifugiert um ein Zellpellet herzustellen. Die Zellen wurden dann resuspendiert, ausgezählt und in EBM-2 Medium in einer T25-Kulturflasche ausgesät. Die HUVEC wurden bei 37°C und 5%CO₂ weiter im Brutschrank bebrütet und bei Bedarf gesplittet.

3.2.14 HUVEC ernten und aussäen

Bevor die Zellen verwendet wurden, wurde mittels Mikroskop kontrolliert, ob die Zellen gut gewachsen sind, ob die Zellen noch vital sind und ob sie am Flaschenboden einen konfluenten Zellrasen gebildet haben.

Die HUVEC wurden auf einer Styropor-Unterlage in die Sterilbank gestellt und das vorhandene Medium abgesaugt.

Die Zellen wurden daraufhin einmal mit 5 ml PBS gewaschen und dieses anschließend wieder abgesaugt.

Im nächsten Schritt wurden 2 ml Trypsin 0,05%-EDTA in die Flasche gegeben um die Zellverbindungen zu spalten, sodass sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen. Das Trypsin sollte nur kurz (30 s bis 1 min) auf die Zellen einwirken, da diese sonst durch die enzymatische Aktivität des Trypsins zerstört werden.

Unter dem Mikroskop konnte kontrolliert werden ob sich die HUVEC vom Flaschenboden abgelöst haben und nun frei in der Lösung schwimmen.

Um die Trypsinaktivität zu stoppen wurden 5 ml Medium 199 + Earle's salts zugegeben und der Inhalt der Flasche gut gemischt.

Anschließend erfolgte die Überführung der Zellsuspension in ein 50ml Falcon®. Diesem Falcon® wurden nun 10 µl entnommen und für die Auszählung der Zellen in der Neubauer-Zählkammer verwendet.

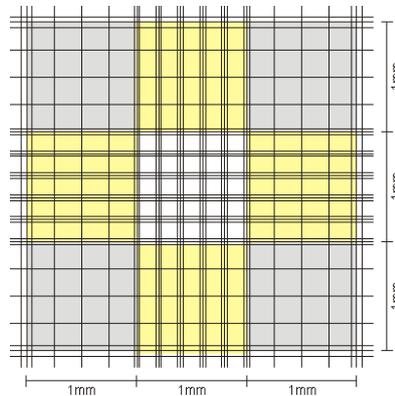


Abb.5: Neubauer-Zählkammer mit vier Quadraten für die Auszählung der Zellen unter dem Mikroskop (Wikipedia commons kein Copyright)

Das Falcon® mit der restlichen Zellsuspension wurde in die Zentrifuge gegeben und bei 280 rcf für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand wurde danach vorsichtig abgesaugt.

Die Zellsuspension, die auf die Objektträger gebracht wird, sollte mindestens 2400 Zellen/µl enthalten, optimal sind 3000 Zellen/µl.

Man benötigt pro Objektträger 100 µl Zellsuspension, so dass sich die Menge der Objektträger an der Menge der Zellen pro Kulturflasche orientiert. In einer vollen Kulturflasche befinden sich 1,5 bis 2 Millionen Zellen, diese reichen für 5 bis 6 Objektträger. Das Zellpellet wurde nun in der ausgerechneten Menge EGM-2 resuspendiert.

Mit 100 µl Zellsuspension pro Objektträger wurde der Kanal mit Zellen durchgespült, dabei wurde mit einer Pipette immer wieder den Auslass abgesaugt und erneut die abgesaugte Zellsuspension in den Einlass gegeben. Unter dem Mikroskop wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen geachtet.

Im Anschluss wurden die Objektträger erneut in den Brutschrank gestellt, um die Zellen adhären zu lassen und nach 2 Stunden nochmals das Medium gewechselt.

Im Anschluss konnten die Zellen im Inkubator auf einen Schüttler gestellt werden, um einen Fluss im Objektträger herzustellen nachdem sich die Zellen bei ihrem Wachstum ausrichten konnten, dieser entsprach 1 dyn/cm^2 .

Das Medium wurde jeden Tag gewechselt, da der Objektträger nur eine geringe Höhe besitzt und generell wenig Medium und somit Nährstoffe für die Zellen vorhanden sind.

Das verbrauchte Medium wurde jeden Tag abgesaugt und durch $130 \mu\text{l}$ frisches EGM-2 ersetzt, um ein gutes Zellwachstum zu garantieren.

Für die Versuche wurden nur Objektträger mit konfluentem Zellrasen verwendet (ca. 1×10^7 Zellen/ cm^2)

3.2.15 Färbeprotokoll Bakterien

Die Bakterien wurden nach 4 bzw. 24 h Wachstum in ein 50 ml Falcon® überführt und zentrifugiert um ein Bakterienpellet herzustellen. Der Überstand (Medium) wurde abgeschüttet und die Bakterien 2 x mit PBS gewaschen.

Ein Färbepuffer wurde aus 420 mg NaHCO_3 und $530 \text{ mg Na}_2\text{CO}_3$ in 10 ml Wasser hergestellt, der pH-Wert des Puffers sollte 10 betragen.

Pro 25 ml Kultur wurden außerdem $300 \mu\text{l}$ DMSO benötigt, dazu wird 1 mg FITC oder alternativ TRITC gegeben.

Pro Bakterienkultur wurden $2,7 \text{ ml}$ des Färbepuffers in ein 15 ml Falcon® geben und das Gemisch aus DMSO und FITC bzw. TRITC zugeben. Diese Lösung wurde gut gemischt und vor Licht geschützt um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern.

In jedes Falcon® mit den in PBS gewaschenen Bakterien wurden dann 3 ml des Färbepuffers geben und die Bakterien im Puffer gut resuspendiert.

Danach wurden die Falcons® für 30 min bei 37°C dunkel im Inkubator gelagert. Es ist darauf zu achten, dass die Bakterien nicht wesentlich länger in der Färbelösung bleiben, da diese aufgrund des DMSO zelltoxisch ist und bei längerer Exposition zu viele Bakterien absterben würden.

Nach 30 min wurde das Bakterien-Färbepuffer-Gemisch bei $500 \times g$ und Raumtemperatur für 5 min abzentrifugiert um den Färbepuffer zu entfernen. Die gefärbten Bakterien wurden im

Anschluss nochmals in 5 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert um Rückstände zu entfernen.

Das Bakterienpellet wurde dann in 1 ml PBS resuspendiert und fotometrisch auf eine OD_{600} von 1 eingestellt. Anschließend wurden die fertig gefärbten Bakterien im Kühlschrank bei 4°C bis zur Versuchsdurchführung (maximal 2 Stunden) aufbewahrt.

3.2.16 Versuchsaufbau und -durchführung

Für die Flussversuche wurde ein modifiziertes IBIDI-Pumpsystem verwendet. Es wurde so verändert, dass noch ein drittes Behältnis hinzugefügt werden konnte, um die Fixierung des Objektträgers zu ermöglichen, ohne den Fluss lange unterbrechen zu müssen.

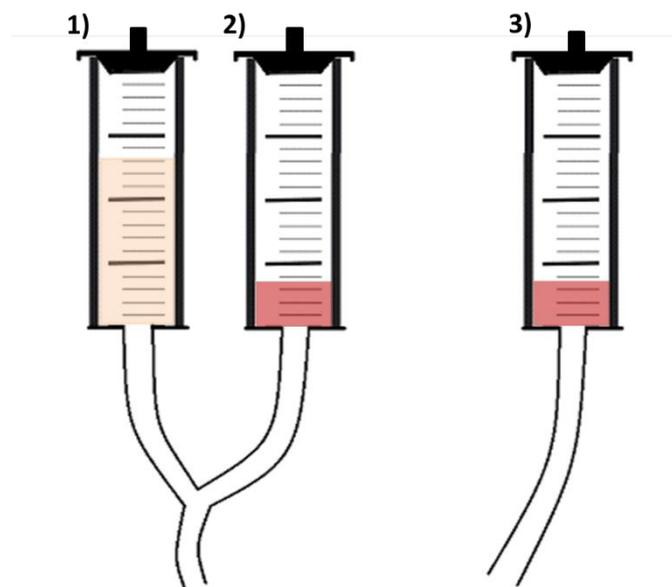


Abb. 6: Modifizierter Aufbau des IBIDI-Pumpsystems mit zusätzlichem Reservoir (1) für Paraformaldehyd 4% (PFA 4%) ganz links

Für die komplette Versuchsdurchführung wurden mit Gelatine beschichtete μ -Slides I^{0,2} Luer (Kanalhöhe [Channel height] 200 μm , Kanalvolumen [Channel volume] 50 μl) verwendet.

In dem in der Abbildung mit 1) gekennzeichneten Behälter befindet sich Paraformaldehyd 4%, welches nach dem Flussversuch zur Fixierung des Objektträgers verwendet wird.

In den beiden anderen Behältern, in der Abbildung mit 2) und 3) gekennzeichnet, befindet sich die Suspension aus Erythrozyten und Bakterien, die sich wie folgt zusammensetzt:

- 1 ml Erythrozytensuspension
- 72 μl mit FITC gefärbte Bakterien (*S. aureus*)
- 20 μl Histaminlösung
- 2908 μl HEPES als Pufferlösung

Alles wurde in ein 25 ml Falcon[®] gegeben und gut gemischt. Es handelt sich nun insgesamt um 4ml Versuchslösung, die nun gleichmäßig auf beide Behälter 2) und 3) verteilt wurde.

Auch der Objektträger wurde mit einer Suspension von 25% Erythrozyten und 75% HEPES gespült, um einen Hämatokritwert von 25% während des kompletten Versuchs zu gewährleisten.

Für die Simulation unter annähernd physiologischen Bedingungen des Versuches war ein ausreichender Hämatokrit unbedingt erforderlich, um den Staphylokokken eine Bindung zum Endothel zu ermöglichen, was ohne Erythrozyten weitestgehend nicht erfolgt. Als Ursache hierfür wird der fehlende Fåhræus-Lindqvist-Effekt angenommen. Zudem wurde durch die Zugabe von Erythrozyten eine realitätsnahe Viskosität des Flussmediums gewährleistet.

Durch die Stimulation mit Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) wurde von den HUVECs der von Willebrand-Faktor ausgeschüttet und durch den ständigen Druck von 10 dyn/cm^2 elongiert (1 dyn entspricht 10^{-5}N). Es handelt sich hierbei um einen hohen Druck auf das Endothel sowie einen Scherfluss wie er zum Beispiel über einer Herzklappe herrscht.

Die Staphylokokkensuspension ($3,6 \times 10^7$ CFU/ml) wurde nun für 15 min über die HUVEC gespült, um eine Bindung an den von Willebrand-Faktor unter Flussbedingungen zu ermöglichen.

Im Anschluss wurde der Objektträger für 10 min mit 4% wässriger Paraformaldehydlösung gespült, um eine Fixation des Ergebnisses zu erreichen. Alle Objektträger wurden danach bei 4°C bis zur Färbung gelagert.

3.2.17 Hinzufügen von Eap

Für die Substitutionsversuche wurde aufgereinigtes Eap verwendet, welches nativ aus dem *S. aureus*-Stamm Newman im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Homburg/Saar isoliert wurde. Es ist durch diese Art der Gewinnung frei von Lipopolysacchariden (LPS), welche bei rekombinanter Gewinnung und unzureichender Aufreinigung eventuell noch vorhanden sein können. Dadurch wird eine Stimulation der Zellen durch LPS ausgeschlossen.

SA 113 *Δeap* wurde nach der Färbung für 90 Minuten mit aufgereinigtem Eap in der Konzentration von 40 µg/ml bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, um eine Lichtinaktivierung des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern.

Anschließend wurde alles bei 500 x g für 5 min abzentrifugiert, und der Überstand abgeschüttet. Das Bakterienpellet wurde nochmals in 500 ml PBS gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgeschüttet und das verbleibende Bakterienpellet in einer geringen Menge PBS resuspendiert. Analog zu den anderen Versuchen wird nun die OD₆₀₀ gemessen und auf 1 eingestellt. So wurde mit allen Bakterienstämmen, die in diesem Versuchsaufbau verwendet wurden verfahren.

3.2.18 Hinzufügen von Lambda-DNA

Für einen Teil der Flussversuche wurde Lambda-DNA verwendet, um das Verknäulen von längeren aus Blut gewonnenen DNA-Stücken zu verhindern. Es handelt sich dabei um lineare doppelsträngige Bakteriophagen-DNA mit einsträngigen komplementären 12 Basenpaaren langen 5'-Enden, die insgesamt 48.502 Basenpaare lang ist.

Die Lambda-DNA wird bei -20°C gelagert, die Konzentration beträgt 500 µg/ml. Für die Versuche wurde eine Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt, die DNA wurde hierzu direkt zu der Versuchssuspension hinzugegeben.

Für die Versuche mit DNA wurde folgende Zusammensetzung der Versuchssuspension gewählt, um den Hämatokritwert in allen Versuche konstant zu halten:

- 1 ml Erythrozytensuspension
- 72 µl mit FITC markierte Bakterien (*S. aureus*)
- 20 µl Histamin
- 2828 µl HEPES als Pufferlösung
- 80 µl Lambda-DNA

3.2.19 Färbeprotokoll Objektträger

Zur Färbung der Objektträger wurden drei verschiedene Färbepuffer benötigt:

Puffer a): Natriumphosphatpuffer mit 4% Succrose

- Dafür wurde Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) 0,1 M und Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) 0,1 M im Verhältnis 1:7 gemischt.
- Dazu wurden noch 8 g Succrose gegeben und alles vollständig gelöst.
- Der Puffer hat einen pH-Wert von 7,4 und wurde im Kühlschrank bei 4°C bis zur Verwendung gelagert
- Bei der Herstellung von Puffer a) sollte bei der Menge beachtet werden, dass 110 ml für die Herstellung von Puffer b) und c) benötigt werden, sowie etwa 1ml pro verwendetem Objektträger.

Puffer b): Natriumphosphatpuffer mit 4% Succrose, 2% BSA und IgG

- Von Puffer a) wurden 10 ml abgenommen, 2% (=0,2 g) BSA (Bovine serum albumine) hinzugegeben und gut gemischt
- Aus Ziegen isoliertes IgG wurde im Verhältnis 1:400 hinzugegeben, was 25 µl entspricht
- Lagerung bei 4°C

Puffer c): Natriumphosphatpuffer mit 4% Succrose und 0,5% BSA

- Von Puffer a) wurden 100 ml abgenommen und 0,5% BSA (=0,5 g) hinzugegeben
- Lagerung bei 4°C

1. Arbeitsschritt:

- Alle Objektträger wurden nach der Fixierung bei 4°C gelagert und sollten vor der Färbung wieder auf Raumtemperatur gebracht werden
- Unter einer Sterilbank (Licht aus, um Fluoreszenz zu schützen!) wurde jeder Objektträger mit 1 ml vom Waschpuffer a) gespült, dabei muss auf die Richtung geachtet werden, um die von Willebrand-Faktor-Fäden nicht abzureißen
- Danach wurde mit Blocklösung b) gespült, für jeden Slide wurden hier 500 µl benötigt
- Die Blocklösung wurde im Kanal des Objektträgers nach dem letzten Durchspülen stehen gelassen und dunkel bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert.

2. Arbeitsschritt:

- Antikörperlösung 1 ansetzen, dafür wurden pro Slide 100 µl von Puffer c) und ein polyklonaler, aus Kaninchen gewonnener, gegen den humanen von Willebrand Faktor gerichtete Antikörpermischung (Polyclonal Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor, Dako, Glostrup, Denmark) benötigt
- Die Antikörperverdünnung beträgt 1:200 in Puffer c)
- Alle Objektträger wurden zuerst mit jeweils 1ml Puffer c) gespült um die Blocklösung zu entfernen
- Danach wurden 100 µl Antikörperlösung 1 auf jeden Objektträger gegeben und mehrmals hin und her pipettiert um eine gute Durchmischung zu erreichen
- Anschließend wurden die Objektträger dunkel bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert

3. Arbeitsschritt:

- Herstellen von Antikörperlösung 2 aus 100 µl Puffer c) und mit Alexa Fluor 555 markierter Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper im Verhältnis 1:400
- Nach Entfernen der Antikörperlösung 1 wurde jeder Objektträger mit 1,5 ml Waschpuffer c) durchgespült und danach 100 µl Antikörperlösung 2 auf jeden Slide gegeben und mehrmals hin und her pipettiert
- Erneut wurden alle Objektträger dunkel bei Raumtemperatur für 2 h mit der Antikörperlösung 2 inkubiert

4. Arbeitsschritt:

- Im Anschluss wurden alle Objektträger mit Puffer c) gewaschen
- Danach wurden 100 µl pro Objektträger einer DAPI-Färbelösung (1:1000 in PBS) auf die Objektträger gegeben und für 10 min dunkel bei Raumtemperatur inkubiert

5. Arbeitsschritt:

- Anschließend wurde jeder Objektträger mit 1,5 ml von Puffer c) gespült und danach mit 1,5 ml Puffer a) gespült um alle Antikörper- und Farbstoffreste zu entfernen
- Im Anschluss wurde jeder Objektträger mit 1,5 ml Millipore-Wasser durchgespült
- 300 µl DABCO-Molwol wurden zur Fixierung in jeden Kanal gegeben und bei 4°C für mindestens 30 min bis zur Aushärtung gelagert, erst danach konnte mikroskopiert werden.

3.2.20 Mikroskopieren und Auswertung der Daten

Nach Aushärtung des DABCO-Molwol konnten die gefärbten Objektträger mikroskopiert werden. Hierzu wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Cell Observer, ZEISS Deutschland, Oberkochen, Deutschland) mit einem 40x Objektiv verwendet. Die Adhäsion der Bakterien am von Willebrand Faktor wurde anhand von 30 zufällig ausgewählten Bildern pro Slide quantifiziert, welche mit der Software ZEN 2012 lite (Carl Zeiss, Jena Deutschland) ausgewertet wurden.

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPadPrism Version 5 (GraphPad Software, La Jolla, USA), p-Werte < 0,05 wurden dabei als signifikant, und p-Werte <0,01 als hochsignifikant gewertet.

4. Ergebnisse

Nach vielversprechenden Befunden von Karin Pappelbaum, die zeigten, dass ULVWF Fäden wesentlich zur Adhäsion von *S. aureus* an intaktes Endothel unter Flussbedingungen beitragen, wurden zur Untersuchung der Relevanz dieser Entdeckung im lebenden Organismus Versuche mit der Rückenhautkammer an Mäusen durchgeführt. In diesem Modell können Gefäße in der Haut mit Hilfe der Intravitalmikroskopie detailliert dargestellt werden.

Im zweiten Teil der hier dargestellten Ergebnisse wurde die Rolle des bakteriellen Proteins Eap bei der Bindung an ULVWF näher beleuchtet. Eap ist ein von *S. aureus* produziertes und sezerniertes Protein, welches mannigfaltige Eigenschaften hat, unter anderem ist es auch als wichtiger Adhäsionsfaktor bekannt. Die spezifische Bindung von Eap an ULVWF wurde bislang jedoch nicht untersucht und soll nun Gegenstand dieser Dissertation sein.

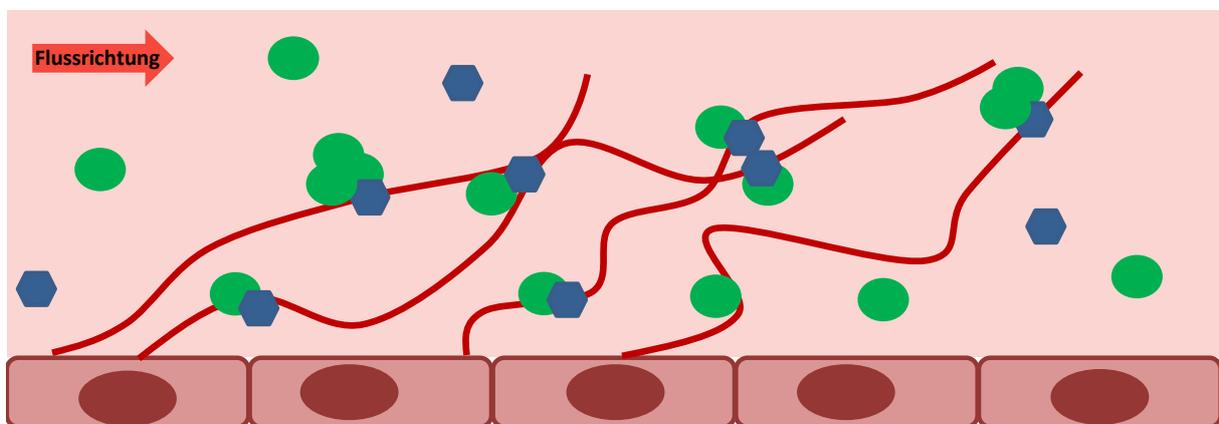


Abb. 7: Modell der hier durchgeführten Versuche

Interaktion von ULVWF [rot], einem wichtigen Gerinnungsfaktor auf der Wirtsseite (freigesetzt von Endothelzellen) und Eap [blau] einem bekannten, bakteriellen Adhäsionsmolekül. Durch die Elongation von ULVWF mit dem Blutstrom [roter Pfeil] können dort zirkulierende Bakterien an das Gefäßendothel binden, Staphylokokken sind in grün dargestellt (Abbildung nicht maßstabsgetreu).

4.1. In-vivo Versuche mit Rückenhautkammer

In *in vivo*-Versuchen mit Wildtyp Mäusen des Typs C57BL/6 und der dazugehörigen Knockout-Mutante C57BL/6 vWF^{-/-} derselben Mauslinie konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von Staphylokokken an die Gefäßwand ohne von Willebrand Faktor deutlich reduziert ist. Dies unterstreicht die Ergebnisse der *in vitro* Versuche am IBIDI-Flussmodell und zeigt, dass auch im lebenden Organismus der Einfluss des von Willebrand-Faktors für die Adhäsion von *S. aureus* an die Gefäßwand von signifikanter Bedeutung ist (Abb. 8). Die Knockout-Mäuse hingegen produzieren keinen von Willebrand-Faktor. Für die eingesetzten Bakterien ist somit eine Bindung an das Endothel über den vWF bzw. die unter Fluss entstehenden ULVWF als Brückenmolekül nicht möglich. Laut unserer Hypothese, die in den nachfolgenden Versuchen auch bestätigt werden konnte, war eine verminderte Bindung an das Gefäßendothel *in vivo* zu beobachten (Abb. 8).

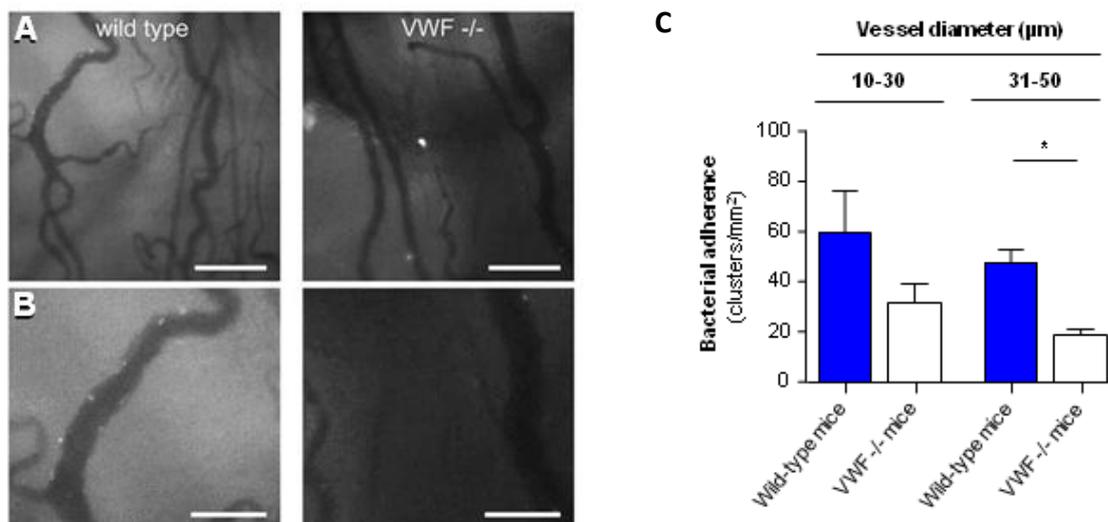


Abb.8: **A** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie der an das Endothel gebundenen, Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester-(CFSE-)markierten *S. aureus* in postkapillären- und Sammelvenen der Rückenhautkammer nach Stimulation der Zellen mit TNF- α . Der Messbalken entspricht 100 μ m. **B** Vergrößerung der am Endothel gebundenen Staphylokokken, Messbalken 50 μ m. **C** Quantitative Analyse der adhärenen Bakterien pro mm² Endotheloberfläche in den Venolen der mit TNF- α stimulierten Rückenhautkammern der Wildtyp-Mäuse (blaue Balken) und der von Willebrandfaktor-defizienten Mäuse (weiße Balken), n=5-6. Die Daten wurden mittels Intravitalfluoreszenzmikroskopie erhoben, und sind dargestellt als Mittelwert + SEM. Mann-Whitney U Test; * $p < 0,05$ (Pappelbaum *et al.*, *Circulation* 128:50-9)

Es konnte zusätzlich festgestellt werden, dass die Adhäsion von *S. aureus* in etwas größeren Venolen mit einem Durchmesser von 31-50µm in der vWF-defizienten Maus signifikant abnahm (Abb. 8). (Pappelbaum et al. 2013)

Auf der Wirtsseite konnte nun ULVWF als intravaskulärer Bindungspartner für *S. aureus* identifiziert werden. Um die Rolle des bakteriellen Proteins Eap in diesem Zusammenhang genauer zu untersuchen wurden im Folgenden weitere *in vitro* Versuche durchgeführt. Dafür wurde das IBIDI-Flusssystem verwendet, welches über einem konfluenten Zellrasen aus HUVEC einen kontinuierlichen Fluss erzeugt. Die humanen Nabelschnurendothelzellen für die nachfolgenden Versuche wurden direkt aus Nabelschnüren von freiwilligen, gesunden Spenderinnen gewonnen und nach Kultivierung in den Versuchen eingesetzt.

4.2. Nabelschnurspendervariabilität

Aufgrund der großen Unterschiede zwischen den einzelnen Spenderinnen der Nabelschnüre in Bezug auf die Anzahl der einzelnen Fäden und der Fadenlänge war es notwendig, die Anzahl der adhärennten Staphylokokken pro 100 µm Faden zu bestimmen. Durch diese Methode der Auswertung konnte die große Variabilität der Anzahl vorhandener ULVWF bei den Spendern berücksichtigt werden. Um die Versuche möglichst so zu gestalten, dass Wildtyp, Mutante und die Mutante mit exogener Substitution von Eap möglichst ähnlich viele Adhäsionsmöglichkeiten haben, wurden bei jedem Spender nach Möglichkeit verschiedene Bakterien aus dem beschriebenen Versuchsaufbau getestet.

Nachfolgende Grafik zeigt die Unterschiede in der Stimulationsfähigkeit mit Histamin der HUVEC bei den unterschiedlichen Spenderinnen (Abb. 9). Während die HUVECs einzelner Spenderinnen (Spender 1,2 und 3) nach Histaminstimulation zum Teil über 70 ULVWF Fäden pro Bildausschnitt produzierten, zeigten die Zellen anderer Spenderinnen (z. B. Spenderinnen 9 und 10.2) eine nur sehr geringe ULVWF Bildungsrate von zum Teil weniger als 10 ULVWF Fäden pro Bild (Abb. 9A).

Worauf diese Unterschiede bei den Spenderinnen zurückzuführen sind, ist noch Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten, denkbar sind jedoch genetische Faktoren und auch der Einfluss von Noxen auf die Nabelschnurendothelzellen während der Schwangerschaft.

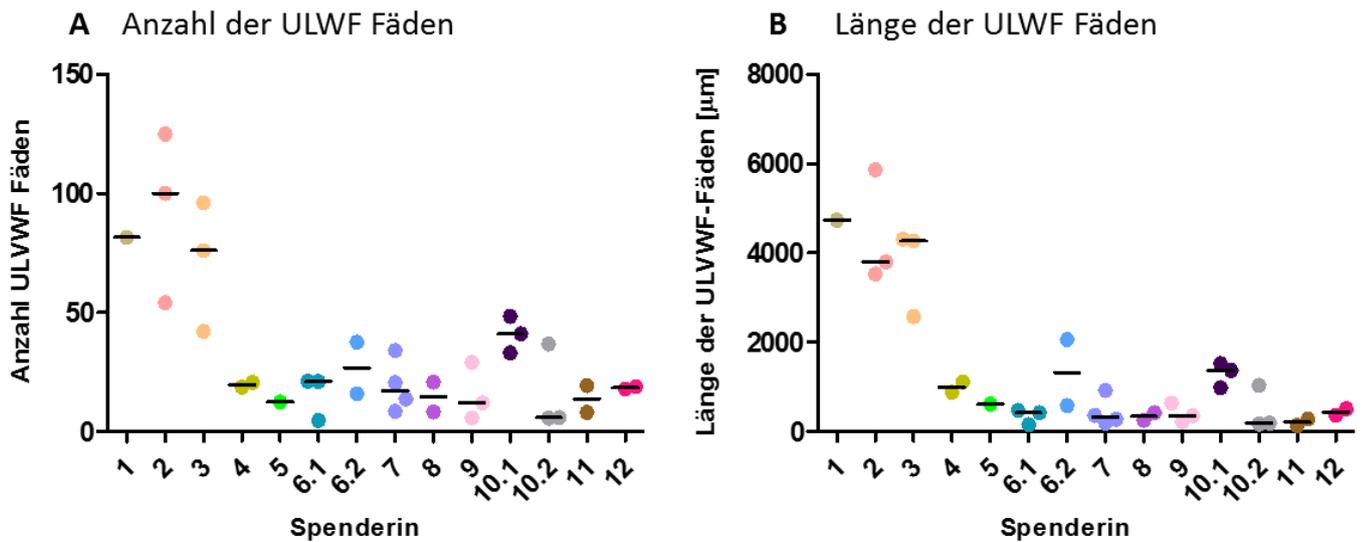


Abb. 9: Einfluss der Spenderzellen auf die Histamin-induzierte Ausschüttung und Bildung von ultralangen von Willebrandfaktorfilamenten (ULVWF) unter hohem Scherfluss (10 dyn/cm²). Humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) verschiedener Spenderinnen wurden in Gelatine-beschichteten Flusskammern (IBIDI) unter niedrigem Scherfluss (1 dyn/cm²) in EGM2 Medium zu einem konfluenten Zellrasen angezogen. Die Ausschüttung und Bildung von ULVWF wurde durch Zugabe von Histamin (100 µM) und gleichzeitiger Erhöhung der Flussrate auf 10 dyn/cm² induziert. Die Anzahl der ULVWF Fäden (A) und die Länge (B) der entsprechenden ULVWF Fäden wurde 20 min nach Histaminzugabe untersucht. Die Daten der in Duplikaten durchgeführten Experimente sind als Dot Plot dargestellt, schwarze Querbalken zeigen die jeweiligen Mediane.

Auch bei der Länge der ULVWF Fäden zeigten sich zum Teil große Unterschiede zwischen den Spenderinnen (Abb. 9B). Welche Faktoren hierfür ursächlich sind, lässt sich zum heutigen Zeitpunkt noch nicht abschließend beurteilen. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte zum Beispiel eine unterschiedlich starke Aktivität des Enzyms ADAMTS-13 sein, welche je nach Spenderin verschieden ausgeprägt ist

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen ULVWF Fadenlänge und -häufigkeit bei den einzelnen Spendern zu identifizieren, wurde mit den in Abb. 9A und B dargestellten Werten eine Korrelationsanalyse durchgeführt (Abb.10).

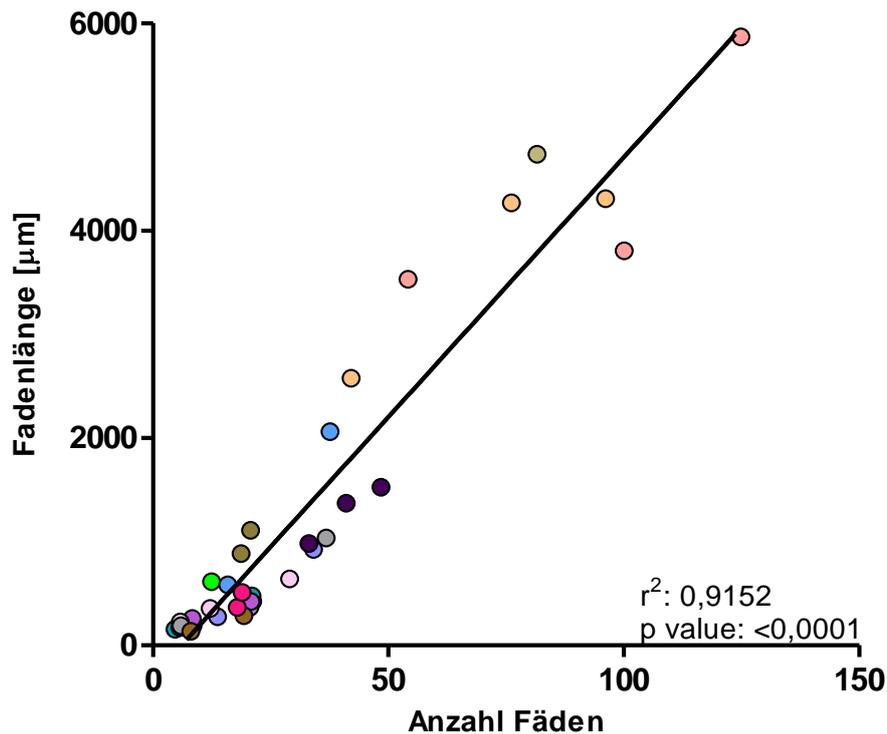


Abb. 10: Korrelationsanalyse mit Linearer Regression.

Analyse der Anzahl der Fäden in Korrelation zur Länge der ULVWF-Fäden in Mikrometer aller vorhandenen Objektträger in allen Gruppen. Es ist eine deutliche positive Korrelation zwischen der Anzahl der ULVWF-Fäden und der Länge der ULVWF-Fäden zu erkennen, wobei die jeweiligen Farben der einzelnen Spenderin (analog zu Abb. 9A und B) zugeordnet werden können. $r^2 = 0,9152$ und $p < 0,0001$.

Mit Hilfe dieser Korrelationsanalyse aller vorhandenen Objektträger aus allen Versuchsgruppen konnte eine eindeutige positive Korrelation zwischen der Länge der ULVWF-Fäden und der Anzahl der ULVWF-Fäden pro Bild gezeigt werden. Dies unterstützt die Hypothese, dass bei Spenderinnen, deren HUVEC besonders zahlreiche ULVWF-Fäden ausbilden, diese auch länger sind. Bei Spenderinnen mit weniger ULVWF-Fäden stellen sich diese sich auch deutlich kürzer dar. Nur für eine Spenderin (Spenderin 1, s. Abb. 11) von HUVECs konnte keine solche positive Korrelation zwischen der Länge der ULVWF-Fäden und der Anzahl der ULVWF-Fäden pro Bild beobachtet werden, da die Zellen dieser Spenderin eine vergleichsweise geringe Anzahl an ULVWF-Fäden pro Bildausschnitt aufwiesen, im Durchschnitt aber vergleichsweise lange ULVWF-Fäden produzierten (Abb. 9A, B und 10). Die Ursache hierfür konnte nicht identifiziert werden.

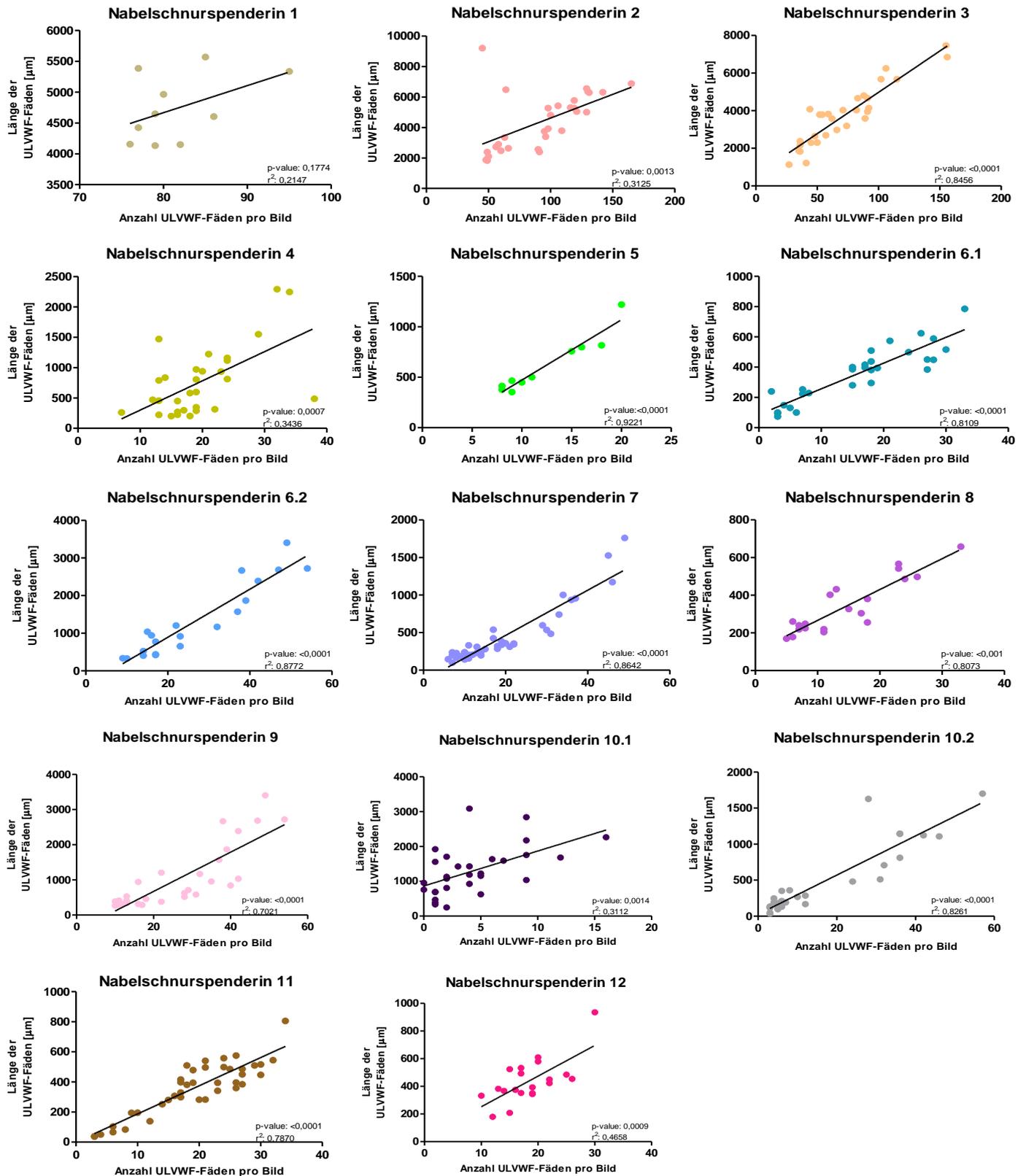


Abb. 11: Korrelationsanalysen der einzelnen Spenderinnen.

Dargestellt sind als Punkte der obigen Dot Plots die einzelnen Bilder, die von den Objektträgern aufgenommen wurden. Die Farben entsprechen denen in Abb. 9A und B, sowie in Abb. 10.

4.3 Stimulation der HUVEC mit Eap

Da von Eap bekannt ist, dass es eine Ausschüttung von TNF- α in Endothelzellen induzieren kann, sollte vor der Versuchsdurchführung geklärt werden, ob die Zellen durch Eap selbst, ähnlich wie bei Histamin, in unserem experimentellen System dazu stimuliert werden können, vWF freizusetzen. Dafür führten wir einen ELISA durch (Abb. 12).

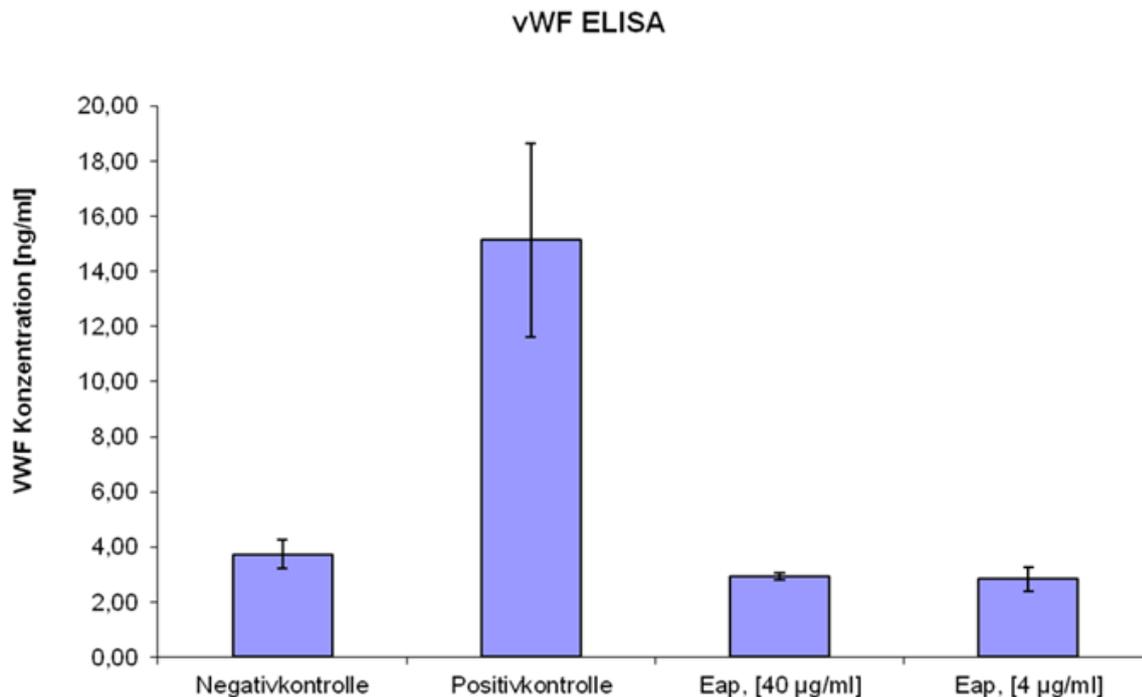


Abb. 12: Verschiedene Konzentrationen von Eap waren nicht in der Lage, die HUVEC zu stimulieren. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden ELISA-Untersuchungen verwendet, als Positivkontrolle wurde Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) verwendet, als Negativkontrolle H_2O . Über den Balken ist die jeweilige Standardabweichung angegeben. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass Eap in den hier eingesetzten Konzentrationen von 4 bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ nicht dazu in der Lage ist, HUVECs zum Ausschütten von vWF zu animieren.

4.4 Vergleich SA113 Wildtyp und Δeap Mutante

Um untersuchen zu können, welchen Einfluss Eap auf die Adhäsionsfähigkeit von *S. aureus* an ULVWF unter physiologischen Flussbedingungen hat, wurde parallel zum Wildtyp SA113 auch eine isogene SA113 Δeap Mutante untersucht, sowie die *eap*-Mutante, welche nachträglich mit Eap inkubiert wurde. Die Abbildungen 13 und 14 zeigen repräsentative Bilder der einzelnen Bakterienderivate und die unterschiedlichen Kanäle, die zur Auswertung der Bilder aufgenommen wurden.

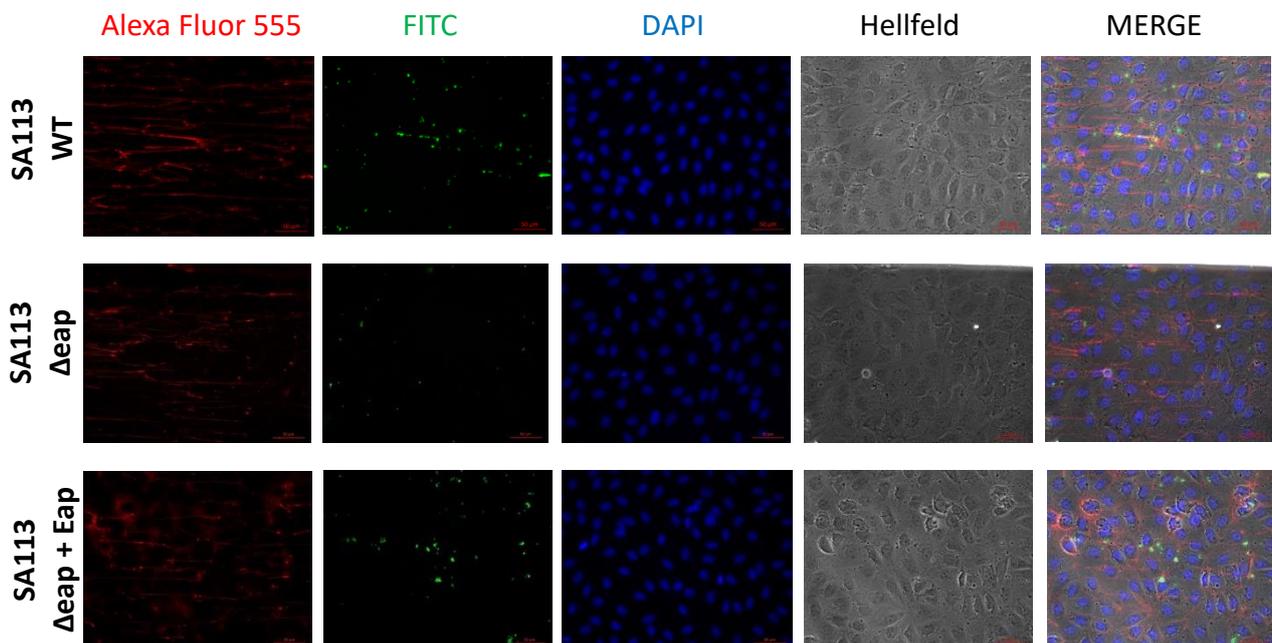


Abb. 13: Repräsentatives Bildbeispiel zum Vergleich der ULVWF Bindungsfähigkeit von SA113, SA113 Δeap und SA113 $\Delta eap+Eap$. ULVWF-Fäden sind in rot mittels Alexa Fluor 555 dargestellt, Bakterien wurden vor der Versuchsdurchführung mittels FITC gefärbt. Zellkerne der HUVEC sind in blau nach DAPI-Färbung abgebildet. Die hier getesteten Bakterien wurden für 4 Stunden in Kulturmedium angezogen und befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

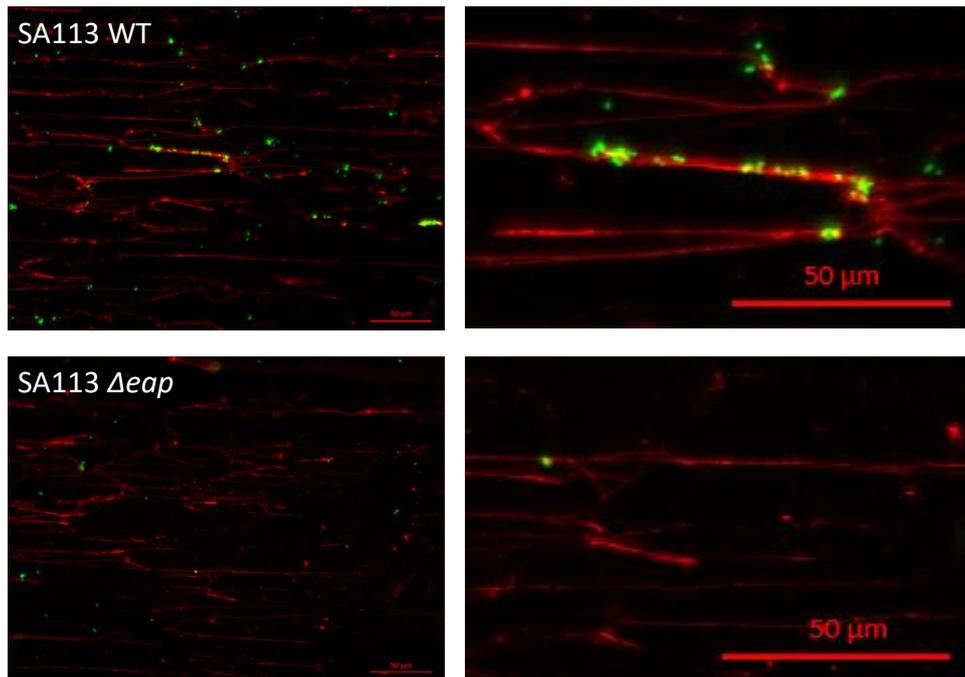


Abb. 14: Repräsentatives Bildbeispiel von zwei verschiedenen Konditionen. ULVWF-Fäden sind rot dargestellt und *S. aureus* wurde grün gefärbt. Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Maßstabsbalken entsprechen 50μm.

Die Zahl der untersuchten biologischen Replikate lag bei allen Versuchen bei 3-6 ($n=3-6$) mit jeweils 2 technischen Replikaten. Da die Expression von Adhäsionsfaktoren in *S. aureus* durch die Wachstumsphase der Bakterienzellen maßgeblich beeinflusst wird (George et al.), wurden in diesem Projekt *S. aureus* Zellen aus zwei verschiedenen Wachstumsphasen (4 und 24 h) verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 graphisch dargestellt.

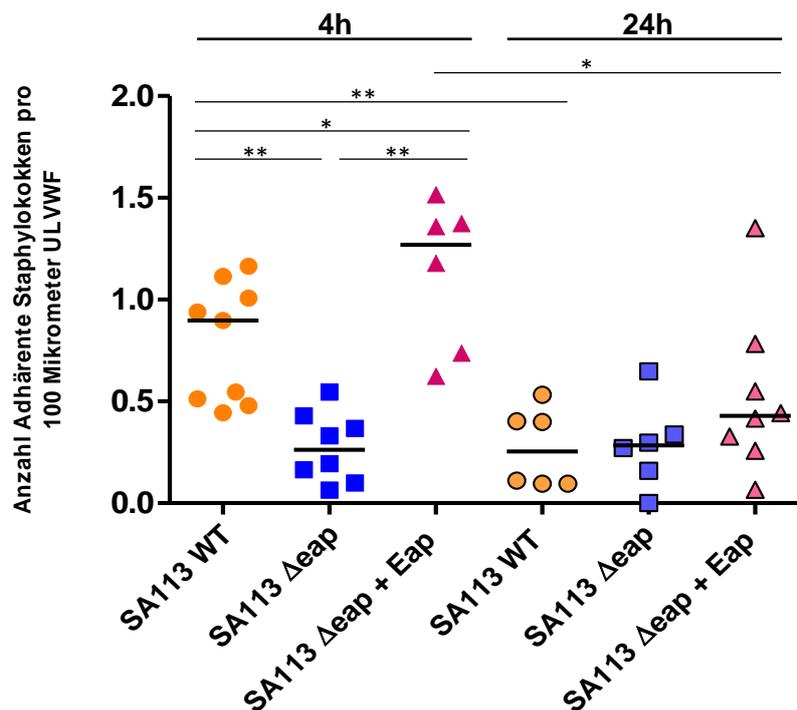


Abb. 15: Vergleich von SA113 (orange), der *eap* Mutante (blau) und der *eap* Mutante, welche nachträglich mit Eap inkubiert wurde (rot). Links in der exponentiellen Wachstumsphase nach 4 Stunden und rechts in der stationären Phase nach 24 Stunden. Aufgetragen sind in dieser Abbildung die adhärennten Bakterien pro 100 μm ULVWF-Faden als Dot Plot. Alle Punktwolken sind mit ihren jeweiligen Medianen dargestellt, * $p < 0.05$ (signifikant), ** $p < 0.01$ (hochsignifikant), alle statistischen Auswertungen mittels Mann-Whitney-Test. Anzahl der Objektträger $n=3-5$ mit jeweils 2 technischen Replikaten.

Diese Versuche zeigten, dass sich die Adhäsion an ULVWF bei exponentielle Phase-Zellen der *eap* Mutante in etwa halbiert (Abb. 15). Interessanterweise konnte dieser Effekt durch Zugabe von exogenem Eap, welches aus dem *S. aureus* Stamm Newman isoliert wurde, wieder aufgehoben werden. Bei genauerem Betrachten ist zudem erkennbar, dass sich die Adhäsion durch Zugabe von exogenem Eap im Vergleich zum Wildtyp sogar noch steigern lässt. Dieselben Versuche mit Bakterien aus der stationären Phase zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede im Adhäsionsverhalten an ULVWF zwischen den einzelnen Gruppen. Die externe Zugabe von Eap zu den stationäre-Phase Zellen der *eap* Mutante führte aber, wie schon bei der 4 h Kultur zu beobachten war, zu einer tendenziellen Erhöhung der Bindungsfähigkeit an ULVWF unter Fluss. Vergleicht man zudem alle sechs Gruppen, das heißt jeweils die drei Versuchsgruppen zu den zwei unterschiedlichen Zeitpunkten, wird deutlich, dass sowohl SA113 WT als auch die *eap* Mutante, welche mit Eap

inkubiert wurde, in ihrem Bindungsverhalten an ULVWF in Hinblick auf die Wachstumsphase signifikante Unterschiede aufwiesen. Beide Zelltypen zeigten in der exponentiellen Wachstumsphase eine klar erhöhte Bindungsfähigkeit an ULVWF als ihre entsprechenden Pendanten aus der stationären Phase. Bei der *eap* Mutante ist der Unterschied zu den zwei verschiedenen Zeitpunkten hingegen nicht erkennbar.

4.5 Die Rolle der freien DNA im System

Da in jüngerer Vergangenheit publizierte Untersuchungen darauf hin wiesen, dass extrazelluläre DNA (eDNA) an ULVWF zu binden und diesen zu stabilisieren vermag (Grässle et al. 2014), und auch von *S. aureus* angenommen wird, dass er an eDNA binden kann (M. Bischoff, persönliche Mitteilung), wurde in den nachfolgenden Untersuchungen dieses Szenario *in vitro* nachgestellt. Außerdem sollte zusätzlich der Einfluss von eDNA auf das Bindevverhalten von *S. aureus* an ULVWF in diesem System untersucht werden. Hierzu wurde dem System Lambda-DNA hinzugefügt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 15 dargestellt.

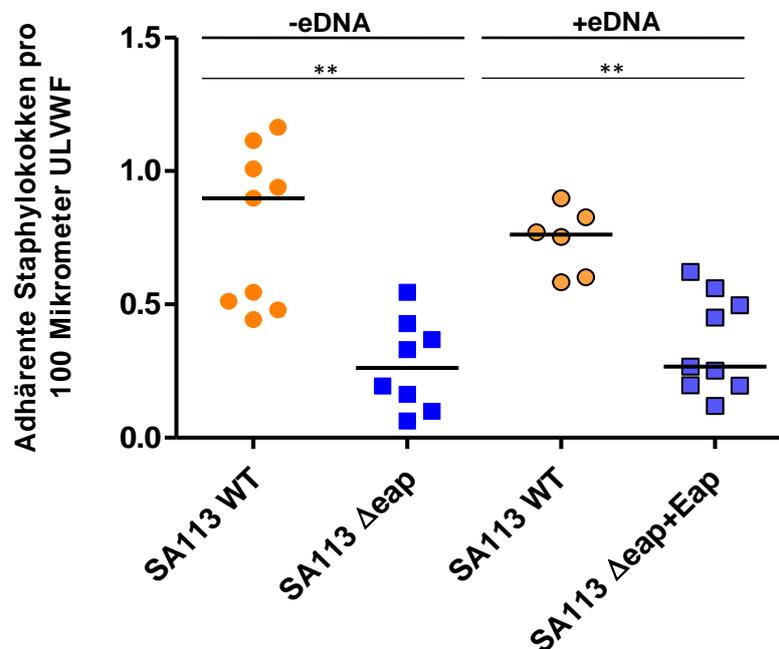


Abb. 16: Vergleich von SA113 Wildtyp und der *eap* Mutante jeweils ohne und mit (schraffiert) extrazellulärer DNA. Dargestellt sind adhärenente Bakterien pro 100 μ m ULVWF-Faden. * $p < 0.05$ (signifikant), ** $p < 0.01$ (hochsignifikant), alle statistischen Auswertungen mittels Mann-Whitney-Test. Anzahl der Objektträger $n = 3-5$ mit jeweils 2 technischen Replikaten, schwarze Querbalken stellen die Mediane dar.

Die Zugabe von eDNA in das Flusssystem ergab weder für den Wildtyp, noch für die *eap* Mutante eine markante Steigerung des Bindeverhaltens an ULVWF unter der getesteten Scherflussrate. Ebenfalls zeigte sich auch in den eDNA supplementierten Proben kein erhöhtes Bindeverhalten des Wildtyps an ULVWF im Vergleich zur isogenen *eap*-Mutante, wobei sich der Unterschied zwischen den beiden SA113 Derivaten im Vergleich zu den nicht mit eDNA ergänzten Proben etwas verringerte, was jedoch nicht signifikant war. Auch die Unterschiede im Bindungsverhalten der *eap* Mutante war tendenziell etwas höher, verfehlte aber Signifikanzniveau.

Da für eDNA bereits eine stabilisierende Wirkung auf ULVWF beschrieben wurde (Grässle et al. 2014), sollte des Weiteren der fadenstabilisierende Effekt von eDNA im Rahmen dieser Arbeit adressiert werden (Abb. 17). Dies wurde außerdem untersucht um Effekte auf die Adhäsion der Bakterien näher zu betrachten und eventuelle Einflüsse feststellen zu können.

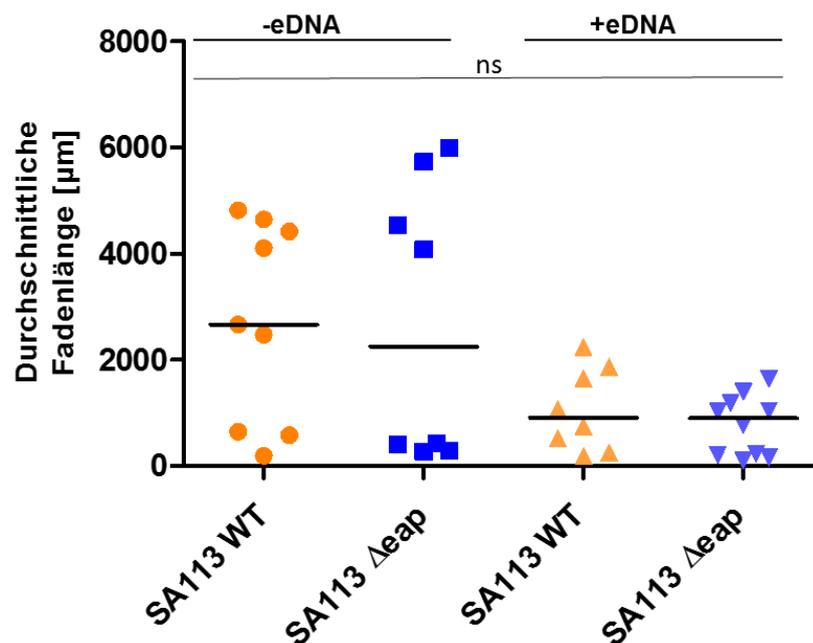


Abb.17: Einfluss von eDNA auf die durchschnittliche ULVWF-Fadenlänge der mit SA113 bzw. der SA113 Δeap Mutante behandelten, Histamin-stimulierten Spenderzellen.

Dargestellt ist die durchschnittliche Fadenlänge des ULVWF in μm , die Mediane sind als schwarzer Querstrich dargestellt, links ohne und rechts mit Zugabe von extrazellulärer DNA im Flusssystem, ns=nicht signifikant laut Mann-Whitney-Test. Anzahl der Objektträger n=3-5 mit jeweils 2 technischen Replikaten

Anders als bei Grässle et al (2014) beobachtet konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch kein signifikanter Einfluss von eDNA auf die Fadenlänge, im Sinne einer fadenstabilisierenden Eigenschaft von eDNA beobachtet werden. Dieser Effekt war auch unabhängig davon, welche Art von Bakterium, also SA113 WT oder SA113 Δeap , vorhanden war. (s. Abb. 17)

4.6 Clusterbildung am ULVWF

S. aureus ist bekannt dafür, in Clustern aufzutreten. Da Eap sowohl an sich selbst, an die bakterielle Zellwand als auch an diverse Wirtsmoleküle binden kann und so die Aggregation von *S. aureus* Zellen fördert (Kreikemeyer et al. 2002), wurde zusätzlich die Adhäsion bakterieller Cluster an ULVWF unter den beschriebenen Flussbedingungen untersucht. Als Cluster von Bakterien wurde hierbei eine Ansammlung von mehr als fünf zählbaren Bakterien definiert. Hier zeigte sich ein klarer Unterschied im ULVWF-Bindevverhalten zwischen der mit Eap supplementierten SA113 Δeap Probe und den Wildtyp bzw. SA113 Δeap Proben in den 4 Stunden Kulturen (Abb. 18).

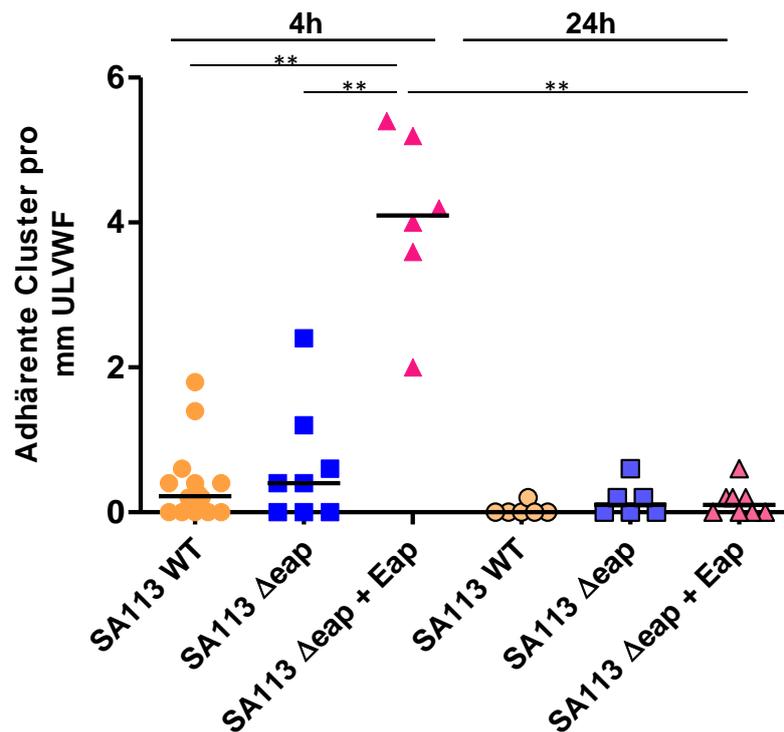


Abb. 18: Einfluss der Wachstumsphase der Bakterienkulturen auf die Adhäsion von Bakterienclustern an ULVWF-Fäden unter hohem Scherfluss.

Dargestellt ist die Anzahl adhärenter Cluster pro mm ULVWF-Fäden, die Mediane der jeweiligen Bakterienderivate sind als schwarzer Querstrich dargestellt. Die ersten drei Wertesammlungen stellen den Zeitpunkt nach 4 Stunden dar, die letzten drei Wertesammlungen stellen den Zeitpunkt nach 24 Stunden dar. * $p < 0.05$ (signifikant), alle statistischen Auswertungen mittels Mann-Whitney-Test. Anzahl der Objektträger $n=3-5$ mit jeweils 2 technischen Replikaten.

Wenn Zellen aus der frühen Wachstumsphase genutzt wurden, adhärte eine signifikant erhöhte Anzahl an Cluster der Eap substituierten SA113 *eap* Proben an ULVWF als die entsprechenden Wildtyp und SA113 *eap* Proben, während sich zwischen den Wildtyp und SA113 *eap* Proben keine klaren Unterschiede im Adhäsionsverhalten ergaben. In den 24 h Kulturen hingegen war dieser Unterschied nicht mehr sichtbar. Hier zeigten alle drei Probenotypen eine ähnlich niedrige Adhäsion von Clustern an ULVWF. Im Vergleich der beiden Eap substituierten SA113 *eap* Probengruppen hingegen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den 4 h und 24 h Kulturen, in denen die 4 Stunden Proben eine deutlich höhere Clusteradhäsionsrate an ULVWF aufwiesen als die 24 h Proben.

Um den Einfluss von eDNA auf die Adhäsionsfähigkeit von *S. aureus* Clustern an ULVWF zu ermitteln, wurden die Bilder zusätzlich in Hinblick auf diesen Aspekt ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt.

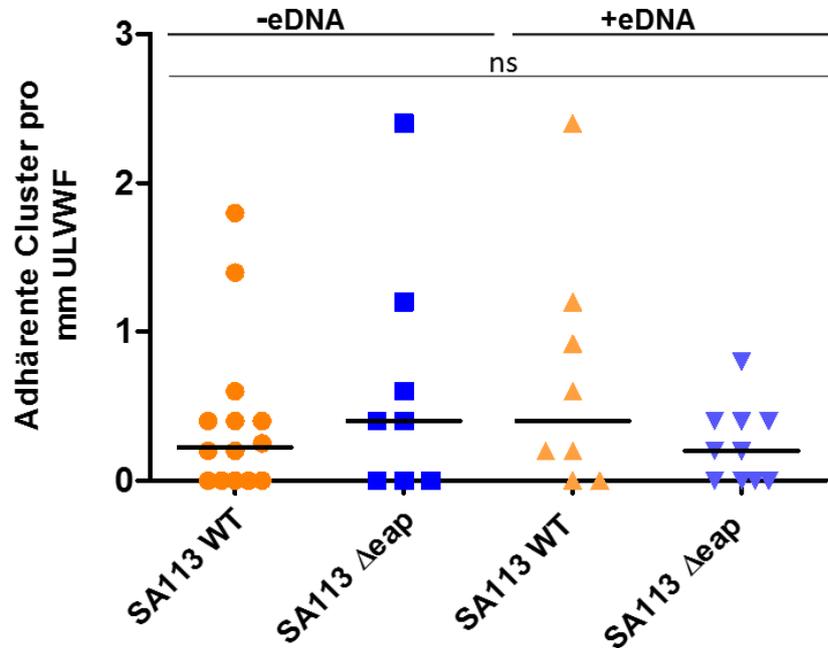


Abb. 19: Einfluss von eDNA auf die Adhäsion von Bakterienclustern an ULVWF-Fäden unter hohem Scherfluss.

Dargestellt sind adhären Cluster pro mm ULVWF und die Mediane der jeweiligen Bakterienderivate als schwarzer Querstrich, links ohne und rechts mit Zugabe von extrazellulärer DNA im Flusssystem. Alle Wertegruppen sind mit ihrem jeweiligen Median dargestellt, ns=nicht signifikant laut Mann-Whitney-Test, n=3-5 bei jeweils 2 technischen Replikaten.

Durch Zugabe von eDNA kommt es bei Wildtyp Zellen zu einer tendenziell vermehrten Anbindung von Bakterienclustern an ULVWF-Fäden, während bei der *eap* Mutante dieser Effekt ausbleibt. Eine signifikante Steigerung der Bindung von Bakterienclustern an ULVWF konnte aber nicht gezeigt werden, lediglich ein Trend in Richtung vermehrte Bindung. Bei der *eap* Mutante scheint sich eher ein Trend in die entgegengesetzte Richtung zu zeigen, denn hier erscheint die Adhäsion durch die Zugabe von eDNA eher vermindert. Diese Ergebnisse sind aber auch nicht signifikant, und zeigen einen ähnlichen Trend wie bei den Wildtyp-Zellen (Abb. 19).

4.7. Endothelbindung von *S. aureus*

Vorarbeiten von Karin Pappelbaum belegten, dass *S. aureus* unter Flussbedingungen zwar bevorzugt an ULVWF bindet, zum Teil aber auch unabhängig von diesem Wirtszellmatrixmolekül an Endothel zu binden vermag, wenn auch nur zu einem geringen Teil (Pappelbaum et al. 2013). Daher wurde auch im Rahmen dieser Arbeit das relative Bindevverhalten von SA113 und der isogenen *eap*-Mutante, sowie der mit Eap substituierten Mutante an ULVWF, an den globulären vWF (gvWF) und an das Endothel ohne sichtbare Beteiligung des von Willebrand-Faktors im Allgemeinen bestimmt (Abb. 20).

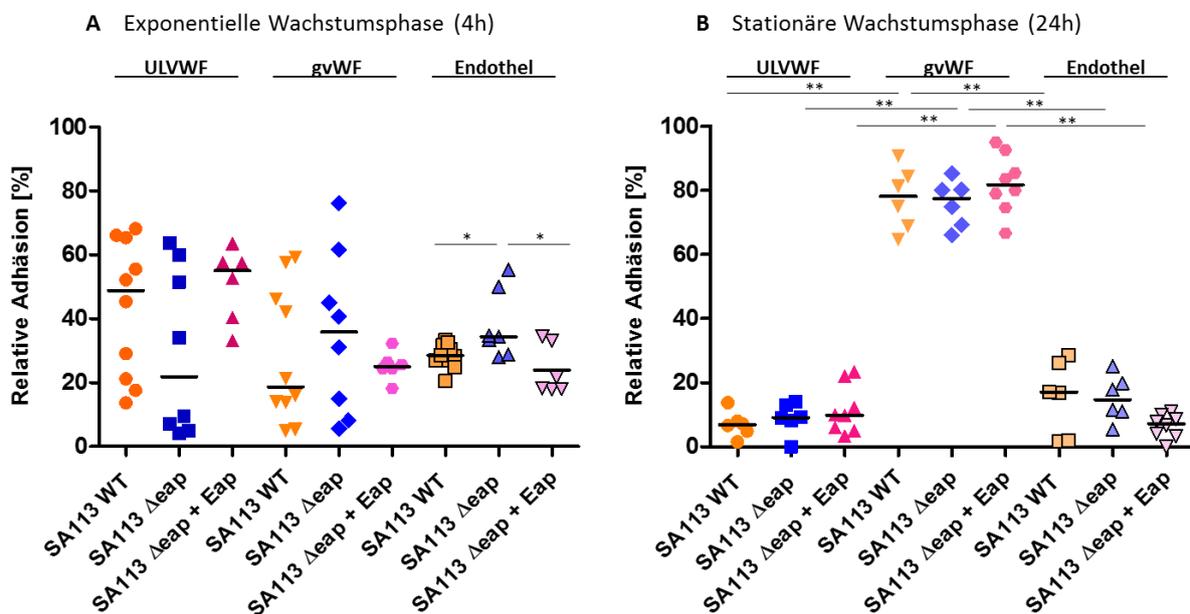


Abb. 20: Vergleich der verschiedenen Stämme Wildtyp (orange), Δeap (blau) und Δeap nach Inkubation mit Eap (rosa) in der exponentiellen Wachstumsphase (A) und in der stationären Wachstumsphase (B).

Hier erfolgte die Einteilung nach Adhäsionsort. In der ersten Teilgrafik sind alle Derivate von *S. aureus* am ULVWF abgebildet in der zweiten Teilgrafik alle Derivate am globulären vWF und im letzten Teil, die Staphylokokken, die an das Endothel, unabhängig vom vWF gebunden haben. Angegeben ist die relative Adhäsion in % im Vergleich zur Gesamtadhäsion.

Hier zeigt sich in der exponentiellen Wachstumsphase ein gemischtes Bild, indem kein bevorzugter Adhäsionsort von *S. aureus* zu erkennen ist, da keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren.

Werden die selben Werte der unterschiedlichen Stämme jedoch nach 24 Stunden Wachstumszeit, also in der stationären Wachstumsphase verglichen, fällt die hohe relative Adhäsion aller Versuchsstämme am globulären vWF auf. Am ULVWF und am Endothel ist die relative Adhäsion deutlich niedriger. Nachgewiesenermaßen ist Protein A der Bindungspartner auf Seiten der Bakterien um an die globuläre Form des vWF zu binden. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass diese Bindung nur auf Systemen mit niedrigeren Flussgeschwindigkeiten zutrifft, was bei diesem Versuchsaufbau nicht der Fall war.

Aus dieser Abbildung wird ersichtlich, dass bei allen Stämmen die vWF-vermittelte Adhäsion, deutlich im Vordergrund steht. Addiert man die Prozentzahlen der SA113 welche an ULVWF oder an den globulären vWF gebunden haben, stellt sich heraus, dass der vWF generell ein sehr wichtiges Adhäsionsmolekül des Wirtes darstellt, denn die Bindung direkt über das Endothel kommt nur zu einem deutlich geringeren Prozentsatz vor.

Auch wenn bei SA113 *Δeap* insgesamt weniger Zellen am vWF adhäreren, sind prozentual an der Gesamtadhäsion immer noch relativ viele an einer Form des vWF gebunden (an der globulären Form oder am ULVWF-Faden). Auch hier ist wieder deutlich erkennbar, dass die Adhäsion von *S. aureus* nicht nur von einem Faktor abhängt, sondern ein multifaktorielles Geschehen ist, in das viele Adhäsionsmoleküle involviert sind.

Abschließend soll zusätzlich noch die Gesamtadhäsion gezeigt werden, um die Unterschiede in der Adhäsion der einzelnen Derivate im Gesamten aufzuzeigen. Die Adhäsion orientiert sich bei dieser Art der Auswertung an der Gesamtadhäsion des Derivates SA113 WT in der exponentiellen Wachstumsphase, welche als 100% angenommen wurde (Abb.21). Alle anderen Derivate wurden damit in der Gesamtadhäsion verglichen, was sich in der Höhe der einzelnen Balken widerspiegelt. Darüber hinaus zeigen die Unterteilungen der Balken den prozentualen Anteil an die drei verschiedenen Adhäsionsorte ULVWF, globulärer vWF (gvWF) und an das Endothel.

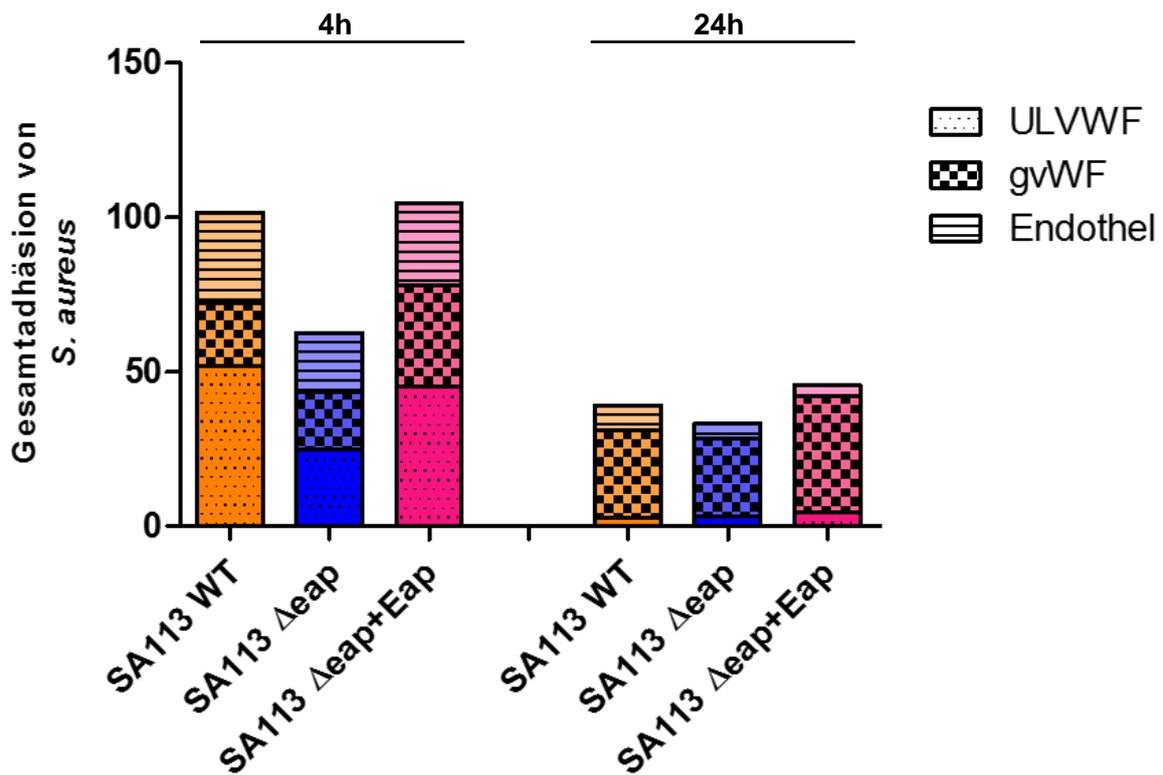


Abb. 21: Gesamtadhäsion aller *S. aureus* Derivate in der exponentiellen (4h) und in der stationären Phase (24h). Die Werte von SA113 WT in der exponentiellen Wachstumsphase wurden als 100% Adhäsion angenommen, alle anderen Werte entsprechend. Die einzelnen Unterteilungen der Balken zeigen die prozentuale Verteilung an die verschiedenen Adhäsionsorte zu den verschiedenen Zeitpunkten nach 4 Stunden (exponentielle Wachstumsphase) und 24 Stunden (stationäre Wachstumsphase).

Hier wird wieder deutlich, dass in der exponentiellen Phase deutlich mehr Bakterien insgesamt an das Gefäßendothel binden. Die Unterschiede zwischen dem Wildtyp-Stamm und der *eap* Mutante scheinen auch hier auf den ersten Blick nicht so groß zu sein. Betrachtet man jedoch schon die erhöhte Gesamtadhäsion der *eap* Mutante und der *eap*-Mutante, welche nachträglich mit Eap inkubiert wurde, werden die Unterschiede wieder deutlicher.

5. Diskussion

Die Adhäsion von *Staphylococcus aureus* an das Gefäßendothel und an andere Wirtszellen ist schon seit langem Gegenstand der mikrobiologischen Forschung und für die Entstehung der für dieses Pathogen charakteristischen Krankheitsbilder, wie beispielsweise der infektiösen Endokarditis, höchst interessant. Aus vorhergehenden Untersuchungen ist bekannt, dass *S. aureus* auch durch Eap dazu in der Lage ist, an verschiedene Zellarten zu binden. Versuche in physiologischen Flussmodellen gab es in der Vergangenheit schon in verschiedenen Versuchsszenarien. Die Untersuchung von Eap auf sein Bindeverhalten unter Flussbedingungen und der Einfluss von vWF in diesem Zusammenhang wurde hingegen noch nicht untersucht.

Shenkman et al. konnten bereits 2001 zeigen, dass der *agr* Locus in *S. aureus* zu einer verminderten Adhäsion an Fibronektin führt, während der *sar* Locus für die erhöhte Bindung an Fibronektin, vWF, ECM und EC verantwortlich ist. Diese Effekte, welche in den jeweiligen defizienten Stämmen beobachtet werden konnten, beziehen sich hauptsächlich auf Versuche, welche unter Flussbedingungen durchgeführt wurden (Shenkman et al. 2001). In weiterführenden *in vivo* Versuchen im syrischen Goldhamster konnte 2011 von Sethi et al. gezeigt werden, dass die Blockade von gC1qR, einem endothelspezifischen Rezeptor für Komplement C1q, die Kolonisation des Endothels mit *S. aureus* deutlich reduzieren konnte. Dies spielt insbesondere eine Rolle bei der Kolonisation des mikrovaskulären Endothels bei der infektiösen Endokarditis, da bekannt ist, dass Protein A aus *S. aureus* ebenfalls an den endothelspezifischen Rezeptor gC1qR binden kann (Sethi et al. 2011). Eine weitere Studie, welche sich speziell auf die Untersuchung von MRSA unter Flussbedingungen konzentrierte, konnte zeigen, dass die Adhäsion dieser multiresistenten Variante von *S. aureus* stark von den Flussbedingungen im Gefäß und von der Inkubationszeit abhängt. Die Autoren beschreiben, dass es in Gefäßen, welche eine geringere Flussgeschwindigkeit aufweisen, zu einer vermehrten Adhäsion von MRSA kommt (Viegas et al. 2011). Auch die Rolle der Fibronektin-Bindeproteine (FnBPs) wurde bereits unter Flussbedingungen untersucht. Hierzu untersuchten Xu et al. die Adhäsion von FnBP-defizienten Mutanten von *S. aureus* im Vergleich zu Stämmen, welche FnBPs exprimieren. Stämme, welche FnBPs produzieren, konnten in diesem Versuchsaufbau schneller und fester an eine mit Fibronektin beschichtete Oberfläche unter Flussbedingungen binden, als die defiziente Mutante (Xu et al. 2008).

Auch der Einfluss von Thrombozyten im Flusssystem unter Anwesenheit von *S. aureus* wurde schon genauer beleuchtet. In einer Untersuchung von George et al. aus dem Jahr 2007 wurde die Adhäsion von *S. aureus* an Thrombozyten untersucht, wobei ebenfalls Staphylokokken in unterschiedlichen Wachstumsphasen verwendet wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass *S. aureus* in der späten Wachstumsphase besser an immobilisierte Thrombozyten bindet im Vergleich zu *S. aureus* in der frühen Wachstumsphase. Als hauptsächlicher Bindungspartner an Thrombozyten konnte hierbei Fibrinogen identifiziert werden, welches besonders in der späten Wachstumsphase von *S. aureus* eine Rolle bei der Adhäsion zu spielen scheint (George et al. 2007). Diese Versuche wurden allerdings nicht, im Gegensatz zu den Untersuchungen in dieser Dissertation, unter Flussbedingungen durchgeführt.

So sind aus vorhergehenden Veröffentlichungen bereits eine Reihe verschiedener Faktoren bekannt, die die Adhäsion an das Gefäßendothel begünstigen können. Auch Eap ist als solches Adhäsionsmolekül in verschiedenen Szenarien bekannt. In dieser Dissertation wurde Eap auf seine Eigenschaften bezüglich der Adhäsion an ULVWF unter Flussbedingungen untersucht, was bisher noch nicht beschrieben wurde.

Deshalb soll in dieser Studie nun der Einfluss von Eap aus *S. aureus* auf die Adhäsionseigenschaften an das Gefäßendothel unter Flussbedingungen untersucht werden. Wie aus den vorhergenannten Studien bereits ersichtlich wurde, ist die Adhäsion an das Gefäßendothel ein wichtiger Schritt für die Entstehung von Infektionen, wie insbesondere für die infektiöse Endokarditis gezeigt werden konnte.

Das Bakterium kann beispielsweise über offene Wunden oder Katheter leicht in den Wirtsorganismus eindringen und sich im Blutstrom über den gesamten Körper verteilen. Um schwere Infektionen der Organe oder Abszesse verursachen zu können, müssen die Staphylokokken den Blutstrom jedoch verlassen. Dies ist ein entscheidender Schritt in der Pathogenese verschiedener Infektionen, da die Bakterien nach Adhäsion im Gefäß das Endothel überwinden müssen, um sich im umliegenden Gewebe zu vermehren und eine Infektion hervorzurufen.

Der Schwerpunkt der bisherigen Untersuchungen lag auf der bakteriellen Adhäsion an verletztes Gefäßendothel und die Entstehung von Infektionskrankheiten durch einen vorbestehenden Endothelschaden (Que et al. 2005, Weidenmaier et al. 2005).

Staphylococcus aureus ist jedoch ebenfalls in der Lage, an unverletztes Endothel zu binden und eine Infektion auszulösen, also auch Individuen ohne vorbestehende Risikofaktoren für eine Blutstrominfektion oder eine Endokarditis zu befallen (Moreillon et al. 2002 und 2004, Choi et al. 2011). Die genauen molekularen Mechanismen der Adhäsion sind jedoch größtenteils unbekannt. Fibronectin und Fibrinogen scheinen für die Bindung allerdings von Bedeutung zu sein, da die Adhäsion von Mutantenstämmen von *S. aureus* an Fibronectin auf etwa 40% im Vergleich zu Wildtypstämmen reduziert ist (Kerdudou et al. 2006). In Versuchen zur bakteriellen Adhäsion im Zusammenhang mit Fibrinogen unter *in vitro* Flussbedingungen war die Adhäsion bei Zugabe von Fibrinogen auf das Doppelte erhöht. Hierbei handelte es sich aber nicht um physiologisch im Blut vorkommende Mengen an Fibrinogen, sondern um über den physiologischen Blutspiegel hinaus artifiziell gesteigerte Mengen (Shenkman et al. 2000).

Im Gegensatz zu früheren Versuchen war das Ziel unserer Versuche, die bakterielle Adhäsion unter physiologischen Flussbedingungen zu untersuchen und so die sehr frühe Phase der Infektionsentstehung und die Rolle von Eap in diesem Zusammenhang genauer zu beleuchten. Dafür eignete sich sehr gut das in vorhergehenden Versuchen benutzte IBIDI-Flusssystem für die *in vitro*-Versuche.

In den genannten Vorarbeiten, die in Kooperation mit der Klinik für Dermatologie der Universitätsklinik Mannheim und unserem Institut durchgeführt wurden, konnten wir bereits zeigen, dass ULVWF der vorherrschende Bindungspartner auf der Wirtsseite für *S. aureus* ist (Pappelbaum et al. 2013).

Frühere Studien zu diesem Thema wiesen schon Fibrinogen als potenten Bindungspartner für *S. aureus* nach, welcher neben der Adhäsion an das Endothel auch die Clusterbildung fördert (Que et al. 2005, Shenkmann et al. 2000). Dasselbe gilt auch für Fibronectin, welches ebenfalls zur Bindung von *S. aureus* an intaktes Endothel *in vivo* beiträgt (Kerdudou et al. 2006).

Diese beiden Ergebnisse stehen jedoch teilweise im Widerspruch mit unseren Resultaten, da in den Untersuchungen von Pappelbaum et al. Fibronectin keine wichtige Rolle bei der Adhäsion an Gefäßendothelien zu spielen scheint. Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Veröffentlichungen und den hier durchgeführten Arbeiten ist jedoch, dass beispielsweise im Hamster-Modell mit Rückenhautkammer, wie es von Kerdudou et al. beschrieben wurde, die Adhäsion von Bakterien in den postkapillären Venolen der Haut

gemessen wurde, wo ein deutlich langsamerer Fluss herrscht als in großen, herznahen Gefäßen. Beim IBIDI-Flusssystem hingegen handelt es sich um ein *in vitro* Modell von Gefäßen, in dem zudem ein deutlich schnellerer Fluss, ähnlich dem in herznahen Gefäßen, generiert wurde.

Der Fokus dieser Arbeit soll aber weniger auf den Wirtsfaktoren wie ULVWF liegen, sondern mehr die Bindungspartner auf der bakteriellen Seite identifizieren. Aufgrund der schon bekannten vielfältigen Bindungseigenschaften von Eap aus *S. aureus* und der Tatsache, dass *S. aureus* ein häufiger Erreger der bakteriellen Endokarditis ist, erschien es sinnvoll, dieses Protein auf seine Bindungseigenschaften an den ULVWF unter hohen Flussbedingungen zu untersuchen.

Im Falle einer physiologischen Bindung des Bakteriums an das Wirtsendothel kann über die Funktion dieser Bindung weiter diskutiert werden. Es ist bis heute wenig erforscht, ob es zum Vorteil des Bakteriums oder des Wirtes ist, dass *S. aureus* an den von Willebrand-Faktor bindet. Das Bakterium kann dem Blutstrom entkommen, um sich im Gewebe auszubreiten, sodass die Adhäsion an ULVWF überwiegend zum Vorteil der Krankheitserreger wäre. Dennoch es ist ebenso denkbar, dass die Staphylokokken am ULVWF wie in einem Netz abgefangen werden und dadurch für Immunzellen zugänglicher werden. Gerade in diesem Zusammenhang ist der Vorgang der NETosis als Abwehrmechanismus des Wirtes zu erwähnen, der in einem späteren Abschnitt noch ausführlicher diskutiert wird. Eine Kombination aus beiden Szenarien erscheint auch möglich.

5.1 Analyse der *in vivo* Ergebnisse der Rückenhautkammer-Experimente

Die Ergebnisse der hier beschriebenen *in vivo*-Versuche bestätigten sehr gut die zuvor durchgeführten *in vitro* Versuche mit Hilfe des IBIDI-Flussmodells, welche in der experimentellen Dermatologie in Mannheim durchgeführt wurden (Pappelbaum et al. 2013). *In vitro* und nach den in Homburg durchgeführten Versuchen *in vivo* konnte gezeigt werden, dass der von Willebrand-Faktor eine entscheidende Rolle in der Adhäsion von Staphylokokken an das Gefäßendothel spielt. Da in der von Willebrand-Faktor-defizienten Maus dieser Effekt geringer ausfiel, konnten ULVWF-Fäden als wichtiger Adhäsionsfaktor identifiziert werden. Für die *in vitro* Untersuchungen wurde zuvor analog ein Kanal mit

stimulierten HUVEC mit fluoreszierenden Bakterien durchströmt und die Adhäsion von *S. aureus* am ULVWF beobachtet. Auch hier konnte eine signifikante Zunahme an adhärenen *S. aureus* Zellen in Anwesenheit von ULVWF detektiert werden. Des Weiteren konnte die A-Domäne des von Willebrandfaktors von Pappelbaum et al. als Bakterienbindungsstelle identifiziert werden. Durch Zugabe von ADAMTS13 in physiologischen Konzentrationen konnte die Fadenlänge dosisabhängig reduziert werden und in der Folge eine Abnahme an adhärenen *S. aureus* Zellen beobachtet werden, auch wenn einzelne Bakterien sich trotzdem noch an die verkürzten ULVWF-Fäden anlagern konnten (Pappelbaum et al. 2013).

Die Untersuchungen mittels Rückenhautkammer stellten eine wichtige *in vivo* Ergänzung zur Vervollständigung der Untersuchung des Adhäsionseffektes von *S. aureus* an ULVWF unter physiologischen Flussbedingungen dar. In diesem Mausmodell sind alle physiologischen Faktoren, die im Blut vorkommen, vorhanden (z.B. ADAMTS-13). Damit bildet dieses System die Wirklichkeit noch besser ab. Mit ihr konnte gezielt die Bindungsfähigkeit von *S. aureus* an kleine Gefäße in der lebenden Maus mit Hilfe der *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie untersucht und anschließend ausgewertet werden. Die Rückenhautkammer stellt bei dieser Art von Untersuchung ein erprobtes Verfahren dar und eignet sich besonders zur Untersuchung sowohl physiologischer wie auch pathologischer Mikrozirkulation (Laschke et al. 2005). Zudem können in diesem Modell verschiedene Umweltfaktoren und deren Einfluss auf das Gefäßsystem untersucht werden.

In den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuchen wurde das *S. aureus* Isolat Cowan I in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet, um die Ereignisse in der frühen Infektionsentstehung beobachten zu können.

Ein großer Nachteil von bisher durchgeführten Tiermodellen zur Untersuchung der infektiösen Endokarditis ist, dass vor der Inokulation der Versuchstiere mit Bakterien immer zuerst ein Endothelschaden generiert werden musste (Héraïef et al. 1982). Eines der Ziele der hier präsentierten *in vivo* Versuche war daher, diesen Schritt der Endothelschädigung zu unterlassen und dafür die Rückenhautkammer mit TNF- α stimuliertem Endothel zu verwenden, um die physiologischen Bedingungen in Menschen ohne Risikofaktoren besser abbilden zu können. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass nur Aussagen zur Bindungsfähigkeit von *S. aureus* an Gefäße in der Haut gemacht werden können. Dort

herrschen andere Bedingungen als beispielsweise an Herzklappen, vor allem ist die Flussgeschwindigkeit in diesen Gefäßen deutlich langsamer.

Ein weiterer Nachteil der vWF-defizienten Maus ist zudem, dass ein Fehlen von vWF auch zu einem Fehlen von Weibel-Palade-Körperchen führt, sodass andere endothelvermittelte Faktoren wie P-Selectin ebenfalls in ihrer Wirkung gestört werden. Aus vorangegangenen Untersuchungen war aber bereits bekannt, dass P-Selectin zwar als ein wichtiger Bindungspartner für Leukozyten fungiert, für die Adhäsion von *S. aureus* an Endothel aber von untergeordneter Bedeutung ist, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass dies die Versuchsergebnisse nicht wesentlich beeinflusst (Niemann et al. 2004).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass es einen signifikanten Unterschied im Bindeverhalten von *S. aureus* an TNF- α stimuliertes Endothel zwischen dem Wildtyp und der vWF-defizienten Mutante der Mäuse gibt und unterstreichen die physiologische Relevanz der vWF-vermittelten Adhäsion für dieses Pathogen *in vivo*.

Aufgrund dieser Befunde in unseren *in vivo* Versuchen sollten im Anschluss noch weitere *in vitro* Versuche zur Aufklärung der Rolle von Eap im Flusssystem durchgeführt werden. Dafür wurde das IBIDI-Flusssystem verwendet, mit dem auch schon Pappelbaum et al. gute Ergebnisse erzielen konnten. In diesem System werden humane Nabelschnurendothelzellen in einem Kunststoff-Objektträger angezüchtet, und über diesen Zellrasen kann dann der gewünschte Fluss mittels Pumpe generiert werden. Doch auch in diesem Versuchsaufbau gibt es aufgrund der unterschiedlichen Spender der Nabelschnüre, aus denen die Endothelzellen isoliert wurden, zum Teil große interindividuelle Unterschiede.

5.2 Variabilität der Nabelschnurspenderinnen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HUVEC wurden aus den Nabelschnüren von verschiedenen Spenderinnen isoliert. In den Abbildungen 9, 10 und 11 ist die Variabilität der Nabelschnurspenderinnen in Hinblick auf die Histamin-induzierte Bildung von ULVWF deutlich zu erkennen. Sowohl die Anzahl als auch die Länge der jeweiligen ULVWF-Fäden variieren deutlich zwischen den einzelnen Spendern. Die Zellen einiger Spender schütten nach Stimulation mit Histamin große Mengen an ULVWF aus, sodass sehr viele Fäden auf den Objektträgern sichtbar waren, während andere nicht so gut stimulierbar waren. Diese Unterschiede waren zum Teil erheblich und variierten um einen Faktor von bis zu 30. Für die

Auswertung der *S. aureus*-ULVWF Adhäsionsergebnisse stellte dies eine gewisse Herausforderung dar, weshalb auf den Objektträgern nicht nur alle adhärenen Bakterien, sondern auch alle Fäden ausgezählt werden mussten, um das Verhältnis von Bakterien zu ULVWF-Fäden für jeden Objektträger im Einzelfall bestimmen zu können. Die Ursachen für die unterschiedliche Ausschüttung und Bildung von ULVWF in den verschiedenen Spenderzellen konnte nicht näher untersucht werden. Es ist jedoch bekannt, dass es in dem für vWF kodierenden Gen im Menschen verschiedene Varianten gibt, die zum Teil auch mit Krankheitsbildern wie dem von-Willebrand-Syndrom verknüpft sind. Seit Kurzem ist es möglich, einige dieser Varianten in einem Assay unter Flussbedingungen zu untersuchen, wodurch die diagnostischen Möglichkeiten auf diesem Gebiet entscheidend erweitert werden konnten (Kraus et al. 2014). Daher ist es denkbar, dass es auch noch weitere genetische Variationen gibt, die für eine unterschiedlich starke Ausschüttung von vWF verantwortlich sein könnten, im Moment aber noch unbekannt sind.

Bereits publiziert ist, dass erhöhte Natriumserumkonzentrationen im Mausversuch ebenfalls dazu führen, dass mehr vWF in den Endothelzellen gebildet und freigesetzt wird und das Thromboserisiko ansteigt (Dmitrieva et al. 2014), sodass von einem multifaktoriellen Geschehen für die Ausschüttung von vWF ausgegangen werden kann.

Welche äußeren Einflüsse und/oder genetische Varianten genau für die Ausschüttung von vWF an Endothelzellen verantwortlich sind, ist zurzeit gerade Gegenstand intensiver Forschung.

Zudem sind noch weitere Faktoren, wie die Aufnahme von Noxen in der Schwangerschaft, denkbar. Hier kommen beispielsweise insbesondere Alkohol, illegale Drogen oder Giftstoffe aus inhaliertem Zigarettenrauch infrage, gezeigt wurde es bisher für die Schwangerschaftshypertonie. Eine Schwangerschaftshypertonie begünstigt die Ausschüttung des von Willebrand-Faktors in den Gefäßen, wie Nadar et al. 2004 belegen konnten (Nadar et al. 2004). Aus diesem Grund kann dieses Krankheitsbild als zusätzlicher Faktor angesehen werden kann, welcher zu den großen Unterschieden in der Ausschüttung des vWF in den hier durchgeführten Versuchen beigetragen haben könnte.

Patientendaten über Erkrankungen der Spender, Raucherstatus oder die Einnahme von Drogen während der Schwangerschaft waren jedoch in diesem Fall nicht vorhanden. Anhand dieser hätten die Unterschiede zwischen den Spendern noch genauer herausgearbeitet und ausgewertet werden können.

5.3 Analyse der Fluss-Ergebnisse

Alle nachfolgenden Versuche wurden mit Hilfe oben genannter, gespendeter HUVECs, welche aus Nabelschnüren isoliert wurden, im IBIDI-Flusssystem durchgeführt.

Durch *in vitro* Versuche mit einer *S. aureus* Cowan I *spa* Mutante konnte in Vorarbeiten von K. Pappelbaum gezeigt werden, dass Protein A als Bindungspartner für ULVWF nur von geringer Bedeutung ist (Pappelbaum et al. 2013), wenngleich Protein A als Bindungspartner von vWF von großer Bedeutung ist (Hartleib et al. 2000). Wir konnten in den vorhergehenden Versuchen ebenfalls bestätigen, dass es sich um ein flussabhängiges Phänomen handelt, und dass bei hohen Flussgeschwindigkeiten Protein A keine wesentliche Rolle für die Adhäsion der Bakterien an ULVWF spielt. In statischen Systemen jedoch konnte Protein A als wesentlicher Bindungsfaktor an die globuläre Form des vWF bestätigt werden. Um die potentiellen Bindungsfaktoren auf Bakterienseite weiter einzugrenzen, wurden von K. Pappelbaum erste Versuche mit verschiedenen *S. aureus* Mutanten, wie einer *srtA* Mutante, welcher alle in der Zellwand verankerten Proteine fehlen oder einer *tagO* Mutante, welcher alle in der Zellwand verankerten Teichonsäuren fehlen, durchgeführt (Pappelbaum et al. 2013). Des Weiteren wurde auch das apathogene *Staphylococcus carnosus* Isolat TM300, das keine humanrelevanten Adhäsionsfaktoren besitzt, im Hinblick auf das Bindeverhalten an ULVWF unter Flussbedingungen untersucht. So konnte gezeigt werden, dass sowohl zellwandgebundene Teichonsäuren als auch zellwandgebundene Proteine eine wichtige Rolle in der Adhäsion spielen (Pappelbaum et al. 2013). Unklar blieb hingegen, ob und wie nicht-kovalent an die Zellwand gebundene Oberflächenproteine, wie die SERAMs Eap und Emp, zur Adhäsion von *S. aureus* an ULVWF unter physiologischen Flussbedingungen beitragen.

In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit das multifunktionale Oberflächenprotein Eap untersucht, welches eine Vielzahl von verschiedenen Funktionen besitzt und bereits als Bindungsfaktor von *S. aureus* an verschiedene Wirtsstrukturen bekannt ist. Die einzelnen bisher bekannten Eigenschaften und Funktionen wurden bereits im Kapitel „Eap“ näher beschrieben.

Die Versuche zur Überprüfung von Eap als möglichen Bindungspartner von ULVWF wurden, analog zu denen von Pappelbaum et al. im IBIDI-Flusssystem durchgeführt. Dabei konnte bei exponentielle Phase-Zellen der SA113 Δeap Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine um 50%

reduzierte Adhäsion an ULVWF festgestellt werden (Abb. 15), während die Adhäsion am Endothel weitestgehend gleich blieb (Abb. 20). Daraus wird deutlich, dass auch Eap eine nicht unwesentliche Rolle bei der Adhäsion von *S. aureus* an aktiviertes Endothel einnimmt und damit wahrscheinlich auch bei der frühen Krankheitsentstehung der infektiösen Endokarditis von Bedeutung ist.

Wie aus den vorhergehenden Erläuterungen ersichtlich, ist deutlicher Unterschied zwischen den gewählten Zeitpunkten zu erkennen. In der stationären Phase ist die Gesamtadhäsion der Bakterien deutlich geringer als in der exponentiellen Wachstumsphase. Dies lässt den Schluss zu, dass Eap in der Anfangsphase der Infektion eine wichtige Rolle bei der Adhäsion spielt und in späteren Phasen nur noch in geringerem Ausmaß vorhanden ist. Aufgrund der aber immer noch stattfindenden Anheftung der Bakterien an das Gefäßendothel kann Eap nicht der alleinige Faktor für die Adhäsion sein. Dies stimmt auch mit vielen anderen Beobachtungen überein, die zeigen, dass es eine Vielzahl an Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von *S. aureus* gibt, Eap aber einen wichtigen Beitrag zur Adhäsionsfähigkeit von Staphylokokken leistet.

Betrachtet man hingegen die relative Adhäsion im Vergleich zur Gesamtadhäsion aller *S. aureus* am Endothel in der exponentiellen Wachstumsphase (Abb. 20A), sind keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen feststellbar. Dies bedeutet ein relativ buntes Bild in der Adhäsion von *S. aureus* in der frühen Phase. Was jedoch auffällt, sind die großen Schwankungen innerhalb der einzelnen Gruppen. Dies lässt auf viele unterschiedliche Einflussfaktoren, wie zum Beispiel Unterschiede bei den Nabelschnurspenderinnen, und/oder die Expression vieler verschiedener Adhäsionsmoleküle auf der bakteriellen Oberfläche in dieser frühen Wachstumsphase schließen.

In der stationären Wachstumsphase (Abb. 20B) hingegen zeigen sich die einzelnen Gruppen deutlich homogener. Es wird klar, dass in späteren Wachstumsphasen deutlich mehr *S. aureus* am globulären vWF, im Vergleich zum ULVWF und Endothel, zu finden sind. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass es sich bei dem hier verwendeten Stamm SA113 um ein Derivat des Stammes 8325 handelt. In diesem Hintergrundstamm gibt es bekannte Mutationen im rsbU-Gen (Giachino et al. 2001), sodass davon ausgegangen werden kann, dass sie auch im hier verwendeten SA113 vorhanden sind. RsbU wird von Gram positiven Mikroorganismen als Antwort auf Stress hochreguliert (Delumeau et al.

2004) und er ist für die posttranslationale Aktivierung von SigB erforderlich, einem Faktor der die Aktivität von Genen wie *agr* und *sar* reguliert (Giachino et al. 2001). Das Fehlen von SigB wiederum führt zu einem Mangel an *agr* und *sar*. Diese beiden Faktoren führen zur Suppression der Protein A-Produktion (Cheung et al. 1997). Da sie beide aber aufgrund der *rsbU*-Mutation nur in geringem Maße vorhanden sind, wird die Produktion von Protein A nicht unterdrückt. Aus diesem Grund kann von einer hohen Expression von Protein A in dem hier untersuchten Stamm ausgegangen werden. Dies könnte eine Erklärung für die vermehrte Bindung am globulären von Willebrand-Faktor sein, wie in Abb. 20B dargestellt. Zudem wird in der postexponentiellen Phase Protein A von *S. aureus* normalerweise herunterreguliert (Gao et al. 2004). Durch die vorher erläuterte *rsbU*-Mutation bleibt dieser Effekt auch noch zusätzlich aus, und Protein A könnte als Adhäsionsfaktor besonders in der stationären Phase zum Tragen kommen.

In Abb. 21 sind diese beiden Ergebnisse nochmal zusammengefasst und als prozentuale Adhäsion an die unterschiedlichen Bindungsorte dargestellt. Es wird hier deutlich, dass in beiden Wachstumsphasen der vWF generell, in seinen beiden unterschiedlichen Formen, als sehr wichtiges Adhäsionsmolekül fungiert. Direkt an das Endothel ist in beiden Wachstumsphasen jeweils nur ein geringer Anteil aller *S. aureus* gebunden, was noch einmal die Wichtigkeit des vWF am Gefäßendothel unterstreicht.

Andererseits ist die Frage, welchen Effekt der vWF im Flusssystem und auch unter physiologischen Bedingungen hat, und ob er auch zu einer Verlangsamung des Flusses führt und dadurch die Adhäsion der Bakterien erleichtert. Zu dieser konkreten Fragestellung ist noch nichts bekannt. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die Veränderung des Flusses auch eine Rolle bei der Adhäsion von Bakterien spielt, wie es bei den Thrombozyten der Fall ist.

Vor einigen Jahren haben Edwards und Mitarbeiter schon das Adhäsionspotential von Eap im Hinblick auf das Adhäsionsverhalten von *S. aureus* an Endothelzellen unter statischen Bedingungen untersucht. Sie kamen zum Ergebnis, dass Eap die TNF- α Sekretion stimuliert und dadurch die Adhäsion über Protein A zunimmt (Edwards et al. 2012).

Unter Flussbedingungen hingegen handelt es sich auf Staphylokokkenseite um das von Willebrand-Faktor-Bindeprotein, welches den größten Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von *S. aureus* unter Flussbedingungen hat. Mit dem von Willebrand Faktor Bindeprotein konnte

ein weiterer wesentlicher Faktor für die Adhäsion von *S. aureus* an den ULVWF unter Flussbedingungen identifiziert werden (Claes et al. 2014). In den Versuchen dieser Arbeitsgruppe wurde der *S. aureus* Stamm Newman verwendet. Dieser besitzt aufgrund verschiedener Punktmutation keine Fibronectin-Bindeproteine in der bakteriellen Zellwand. Von diesen ist allerdings bekannt, dass sie auch ein wichtiger Faktor bei der Adhäsion an Wirtszellen sind (Sinha et al. 2000). Des Weiteren produziert das *S. aureus* Isolat Newman eine große Anzahl von Proteinasen und weiteren lytischen Enzymen, die es ihm ermöglichen, nach dem ersten Schritt der Adhäsion im zweiten Schritt auch invasiv zu werden, Wirtsgewebe gezielt zu zerstören und typische Infektionen auszulösen (Mrak et al. 2012). Anders als mit dem *S. aureus* Isolat SA113 konnte mit Zellen des Stammes Newman mit dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten experimentellen Setup keine Adhäsion an ULVWF unter Flussbedingungen ermittelt werden, da in den mit *S. aureus* Newman durchfluteten Objektträgern, unabhängig vom Spender der HUVECs, keine ULVWF detektiert werden konnten. Hingegen zeigten die HUVECs dieser Spender in Kontrollexperimenten, in denen keine *S. aureus* Newman Zellen zum Einsatz kamen, eine klare ULVWF Bildung nach Histamin-Stimulation, was die Vermutung nahelegt, dass die von den *S. aureus* Newman Zellen gebildeten Proteasen diese ULVWF während der Co-Kultivierung vollständig abgebaut haben.

Denkbar ist, dass in Bezug auf das Fehlen der ULVWF-Fäden, diese von *S. aureus* Newman aufgrund einer Mutation im Genregulatorsystem SaeRS überexprimierten Proteasen (Mrak et al. 2012), die Fäden des vWF durchtrennen und so die Versuchsergebnisse beeinflusst werden. Staphylokokken benötigen unter Umständen eine solche Protease, denn wenn sie an den vWF binden, um dem Blutstrom zu entkommen, brauchen sie ein weiteres Werkzeug, um sich von vWF wieder zu lösen und das Endothel zu durchdringen. Andernfalls wären sie an den ULVWF-Fäden gefangen und den Zellen des Wirtsimmunsystems ausgeliefert. Deshalb wurde für die Versuche der Stamm SA113 verwendet, da dieser Stamm nicht über eine exzessive Produktion von Exoproteinasen verfügt, und er sich bereits in unseren vorhergehenden Experimenten als vielversprechend zeigte. Ein weiterer Vorteil dieses Stammes ist zudem, dass er über weitere Adhäsionsmoleküle, insbesondere über Fibronectin-Bindeproteine, verfügt und so die physiologischen Bedingungen besser simuliert werden können.

Mit dem Vorwissen, dass die Adhäsion ein multifaktorielles Geschehen ist, in welchem viele Adhäsionsmoleküle sowohl auf Seite der Bakterien, wie auch auf der Wirtsseite vorhanden sind, sollte nun hier die Rolle von Eap untersucht werden.

Die Adhäsion an ULVWF unterscheidet sich jedoch signifikant im Hinblick auf die unterschiedlichen Wachstumsphasen. Für die Adhäsion konnten wir bestätigen, dass es in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien zu einer deutlich höheren Adhäsion kam, als in der stationären Wachstumsphase. Durch die Zugabe von exogenem Eap konnte die Adhäsion zu beiden Zeitpunkten nochmals über das Wildtyp-Niveau gesteigert werden.

In diesem Zusammenhang und mit dem Wissen, dass die Expression der Adhäsionsfaktoren auch von der Wachstumsphase abhängig ist (George et al. 2007), wurden hier zwei verschiedene Zeitpunkte gewählt. Zum einen die exponentielle Wachstumsphase, in welcher die Invasion in den Wirtsorganismus eher entscheidend für die Infektionsentstehung erscheint, und zum anderen die stationäre Wachstumsphase, in welcher die Abschirmung vom Immunsystem und die Ausbreitung im Wirt wichtiger erscheinen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das von *S. aureus* produzierte Eap in der exponentiellen Wachstumsphase zur Adhäsion an ULVWF beiträgt und damit die Krankheitsentstehung im Wirt begünstigt.

In späteren Phasen des Wachstums und mit Fortschreiten der Krankheit im Wirt wird von *S. aureus* aber immer noch weiter Eap produziert. Dieses scheint allerdings für die Adhäsion am ULVWF eine geringere Rolle zu spielen. Dies ist auch durchaus vorstellbar, denn der Keim hat sich im Körper des Wirts bereits ausgebreitet und Eap kann in dieser Phase der Infektion andere Aufgaben übernehmen. Ein wichtiger Punkt könnte hier die Unterdrückung des Immunsystems sein, um die Bakterien vor Angriffen zu schützen. Diese immunsuppressive Wirkung könnte allerdings bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen von Vorteil sein. Die Behandlung dieser Krankheiten hat zum Ziel, das Immunsystem des Patienten absichtlich zu schwächen, um eine fehlgeleitete Immunantwort auf körpereigenes Gewebe abzuschwächen.

Kürzlich wurde gezeigt, dass im Mausmodell eine EAE deutlich gebessert werden konnte, wenn zusätzlich eine chronische, mit Staphylokokken infizierte Wunde in den zu untersuchenden Tieren vorlag. Lange waren chronische Wunden im Verruf, eine

Verschlechterung chronischer Erkrankungen zu verursachen und den Entzündungsprozess zu unterstützen. Erstmals wurde jetzt dieses Phänomen untersucht und Eap als antiinflammatorischer Faktor bei chronischen Infektionen identifiziert (Kumar et al. 2015). Dieser auch für therapeutische Maßnahmen denkbare Ansatz kann *S. aureus* vor dem Rekrutieren von Wirtsimmunen schützen und als Folge dessen die weitere Ausbreitung der Infektion fördern. In chronisch-entzündlichen Erkrankungen wäre es denkbar, dass die Verabreichung von Eap die Rekrutierung von Immunzellen hemmen kann, und somit Nervenzellen, in Falle der EAE, vor einer Autoimmunreaktion geschützt werden könnten, die sonst zerstört werden würden. Dies hätte positive Effekte auf das zentrale Nervensystem und das Voranschreiten der Krankheit könnte verhindert, oder im Besten Fall sogar vollständig unterdrückt werden.

Auch für die Krebsforschung ist Eap ein sehr interessantes Protein. Es konnte bereits 2007 in Untersuchungen an Tumorzellen des Mammakarzinoms gezeigt werden, dass Eap die Knochenmetastasierung deutlich reduziert. Zurückgeführt wurde dieser Effekt auf die Hemmung der $\alpha_v \beta_3$ -Integrin abhängige Adhäsion der zirkulierenden Tumorzellen an Osteopontin (OPN). Diese Effekte konnten auch *in vivo* bestätigt werden (Schneider 2007). Weitergehende Forschungsarbeiten auf diesem sehr interessanten Gebiet der Tumormetastasierung sind aber noch dringend notwendig, um die protektiven Mechanismen von Eap auf die Tumorentstehung genauer verstehen zu können.

5.4 Versuche mit DNA

Die Versuche mit DNA wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob Eap direkt an ULVWF bindet, oder ob dieser Bindungseffekt noch durch ein zusätzliches Verbindungsmolekül, in diesem Fall extrazelluläre DNA, zwischen Eap und ULVWF verstärkt wird. Es ist bekannt, dass DNA sehr gut an ULVWF bindet, was auch bei der Entstehung sogenannter NETs wichtig ist (Grässle et al. 2014). Unter hohen Flussraten wird der vWF von Endothelzellen ausgeschüttet und auf deren Oberfläche fixiert.

Leukozyten können im Rahmen eines speziellen Zelltodprogramms ihre intrazelluläre DNA an die Umwelt abgeben und so ein Geflecht aus DNA bilden, um Krankheitserreger abzuwehren. Diese DNA kann direkt an den vWF binden und bildet mit diesem zusammen eine netzartige Struktur (Grässle et al. 2014). Es ist vorstellbar, dass in diesem Netz

Krankheitserreger abgefangen werden können, wie es für die NETs alleine schon gezeigt werden konnte (Brinkmann et al. 2004). Dies wäre für die Infektabwehr ein wichtiger Mechanismus, denn so werden gleichzeitig Krankheitserreger fixiert und dadurch inaktiviert und den Leukozyten wird dadurch die Bekämpfung von bereits eingedrungenen Erregern erleichtert.

Angesichts dieser Ergebnisse erschien es spannend zu untersuchen, ob eventuell DNA ein Bridging-Molekül darstellen könnte, das zwischen dem auf der Bakterienoberfläche gebundenen Eap und dem ULVWF eine Verbindung herstellt. Deshalb wurden die Versuche um eine zusätzliche Versuchsanordnung erweitert. In dieser Anordnung wurde dem System zusätzlich Lambda-DNA zugefügt. Bei dieser DNA handelt es sich um kurze, lineare DNA-Abschnitte, die vom Lambda Bakteriophagen stammen. Sie hat den Vorteil, im Vergleich zu der aus menschlichem Blut gewonnenen DNA, dass es aufgrund der eingeschränkten Länge der einzelnen Fragmente nicht zu Verklumpungen während der Durchflusszeit durch das System kommt. Die Länge der Lambda-DNA beträgt lediglich 48.502 Basenpaare, während die humane DNA, welche beispielsweise aus Leukozyten im Blut gewonnen werden kann, etwa 3,2 Milliarden ($3,2 \cdot 10^9$) Basenpaare lang ist und zudem in Chromosomen vorliegt. In unseren Versuchen konnte jedoch keine wesentliche Steigerung der Adhäsion von Bakterien an ULVWF festgestellt werden. Dies kann auf unterschiedliche Faktoren zurückzuführen sein. Zum einen kann es sein, dass durch die Aufbereitung und Zentrifugation des Blutes zur Gewinnung der Erythrozyten andere Blutzellen zerstört wurden und sich im System sowieso schon DNA in ausreichender Menge aus Leukozyten befindet und sich der Effekt deshalb nicht noch weiter steigern lässt.

Zum anderen kann es natürlich auch sein, dass die Annahme, dass DNA als ein Bridging-Molekül fungiert, falsch ist und nur im Rahmen der NETosis bei der Immunabwehr eine Rolle spielt. Insgesamt war die Adhäsion sowohl beim Wildtyp wie auch bei der *eap* Mutante im Vergleich zum System ohne zusätzliche DNA unverändert. Nur die Unterschiede zwischen SA113 Wildtyp und SA113 Δeap sind weiterhin signifikant und auch nach Zugabe von eDNA noch in gleichem Umfang vorhanden.

5.5 Clusterbildung

Als weiterer wichtiger Punkt erschien es ebenfalls interessant, ob in unserem Flusssystem bei Zugabe von Eap mehr Bakteriencuster gebildet werden. Es wäre nämlich denkbar, dass ein Cluster von Bakterien eine bessere Chance hat, an einer Stelle des Endothels invasiv zu werden, weil von einer Ansammlung von Bakterien mehr Faktoren für eine Invasion gebildet werden können als von einzelnen.

Die Clusterbildung scheint in der stationären Wachstumsphase am ULVWF-Faden generell in allen Konditionen reduziert (Abb. 18). Ein Grund hierfür könnte sein, dass in der exponentiellen Wachstumsphase mehr Adhäsionsmoleküle gebraucht werden, weil hier die Adhäsion eine essentielle Rolle bei Infektionsentstehung spielt. In der stationären Phase hingegen ist idealerweise eine Adhäsion an das Wirtsendothel bereits erfolgt und es werden im Anschluss andere Proteine gebraucht und produziert. Ein Beispiel könnte die vermehrte Bildung von Proteasen durch *S. aureus* sein, um im Wirtsgewebe invasiv werden zu können und sich demzufolge auszubreiten. Dies könnte ein Grund sein, warum Eap in einer späteren Wachstumsphase keine große Rolle bei der Adhäsion mehr spielt, obwohl es in dieser Wachstumsphase bevorzugt exprimiert wird. Es könnte dann hauptsächlich andere wichtige Funktionen übernehmen, wie beispielsweise die Blockierung von Rezeptoren am Endothel, sodass eine Extravasation von Leukozyten verhindert wird. Durch diese frühe Blockierung des Immunsystems kann sich *S. aureus* einen Überlebensvorteil verschaffen und sich weiter ausbreiten und vermehren.

Unter den genannten Gesichtspunkten war weiterhin wissenswert herauszufinden, ob die Zugabe von eDNA zum System einen Unterschied in der Clusterbildung hervorruft. Wäre dies der Fall, ist davon auszugehen, dass es bis jetzt noch unbekannte Faktoren gibt, die eine Interaktion zwischen Eap und eDNA möglich machen würden.

Nach Zugabe von DNA zum System treten jedoch nur tendenziell etwas mehr Cluster am ULVWF-Faden beim Wildtyp-Stamm von *S. aureus* auf, es handelt sich aber nicht um einen signifikanten Unterschied (Abb. 19).

In unseren Versuchen konnte deshalb kein wesentlicher Einfluss von extrazellulärer DNA auf die Adhäsion oder die Clusterbildung von *S. aureus* festgestellt werden.

5.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen dieser Dissertation geschlossen werden, dass Eap ein nicht unerheblicher Adhäsionsfaktor an das Wirtsendothel darstellt. Die Bindung an das Endothel erfolgt vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase über den ULVWF, wobei auch die globuläre Form den vWF nicht vernachlässigt werden darf. In unseren Versuchen mit der *eap*-Mutante von *S. aureus* konnte eine deutliche Reduktion der Adhäsion an ULVWF gezeigt werden, die nach Zugabe von Eap vollständig reversibel war.

Aus den hier gewonnenen Resultaten kann geschlossen werden, dass Eap im Prozess der frühen Krankheitsentstehung wie beispielsweise bei der schweren Sepsis, der infektiösen Endokarditis und anderen Infektionskrankheiten, die durch *S. aureus* hervorgerufen werden, eine Rolle spielt.

S. aureus Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase adhären deutlich besser an ULVWF-Fäden und auch generell an andere Zielstrukturen des Endothels, was vermuten lässt, dass dieser Mechanismus in einer sehr frühen Phase der Krankheitsentstehung eine wichtigere Rolle spielt als in der stationären Phase. Es handelt sich aller Wahrscheinlichkeit nach um einen wichtigen Mechanismus, welcher es den Staphylokokken erlaubt, nach Eindringen in das Blutgefäßsystem dieses wieder zu verlassen und sich so im Wirtsorganismus auszubreiten.

Dabei gibt es viele weitere Faktoren zu beachten, die auch vom Wirtsorganismus abhängig sind. Die in unseren Versuchen verwendeten HUVEC von freiwilligen, gesunden Nabelschnurspenderinnen weisen auf einen deutlichen Unterschied zwischen der Stimulierbarkeit zur Ausschüttung von vWF auf. Sowohl die Länge als auch die Anzahl der ULVWF-Fäden unterlag auffallenden interindividuellen Schwankungen, die dann selbstverständlich auch zu einer vermehrten beziehungsweise verringerten Gesamtadhäsion führten. In einer zusammenfassenden Korrelationsanalyse aller Spender konnte in diesem Fall auch ein eindeutiger Zusammenhang zwischen ULVWF-Fadenlänge und der Anzahl der vorhandenen Fäden festgestellt werden. Dies bedeutet, dass Zellen, auf denen besonders lange ULVWF-Fäden gefunden wurden, diese auch in größerer Anzahl ausschütteten, als Zellen, die über kürzere ULVWF-Fäden verfügen.

Ein weiterer Faktor, der im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wurde, war der Einfluss von extrazellulärer DNA im Flusssystem auf die Adhäsion der einzelnen Derivate von *S.*

aureus. Die Gründe für diese Art von Untersuchung war, dass DNA unter physiologischen Bedingungen der Immunabwehr auch eine Rolle spielt. Sie stammt aus Leukozyten, welche ihre intrazelluläre DNA ausschütten, um in diesem Netz aus DNA Krankheitserreger einzufangen. So wäre es denkbar gewesen, dass sie außerdem als Verbindungsmolekül zwischen Eap auf der Bakterienoberfläche und dem ULVWF des Wirtes dient. Hier konnte kein signifikanter Einfluss von eDNA auf die Adhäsion festgestellt werden, die Adhäsion blieb bei SA113 WT und SA113 Δ eap auf demselben Niveau wie ohne die Zugabe von eDNA.

Die Clusterbildung am ULVWF ist ein zusätzlicher Faktor auf Bakterienseite, der eine Rolle bei der Adhäsion spielen könnte, und auch hier sollte die Rolle von Eap genauer beleuchtet werden. Zwischen dem Wildtyp, welcher physiologische Mengen an Eap auf seiner Oberfläche besitzt, und der *eap*-Mutante von *S. aureus* konnte jedoch kein Unterschied der Clusterbildung am ULVWF beobachtet werden. Wurden die Mengen an Eap jedoch künstlich durch die Zugabe einer größeren Menge Eap über das normale Niveau hinaus gesteigert, kam es zu einer signifikant erhöhten Anzahl an Clustern am ULVWF im Vergleich zum WT und zur *eap*-Mutante. Interessanterweise konnte dieser Effekt nur bei *S. aureus* in der exponentiellen Wachstumsphase gesehen werden, in der stationären Wachstumsphase war dieser Effekt nicht mehr zu sehen. Ein Einfluss von eDNA auf die Clusterbildung konnte auch nicht beobachtet werden. Da aber aus einer Studie zur Interaktion von ULVWF und eDNA bekannt ist, dass eDNA die ULVWF-Fäden stabilisieren kann (Grässle et al. 2014), wurde die Länge der ULVWF-Fäden in Versuchen mit und ohne Zugabe von eDNA gemessen. Ein fadenstabilisierender Effekt wäre in unserem Fall auch eine Erklärung für eine vermehrte Bindung von *S. aureus* an ULVWF, da mehr potentielle Adhäsionsorte vorhanden wären. In unseren Versuchen konnten wir aber keinen Effekt der eDNA auf die Fadenlänge feststellen (Abb. 17).

Abschließend wurde noch die Gesamtadhäsion an die verschiedenen Ziele untersucht. An diesem Punkt wurden alle Derivate von *S. aureus* zu den beiden verschiedenen Zeitpunkten untersucht, um einen Überblick über die Adhäsionsorte zu bekommen. In der exponentiellen Wachstumsphase zeigt sich ein „buntes Bild“ an Adhäsionsorten, wobei lediglich am Endothel tendenziell weniger *S. aureus* gebunden waren. Nach 24h Wachstumszeit, also in der stationären Wachstumsphase, zeigt sich ein etwas einheitlicheres Bild. Hier sind die meisten *S. aureus*, unabhängig von ihrer *eap*-Expression an die globuläre Form des vWF

gebunden, wobei sich die relative Adhäsion am ULVWF und am Endothel kaum noch unterscheiden.

Werden die Adhäsionsereignisse am ULVWF und am gvWF zusammengefasst (vWF-abhängig) zeigt sich in beiden Wachstumsphasen der wichtige Einfluss des vWF bezüglich der Adhäsion von *S. aureus* am Wirtsendothel. Direkt an das Endothel gebunden ist dann nur noch ein kleiner Anteil aller Bakterien.

Ergänzend dazu wird in der letzten Abbildung noch die Gesamtadhäsion aller *S. aureus*-Derivate an alle Adhäsionsorte veranschaulicht. Hier zeigten sich schon Unterschiede in der Gesamtadhäsion, wobei die Adhäsion von SA113 WT in der exponentiellen Wachstumsphase als 100% angenommen wurde. Deutlich wird hier wiederum die wesentlich geringere Adhäsionskapazität aller *S. aureus* in der stationären Wachstumsphase.

5.8 Ausblick

Die Untersuchung des höchst interessanten Proteins Eap ist noch lange nicht abgeschlossen, und wird vermutlich noch einige Jahre dauern. Sein Einsatz als Therapeutikum bei verschiedenen Erkrankungen scheint aber auch heute schon denkbar. Aufgrund der gegenwärtig bekannten Eigenschaften von Eap, wie beispielsweise seine Fähigkeit, eine Immunreaktion zu unterdrücken, könnte es in der Zukunft ein vielversprechendes Medikament zur Behandlung diverser Autoimmunerkrankungen beim Menschen sein. Es wäre für die Forschung und für die Entwicklung spezifischer Medikamente für die Therapie von Autoimmunerkrankungen, Infektionskrankheiten oder zur Tumorthherapie unbedingt erforderlich, mehr über die einzelnen Untereinheiten zu erfahren beziehungsweise herauszuarbeiten, welche Untereinheit von Eap für welchen spezifischen Effekt verantwortlich ist. Somit könnten sicherere und spezifischere Medikamente für Patienten hergestellt werden, die nur einen der vielseitigen Effekte von Eap aufweisen, und nicht das komplette Spektrum von Eap abbilden.

Vorstellbar ist hier insbesondere die Therapie von Autoimmunerkrankungen, denn durch die spezifische Blockade von Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise ICAM-1, wie sie von Leukozyten benutzt werden, könnte verhindert werden, dass Immunzellen in großer Anzahl das Gefäß verlassen, um körpereigene Organe und Gewebe zu schädigen. Wie in vorherigen Abschnitten dieser Dissertation schon genannt, konnte dies für die EAE, ein Mausmodell der

Multiplen Sklerose, schon eindrücklich gezeigt werden. Hier wäre es dringend nötig und sehr spannend, weitere Modelle, die Autoimmunerkrankungen bei Menschen darstellen, zu testen, um die Effektivität von Eap in diesen Szenarien genauer zu beleuchten.

Auch die Tumorthherapie könnte von der weiteren Erforschung der vielfältigen Funktionen von Eap profitieren. Besonders die Metastasierung von vorbestehenden Tumorerkrankungen scheint ein Target für die spezifische Tumorthherapie zu sein. Für das Mammakarzinom konnte dies bereits 2007 in einer Arbeit von Schneider et al. gezeigt werden. Dort konnte durch die Gabe von rekombinantem Eap die Metastasierung von Brustkrebszellen in die Knochen deutlich reduziert werden.

Eine weitere spannende Option zur Nutzung dieser Befunde in der Tumorthherapie beruht darauf, dass im Tumorgewebe deutlich mehr vWF am Endothel vorhanden ist. Hier könnten entweder apathogene Staphylokokken, die mit Chemotherapeutika beladen sind, oder mit Eap-beschichtete und mit Chemotherapeutika beladene Nanopartikel, diese Wirkstoffe effektiver und nebenwirkungsärmer an den Ort der Tumorausdehnung bringen und so zur erfolgreichen Krebstherapie entscheidend beitragen.

Auch die weitere Erforschung der Adhäsionseigenschaften von Eap sind im Zusammenhang mit Therapie und Prävention von Krankheiten besonders wichtig. Hier könnte gerade in der Prävention viel getan werden, denn wenn es uns gelingt noch genauer die ganz frühen Phasen der Infektionsentstehung versteht, können schwerwiegende Infektionen eventuell ganz verhindert werden. Dies wäre vielversprechend für Patienten, die aufgrund von schweren Vorerkrankungen oder im Rahmen einer immunsuppressiven Therapie über ein nicht ausreichend funktionierendes Immunsystem verfügen und deshalb für Infektionskrankheiten besonders anfällig sind. Ein spezifischer Antikörper, der gegen Eap gerichtet ist, könnte die Entstehung einer Infektion durch *S. aureus* verhindern und somit folgenschwere Infektionen für gesundheitlich angegriffene Patienten beispielsweise auf Intensivstationen vorbeugen.

Da im Erwachsenenalter in der Regel im Serum anti-Eap-Antikörper vorhanden sind wäre dies beispielsweise eine Option für Frühgeborene, die in den ersten Lebenswochen auf Intensivstationen einem hohen Risiko von Infektionskrankheiten ausgesetzt sind, und von einer präventiven Therapie besonders profitieren könnten.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Eap eine wichtige Rolle spielt, wenn es um die Adhäsion an das Gefäßendothel geht und damit in der initialen Phase der Krankheitsentstehung, wenn beim Patienten noch keinerlei Symptome vorhanden sind. Demzufolge wäre eine präventive Therapie mit rekombinanten anti-Eap-Antikörpern von infektionsgefährdenden Patienten, besonders von Frühgeborenen, im Bereich des Möglichen.

Aus den vorhergehenden Abschnitten wird ersichtlich, in wie vielen verschiedenen Erkrankungen, die pathophysiologisch sehr unterschiedlich sind, Eap als Teil einer wirksamen Therapie zum Einsatz kommen könnte. Sei es durch die Gabe von rekombinantem Eap, wie es für die Therapie von Autoimmunerkrankungen oder Tumorerkrankungen vorstellbar wäre, oder als Zielmolekül, welches es mittels Antikörper zu blockieren gilt, wie es für die Therapie von schweren Infektionskrankheiten denkbar wäre.

Auch weitere, bis jetzt noch nicht entdeckte Funktionen von Eap sind denkbar, deshalb sind dringend noch weitere Forschungsarbeiten notwendig, um Eap besser kennenzulernen und um es vielleicht in Zukunft gewinnbringend als Medikament für Patienten einsetzen zu können.

6. Anhang

Vergleich SA113 Wildtyp und Δeap Mutante (Invertierte Bilder)

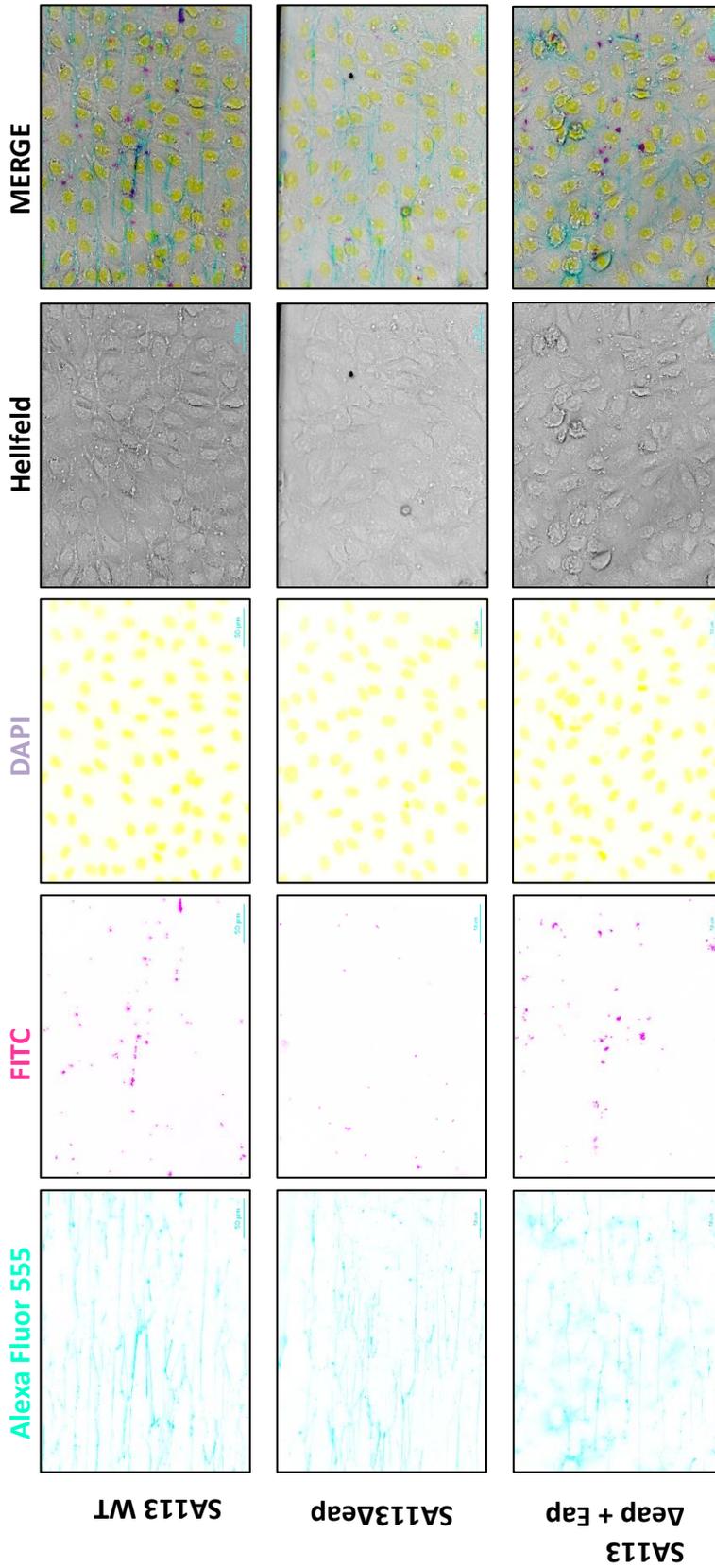


Abb. 22: Repräsentatives Bildbeispiel zum Vergleich der ULVWF Bindungsfähigkeit von SA113, SA113 Δeap und SA113 Δeap +Eap. Die hier getesteten Bakterien wurden für 4 Stunden in Kulturmedium angezogen und befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm . Es handelt sich um dieselben Bilder wie in Abb. 13 zu besseren Darstellung wurden hier jedoch alle Farben invertiert.

7. Literaturverzeichnis

1. Agnoletti F, Mazzolini E, Bacchin C, Bano L, Berto G, Rigoli R, Muffato G, Coato P, Tonon E, Drigo I (2014) First reporting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in an industrial rabbit-holding and in farm-related people. *Vet. Microbiol.* 170 (1-2): 172-7
2. Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, Sobke A, Schneider D, Weber H, Augustin HG, Eming SA, Schubert U, Linn T, Nawroth PP, Hussain M, Hammes HP, Herrmann M, Preissner KT, Chavakis T (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
3. Archer GL (1998) *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis.* 26(5):1179-81
4. Bæk KT, Frees D, Renzoni A, Barras C, Rodriguez N, Manzano C, Kelley WL (2013) Genetic variation in the *Staphylococcus aureus* 8325 strain lineage revealed by whole-genome sequencing. *PLoS One* 8(9):e77122
5. Barrett L, Atkins B (2014) The clinical presentation of prosthetic joint infection. *J Antimicrob Chemother* 69 Suppl 1:i25-7. doi: 10.1093/jac/dku250
6. Berliner S, Niiya K, Roberts JR, Houghten RA, Ruggeri ZM (1988) Generation and characterization of peptide-specific antibodies that inhibit von Willebrand factor binding to glycoprotein IIb/IIIa without interacting with other adhesive molecules. *J Biol Chem* 263(16):7500-5
7. Bjerketorp J, Nilsson M, Ljungh A, Flock JI, Jacobsson K, Frykberg L (2002) A novel von Willebrand factor binding protein expressed by *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 148(7):2037-44
8. Bjerketorp J, Jacobsson K, Frykberg L (2004) The von Willebrand factor-binding protein (vWbp) of *Staphylococcus aureus* is a coagulase. *FEMS Microbiol Lett* 234(2):309-14
9. Bokarewa MI, Jin T, Tarkowski A (2006) *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *Int J Biochem Cell Biol* 38(4):504-9
10. Boyce JM (2007) Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J Hosp. Infect.* 65 Suppl 2:50-54
11. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-35
12. Bur S, Preissner KT, Herrmann M, Bischoff M (2013) The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. *J Invest Dermatol.* 133(8):2004-12

13. Cabañas C, Hogg N (1993) *Ligand intercellular adhesion molecule 1 has a necessary role in activation of integrin lymphocyte function-associated molecule 1*. Proc Natl Acad Sci U S A 90:5838-42.
14. Casman EP, McCoy DW, Brandly PJ (1963) Staphylococcal growth and Enterotoxin production in Meat. Appl Microbiol. 11(6):498-500
15. Cawdery M, Foster WD, Hawgood BC, Taylor C (1969) The role of coagulase in the defence of Staphylococcus aureus against phagocytosis. Br J Exp Pathol 50(4):408-12
16. Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI, Herrmann M, Preissner KT (2002) *Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes*. Nat Med 8:687-93
17. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: The role of bacterial "Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. Thromb Haemost. 94:278-85
18. Chavatis T, Preissner KT and Herrmann M (2007) The anti-inflammatory activities of Staphylococcus aureus. Trends Immunol. 28:408-18
19. Chen, XX, Lo YC, Su LH, Chang CL (2014) Investigation of the case numbers of catheter-related bloodstream infection overestimated by the central line-associated bloodstream infection surveillance definition. J Microbiol Immunol Infect 48(6):625-631
20. Cheung AL, Eberhardt K, Heinrichs HJ (1997) Regulation of Protein A synthesis by the sar and agr loci of Staphylococcus aureus. Infect Immun. 65(6):2243-9
21. Choi S-W, Bun BJ, Kim D-H, Song J-M, Kang D-H, Song J-K (2011) Abstract 14612: Infective endocarditis in patients without previous history of cardiac diseases: clinical features and treatment outcome. Circulation 124:A14612
22. Claes J, Vanassche T, Peetermans M, Liesenborghs L, Vandenbriele C, Vanhoorelbeke K, Missiakas D, Schneewind O, Hoylaerts MF, Heying R, Verhamme P (2014) Adhesion of Staphylococcus aureus to the vessel wall under flow is mediated by von Willebrand factor-binding protein. Blood 124(10):1669-76. doi: 10.1182/blood-2014-02-558890
23. Cohn Z (1962) Determinants of infection in the peritoneal cavity. I. Response to the fate of Staphylococcus aureus and Staphylococcus albus in the mouse. Yale J Biol Med. 35:12-28
24. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 21;284:(5418)1318-22

25. De Kraker ME, Davey PG, Grundmann H; BURDEN study group (2011) Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PLoS Med.* 8(10):e1001104
26. Delumeau O, Dutta S, Briqulla M, Kuhnke G, Hardwick SW, Völker U, Yudkin MD, Lewis RJ (2004) Functional and structural characterization of RsbU, a stress signaling protein phosphatase 2C. *J Biol Chem.* 279(39):40927-37
27. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert P (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13:16-34
28. Dmitrieva NI, Burg MB (2014) Secretion of von Willebrand factor by endothelial cells links sodium to hypercoagulability and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:6485-90
29. Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K, López JA (2002) ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 100(12):4033-9
30. Dossett JH, Kronvall G, Williams RC, Quie PG (1969) Antiphagocytic effects of staphylococcal protein A. *J Immunol.* 103:1405-1410
31. Drougka E, Foka A, Koutinas CK, Jelastopulu E, Giormezis N, Farmaki O, Sarrou S, Anastassiou ED, Petinaki E, Spiliopoulou I (2016) Interspecies spread of *Staphylococcus aureus* clones among companion animals and human close contacts in a veterinary teaching hospital. A cross-sectional study in Greece. *Prev Vet Med* 1;126:190-8
32. Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA (1999) Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun* 67:4673-8
33. Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Laabei M, Massey RC (2012) *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein triggers TNF- α release, promoting attachment to endothelial cells via protein A. *PLoS One* 7(8):e43046
34. El-Bouri K, Johnston S, Rees E, Thomas I, Bome-Mannathoko N, Jones C, Reid M, Ben-Ismaeli E, Davies AR, Harris LG, Mack D (2012) Comparison of bacterial identification by MALDI-TOF mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods: agreement, speed and cost implications. *Br J Biomed Sci* 69(2):47-55
35. Flock M, Flock JI (2001) Rebinding of extracellular adherence protein Eap to *Staphylococcus aureus* can occur through a surface-bound neutral phosphatase. *J Bacteriol* 183(13):3999-4003.
36. Foster TJ, Höök M (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 6(12):484-8

37. Furlan M, Lämmle B (2001) Aetiology and pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome: the role of von Willebrand factor-cleaving protease. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2):437-54
38. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodly P (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 13(1):34-40
39. Gao J, Stewart GC (2004) Regulatory elements of the *Staphylococcus aureus* protein A (Spa) promoter. *J Bacteriol.* 186(12):3738-48
40. Geisbrecht BV, Hamaoka BY, Perman B, Zemla A, Leahy DJ (2005) The crystal structures of Eap domains from *Staphylococcus aureus* reveal an unexpected homology to bacterial superantigens. *J Biol Chem* 280(17):17243-50
41. George NP, Konstantopoulos K, Ross JM (2007) Differential kinetics and molecular recognition mechanisms involved in early versus late growth phase *Staphylococcus aureus* cell binding to platelet layers under physiological shear conditions. *J Infect Dis.* 196(4):639-46
42. Giachino P, Engelmann S, Bischoff M (2001) Sigma(B) activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 183(6):1842-52
43. Gilbert I (1931) Dissociation is an encapsulated staphylococcus. *J Bacteriol.* 21:157-60
44. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. (2002) Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359:753-9
45. Goerge T, Niemeyer A, Rogge P, Ossig P, Oberleithner H, Schneider SW (2002) Secretion pores in human endothelial cells during acute hypoxia. *J Membr Biol* 187(3):203-11
46. Goodyear CS, Silverman GJ (2003) Death by a B cell superantigen: In vivo VH-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by Staphylococcal toxin. *J Exp Med.* 197(9):1125-39
47. Grässle S, Huck V, Pappelbaum KI, Gorzelanny C, Aponte-Santamaria C, Baldauf C, Gräter F, Schneppenheim R, Obser T, Schneider SW (2014) von Willebrand factor directly interacts with DNA from neutrophil extracellular traps. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:1382-9
48. Grundmeier M, Hussain M, Becker P, Heilmann C, Peters G, Sinha B (2004) Truncation of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* strain Newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function. *Infect Immun* 72(12):7155-63
49. Hagggar A, Hussain M, Lönnes H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock JI (2003) Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun* 71:2310-7

50. Hagggar A, Ehrnfelt C, Holgersson J, Flock JI (2004) The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits neutrophil binding to endothelial cells. *Infect Immun* 72(10):6164-7
51. Hagggar A, Shannon O, Norrby-Teglund A, Flock JI (2005) Dual effects of extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* on peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 192(2):210-7
52. Hague RU (1967) Identification of staphylococcal hemolysins by an electrophoretic localization technique. *J Bacteriol* 93(2):525-30
53. Harraghy N, Hussain M, Hagggar A, Chavakis T, Sinha B, Herrmann M, Flock JI (2003) The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology* 149(10):2701-7
54. Harraghy N, Seiler S, Jacobs K, Hanning M, Menger MD, Herrmann M (2006) Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. *Int J Artif Organs* 29:368-78
55. Harraghy N, Homerova D, Herrmann M, Kormanec J (2008) Mapping the transcription start points of the *Staphylococcus aureus* eap, emp and vmb promoters reveals a conserved octanucleotide sequence that is essential for expression of these genes. *J Bacteriol* 190(1):447-51
56. Hart ME, Hart MJ, Roop AJ (2009) Genotypic and Phenotypic Assessment of Hyaluronidase among Type Strains of a Select Group of Staphylococcal Species. *Int J Microbiol.* 2009:614371
57. Hartleib J, Köhler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM, Foster TJ, Peters G, Kehrel BE, Herrmann M (2000) Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 96(6):2149-56
58. Heins JN, Suriano JR, Taniuchi H, Anfinsen CB (1967) Characterization of a nuclease produced by *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 242(5):1016-20
59. Héraïef E, Glauser MP, Freedman LR (1982) Natural history of aortic valve endocarditis in rats. *Infect Immun.* 37:127-31
60. Herbert S, Ziebandt AK, Ohlsen K, Schäfer T, Hecker M, Albrecht D, Novick R, Götz F (2010) Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect Immun.* 78(6):2877-89
61. Hu C, Xiong N, Zhang Y, Rayner S, Chens S (2012) Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 419(4):617-20

62. Hussain M, Hagggar A, Heilmann C, Peters G, Flock JI and Herrmann M (2002) *Insertional inactivation of Eap in Staphylococcus aureus strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts*. Infect Immun 70:2933-40
63. Hussain M, von Eiff C, Sinha B, Joost I, Herrmann M, Peters G, Becker K (2008) *eap* Gene as a novel target for specific identification of Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol. 46:470-6
64. Hynes WL, Walton SL (2000) Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Lett 183(2):201-7
65. Ibberson CB, Jones CL, Singh S, Wise MC, Hart ME, Zuravski DV, Horsvill AR (2014) Staphylococcus aureus hyaluronidase is a CodY-regulated virulence factor. Infect Immun. 82(10):4253-64
66. Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, Anbo H, Kawai Y, Watanabe K, Itagaki I et al. (1991) The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. J Clin Invest 87(4):1234-40
67. Jahreis A, Yousif Y, Rump JA, Dräger R, Vogt A, Peter HH, Schlesier M (1995) Two novel cationic staphylococcal proteins induce IL-2 secretion, proliferation and immunoglobulin synthesis in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of both healthy controls and patients with common variable immunodeficiency (CVID). Clin Exp. Immunol 100(3):406-11
68. Joubert O, Voegelin J, Guillet V, Tranier S, Werner S, Colin DA, et al. (2007) Distinction between pore assembly by staphylococcal alpha-toxin versus leukotoxins. J Biomed Biotechnol. 2007(1):25935.
69. Karlsson A, Saravia-Otten P, Tegmark K, Morfeldt E, Arvidson S (2001) Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus sarA* mutants due to up-regulation of extracellular proteases. Infect. Immun. 69:4742-8
70. Kerdudou S, Laschke MW, Sinha B, Preissner KT, Menger MD, Herrmann M (2006) Fibronectin binding proteins contribute to the adherence of Staphylococcus aureus to intact endothelium in vivo. Thromb Haemost. 96:183-9
71. Kobayashi SD, DeLeo FR (2013) *Staphylococcus aureus* protein A promotes immune suppression. mBio 4(5):e00764-13. doi: 10.1128/mBio.00764-13
72. Kolar SL, Ibarra A, Rivera FE, Mootz JM, Davenport JE, Stevens SM, Horsvill AR, Shaw LN (2013) Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the goal modulation of virulence-determinant stability. Microbiologyopen 2(1):18-34

73. Kolmos HJ (2007) Hospital infections: sources and routes of infection. *Ugeskr. Laeger* 169:4138-42
74. Krakauer T, Stiles BG (2013) The staphylococcal enterotoxin (SE) family: SEB and siblings. *Virulence* 4(8): 759-73
75. Kraus E, Kraus K, Obser T, Oyen F, Klemm U, Schneppenheim R, Brehm MA (2014) Platelet-free shear flow assay facilitates analysis of shear-dependent functions of VWF and ADAMTS13. *Thromb Res.* 134:1285-91
76. Kreikemeyer B, McDevitt D, Podbielski A (2002) *The role of the map protein in Staphylococcus aureus matrix protein and eukaryotic cell adherence.* *Int J Med Microbiol* 292:283-95
77. Kumar P, Kretzschmar B, Herold S, Nau R, Kreutzfeld M, Schütze S, Bähr M, Hein K (2015) Beneficial effect of chronic *Staphylococcus aureus* infection in a model of multiple sclerosis is mediated through the secretion of extracellular adherence protein. *J Neuroinflammation* 2015 12:22. doi: 10.1186/s12974-015-0241-8
78. Laschke MW, Kerdoudou S, Herrmann M, Menger MD (2005) Intravital fluorescence microscopy: a novel tool for the study of the interaction of *Staphylococcus aureus* with the microvascular endothelium in vivo. *J Infect Dis.* 1;191(3)435-43
79. Lee JC, Xu S, Albus A, Livolski PJ (1994) Genetic analysis of type 5 capsular polysaccharide expression by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 176:4883-9
80. Lee LY, Miyamoto YJ, McIntyre BW, Hook M, McCrea KW, McDevitt D, Brown EL (2002) The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest* 110:1461-71
81. Lee JH (2003) Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol* 69(11):6489-94
82. Lee S, Park YJ, Oh EJ, Khang J, Yoo JH, Jeong IH, Kwon YM, Han K (2007) Comparison of protocols for surveillance of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): medical staff vs ICU patients. *Ann Clin Lab Sci.* 37:248-50
83. Le Moing V, Alla F, Doco-Lecompte T, Delahaye F, Piroth L, Chirouze C, Tattevin P, Lavigne JP, Erpelding ML, Hoen B, Vandenesch F, Duval X, VIRSTA study group (2015) *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection and Endocarditis – A Prospective Cohort Study. *PLoS One* 10(5):e0127385
84. LeRiche T, Black AY, Fleming NA (2012) Toxic shock syndrome of a probable gynecologic source in an adolescent: a case report and review of the literature. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 25(6):e133-7
85. Lillibridge CB, Melish ME, Glasgow LA (1972) Site of action of exfoliative toxin in the staphylococcal scaled-skin syndrome. *Pediatrics* 50(5):728-38

86. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M et al. (2010) Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. PLoS Pathog 6:e1000715
87. Lollar P (1991) The association of factor VIII with von Willebrand factor. Mayo Clin Proc 66(5):524-34
88. Lowy FD (1998) Staphylococcus aureus infections. N. Engl. J. Med. 339:520-32
89. Lowy FD (2003) Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. J Clin Invest. 111(9):1265-73
90. Mainiero M, Goerke C, Geiger T, Gonser C, Herbert S, Wolz C (2010) Differential target gene activation by the Staphylococcus aureus two-component system saeRS. J Bacteriol. 192(3):613-23
91. Malachowa N, Kobayashi SD, Porter AR, Braughton AR, Scott DP, Gardner DJ, Missiakas DM, Schneewind O, DeLeo FR (2016) Contribution of Staphylococcus aureus Coagulases and Clumping Factor A to Abscess Formation in a Rabbit Model of Skin and Soft Tissue Infection. PLoS ONE 11(6):e0158293
92. Mandell BF (2008) A report from the department of staph affairs. Cleve Clin J Med 75(3):166
93. McGavin MH, Krajewska-Pietrasik D, Rydén C, Höök M (1993) Identification of a Staphylococcus aureus extracellular matrix-binding protein with broad specificity. Infect Immun 61(6):2479-85
94. Menger MD, Laschke MW, Vollmar B (2002) Viewing the microcirculation through the window: Some twenty years Experience with the Hamster Dorsal Skinfold Chamber. Eur Surg Res. 34(1-2):83-91
95. Metcalf DJ, Nightingale TD, Zenner HL, Lui-Roberts WW, Cutler DF (2008) Formation and function of Weibel-Palade bodies. J Cell Sci. 1;121(1):19-27
96. Moreillon P, Que YA, Bayer AS (2002) Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis. Infect Dis Clin North Am. 16:297-318
97. Moreillon P, Que JA. (2004) Infective endocarditis. Lancet 363:139-49
98. Mrak LN, Zielinska AK, Beenken KE, Mrak IN, Atwood DN, Griffin LM, Lee CY, Smeltzer MS (2012) saeRS and sarA act synergistically to repress protease production and promote biofilm formation in Staphylococcus aureus. PLoS One 7(6)e:38453
99. Nadar SK, Al Yemeni E, Blann AD, Lip GY (2004) Thrombomodulin, von Willebrand factor and E-selectin as plasma markers of endothelial damage/dysfunction and activation in pregnancy induced hypertension. Thromb Res. 113(2):123-8

100. Nanra JS, Buitrago SM, Crawford S, Ng J, Fink PS, Hawkins J, Scully IL, McNeil LK, Aste-Amézaga JM, Cooper D, Jansen KU, Anderson AS (2013) Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Hum Vaccin Immunother.* (9)3: 480-7
101. Narita K, Hu DL, Asano K, Nakane A (2015) Vaccination with non-toxic mutant toxic shock syndrome toxin-1 induces IL-17 dependent protection against *Staphylococcus aureus* infection. *Pathog Dis.* 73(4):ftv023. doi: 10.1093/femspd/ftv023
102. Niemann S, Spehr N, Van Aken H, Morgenstern E, Peters G, Herrmann M, Kehrel BE (2004) Soluble fibrin is the main mediator of *Staphylococcus aureus* adhesion to platelets. *Circulation* 110:193-200
103. Nightingale T, Cutler D (2013) The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story. *J Thromb Haemost.* 11(suppl 1):192–201
104. Ogston A (1882) *Micrococcus poisoning*, *J. Anat* 17:24-58
105. O'Halloran DP, Wynne K, Geoghegan JA (2015) Protein A is released into the *Staphylococcus aureus* culture supernatant with an unprocessed sorting signal. *Infect Immun.* 83(4):1598-609
106. Okada K, Ueshima S, Tanaka M, Fukao H, Matsuo O (2000) Analysis of plasminogen activation by the plasmin-staphylokinase complex in plasma of alpha2-antiplasmin-deficient mice. *Blood Coagul Fibrinolysis* 11(7):645-55
107. O'Seaghda M, van Schooten CJ, Kerrigan SW, Emsley J, Silverman GJ, Cox D, Lenting PJ, Foster TJ (2006) *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *FEBS J.* 273(21):4831-41
108. Paharik AE and Horswill AR (2016) The *Staphylococcal* Biofilm: Adhesins, regulation and host response. *Microbiol. Spectr.* 4(2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015.
109. Palma M, Haggar A, Flock JI (1999) Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* 181(9):2840-5
110. Pappelbaum KI, Gorzelanny C, Grässle S, Suckau J, Laschke MW, Bischoff M, Bauer C, Schorpp-Kirstner M, Weidenmeier C, Schneppenheim R, Obser T, Sinha B, Schneider SW (2013) Ultra-Large von Willebrand Factor fibers mediate luminal *Staphylococcus aureus* adhesion to an intact endothelial cell layer under shear stress. *Circulation* 128(1):50-9
111. Peacock SJ, Foster TJ, Cameron BJ, Berendt AR (1999) Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology* 145:3477-86

112. Peisker, H et al. (2016) Biospektrum VAAM 2016, Tagungsband S91, D13808F, ISSN 0947-0867
113. Petri B, Broermann A, Li A, Khandoga AG, Zarbock A, Krombach F, Goerge T, Schneider SW, Jones C, Nieswandt B, Wild MK, Vestweber D (2010) Von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. *Blood* 116(22):4712-9. doi: 10.1182/blood-2010-03-276311
114. Que YA, Haefliger JA, Piroth L, Francois P, Widmer E, Enternza JM, Sinha B, Herrmann M, Francioli P, Vaudaux P, Moreillon P (2005) Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J Exp Med.* 201:1627-35
115. Reiter RA, Varadi K, Turecek PL, Jilma B, Knöbl P (2005) Changes in ADAMTS13 (von-Willebrand-factor-cleaving protease) activity after induced release of von Willebrand factor during acute systemic inflammation. *Thromb Haemost* 93(3):554-8
116. Reyer KK, Dohoo IR, Scholl DT, Keefe GP (2012) Evaluation of minor pathogen intramammary infection, susceptibility parameters, and somatic cell count on the development of new intramammary infections with major mastitis pathogens. *J Dairy Sci.* 95(7):3766-80
117. Rodriguez-Fernandez JL, Gomez M, Luque A, Hogg N, Sanchez-Madrid F and Cabansa C (1999) The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. *Mol Biol Cell* 10:1891-1907
118. Roughmann M, Taylor KL, Gupte A, Zhan M, Johnson JA, Cross A, Edelman R, Fattom AI (2005) Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia. *J Hosp Infec* 59:27-32
119. Ruggeri ZM, De Marco L, Gatti L, Bader R, Montgomery RR (1983) Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. *J Clin Invest* 72(1):1-12
120. Ruggeri ZM, Ware J (1993) Von Willebrand factor. *FASEB J* 7(2):308-16
121. Sabirova JS, Xavier BB, Ieven M, Goossens H, Malhotra-Kumar S (2014) Whole genome mapping as a fast-track tool to assess genomic stability of sequenced *Staphylococcus aureus* strains. *BMC Res Notes* 2014 7:740. doi: 10.1186/1756-0500-7-704
122. Sadler JE (1991) Von Willebrand factor. *J Biol Chem* 266(34):22777-80
123. Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ (1979) Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII–von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature* 279:636–8

124. Schäfer D, Lãm TT, Geiger T, Mainiero M, Engelmann S, Hussain M, Bosserhoff A, Frosch M, Bischoff M, Wolz C, Reidl J, Sinha B (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
125. Schmithausen RM, Schulze-Geisthoevel SV, Stemmer F, El-Jade M, Reif M, Hack S, Meilaender A, Montabauer G, Fimmers R, Parcina M, Hoerauf A, Exner M, Petersen G, Bierbaum G, Bekeredjian-Ding I (2015) Analysis of Transmission of MRSA and ESBL-E among pigs and farm personnel. *PLoS One* 10(9):e0138173. doi: 10.1371/journal.pone.0138173
126. Schneider D, Liaw L, Daniel C, Athanasopoulos AN, Herrmann M, Preissner KT, Chavakis T (2007) Inhibition of breast cancer cell adhesion and bone metastasis by the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 357(1):282-8
127. Schröder E, Kunstmann G, Hasbach H, Pulverer G (1988) Prevalence of serum antibodies to toxic-shock-syndrome-toxin-1 and to staphylococcal enterotoxins A, B and C in West-Germany. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg A.* 270(1-2):110-4
128. Seifert H, Jansen B, Farr BM (2004) Catheter-related infections, secondary edition, revised and expanded, Part II, Chapter 6, 141-164
129. Sethi S, Herrmann M, Roller J, von Müller L, Peerschke EI, Ghebrehiwet B, Bajric I, Menger MD, Iaschke MW (2011) Blockade of the gC1qR/p33, a receptor for C1q, inhibits adherence of *Staphylococcus aureus* to the microvascular endothelium. *Microvasc Res.* 82:(1):66-72
130. Shenkman B, Rubinstein E, Tamarin I, Dardik R, Savion N, Varon D (2000) *Staphylococcus aureus* adherence to thrombin-treated endothelial cells is mediated by fibronectin but not by platelets. *J Lab Clin Med.* 135:43-51
131. Shenkman B, Rubinstein E, Cheung AL, Brill GE, Dardik R, Tamarin I, Savion N, Varon D (2001) Adherence properties of *Staphylococcus aureus* under static and flow conditions: roles of agr and sar loci, platelets, and plasma ligands. *Infect Immun* 69(7):4473-8
132. Sinha B, François PP, Nuesse O et al. (1999) Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasins via fibronectin bridging to integrin $\alpha_5\beta_1$. *Cell Microbiol* 1:101-17
133. Sinha B, François PP, Que Y-A et al. (2000) Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun* 68:6871-8
134. Sixma JJ, Sakariassen KS, Beeser-Visser NH, Ottenhof-Rovers M, Bolhuis PA (1984) Adhesion of platelets to human artery subendothelium: effect of factor VIII-von Willebrand factor of various multimeric composition. *Blood* 63:128-39

135. Sixma JJ, de Groot PG (1991) Von Willebrand factor and the blood vessel wall. *Mayo Clin Proc* 66(6):628-33
136. Sixma JJ, Schiphorst ME, Verweij CL, Pannekoek H (1991) Effect of deletion of the A1 domain of von Willebrand factor on its binding to heparin, collagen and platelets in the presence of ristocetin. *Eur J Biochem* 196(2):369-75
137. Sjødahl J (1977) Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*. Arrangement of five regions within the protein, four being highly homologous and Fc-binding. *Eur J Biochem.* 73(2): 343-51
138. Stel HV, Sakariassen KS, de Groot PG, van Mourik JA, Sixma JJ (1985) Von Willebrand factor in the vessel wall mediates platelet adherence. *Blood* 65:85-90
139. Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358(9276):135-8
140. Stromnes IM, Goverman JM. (2006) Active Induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc.* 1(4):1810-9
141. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG (1994) Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 38(9):2125-33
142. Thammavongsa V, Missiakas DM, Schneewind O (2013) *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science* 342(6160):863-6
143. Thompson KM, Abraham N, Jefferson KK (2010) *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein contributes to biofilm formation in the presence of serum. *FEMS Microbiol Lett* 305(2):143-7. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01918.x
144. Tilahun AY, Chowdhary VR, David CS, Rajagopalan G (2014) Systemic inflammatory response elicited by superantigen destabilized T regulatory cells, rendering them ineffective during toxic shock syndrome. *J Immunol.* 193(6):2919-30
145. Titani K, Kumar S, Takio K, Ericsson LH, Wade RD, Ashida K, Walsh KA, Chopek MW, Sadler JE, Fujikawa K (1986) Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* 25(11):3171-84. doi: 10.1021/bi00359a015
146. Tiwari JG, Tiwari HK (2007) *Staphylococcal* zoonosis on dairy farms in Assam and Meghalaya. *Indian J. Public Health* 51:97-100
147. Tsai HM (2009) Mechanisms of microvascular thrombosis in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int Suppl* 112:S11-4. doi: 10.1038/ki.2008.610
148. Van Belkum A (2016) Hidden *Staphylococcus aureus* Carriage: Overrated or Underappreciated. *mBio* 7(1):e00079-16. doi:10.1128/mBio.00079-16

149. Viegas KD, Dol SS, Salek MM, Sherpherd RD, Martinuzzi RM, Rinker KD (2011) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* adhesion to umbilical vein endothelial cells demonstrates wall shear stress dependent behaviour. *Biomed Eng Online* 22;10:20
150. Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stanner H, Peters G (2001) Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study group. *New Engl J Med* 344:11-6
151. Wang H, von Rohrscheidt J, Roehrbein J, Peters T, Sindrilaru A, Kess D, Preissner KT, Scharfetter-Kochanek K (2010) Extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* suppresses disease by inhibiting T-cell recruitment in a mouse model of psoriasis. *J Invest Dermatol* 30(3):743-54. doi: 10.1038/jid.2009.310
152. Wang JT, Hsu LY, Lauderdale TL, Fan WC, Wang FD (2015) Comparison of outcomes among adult patients with nosocomial bacteremia caused by methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A retrospective cohort study. *PLoS One* 10(12):e0144710. doi: 10.1371/journal.pone.0144710
153. Weidenmaier C, Peschel A, Xiong YQ, Kristian SA, Dietz K, Yeaman MR, Bayer AS (2005) Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J Infect Dis.* 191:1771-7
154. Wertheim HF, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JA, van Keulen PH, Vandenbrouke-Grauls CM, Meester MH, Verbrugh HA (2004) Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers, *Lancet* 364(9435):703-5
155. Xie C, Alcaide P, Geisbrecht BV, Schneider D, Herrmann M, Preissner KT, Luscinskas FW and Chavakis T (2006) Suppression of experimental autoimmune encephalitis by extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus*. *J Exp.Med.* 203(4):985-994
156. Xu CP, Boks NP, DeVries J, Kaper HJ, Norde W, Busscher HJ, van der Mei HC (2008) *Staphylococcus aureus*-fibronectin interactions with and without fibronectin binding protein and their role in adhesion and desorption. *Appl Environ Microbiol.* 74(24):7522-8

8. Publikationen

Publikationen:

Pappelbaum KI, Gorzelanny C, Grässle S, Suckau J, Laschke MW, Bischoff M, Bauer C, Schorpp-Kirstner M, Weidenmeier C, Schneppenheim R, Obser T, Sinha B, Schneider SW (2013) Ultra-Large von Willebrand Factor fibers mediate luminal Staphylococcus aureus adhesion to an intact endothelial cell layer under shear stress. Circulation. 2013 Jul 2;128(1):50-9

Posterpräsentation:

Präsentation eines Posters beim 4. Gemeinsamen Kongress von DGHM und VAAM vom 05.-08. Oktober 2014 in Dresden

9. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Mathias Herrmann für die freundliche Überlassung dieses hochinteressanten Themas und die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien sowie die finanzielle Unterstützung für die Fahrten nach Mannheim.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Markus Bischoff für die jahrelange Unterstützung und fachkundige Hilfe bei der Dissertation. Ich danke ihm für die viele Arbeit und Zeit, die er in die Fertigstellung der Dissertation investiert hat, und dafür, dass er jederzeit ein offenes Ohr für Probleme hatte sowie für die stets motivierende Arbeitshaltung und viele anregende Diskussionen. Er wurde für mich zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter.

Ein großes Dankeschön auch an das Team des Sekretariats, die immer bemüht waren, größere und kleinere Probleme aus dem Weg zu räumen.

Herzlichen Dank auch an die gesamte Forschungsgruppe der medizinischen Mikrobiologie für die liebevolle Aufnahme in das Team und die Unterstützung während dieser anstrengenden Zeit. Insbesondere danken möchte ich Frau Karin Hilgert für die Geduld und große Hilfsbereitschaft, mit der sie mich während meiner Zeit unterstützt hat.

Bei Prof. Dr. Matthias Laschke und Christina Körbel möchte ich mich für die Unterstützung und große Hilfe bei der Durchführung der Tierexperimente und die Einführung in die Operationstechniken bedanken, sowie beim ganzen Team der experimentellen Chirurgie für die professionelle Sachkunde.

Ich möchte mich auch besonders bei Prof. Stefan Schneider, Leiter der Arbeitsgruppe Experimentelle Dermatologie am Uniklinikum Mannheim für die Möglichkeit der Versuchsdurchführung und für die konstruktive Kritik herzlich bedanken. Mein Dank gilt der kompletten Arbeitsgruppe der experimentellen Dermatologie insbesondere Christian Gorzelanny, Sandra Grässle und Alexander Bauer, die mich herzlich in das Team aufgenommen haben, mich bei der Einarbeitung in das Thema wesentlich unterstützt haben und mir immer mit Rat und Tat zu Seite standen.

Einen besonderen Dank schulde ich Karin Pappelbaum, die mich viele Wochen bei der Durchführung der Experimente unterstützt hat, und die eine wichtige Ansprechpartnerin während der kompletten Zeit war.

Für die technische Unterstützung im Labor möchte mich auch bei Natalia Halter bedanken.

Ich danke meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester für die Geduld in den letzten drei Jahren der experimentellen Doktorarbeit, mit all ihren Höhen und Tiefen. Ein besonderer Dank gilt ihnen dafür, dass sie mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben, sowie auch meinen Großeltern für die immerwährende Unterstützung während vieler Jahre. Sie alle haben in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt.

Besonders bedanken möchte ich mich auch meinem Freund für die Ausdauer, Ruhe und unendliche Geduld, womit er mir zur Seite stand und mich immer wieder aufgemuntert und in meiner Arbeit bestärkt hat.

Nicht zuletzt danke ich allen meinen Freunden danke ich für die jahrelange Unterstützung und Motivation während der gesamten Zeit des Studiums und der Dissertation und für den Beistand in anstrengenden Zeiten.

